

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



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

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

Mgr. Martina Koláčková

Školitel: Prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Doktorský studijní program Lékařská imunologie

Hradec Králové

2014

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 4.3.2014

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za neuvěřitelnou příležitost, kterou mě dovedl k vědecké činnosti, jejímž výsledkem je také zpracování této dizertační práce. Děkuji mu za podporu, motivaci, cenné rady i dostatek trpělivosti.

Za spolupráci, bez které by se tato práce neuskutečnila, děkuji jak kolegům Mgr. Manuele Kudlové-Trojáčkové, Ph.D. a doc. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D., tak týmu kardiologů a dalšímu zdravotnímu personálu – MUDr. Pavlu Kunešovi, prof. MUDr. Jiřímu Mandřákovi, Ph.D., prof. MUDr. Vladimíru Lonskému, Ph.D., Mgr. Daně Vláškové, MUDr. Vladimíru Svitkovi, Ph.D., MUDr. Zdeně Holubcové, Jaroslavu Kubíčkoví, Martinu Voltovi a dalším.

S korekturou struktury textu a jazyka anglických článků, jež jsou nezbytnou součástí dizertační práce, pomáhal Zsolt Balint, M.Sc., kterému tímto děkuji. Za věcné připomínky a korektury českých textů, včetně této práce, jsem vděčná a děkuji MUDr. Drahomíře Holmannové.

Mé poděkování patří i všem ostatním, kteří zásadně přispěli k realizaci výzkumných projektů a nejsou zde jmenovitě uvedeni.

SEZNAM ZKRATEK

$\alpha\alpha$ -DBBF Hb	α -crosslinked hemoglobin
A	adenin
ACEI	Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors
ACT	Activated Clotting Time
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADCC	protilátkami zprostředkovaná buněčná cytotoxicita
ADP	adenosindifosfát
Akt	serine/threonine-specific protein kinase, PKB
ATP	adenosintrifosfát
Bcl	B-cell CLL/lymphoma
BMI	Body Mass Index
C	cytosin
C1q	Complement Component 1q
C5a	Complement Component 5a
CD	Cluster Designation (Differentiation)
cFLIP	cellular FLICE (FADD-Like IL-1 β -Converting Enzyme)-Inhibitory Protein
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
CHR	Cytokine-binding Homology Region
CMV	cytomegalovirus
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CPB	Cardiopulmonary Bypass, kardiopulmonární bypass
CRP	C-reaktivní protein
DcR	Decoy Receptor
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DL	Death Ligand
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DR	Death Receptor
EBV	Epstein-Barr Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EKG	elektrokardiogram
ELISA	enzymem řízená imunosorbentní analýza
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
F-actin	Filamentous actin
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fc	Fragment, crystallizable
FGF	Fibroblast Growth Factor
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
G	guanin
<i>gld</i>	generalized lymphoproliferative disease (fasl mutation)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

GRE	Glucocorticoid-Responsive Element
Hb	hemoglobin
HCP-1	Heme Carrier Protein 1
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1A
HMGB-1	High-Mobility Group Box 1 Protein
HO-1	hemoxigenáza 1
Hp	haptoglobin
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-2	Intercellular Adhesion Molecule 2 (CD102)
IFN- γ	interferon γ
Ig	imunoglobulin
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IKK	I κ B Kinase
IL-	interleukin
IP-10	IFN- γ Inducible Protein-10
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs
IU	International Unit
I κ B	Inhibitor of κ B
JAK	Janus Kinase
JAM	Junctional Adhesion Molecule protein
Lck	Lymphocyte-specific <i>protein</i> tyrosine kinase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
<i>lpr</i>	lymphoproliferation (<i>fas</i> mutace)
<i>lpr^{cg}</i>	lymphoproliferation (<i>fas</i> mutation, death domain-disabled)
LPS	lipopolysacharid
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 1 (CD91)
LRR	Leucine Rich Repeats
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia protein 1
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1 (CCL2)
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MFI	Median Fluorescence Intensity
MO	mimotělní oběh
MP	metylprednisolon
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells
NK	Natural Killer
NO	oxid dusnatý
(i, e)NOS	(inducible, endothelial) Nitric Oxide Synthase
OmpA	Outer membrane protein A
ORF	Open Reading Frame
pa(CO ₂ n. O ₂)	partial pressure
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor

PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecul 1 (CD31)
PGI ₂	prostacyklin (prostaglandin I ₂)
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PTK	protein tyrozin kináza
PYK2	Proline-rich Tyrosine Kinase 2, PTK2
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (CCL5)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	Reactive Oxygen Species
RTG	Rentgenové vyšetření
SCART1	Scavenger Receptor Cysteine-rich Type 1 protein
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
SPPL2a	Signal Peptide Peptidase-Like 2A
Sp α	Secreted protein α (Apoptosis Inhibitor 6)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	thymin
TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2
TACE	TNF- α Converting Enzyme (ADAM17)
TAK1	TGF- β Activated Kinase-1
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Th	T helper
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR-Domain Containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
tPA	tkáňový aktivátor plasminogenu
TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TWEAK	TNF-Related Weak Inducer of Apoptosis
TYK	Tyrosine Kinase
U	uracil
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WC1	White Collar 1 protein

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Ateroskleróza	1
1.2	Operace s mimotělním oběhem	2
1.2.1	Historie techniky operace s mimotělním oběhem	2
1.2.2	Technika operace s mimotělním oběhem	3
1.2.3	Změny indukované operací s mimotělním oběhem	5
1.3	CD163, receptor pro hemoglobin – haptoglobin (Hp-Hb)	8
1.3.1	Charakteristika CD163	8
1.3.2	Expresce CD163	10
1.3.3	Charakteristika hemoglobinu a haptoglobinu	12
1.3.4	Funkce CD163	13
1.4	FcγRI (CD64), vysoce afinní receptor 1 pro Fc fragment IgG	15
1.4.1	Charakteristika FcγRI	15
1.4.2	Expresce FcγRI	16
1.4.3	Charakteristika ligandů	17
1.4.4	Funkce ligandů FcγRI a signalizace	18
1.5	Toll-like receptor 2 (TLR2) a Toll-like receptor 4 (TLR4)	19
1.5.1	Charakteristika TLR2 a TLR4 a signalizace	19
1.5.2	Expresce TLR2 a TLR4	23
1.5.3	Funkce TLR2 a TLR4	24
1.6	Fas (CD95)	24
1.6.1	Charakteristika Fas receptoru	24
1.6.2	Expresce Fas	25
1.6.3	Charakteristika Fas ligandu	26
1.6.4	Funkce FasL/Fas a signalizace	28
1.7	Interleukin-10 (IL-10)	30
1.7.1	Charakteristika IL-10	30
1.7.2	Expresce IL-10	32
1.7.3	Charakteristika receptoru pro IL-10 (IL-10R, CD210) a signalizace	33
1.7.4	Funkce IL-10/IL-10R	34
1.8	Interleukin-6 (IL-6)	36
1.8.1	Charakteristika IL-6	36
1.8.2	Expresce IL-6	36
1.8.3	Charakteristika receptoru pro IL-6 (IL-6R-gp130) a signalizace	37
1.8.4	Funkce IL-6/IL-6R-gp130	39
2	CÍLE	41
3	MATERIÁL A METODY	42
3.1	Soubor pacientů	42
3.2	Operace s mimotělním oběhem	42
3.3	Anestézie	43
3.4	Pooperační péče	43
3.5	Sběr vzorků	45
3.6	Stanovení počtu buněk	45
3.7	Průtoková cytometrie	45
3.7.1	Kit Leuko64	45
3.7.2	Stanovení procenta monocytů a granulocytů	47
3.7.3	Stanovení exprese TLR2, TLR4 a CD95	48
3.8	Enzymem řízená imunosorbentní analýza (ELISA)	52
3.9	Statistické hodnocení	52
4	VÝSLEDKY	54

4.1	Detekované parametry	54
4.1.1	Počet leukocytů	54
4.1.2	Procento monocytů a granulocytů.....	55
4.1.3	Povrchová exprese proteinů	57
4.1.3.1	Exprese CD163	57
4.1.3.2	Exprese FcγRI (CD64).....	58
4.1.3.3	Exprese TLR2 (CD282)	60
4.1.3.4	Exprese TLR4 (CD284)	65
4.1.3.5	Exprese Fas (CD95).....	70
4.1.4	Sérové parametry	75
4.1.4.1	Interleukin-10.....	75
4.1.4.2	Interleukin-6.....	76
4.2	Klinická data	78
4.3	Vztah parametrů k pre- a pooperačním charakteristikám	78
4.3.1	Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů se selháním orgánů	78
4.3.2	Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů s diabetes mellitus	79
5	DISKUZE	83
5.1	Počet leukocytů	83
5.2	Procento monocytů	84
5.3	Procento granulocytů	84
5.4	Povrchová exprese proteinů	85
5.4.1	Exprese CD163	85
5.4.1.1	Exprese CD163 na monocytech.....	85
5.4.2	Exprese FcγRI (CD64).....	89
5.4.2.1	Exprese FcγRI na monocytech.....	89
5.4.2.2	Exprese FcγRI na granulocytech.....	90
5.4.3	Exprese Toll-like receptoru 2 (CD282)	90
5.4.3.1	Exprese TLR2 na monocytech.....	90
5.4.3.2	Exprese TLR2 na granulocytech	92
5.4.4	Exprese Toll-like receptoru 4 (CD284)	93
5.4.4.1	Exprese TLR4 na monocytech.....	93
5.4.4.2	Exprese TLR4 na granulocytech	94
5.4.5	Exprese Fas	94
5.4.5.1	Exprese Fas na monocytech.....	94
5.4.5.2	Exprese Fas na granulocytech	96
5.5	Sérové parametry	97
5.5.1	Interleukin-10.....	97
5.5.2	Interleukin-6.....	98
6	ZÁVĚR	100
7	POUŽITÁ LITERATURA	101
8	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY	151
8.1	Původní články.....	151
8.2	Přehledové články	152
9	PŘÍLOHY	154

1 ÚVOD

1.1 Ateroskleróza

Tukové pláty se objevují v arteriích již u mladých lidí. Tyto pláty ukládající se pod endotelem mohou vymizet nebo se pomalu vyvíjejí v aterosklerotickou lézi (ateroma). I když jsou aterosklerotické pláty přítomné, některé osoby zůstávají asymptomatické po celý život. Vývoj plátu je neodmyslitelně spjatý se zánětem a prevence hypercholesterolemie a vysokého krevního tlaku jen částečně řeší mnohem komplexnější problém, než se odborníci zpočátku domnívali (1, 2).

Pláty jsou lokalizovány ve vnitřní vrstvě artérie – intimě; s vývojem ateromu dochází k jejímu ztluštění. Ztluštění intimy je dáno hlavně zmnožením buněk hladké svaloviny. Tyto léze patrné u dětí korelují s distribucí aterosklerotických plátů u dospělých (3). V centru plátu se nacházejí pěnové buňky a tukové kapénky, které jsou obklopeny buňkami hladké svaloviny a kolagenovou vrstvou. Povrch kryje fibrózní čepička. Ta může mít různou tloušťku (2).

Do plátu migrují lymfocyty, žírné buňky a makrofágy. Právě makrofágy dávají vznik pěnovým buňkám. Rozsah infiltrace buňkami se u různých plátů může lišit; na charakteru aterosklerotických plátů je pak založena jejich klasifikace (3).

Vcestovalé buňky jsou zdrojem prozáněťových cytokinů a umožňují další progresi plátu. Produkce lytických enzymů (zejména matrix metaloproteáz a cysteinových proteáz) působí ztenčování fibrózní čepičky. Přítomnost buněk imunitního systému, respektive množství těchto buněk v plátu, indikuje destabilizaci aterosklerotického plátu (4, 5).

Progredující růst plátu vede k zúžení tepny, krevní zásobování orgánu se zhoršuje a tím i jeho funkce. Zásadní událostí je ruptura plátu, zpravidla v místě ztenčení fibrózní vrstvy, a uvolnění prozáněťových faktorů a trombogenního materiálu obsaženého v plátu. Vstup trombogenního materiálu do krevního řečiště může způsobit okluzi i ve vzdálenějších tepnách, zatímco v místě porušeného aterosklerotického plátu dochází k formování trombu (6). Nejvýraznějším a nejčastějším projevem ischemie jsou infarkt myokardu a mozková mrtvice. Ztenčování fibrózní čepičky a vliv trombotických faktorů může vysvětlit, proč dochází k nepředvídatelnému infarktu myokardu nebo náhlému úmrtí z důvodu onemocnění koronárních cév u osob s neokluzivními pláty, které nepůsobí žádné klinické symptomy ani při fyzické nebo psychické zátěži (6-8). Exprese C-reaktivního proteinu (CRP) je indukována IL-6, jehož podstatným zdrojem jsou právě buňky monocyto-makrofágové linie a endoteliální buňky (9). Zvýšená hladina CRP je jedním ze základních markerů progresu aterosklerotického onemocnění a svědčí o zásadní úloze buněk imunitního systému u tohoto onemocnění (10, 11).

Výskyt aterosklerózy je nejčastěji spojen s metabolickým syndromem. Na vzniku aterosklerózy se podílí kouření a nedostatek fyzické aktivity, jak bylo prokázáno také na zvířecích modelech. Rozsáhlé klinické studie však ukázaly, že i jedinci v kontrolních skupinách až v 85 % splňovali kritéria pro vznik aterosklerotického onemocnění (jako metabolický syndrom, kouření, neaktivita), kterým však netrpěli (12). Zůstává tak nejasné, které proteiny jsou klíčové pro vznik aterosklerózy a jaké konkrétní genetické pozadí určuje negativní prognózu.

Ateroskleróza postihující koronární cévy vede k nepoměru mezi krevním zásobením a spotřebou kyslíku myokardem. Projevem aterosklerotického onemocnění věnčitých tepen je ischemická choroba srdeční, která se stále umísťuje na vedoucí příčce úmrtnosti, nejen v České republice, a je i příčinou významné invalidity populace v produktivním věku. Jednou z možností léčby ischemické choroby srdeční je revaskularizace pomocí tepenných štěpů (*arteria mammaria*, *arteria radialis*, *arteria gastroepiploica dextra*) nebo s použitím žilních štěpů (*vena saphena magna* nebo *parva*).

1.2 Operace s mimotělním oběhem

Revaskularizace věnčitých tepen (CABG, Coronary Artery Bypass Grafting) se provádí s použitím mimotělního oběhu (CPB, cardiopulmonary bypass). Další možností je i revaskularizace na bijícím srdci bez použití mimotělního oběhu rozvíjející se spíše poslední dobou. Použití mimotělního oběhu se však stále považuje za standardní metodu, která se neustále vyvíjí. První výkony s použitím CPB se datují do 50. let minulého století. Od té doby technika zaznamenala řadu vylepšení, které vedly ke snížení mortality a morbidit u pacientů. Některá pracoviště téměř nahradila konvenční CPB minimálně invazním CPB.

1.2.1 Historie techniky operace s mimotělním oběhem

1901-1910 Alexis Carrel zkoumal způsoby, jak úspěšně sešít cévy a představil Americké chirurgické společnosti plán revaskularizace koronárních tepen (13).

1934 Michael DeBakey, student medicíny, upravil Porter-Bradleyho infuzní pumpu a vytvořil tak první rotační válečkovou pumpu (14).

1937-1953 John Heysham Gibbon sestavil první přístroj umožňující kardiopulmonální bypass a díky heparinu (objeveného McLeanim už v roce 1916, nicméně v klinice poprvé použitého Craffordem v roce 1935) dosáhl výrazného zlepšení přežití pokusných zvířat (1939). Společně s inženýry byl schopen odstranit vzduchové bubliny a tak 1953 ve Philadelphii poprvé úspěšně operoval s použitím mimotělního oběhu 18letou pacientku s vrozeným defektem mezisíňového

septa (15-17). Tento úspěch pak ale nebyl schopen zopakovat. A teprve John Kirklin na Mayo Clinic s použitím modifikovaného Gibbonova přístroje operoval sérii pacientů. Pooperační úmrtnost však byla vysoká (50 %) (18).

1945, 1947 a 1951 Arthur Vineberg revaskularizoval myokard přesměrováním *arteria thoracica interna* do levé komory (19).

1952-1953 několik chirurgů včetně dr. Murray oznámilo úspěšné použití arteriálních tepen k revaskularizaci myokardu (20).

1957 Sidney Smith použil štěpu z *vena saphena magna* k revaskularizaci myokardu (21).

1962 F. Mason Sones a Shirey poprvé demonstrovali použití angiografie k vizualizaci blokády v koronární artérii (22).

1973 Benetti, Calafiore a Subramanian poprvé zpřístupnili srdce 10 cm řezem mezi žebry (23-25).

1976 počátek využívání centrifugálních pump jako součást kardiopulmonálního bypassu.

Od r. **1980** nahrazování bublinkových oxygenátorů membránovými, o deset let později se pak rozvíjejí minimálně invazivní techniky, které zahrnují:

minimálně invazivní přístup k srdci;

zmenšení mimotělního oběhu, kdy jsou využívány hemokompatibilní povrchy;

častá je operace na bijícím srdci s použitím tkáňového stabilizátoru;

využití aprotininu, inhibitorů kallikreinu, metylprednisolonu apod.

1.2.2 Technika operace s mimotělním oběhem

Principem mimotělního oběhu je nahradit funkci srdce a plic a tímto umožnit provádění chirurgických výkonů na zastaveném srdci.

K tomu, aby bylo dosaženo bezkrevného operačního pole a nehybného srdečního svalu je po spuštění mimotělního oběhu na vzestupnou část aorty umístěna svorka, tudíž krev nemůže vstupovat do věnčitých tepen a srdečních komor. K ochraně srdečního svalu a zabránění buněčné smrti se používá technika tzv. kardioplegie. Kardioplegický roztok je do krevního řečiště opakovaně aplikován antegrádně, popř. retrográdně (v případě vážné okluze artérie), každých 15-30 min. srdeční zástavy. Kontinuální aplikace kardioplegického roztoku sice přináší lepší ochranu myokardu, ale není vždy technicky možná. K navození srdeční zástavy je používáno kalium (přibližně v množství 20 mmol/l), které způsobí změnu membránového potenciálu a diastolickou zástavu. Kardioplegické roztoky se mohou lišit. Používána je studená krystaloidní kardioplegie nebo krevní kardioplegie, která je aplikována studená nebo teplá. Díky hemoglobinu přináší krevní kardioplegie některé výhody jako je rozvod kyslíku na buněčné úrovni, schopnost pufrovat

vodíkové ionty a vychytávat volné radikály. Výsledkem je redukce srdečního edému a zlepšení mikrovaskulární cirkulace (26, 27).

Nekardioplegické techniky ochrany myokardu zahrnují několik přístupů, např. hypotermii. Nejedná se pouze o vnější chlazení, ale o hypotermickou systémovou perfúzi se snahou o udržení teploty jádra 30-32°C. Nebo bývá svorka naložena v krátkých periodách (intermittent cross-clamp fibrillation) a používána je i předcházející ischemická kardioprotekce (ischemic preconditioning) (26-28).

Během operace prováděné s mimotělním oběhem je krev použitím venózní kanylace a systém hadic sváděna ze pravostranných srdečních oddílů do venózního rezervoáru. Do arteriálního systému se následně vrací okysličená z oxygenátoru za využití pumpy. Jak je patrné z názvu, oxygenátor podobně jako plíce zajišťuje výměnu plynů; jeho součástí je i tepelný výměník. Vlastní plíce jsou ze systémové cirkulace během mimotělního oběhu vyřazeny a ja v nich zachován pouze nutritivní oběh. V minulosti se používalo oxygenátorů bublinkových (kyslík volněprobublával krví) nebo diskových (docházelo k výměně plynů mezi krevním filmem a atmosférou bohatou na kyslík). Současné oxygenátory provádějí výměnu plynů pomocí různých typů membrán. Nejčastěji se jedná o dutá vlákna z mikroporézního z polypropylénu s velikosti póru od 0,05 do 0,3 μm . Dutá vlákna z polymetylpentenu umožňují použití oxygenátoru dlouhodobě po dobu i několika týdnů (26, 27).

Krevní pumpy jsou mechanická zařízení, která zajišťují konstantní tok okysličené krve, jíž jsou zásobeny tělní orgány pacienta. Tyto pumpy musí být schopné zajistit krevní zásobení i přes určitý odpor, kdy nesmí docházet k vytváření míst se stagnací krve a turbulence. Rutinně jsou používány centrifugální a válečkové pumpy, které se vyznačují nízkým indexem hemolýzy. Centrifugální pumpa je pro některé své vlastnosti vhodnější zařízení, jelikož je zcela neokluzivní a tím zabraňuje tvorbě excesivního tlaku v mimotělním oběhu a brání případným trhlinám (26).

Operace v mimotělním oběhu může být prováděna v normotermii nebo hypotermii. V současnosti se používá jen velmi mírná hypotermie (při nazofaryngeální teplotě vyšší než 32°C); při náročných zákrocích může být ale použita i hluboká hypotermie (18-22°C). Hypotermie sice snižuje spotřebu kyslíku v tělesných tkáních obecně, ale normotermie, nebo jen tzv. mírná (tepid) hypotermie, představuje fyziologičtější stav a není provázena některými škodlivými pooperačními následky jako je zvýšená krvácivost a porucha membránové funkce buněk srdečního svalu (26, 28).

Krev z operačního pole může být odsávána pomocí kardiotorického sání a vrácena do venózního rezervoáru. Rezervoár je vybaven filtry, které jsou schopné redukovat množství mikrobublin vzduchu, tukových částic, fibrinu a kontaminace pocházející z operačního pole (26).

1.2.3 Změny indukované operací s mimotělním oběhem

Během chirurgického zákroku dochází ke změnám v endokrinním, nervovém a imunitním systému. Tyto změny jsou do velké míry spojeny s narušením různých typů tkání. V případě kardiochirurgické operace prováděné s mimotělním oběhem je přístup k srdci nejčastěji zajištěn střední sternotomií. Tento postup sice zajišťuje jedinečný přístup k srdci a přehlednost operačního pole, ale v některých případech bývá spojen s komplikacemi. Kromě epiteliální tkáně, svalové tkáně a endotelu, je u takové operace poškozená i kostní tkáň. Tato poškození vedou k silné aktivaci koagulačního a fibrinolytického systému. Nejen že je operační rána náchylná k infekci, z narušených buněk jsou uvolňovány molekuly, z nichž mnohé slouží jako „damage associated molecular patterns“, ale jsou produkovány látky se systémovým dosahem – prostaglandiny, leukotrieny a histamin. Po prvotní vazokonstrikci dochází hlavně účinkem histaminu k vazodilataci a prosakování plazmy a tvoří se edém. Atrahovány jsou destičky a aktivována je i koagulační kaskáda, které mají zabránit krvácení. Jak rovnováha mezi vazokonstrikcí a vazodilatací, tak koagulační a fibrinolytický systém jsou však při operaci do různé míry narušeny (29-31).

Za normálních okolností je povrch endotelu pokryt glykosaminoglykany (dříve mukopolysacharidy), které mají vlastnosti podobné heparinu a slouží jako kofaktory antitrombinu III. Antitrombin je součástí důležitého mechanismu vedoucího k inaktivaci trombinu a faktorů VIIa, IXa, Xa, XIa. Další mechanismus zahrnuje působení trombomodulinu společně s proteinem C a proteinem S, které degradují faktory Va a VIIIa. Během fibrinolytického mechanismu se uplatňuje plasminogen vázající se dohromady s tkáňovým aktivátorem plasminogenu (tPA) na fibrin. Plasminogen je pomocí tPA proteolyticky štěpen na plasmin; účinkem plasminu pak dochází k degradaci fibrinové sítě na štěpy (30, 31).

Při narušení povrchu endotelu se endoteliální buňky rychle stávají protrombocytickými. Negativně nabitě fosfolipidy na destičkách a poškozených endoteliálních buňkách vážou koagulační faktory a přeměňují zymogeny na aktivní serinové proteázy. Endoteliální buňky rovněž uvolňují von Willebrandův faktor, který zvyšuje adhezi povrchového glykoproteinu Ib na destičkách na subendoteliální kolagen. Proti agregaci destiček působí prostacykliny (PGI₂), k jejichž rychlému vyčerpání však dochází při rozsáhlém narušení endotelu. Poškození endoteliálního povrchu a tvorba trombu navíc mění i fyzikální vlastnosti krevního průtoku. Dalším faktorem ovlivňující průtok je produkce vazoaktivních molekul jako oxid dusnatý (NO), eikosanoidy, angiotensin. Tyto látky mají vliv na tonus buněk hladké svaloviny v cévní stěně a jejich produkce určuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí. Endoteliální dysfunkce provázená nízkou dostupností NO je charakteristická pro aterosklerotické onemocnění, nicméně se objevuje rovněž v souvislosti s použitím mimotělního oběhu a je dále prohloubena ischemicko-reperfuzním poškozením. Kromě

vazodilatačního účinku zabraňuje NO agregaci destiček v endotelu a adhezi leukocytů. Při hemolýze provázející operaci ale nastává vazbou na volný hemoglobin vyčerpání přítomného NO (30-32).

Vzhledem k narušení antitrombotického prostředí udržovaného endotelem je během operačního výkonu důležitá snaha o navození rovnováhy mezi krvácením a srážením. Přestože krvácení je závažný stav, tvorba trombů je obtížně léčitelná a mnohem nebezpečnější, může vést např. mozkové mrtvici či ledvinnému infarktu. Při operacích je k navození antitrombotického stavu využíváno heparinu, jehož účinek je v závěru zákroku antagonizován podáním protamin sulfátu. Teoreticky by pak mohlo docházet k tomu, že během operace a krátce po operaci se objevuje krvácení, zatímco pooperačně se může vyskytnout tromboembolická komplikace. Nicméně vznik trombů, stejně jako krvácení v pooperačním období není vyloučený. Co se týká následků samotného poškození sterna při střední sternotomii, nejčastější komplikací bývá právě krvácení. Další komplikace zahrnují špatné hojení sterna, infekci a dehiscenci (30, 31, 33).

Neutrofilů představují první linii obrany imunitního systému, není proto překvapující, že při zánětu vyvolaném chirurgickým zákrokem jejich množství stoupá. Nejen že neutrofilů odpovídají na vnější signály migrací do místa zánětu a likvidací bakteriálních a vlastních poškozených buněk, ale samy jsou podstatným zdrojem chemokinů, prozáněťových cytokinů i aktivačních molekul na svém povrchu. Takto jsou neutrofilů schopné stimulovat ostatní buňky a přispívat k rozvoji zánětu. Aby došlo k přesunu neutrofilů z periferní krve do určité lokalizace, je potřeba, aby se klidové neutrofilů aktivovaly a následně přestoupily bariéru endoteliálních buněk a bazální membrány. Aktivačním signálem bývají jak mikrobiální struktury jako třeba LPS nebo flagelin, tak i solubilní molekuly uvolněné z vlastních buněk. Může se jednat o poškozené buňky uvolňující DAMP, kdy jako silný aktivátor neutrofilů slouží např. molekula hemu, mitochondriální DNA, HMGB-1 nebo extracelulární ATP. Aktivované buňky sekretují TNF- α , IFN- γ , IL-1 β a další cytokiny, které dále neutrofilů stimulují (34). Interakce mezi neutrofilů a endoteliálními buňkami mají za účel zpomalit, zastavit a místně navést neutrofilů. Tyto interakce probíhají přes povrchové struktury, které zahrnují různé typy selektinů, integrinů, adresinů, homingových receptorů a karbohydrátových ligandů. Bylo zjištěno, že endoteliální buňky nejen produkují adhezivní molekuly, ale také umí vychytávat a exprimovat na svém povrchu některé chemokiny jako IL-8 a RANTES udávající lokalizaci zánětu (35). Neutrofilů k přestupu do tkání využívají spojení mezi sousedícími endoteliálními buňkami (paracelulární migrace), kdy se uplatňují proteiny jako ICAM-2, PECAM-1 a JAM rodina proteinů (34). Transcelulární migrací prostupuje jen malé množství neutrofilů. Takový způsob překonání bariéry endotelu je umožněn expresí vysoké density ICAM-1 a spočívá v penetraci a průchodu póry v cytoplazmě endoteliálních buněk (34). Přejít těchto granulocytů je polarizovaný a probíhá směrem od lumenálního k ablumenálnímu kompartmentu. Bylo zjištěno, že se některé buňky vracejí

zpět reverzní transendoteliální migrací. Děje se tak při rozsáhlém zánětu nebo třeba ischemii. Takové neutrofilie diseminují zánět a produkují větší množství prozáněťových faktorů (TNF- α , IL-1 β , IL-8), a tím zánět také prohlubují; mechanismus reverzní transendoteliální migrací se patrně uplatňuje při vzniku systémového zánětu.

Po přestupu migrují neutrofilie v koncentračním gradientu chemotaktických molekul, kam patří např. IL-8, C5a, fMLP, ale také ATP unikající z poškozených buněk. V daném místě jsou likvidovány a fagocytózou odstraněny mikrobiální patogeny, stejně jako nekrotické či apoptotické buňky. Vzhledem k sekreci ROS a proteolytických enzymů narušují neutrofilie do jisté míry i okolní tkáň. Přestože jsou neutrofilie krátce žijící buňky, během zánětu se jejich životnost prodlužuje. Takové neutrofilie také produkují řadu proteinů, které aktivují další buňky jako třeba monocyt/makrofágy, jež migrují do místa zánětu vzápětí po neutrofilech. Chemotaktické molekuly jsou obsaženy přímo v granulech; zahrnují hlavně α -defensiny a „human cationic antimicrobial protein 18“ (proforma LL-37) a přítomnost funkčních granulocytů je klíčová pro následující fáze zánětu spojené se vstupem dalších buněk. Monocyty při své migraci ve větší míře využívají odlišné molekuly: CD62E, β -integriny, VCAM-1 a MCP-1. Také monocyty slouží jako buňky odstraňující debris v postiženém místě. Kromě fagocytózy tyto buňky vylučují množství proteinů, které sice v počátcích aktivují a atrahují další neutrofilie a monocyty a prohlubují tak zánět (IL-1 β , IL-6, IL-8), v pozdějších fázích ale vedou k jeho ukončení a následnému hojení rány. Děje se tak díky růstovým faktorům (PDGF, TGF- β , EGF, FGF, VEGF, IGF), které podporují migraci a proliferaci mnohých buněk, v neposlední řadě fibroblastů a endoteliálních buněk (34, 35).

Použití mimotělního oběhu, kde krevní elementy přicházejí do přímého styku se vzduchem, stejně jako s nehemokompatibilním povrchem zařízení, zesiluje odpověď imunitního systému. Další faktory, jako je použití kardiotoomického sání, hemodiluce, hemolýza, nepulsatilní tok krve, endotoxemie a časová náročnost operací, přispívají k výskytu komplikací spojených s operací. Není překvapující, že zákrok bývá ve většině případů doprovázen systémovou záněťovou odpovědí (Systemic Inflammatory Response Syndrom, SIRS), která samovolně odezní bez vnějšího zásahu. Tato odpověď je charakteristická zvýšením C-reaktivního proteinu v séru, které je možné detekovat téměř u všech pacientů po kardiokirurgické operaci. U některých nemocných však záněťová odpověď může progredovat až k selhávání jednoho nebo více orgánů. Navzdory rozsahu kardiokirurgického zákroku s použitím mimotělního oběhu jsou operační a pooperační komplikace jen přechodné a úmrtnost v souvislosti se zákrokem je relativně nízká (36).

V průběhu imunitní odpovědi se u kardiokirurgických pacientů uplatňují jak prozáněťové, tak protizáněťové mechanismy. Podle tradičního schématu má spuštění prozáněťových mechanismů za úkol chránit před případnou infekcí, zatímco protizáněťové mechanismy souvisí s ukončováním imunitní odpovědi a hojením. Při použití mimotělního oběhu je pozorováno, že od počátku

kardiochirurgického zákroku až do prvního pooperačního dne je nejvýraznějším projevem imunitní odpovědi aktivace protizáněťové složky reprezentované proteiny jako je interleukin-10 (IL-10), pentraxin-3 a receptor pro haptoglobin-hemoglobin, CD163. Tento protizáněťový stav je podpořen změnami v buněčné imunitě. Použití mimotělního oběhu je provázáno snížením počtu monocytů a odštěpováním rozličných receptorů (např. CD14, TLR2, TLR4) na jejich povrchu. Přestože počet neutrofilních granulocytů v průběhu operace a po operaci stoupá, jsou tyto buňky protizáněťově polarizovány, což je charakterizováno vysokou expresí znaků: CD16^{dim}, CD200R a olfaktomedin-4 (37). Protizáněťový stav indukovaný operací je vysvětlován změnami v endokrinním a nervovém systému. Ústřední roli přitom hraje kortizol produkovaný po stimulaci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny aferentními nervy z místa, kde dochází k porušení tkání. Kortizol vede k metabolickým změnám. Ty umožňují zvýšit hladinu glukózy a zároveň snížit schopnost jejího využití svalovou tkání. Je zvyšována také retence solí a vody a katabolismus bílkovin. Zásadní účinek má kortizol na buňky imunitního systému. Kortizol funguje imunosupresivně a protizáněťlivě – potlačuje produkci prozáněťových proteinů a indukuje produkci protizáněťových. Kortizol rovněž zvyšuje množství neutrofilů v krvi a snižuje jejich migraci do místa zánětu. U makrofágů inhibuje diferenciaci. Zároveň také kortizol zvyšuje u makrofágů schopnost fagocytózy (38).

Ke zvýšení exprese proteinů účastnících se prozáněťové odpovědi dochází se zpožděním v porovnání s protizáněťovými proteiny. Navíc aktivace prozáněťových proteinů se zdá být přísně regulovaná i co se týká kvantitativních změn, které nejsou natolik markantní jako u protizáněťových proteinů. Tyto jevy vysvětlují, proč se kardiochirurgictí pacienti po určité době nacházejí v imunosuprimovaném stavu a mohou být ohroženi komplikacemi jako je infekce a sepse.

1.3 CD163, receptor pro hemoglobin – haptoglobin (Hp-Hb)

1.3.1 Charakteristika CD163

CD163 patří do nadrodiny „cystein-rich“ scavenger receptorů (SRCR), které jsou schopné rozpoznat konzervované motivy patogena přímo (39). Jedna nebo více domén bohatých na cystein jsou umístěny na C-konci molekuly a jsou homologní k doméně makrofágového SR-I (40). SRCR domény jsou evolučně konzervované části molekuly a jsou zodpovědné za vazbu ligandu.

Skupina B SRCR zahrnuje CD163, WC1, CD5, CD6, Sp α , Hensin, Ebnerin, CRP-duktin, žlučníkový mucin a Pema-SREG (40-49). Domény skupiny B SRCR obsahují 100-110 aminokyselin a jsou charakteristické přítomností 6 až 8 cysteinů a 3 až 4 disulfidickými vazbami

(50). Dalším společným znakem této skupiny je, že každá SRCR doména je kódována jedním exonem.

CD163 molekuly jsou tvořeny extracelulární částí obsahující SRCR domény, krátkým transmembránovým segmentem (24 aminokyselin) a rovněž krátkým cytoplazmatickým koncem (40). CD163 rodina obsahuje několik členů: CD163A, CD163B (- α , - β), CD163c (50-53). CD163c (SCART) je zastoupen dvěma proteiny: SCART1, vyskytující se v lymfatických uzlinách, plicích a trachey myši a SCART2 exprimovaný na $\gamma\delta$ T buňkách produkujících IL-17 (54-56). CD163B (nebo také „CD163-like molekule“, CD163L1, M160) se nachází na buňkách na monocytomakrofágové linii a vyskytuje se ve dvou formách. CD163B- α je častější, má delší cytoplazmatickou část (71 aminokyselin). CD163B- β má cytoplazmatický konec dlouhý jen 39 aminokyselin a na rozdíl od dlouhé formy pravděpodobně neobsahuje fosforylační místa (51). CD163A (M130, dále v textu jen CD163) je kódován genem na chromozómu 12p13. *cd163* gen obsahuje 17 exonů a 16 intronů (57, 58).

CD163 obsahuje v extracelulární části 9 SRCR domén. Každá doména je tvořena α -helixem a šesti β -skládanými listy, přičemž mezi pátým a šestým β -listem se nachází smyčka. Mezi SRCR doménou 6 a 7 je interdoména označovaná také jako „spacer“, která je kódovaná exonem 9. Interdoména je integrální součástí tzv. „long range SRCR cassette“, kdy společně s 6 předcházejícími doménami tvoří konzervovanou funkční jednotku receptoru (40, 57, 58). Vyskytuje se také u CD163B a WC1 (59, 60). Díky alternativnímu sestřihu mRNA mohou vznikat různé izoformy CD163 proteinu, které se liší jak extracelulární, tak cytoplazmatickou částí molekuly. Délka cytoplazmatického konce se pohybuje v rozsahu 49 aminokyselin, což je nejběžnější „krátká“ forma, nebo v rozsahu 84 a 89 aminokyselin u „dlouhých“ forem (40, 57, 58). Všechny tři formy proteinu přitom mají stejnou k cytoplazmatické membráně proximální část 42 aminokyselin na intracelulárním konci molekuly (40). Tato oblast nese motiv YXX ϕ (pravděpodobně: Tyr-Arg-Glu-Met) pro internalizaci ligandu. Substituce jediného tyrozinu YXX ϕ motivu naruší schopnost endocytózy (61). Cytoplazmatická oblast molekuly je zodpovědná za aktivaci kináz. Po přemostění CD163 na glukokortikoidem stimulovaných makrofázích monoklonální protilátkou (klon EDHu-1) dochází k jejich aktivaci a produkci cytokinů IL-6, IL-1 β a GM-CSF. Přenos signálu je přitom závislý na aktivitě protein tyrozin kinázy (PTK), která mobilizuje intracelulární zdroje kalcia a vede k tvorbě inositol trifosfátu (62). Signalizace se účastní i serin/treonin kinázy, kasein kináza II a protein kináza C- α , které jsou asociovány s cytoplazmatickou částí CD163 molekuly a jsou nezbytné pro plnou produkci cytokinů (63). Předpokládá se, že se tento mechanismus uplatňuje i při aktivaci receptoru ligandem – komplexem hemoglobinu (Hb) s haptoglobinem (Hp). Na druhou stranu produkce těchto cytokinů (pokud k ní opravdu dochází) je z klinického nevýznamná, protože

pohlcování hemoglobinu je proces, který nevede k zánětové odpovědi, a CD163 receptor funguje hlavně jako internalizační molekula aktivující hemoxigenázu-1 (HO-1) (64, 65).

1.3.2 Exprese CD163

Krátká převažující varianta CD163 se nachází na povrchu buňky, kdežto dlouhé formy jsou lokalizovány převážně v Golgiho aparátu a v endosomech. Krátká forma má nejvyšší endocytickou aktivitu (61).

Exprese CD163 je vysoká na mikrofázích, v játrech a slezině v oblasti červené pulpy; v těchto místech končí většina komplexů Hb-Hp (66, 67). Důležitými vychytávacími buňkami jsou ale i monocyty a jejich role je zřejmá při tkáňovém krvácení, kdy by jinak docházelo k výraznému poškození v důsledku přítomnosti volného hemoglobinu (68). Bazální exprese CD163 na monocyttech je zvýšená v pozdní fázi zánětu a je spojená s uvolňováním protizáněťových produktů a ukončováním prozáněťové odpovědi (69). *In vitro* dochází k zesílení exprese povrchového CD163 při diferenciaci izolovaných monocytů ve fagocytující buňky za účinku M-CSF, zatímco při diferenciaci v dendritické buňky při působení GM-CSF a IL-4 dochází ke snížení exprese CD163 (70). V promotorové oblasti *cd163* genu se nacházejí četné GRE (glucocorticoid-responsive element), které mají za následek zvýšení exprese CD163 po podání dexametasonu nebo metylprednisolonu (57). Snížení exprese CD163 naopak souvisí s počátkem aktivace monocytů účinkem agonistů TLR nebo závěrečným utlumením aktivace monocytů (63, 71).

Zatímco je zřejmé, že LPS, resp. stimulace TLR4 je následována odštěpováním povrchového CD163 a tedy snížením exprese, data o účinku ligandu - hemoglobinu na expresi CD163 jsou rozporuplná (72, 73). V experimentálních podmínkách účinkem LPS (ale také třeba PMA) dochází k odštěpení povrchového CD163 metaloproteázou, pravděpodobně TACE, „TNF- α converting enzyme“ nebo-li ADAM17, který je rovněž zodpovědný za uvolňování TNF- α z LPS aktivovaných buněk (74-76). Hladina solubilního CD163 (sCD163) tedy negativně koreluje s povrchovou expresí CD163 na monocyttech a je nezávislá na počtu monocytů (77). sCD163 je schopen vazby na Hb-Hp. Navíc byla prokázána vazba mezi sCD163 a myozinem typu A na T lymfocytech (78). Přestože zvýšená hladina sCD163 provází různá záněťová onemocnění, viz níže, paradoxně má solubilní receptor na T lymfocyty inhibiční efekt – zabraňuje jejich aktivaci a proliferaci – a je v tomto případě možné jej považovat za součást protizáněťového mechanismu odpovědi (79, 80).

Hodnoty solubilního CD163 jsou zvýšeny u obézních lidí a diabetiků (81). Protože exprese CD163 je lokalizována na buňky monocyto-makrofágové linie, dá se předpokládat, že tyto buňky budou onemocněním zásadně ovlivněny. Vzhledem k tomu, že obezita je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy a makrofágy hrají důležitou roli v progresi aterosklerotického

plátu, je pravděpodobná i úloha sCD163 v ateroskleróze (82, 83). Navíc je sCD163 spojován s inzulinovou rezistencí a může se v budoucnu stát, že bude používán společně s ostatními markery, např. CRP a triglyceridy, pro zjištění rizika onemocnění cukrovkou typu II (84).

Bylo zjištěno, že se CD163 exprimovaný na makrofázích váže na dosud neznámý ligand na erytrocytech a podporuje tak růst a přežívání erytrocytů (85). U diabetiků dochází v periferní krvi k posunu ve prospěch monocytů exprimujících M1 znaky, tj. prozánětové markery jako je TNF- α a IL-6, zatímco exprese protizánětových markerů M2 populace (IL-10, CD163) je snižena. Lze proto předpokládat, že u diabetiků bude snižena exprese CD163 podpořená zvýšeným odštěpování CD163 z povrchu makrofágů nepříznivě ovlivňovat extramedulární erythropoézu. Vzhledem k hyperglykémii a následné hypoxii v renálním intersticiu u diabetiků by mělo docházet k zvýšené produkci erythropoetinu. Nicméně hyperglykémie interferuje s funkcí HIF-1 α , jehož exprese se jinak v hypoxickém prostředí zvyšuje. Degradace HIF-1 α je pravděpodobně příčinou negativního ovlivnění produkce erythropoetinu peritubulárními fibroblasty. Protože ledviny jsou v dospělosti hlavním místem produkce erythropoetinu, tento deficit doplněný dalšími patologickými mechanismy jako je nízká exprese CD163 bude vést k anémii typické pro určité procento pacientů s diabetem (86).

Solubilní CD163 byl nalezen ve vysokých hodnotách také u septických pacientů a pacientů s onemocněním jater, přitom vysoká hladina byla markerem nepříznivé prognózy (87, 88). Jestli samotný solubilní protein CD163 má prozánětovou funkci a jakým způsobem ji vykonává, není známo. Jednou z možností je, že sCD163 může fungovat jako opsonin bakteriálních buněk. K odštěpení receptoru dochází za účinku stejné metaloproteázy, která vede k uvolňování TNF- α , lze proto sCD163 považovat za nepřímý indikátor množství sekretovaného TNF- α díky tomu i za prozánětový marker. Myšlenku sCD163 jako prozánětového markeru podporuje rovněž fakt, že odštěpování CD163 z povrchu monocytů/makrofágů snižuje úlohu těchto buněk v protizánětové odpovědi. Nabízí se tedy otázka, zda sCD163 není spolehlivější ukazatel zánětu než TNF- α . TNF- α sekrece je totiž zpravidla lokální a navíc je buňkami rychle vychytáván. Navíc se lze domnívat, že účinnější než protilátky namířené proti TNF- α nebo solubilní receptory pro TNF- α , které jsou používané k léčbě onemocnění jako revmatoidní artritida nebo Crohnova choroba, budou specifické inhibitory TACE (ADAM17). Takové inhibitory zároveň povedou k podpoře protizánětové funkce monocytů/makrofágů a je pravděpodobná jejich využitelnost u širšího spektra chorob, kde TNF- α a následně ovlivněné proteiny mají negativní dopad na onemocnění.

1.3.3 Charakteristika hemoglobinu a haptoglobinu

Hemoglobin je metaloprotein obsahující hem B jako prostetickou skupinu tvořenou iontem železa v porfyrinovém kruhu. Funkce hemoglobinu je umožněna sterickým uspořádáním globinových jednotek a v blízkosti skupiny hemu přítomného histidinového zbytku, který změnou náboje ovlivňuje vazbu kyslíku (89, 90). Částí hemoglobinu, která interaguje s CD163 a umožňuje vytvoření komplexu receptor-ligand, je $\beta 2$ -řetězec. Naproti tomu na α -řetězci hemoglobinu se nacházejí Hp-vazebná místa a tak je důležitý pro vytvoření komplexu Hb-Hp (91, 92). Vazba Hb-Hp je ireverzibilní a vytvoření komplexu je nezbytné pro ochranu hemoglobinové molekuly před oxidativním účinkem H_2O_2 , který oxiduje β -řetězec a zamezuje následné vazbě volného oxidovaného hemoglobinu na CD163 receptor. Přítomnost haptoglobinu je tedy mimořádně důležitá při zánětovém procesu, kdy dochází k oxidativnímu vzplanutí neutrofilů a monocytů a k produkci H_2O_2 a následně kyslíkových radikálů (93). Peroxidace hemoglobinu vede ke vzniku radikálu, jeho difúzi a oxidaci aminokyselin, viz níže. Kromě toho hemoglobin vykazuje i pseudoperoxidázovou (autoperoxidázovou) aktivitu, kdy se spontánně oxiduje železnatý ion na železitý a pak železičitý za současného vzniku proteinového radikálu v nepřítomnosti antioxidantů – superoxid dismutázy a katalázy (93, 94).

- 1) $Hb(Fe^{2+}) + H_2O_2 \rightarrow Hb(Fe^{4+} = O^{2-}) + H_2O$
- 2) $Hb(Fe^{2+}) + Hb(Fe^{4+} = O^{2-}) + H^+ \rightarrow Hb(Fe^{3+}) + OH^-$
- 3) $Hb(Fe^{3+}) + H_2O_2 \rightarrow Hb^{\cdot+}(Fe^{4+} = O^{2-}) + H_2O$

Volný hemoglobin a hem nejen že poškozují např. plazmatické proteiny a endoteliální buňky, ale hemoglobin je také schopný vychytávat NO, který je důležitým vazodilatátorem a jeho nepřítomnost vede k plicní hypertenzi a pravostrannému srdečnímu selhání (95, 96). U obézních pacientů je nejen zvýšená koncentrace sCD163, ale dochází také ke glykaci hemoglobinu. Takový hemoglobin si uchovává vysokou oxidační aktivitu a vazba s haptoglobinem není protektivní (97). Glykosylovaný hemoglobin pak oxiduje proteiny jako např. LDL. Praktickým důsledkem je rozvoj aterosklerotického plátu s obsahem oxLDL, který je výrazně rychlejší u diabetiků tím spíše, že mají obrát erytrocytů v krvi zvýšený (98-100).

Haptoglobin je protein akutní fáze, jehož exprese je zvyšována glukokortikoidy a IL-6 (101). Haptoglobin sice zvyšuje afinitu vazby hemoglobinu na CD163, ale hlavní funkcí haptoglobinu je chránit hemoglobin před oxidativním poškozením.

Gen pro lidský Hp je lokalizován na 16q22 (102). Hlavním zdrojem jsou játra, ale také ledviny, slezina nebo thymus produkují Hp (103, 104). V důsledku existence dvou alel *hp1* a *hp2*, z nichž *hp2* vznikla duplikací *hp1*, existují v lidské populaci tři fenotypy Hp1-1, Hp2-2 a Hp2-1 (102, 105). Hp je tvořený α a β -řetězci a polymorfismus se týká právě α řetězce. β -řetězec, který je více

konzervovanou částí Hp a je si mezi různými druhy živočichů podobný, nese doménu homologní k serinovým proteázám (106). Na rozdíl od serinových proteáz však β -řetězci chybí katalytické místo (107). Sekvence zodpovědné za vazbu Hb se nachází na β -řetězci, který nese na povrch exponované smyčky (97, 108). β -řetězec je navíc zodpovědný za vysoce afinní vazbu komplexu Hb-Hp na CD163 (109). Oba řetězce, α a β , v případě Hp1-1 vytvářejí dimer $(\alpha\beta)_2$, kde jsou jednotky spojeny přes cystein 33 v α -řetězci (107). Intragenová duplikce zahrnovala *hpl* cystein účastníci se vytvoření disulfidické vazby mezi α řetězci, následkem čehož Hp2-2 a Hp2-1 tvoří různé multimery (110). Tento fakt je velmi důležitý pro vazbu Hb-Hp/CD163, odstraňování komplexů a rychlost recyklace receptoru CD163 (97). Zatímco CD163 váže komplex Hb-(Hp2-2) s mnohem vyšší afinitou než Hb-(Hp1-1), samotný Hp, ať Hp1-1 nebo Hp2-2, není receptorem vázán vůbec (99).

U obézních pacientů typ alely pro haptoglobin hraje zásadní roli v průběhu onemocnění. Clearance Hb v přítomnosti Hp2 je pomalejší a důsledky oxidace významnější (111).

Vzhledem k zvýšené hladině sCD163 provázející některá onemocnění, byla zkoumána možnost vazby mezi sCD163 a komplexem Hb-Hp. Bylo potvrzeno, že Hb-Hp je schopen vazby s sCD163, nicméně afinita je slabší než v případě membránového CD163, a vytvořený komplex snadno disociuje (112). Předpokládá se, že celý komplex včetně sCD163 může být endocytován.

CD163 receptor je schopen rozpoznávat a internalizovat i modifikované typy hemoglobinové molekuly např. $\alpha\alpha$ -DBBF Hb, který na rozdíl od hemoglobinu nedisociuje na $\alpha\beta$ dimery a zůstává tetrametrem díky kovalentní vazbě mezi α -řetězci. $\alpha\alpha$ -DBBF Hb vytváří komplex s haptoglobinem jen minimálně, přesto je internalizován receptorem CD163 účinněji než volný hemoglobin a rovněž indukuje expresi HO-1 (92). Tento mechanismus naznačuje, že odstraňovány budou jen takové pozměněné molekuly hemoglobinu, které budou mít zachována vazebná místa pro CD163 na β -řetězci.

1.3.4 Funkce CD163

Po vazbě Hb-Hp na CD163 dochází k internalizaci komplexu, přičemž rychlost ostraňování Hb-Hp z plazmy je úměrná množství exprimovaného povrchového receptoru (113). Zvýšení exprese CD163 účinkem glukokortikoidů vede i ke zvýšení internalizovaného Hb-Hp (113). Vazba CD163/Hb-Hp je vysoce afinní, nicméně při primární nepřítomnosti, např. při anhaptoglobinemii (*hp0-hp0* genotyp), nebo vyčerpání haptoglobinu v plazmě anebo hemolytické anémii, není přítomnost volného hemoglobinu letální (114, 115). K jeho odstranění dochází nízkou afinní vazbou na CD163. Např. při stavech, které jsou provázeny hemolýzou, jako je třeba použití mimotělního

oběhu, je funkce příjmu hemoglobinu bifazická. Přednostně je vázán komplex Hb-Hp, po vyčerpání haptoglobinu také samotný hemoglobin, avšak s menší účinností. Pro vazbu receptoru s ligandem je vždy důležitá přítomnost Ca^{2+} iontů (68, 73). Podobně jako při internalizaci Hb-Hp, dochází i při internalizaci volného hemoglobinu k indukci exprese mRNA pro HO-1 (92). Exprese HO-1 je ovšem indukována i volnou molekulou hemu, která prochází membránou buňky na CD163 receptoru nezávislým mechanismem, patrně za účasti hemopexinu a CD91/LRP (116). HO-1 je tedy produkována jak CD163^+ , tak CD163^- buňkami (92). Je zřejmé, že hemem indukovaná exprese HO-1 je přizpůsobením se chemicko-fyzikálním vlastnostem hemoglobinové molekuly, ze které je hem poměrně rychle samovolně uvolňován (neoxidovaný Hb, 16 min.) (93). Zajímavý je fakt, že se také modifikované typy hemoglobinu (met-Hb a CN-met-Hb) váží na CD163 receptor a jejich internalizace rovněž vede k expresi HO-1, přestože např. hem v molekule CN-met-Hb je ireverzibilně blokován kyanidovým iontem (92). Tyto jevy naznačují, že je exprese HO-1 řízena nezávislými mechanismy souvisejícími s ochranou před volným hemoglobinem a hemem při hemolýze. Zároveň je však vyloučena dráha, které se účastní glutation a která vede k indukci HO-1, enzymu spojenému s oxidativním stresem, protože aktivace HO-1 komplexem Hb-Hp nebo volným hemoglobinem nevede k depleci glutationu (65, 117).

Po endocytóze dochází k degradaci ligandu a regeneraci receptoru CD163. Recyklace hemu se účastní HCP-1 (heme-carrier protein). HCP-1 byl původně identifikován v duodenálních enterocytech, kde se společně s dalšími proteiny účastní transportu železa (118). Podobně jako CD163 je také exprese HCP-1 regulována TLR agonisty, které expresi snižují, a glukokortikoidy, které ji naopak zvyšují (119).

V makrofázích po internalizaci komplexu CD163/ligand HCP-1 transportuje hemoglobin z endozomů do cytoplazmy, kde je v oblasti ER lokalizovaná HO-1 (119, 120). Promotorová oblast genu pro HO-1 nese „glucocorticoid response elements“ a její exprese není zvyšována glukokortikoidy na rozdíl od HO-2, CD163 a HCP-1 (58, 121). Zatímco HO-2 je exprimována konstitutivně, HO-1 je inducibilní enzym a promotor *ho-1* obsahuje celou řadu elementů ovlivněných oxidativním, tepelným nebo energetickým stresem (117, 122-124). Hemoglobin je hemoxigenázou-1 rozložen na biliverdin, oxid uhelnatý a železnatý kation (125). Donorem elektronu pro reakci je NADPH-cytochrom P-450 reduktáza (122). Biliverdin je v dalších krocích enzymem biliverdin reduktázou přeměněn na bilirubin (126).

Kromě Hb jsou CD163 receptorem rozpoznávány i struktury na Gram-pozitivních i Gram-negativních bakteriálních buňkách a erytrocytech. Na rozdíl od vazby Hb-Hp, za kterou je zodpovědná SRCR doména 3, vazby s erytrocyty a bakteriálními buňkami se účastní doména 2 (CD163p2) a k vazbě není potřeba iontů vápníků (85, 127, 128). Zatímco adheze CD163 k erytrocytům souvisí s erythropézou, rozpoznání bakteriálních buněk pomocí CD163 vede

k produkci TNF- α u monocytů a CD163-THP-1 linie. Konkrétní antigen, na který se na erythrocytech nebo bakteriálních buňkách váže CD163, však není znám (85, 128). TWEAK, „TNF-like weak inducer of apoptosis“, je pravděpodobně dalším ligandem receptoru CD163. TWEAK je z plazmy vychytáván receptorem, a tak s komplexem Hb-Hp kompetuje o vazebná místa na CD163. Hb-Hp a TWEAK sdílejí určité podobnosti v sekvenci aminokyselin; tím může být vysvětleno rozpoznávání TWEAK receptorem CD163. Po vazbě je TWEAK internalizován (129, 130).

1.4 Fc γ RI (CD64), vysoce afinní receptor 1 pro Fc fragment IgG

1.4.1 Charakteristika Fc γ RI

U člověka se vyskytují tři receptory s různou afinitou pro Fc fragment IgG. Dva z nich, Fc γ RII (CD32) a Fc γ RIII (CD16), vážou Fc fragment s nižší afinitou, zatímco Fc γ RI (CD64) je vysoce afinní receptor pro IgG. Geny pro Fc γ R se nacházejí na chromozómu 1q23-24 (131-133). Samotný *fc γ RI* gen byl izolován a popsán v r. 1991. Gen kódující silně glykosylovaný protein o velikosti 72 kDa je tvořen šesti exony (134, 135). Exon tři, čtyři a pět (EC1, EC2, EC3) kódují extracelulární „Ig-like“ domény, které tento protein řadí do imunoglobulinové nadrodiny (136). Zatímco Fc γ RI obsahuje tři „Ig-like“ domény, Fc γ RII a Fc γ RIII obsahují jen po dvou doménách (135).

Poslední exon kóduje transmembránovou část a krátký cytoplazmatický konec. Exon jedna a dva (S1 a S2) kódují leader sekvenci. Exon dva pak obsahuje také místo pro štěpení endopeptidázou (135).

Pro Fc γ RI existují tři různé, ale vzájemně si velmi podobné geny (> 98% v sekvenci nukleotidů), které zřejmě vznikly genovou duplikací. Výše popsaná struktura platí pro gen *A*. U genu *B* a *C* je v pátém exonu (EC3) umístěn stop kodon naznačující možnou existenci sekretované formy Fc γ RI, která neobsahuje třetí „Ig-like“ doménu (137). Rozdíly v sekvenci nukleotidů se v rámci *fc γ RI* genů nacházejí i v EC2 (138). Protože vysoké afinity vazby Fc γ RI-A a IgG je dosaženo specifickou interakcí mezi doménou dva a doménou tři za podpůrné role první domény, produkty genů *fc γ RI-B* a *-C* budou představovat nízce afinní receptory (139).

fc γ RI DNA obsahuje dvě místa, ze kterých probíhá transkripce. Druhé místo je využíváno v přítomnosti IFN γ ; v důsledku této vlastnosti bývají v buňkách stimulovaných interferonem přítomny dvě různé *fc γ RI* mRNA (1,7 a 1,6 kb) jako produkt jediného genu. Kromě „*ifn γ response*“ elementu se u všech tří *fc γ RI* genů v promotorové oblasti nalézá také „glucocorticoid response element consensus“ sekvence (140).

Na chromozómu 1q23 je umístěn gen pro γ -řetězec, který je funkčně asociovaný s α -řetězcem Fc γ RI. Protein je podobný CD3 ζ -podjednotce, jejíž gen je lokalizovaný ve stejné oblasti na prvním chromozómu, a s nejvyšší pravděpodobností geny vznikly genovou duplikací (141, 142). γ -řetězec je sdílen i dalšími Fc receptory jako rozšířený mechanismus signální transdukce. Stechiometrie vazby v případě Fc γ RI je $\alpha\gamma 2$. γ -řetězec nese v intracelulární části molekuly „tyrosine activation motif“ (ITAM) fosforylovaný Src kinázou a je tedy zodpovědný za přenos signálu po aktivaci Fc γ RI a následnou fagocytózu. Přesto při fagocytóze nemusí být přítomnost γ -řetězce klíčová. Je-li v lipidových raftech Fc γ RI kolokalizován s Fc γ RIIa (CD32), není nutný γ -řetězec, fagocytóza je zprostředkována Fc γ RIIa, který nese v cytoplazmatické části tyrosinový motiv schopný downstream signalizace (143, 144). Přestože nepřítomnost tyrosinového aktivačního motivu obvykle vede k inhibici fagocytózy, není ovlivněna schopnost endocytovat imunokomplexy a vytvářet pseudopodia (145-148). Schopnost fagocytózy je kvantitativně ovlivněna i zkrácením cytoplazmatické části α -řetězce, která je jinak konstitutivně fosforylovaná (147-149). Chybění α -řetězce u makrofágových buněk navíc zabraňuje produkci IL-6 jinak spojené s aktivací Fc γ RI. Po aktivaci Fc γ RI totiž dochází k defosforylaci konstitutivně fosforylovaného α -řetězce, přičemž nejdůležitější je defosforylace čtyř serinových reziduí; inhibice jejich defosforylace má stejný efekt jako delece cytoplazmatické části α -řetězce (149).

1.4.2 Exprese Fc γ RI

Konstitutivně je Fc γ RI exprimován na buňkách monocyto-makrofágové linie, jeho exprese je zvýšená podáním IFN- γ a při diferenciaci monocytů (150, 151). IL-10 rovněž zvyšuje expresi FcRI na monocytech, zatímco u neutrofilů podobný efekt nemá (151, 152). Za podmínek, kdy neprobíhá záněť, je bazální exprese Fc γ RI na neutrofilech velmi nízká. Inducibilní Fc γ RI se vyskytuje na neutrofilech po stimulaci IFN- γ , aniž by byla ovlivněna exprese receptorů Fc γ RII a Fc γ RIII (153). Fc γ RI je na neutrofilech silně indukován také v přítomnosti G-CSF a jeho exprese koreluje se zvýšenou cytotoxicitou těchto buněk. Jak IFN- γ , tak G-CSF prodlužují životnost neutrofilů a udržují je ve funkčně aktivním stavu (154). Efekt IFN- γ a G-CSF na zvýšení exprese Fc γ RI byl pozorován *in vitro* i *in vivo* (153, 155-157). Naopak, kortikosteroidy mají inhibiční vliv jak na expresi receptoru, tak na indukci fagocytózy a cytotoxicity (153). Fc γ RI je exprimován i v některých populacích dendritických buněk. Jedná se o CD33^{bright} CD14⁻ HLA-DR^{bright} CD83⁻ i CD83⁺ dendritické buňky a buňky indukované z monocytů pomocí GM-CSF a IL-4 a stimulované IFN- γ . U těchto buněk Fc γ RI společně s Fc γ RII umožňuje schopnost fagocytovat, i když do menší míry, než je tomu u monocytů (158). Od monocytů odvozené dendritické buňky exprimující Fc γ RI mohou po stimulaci receptoru Fc γ hrát roli v indukcii autoreaktivních T lymfocytů (159).

Jak Fc γ RI, tak Fc γ RII jsou exprimovány na endoteliálních buňkách (160). Z této skutečnosti vyplývá možná role CRP v ateroskleróze nebo při trombotické události. Bylo prokázáno, že přibližně 50 % CRP je endoteliálními buňkami po vazbě na Fc γ RI a Fc γ RII internalizováno (160). Výsledkem aktivace endoteliálních buněk je produkce IL-8, MCP-1, sekrece ICAM-1, VCAM-1 a LOX-1, tzn. molekul, které se účastní chemotaxe a adheze buněk (160, 161). Navíc CRP přes Fc γ RI/II na monocytech zvyšuje expresi CD11b a vylepšuje tak následnou adhezi na endoteliální buňky (162). Protože CRP váže také oxLDL, v případě monocytů se CRP přes Fc γ RI/II a vychytávací receptory (SR-A a LOX-1) podílí na vzniku pěnových buněk (163-166).

1.4.3 Charakteristika ligandů

Na rozdíl od Fc γ RII a Fc γ RIII, které tvoří vazbu s komplexy protilátek IgG, lidský Fc γ RI váže, sestupnou afinitou podle pořadí, monomerní IgG1, IgG3 a IgG4 a také myší IgG2a a IgG3 (detailně v *Biology of Human Immunoglobulin G Fc Receptors* (167)). Proto také značná část výzkumu týkajícího se lidského Fc γ RI byla prováděna na myším modelu, za použití myšího monomerního IgG2a (139).

Za vazbu na receptor odpovídá pouze těžký řetězec v Fc části protilátkové molekuly (168). Síla vazby mezi Fc γ RI a protilátkou je ovlivněna stupněm glykosylace protilátkové molekuly a protože se Fc γ RI účastní protilátkami zprostředkované buněčné cytotoxicity (ADCC), je i tento mechanismus zesílen, nebo oslaben v závislosti na afinitě vazby Fc γ RI-IgG. Lze předpokládat, že také ostatní funkce, jako třeba schopnost fagocytózy, budou pozměněny v návaznosti na stupeň glykosylace protilátkové molekuly (169). Funkce Fc γ RI je ovlivňována jak přímo – ligandem nebo samotným receptorovým komplexem, tak sekundárně jako třeba stimulací specifických receptorů. Příkladem je nepřítomnost γ -řetězce, která má negativní dopad na schopnost ADCC, zatímco stimulace TLR pozitivně ovlivňuje jak cytotoxicitu, tak fagocytózu (170). Konkrétně stimulace TLR4 vede k zvýšené schopnosti fagocytózy podobně jako stimulace TLR7/8 a TLR9 zvyšuje schopnost ADCC (171-173). C-reaktivní protein představuje další ligand Fc γ RI. Buňky nesoucí Fc γ RI a Fc γ RII (za současné exprese γ -řetězce) tak budou vázat a fagocytovat částice opsonizované nejen protilátkou IgG1, ale také CRP (143, 174). Pentamerní struktura CRP interaguje svou B částí s ionty vápníku, A část pak váže Fc γ RI nebo Fc γ RII a ligandy, kterými jsou monofosfátové estery jako fosfocholin a od něj odvozený fosfatidylcholin. Dalším ligandem CRP je C1q složka spouštějící následně po své aktivaci komplementovou kaskádu. CRP funguje tedy jako opsonin, kdy za účasti Ca²⁺ iontů váže fosfocholin přítomný v malé míře v buněčných stěnách rozmanitých mikroorganismů (175).

Kromě IgG a CRP je zřejmě dalším ligandem Fc γ RI OmpA *Escherichia coli* K1. Přestože Fc γ RI společně s CRP zajišťují ochranu před mikroorganismy, v případě *E. coli* K1 bakterie využívá α -podjednotky pro vstup a následné množení v makrofágové buňce (176, 177).

1.4.4 Funkce ligandů Fc γ RI a signalizace

CRP se podílí nejen na protimikrobiální odpovědi, ale také na odstraňování nefunkčních buněk. Antimikrobiální odpověď je umožněna interakcí CRP s fosfocholinovými skupinami kyseliny teichoové a lipoteichoové, které jsou strukturálními komponentami buněčné stěny *Streptococcus pneumoniae* (178), a lipofosfoglykanem na povrchu metacyklických *Leishmania donovani* (179). CRP se rovněž váže na fosfatidylcholin (pouze oxidovanou formu), který je ve větší míře exprimován na povrchu apoptotických či nekrotických živočišných buněk (163, 180-182). Ty jsou pak za spolupráce fagocytujících buněk exprimujících Fc γ RI a Fc γ RII odstraňovány. CRP se tak společně Fc γ RI a Fc γ RII podílí na likvidaci umírajících a mrtvých buněk, aniž by docházelo k aktivaci imunitního systému (183).

Role CRP a Fc γ RI/ Fc γ RII byla popsána i u autoimunitních onemocnění a při septickém šoku, kdy správně načasovaná přítomnost a kvantita CRP a receptoru zajišťuje ochranu a může zvrátit jinak negativní průběh obou procesů (178, 184-188). Princip pravděpodobně spočívá v indukci exprese IL-10, který je společně s dalšími cytokiny (IL-6, TNF- α , IL-1 β) po stimulaci CRP s LPS (nebo přímo koloniemi živých bakterií) produkován monocyto-makrofágovými buňkami (176, 186). Zatímco odpověď TNF- α a IL-1 β je víceméně lineární, koncentrace IL-10 a IL-6 narůstá mnohem rychleji při nízkých dávkách LPS. Odpověď vedoucí k produkci kopíruje logaritmickou funkci; to do jisté míry může vysvětlit, proč lze CRP spolu s Fc γ RI/II považovat také za součást antiinflatorního mechanismu, přestože dochází k současné produkci TNF- α . IL-10, IL-1 β a IL-1RA jsou ve významném množství produkovány rovněž při stimulaci samotným CRP bez přítomnosti LPS (176). Jak bylo ukázáno na KO myších, zvýšení IL-10 přímo závisí na expresi γ -řetězce. Chybí-li γ -řetězec, k produkci interleukinu nedochází (189).

Nejen monocytová řada je aktivovaná CRP, ale i neutrofilů jsou ovlivněny přítomností CRP rozpoznávaného Fc γ RI. Zatímco se CRP-Fc γ RI podílí na chemotaxi a zvýšené adhezi monocytů, u neutrofilů inhibuje chemotaxi indukovanou IL-8 a snižuje i schopnost adheze (190, 191). Tento efekt je důležitý při zabránění agregace neutrofilů v důsledku aktivace destiček (192). Působením CRP dochází i k inhibici respiračního vzplanutí, přestože přemostění Fc γ RI protilátkou působí na neutrofilů právě opačně (191, 193). Na zprostředkování rozpoznávacího signálu u neutrofilů se zřejmě podílí nejen Fc γ RI a Fc γ RIIa, ale i klastrovaný Fc γ RIIb (CD16b) rekrutující Fc γ RIIa, jehož cytoplazmatická část nese ITAM a odpovídá za přenos signálu (191, 194). Jiná studie uvádí podíl γ -

řetězce Fc γ RIIIa (CD16a) na indukci fagocytózy po stimulaci Fc γ RI (195). Do signalizace po aktivaci receptoru je zapojená fosfatidylinositol-3 kináza i mitogen-aktivovaná protein kináza (191). Fc γ receptory, které jsou prostředníkem mezi CRP a funkcí vykonávající buňkou, tak zásadním způsobem spojují humorální a vrozenou imunitu.

Podobně jako vazba CRP i vazba protilátky na lidský Fc γ RI vede k produkci TNF- α a IL-6 (196). Obecně jsou Fc receptory zodpovědné za dlouhou životnost protilátek, které nenavázané by jinak byly rychle odstraněny (197). Zajímavým faktem je, že přítomnost Fc části imunoglobulinové molekuly je dostačující nejen pro vazbu na receptor FcR, ale i pro vazbu na neonatální Fc receptor (FcRn) a také pro navázání C1q složky komplementu (198, 199). Tohoto faktu se využívá ke konstruování Fc variant se zvýšenou schopností vazby komplementu za účelem odstranění nádorových nebo patogenem infikovaných buněk (200).

1.5 Toll-like receptor 2 (TLR2) a Toll-like receptor 4 (TLR4)

1.5.1 Charakteristika TLR2 a TLR4 a signalizace

Toll-like receptory (TLR) patří do skupiny „pattern recognition“ receptorů, PRR, kam jsou řazeny například vychytávací a lektinové receptory, pentraxiny, „NOD-like“ receptory (NLR) a „RIG-I-like“ receptory (RLR). PRR jsou schopny rozpoznávat mikrobiální a virové struktury. Tyto proteiny mohou fungovat jako opsoniny a iniciovat komplement, indukovat fagocytózu nebo koagulační kaskádu a zabránit tak šíření patogena v organismu. PRR také obvykle spouštějí signální dráhy vedoucí k protivirové a protimikrobiální odpovědi (201, 202). Komplementární struktury rozpoznávané receptory pak C.A. Janeway Jr. v r. 1989 pojmenoval „pathogen-associated molecular patterns“, PAMP (203). Jedná se o evolučně konzervované mikrobiální vzory vlastní mikroorganismům a virům. Při interakcích s hostitelem, jsou tyto vzory odlišné od molekulárních struktur hostitele a jsou rozpoznávány jako „non-self“ a „danger signal“ (204, 205). PRR pravděpodobně rozpoznávají také endogenní molekuly charakteristické pro hostitele. Tyto molekuly jsou zpravidla uvolňovány při setkání s mikroorganismy a slouží jako zesílené signály nebezpečí (206). Jsou označovány jako „damage-associated molecular patterns“, DAMP. Do této skupiny jsou řazeny např. oligosacharidy kyseliny hyaluronové, proteiny tepelného šoku (Hsp), některé alarminy, fibrinogen a mnoho dalších.

TLR2 je kódován genem umístěným na chromozómu 4q32. Gen se sestává ze dvou nekódujících exonů následovaných kódujícím exonem. U monocytů je znám alternativní sestřih exonu II (207). Gen pro TLR4 se nachází na chromozómu 9q33.1 a je tvořen čtyřmi exony. Pouze kombinace exonů I, II, IV vytváří funkční protein (208).

Toll receptory (TR) byly objeveny na konci 80. let jako proteiny vázající endogenní ligand Spätzle a určující tak dorzoventrální polaritu embrya *Drosophila melanogaster* (209-211). Později bylo zjištěno, že TR jsou součástí vrozené imunity a účastní se protimikrobiální odpovědi aktivací „dorsal immunity factor“, DIF, transaktivátoru homolognímu k savčímu NF- κ B (212). Dosud bylo popsáno devět různých typů Toll receptorů u drozofily (213). Toll receptorům podobné struktury byly objeveny i u savců a dalších živočišných druhů (204, 214). Savčí obdoba Toll byla pojmenována Toll-like receptory, TLR a vůbec prvním objeveným receptorem byl TLR4 (204). TLR mají nezastupitelnou úlohu v odpovědi vrozené imunity na mikrobiální podnět. Tyto receptory jsou v buňce lokalizovány jak na cytoplazmatické membráně, tak endosomálních strukturách v cytoplasmě. TLR obsahují několik tandemově umístěných leucinů, „leucine rich repeats“, LRR, v extracelulární části molekuly (215, 216). Přítomnost LRR řadí TLR do LRR rodiny, která čítá více než 6000 proteinů a je charakterizována konzervovaným motivem obsahujícím LxxLxLxxN, kde x je jakákoliv aminokyselina a L je leucin, izoleucin, prolin nebo fenylalanin. N pak značí asparagin, treonin, cystein nebo serin (217, 218). Rodina LRR proteinů je značně rozsáhlá a nejenže se tyto proteiny vyskytují u eukaryot a prokaryot, ale jsou také součástí virových částic a organismů říše Archaea. Podle sekvence aminokyselin a struktury rozlišujeme sedm podtříd LRR: „typické“, „RI-like (ribonuclease inhibitor-like)“, „CC (cysteine containing)“, „PS (plant specific)“, „SDS22-like (SDS22⁺-protein like)“, „bakteriální“ a „TpLRR (*Treponema pallidum* LRR)“ (215, 219, 220). Obecně však díky konzervovaným sekvenčním vzorům v LRR mají všechny LRR proteiny podkovovitou strukturu (221). Samotné LRR přitom slouží jako „protein recognition motif“ pro rozpoznání a interakci proteinů (220). LRR tvoří moduly („repeat numbers“). Krátké molekuly mohou obsahovat pouhé tři moduly, zatímco u dlouhých molekul se objevuje až 40 modulů; každý z modulů se skládá z 20-30 aminokyselin (219, 220).

TLR jsou „typické“ LRR proteiny, které nesou 16-28 modulů obsahujících 24 aminokyselin: xLxxLxxLxLxxNxLxxLPxxxFx (215). Extracelulární část molekuly má podkovovitou strukturu, ve které jsou hydrofóbní LRR umístěny v konkávní oblasti tvořené β -listy (219, 220, 222). Ektodoména TLR2, TLR4 a TLR1 se liší od ostatních TLR receptorů. Je možné ji rozdělit na tři odlišné části – N-terminální, centrální a C-terminální subdoménu. Zatímco N-terminální subdoména odpovídá ostatním TLR, centrální a C-terminální subdoména nese různý počet aminokyselin. Navíc struktura α -helixů tvořících konvexní část podkovy obsahuje narušené žebříky asparaginů, které jinak vytvářením vodíkových vazeb molekulu stabilizují. (20-33) Tyto strukturní anomálie přispívají k biologickým vlastnostem TLR2 a TLR4, jež souvisejí s rozpoznáním ligandů a vazbou koreceptorů (223, 224). Po krátké transmembránové části receptoru následuje cytoplazmatický konec molekuly, který odpovídá za signální transdukci po identifikaci PPR. Cytoplazmatický konec sdílí výraznou homologii s intracelulární částí IL-1R. Tato homologie řadí TLR, IL-1R a IL-18R do

společné nadrodiny receptorů: homologní oblast je označovaná jako TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) doména, je tvořena ~200 aminokyselinami, jejichž konzervované části vytvářejí 3 boxy (225). Interakce TIR domén proteinů je trojího typu. „A rozhraní“ je vlastní oligomerizujícím TIR doménám receptorů po interakci s ligandem. „R rozhraní“ zprostředkuje oligomerizaci TIR domén adaptorového proteinu MyD88 (nebo homologu CG2078 u drozofily) pravděpodobně usnadněnou interakcí DD domén. „S rozhraní“ zajišťuje dimerizaci TIR domény receptoru a adaptoru (226-228). Mezi různými TIR doménami je 20-30 % shody v sekvenci aminokyselin. TIR doména je tvořena 5 centrálními β -listy a obklopujícími α -helixy, které jsou vzájemně spojeny smyčkami. BB-smyčka mezi druhým β -listem a druhým α -helixem je důležitým místem interakce TIR domén; u myšího TLR4 a Toll drozofily bylo prokázáno, že jakákoliv mutace v BB smyčce redukuje signalizaci (227, 229). Xu a kol. (2000) zjistili, že jediná bodová mutace Pro681His, která nemá vliv na strukturní vlastnosti BB-smyčky v TIR doméně lidského TLR2, způsobuje neschopnost dimerizace TIR domény TLR a MyD88 a tím pádem i nemožnost signální transdukce (228, 230). Neschopnost TIR domén dimerizovat představuje účinný způsob, jakým je možné ovlivnit aktivaci vrozené imunity, kdy stimulace TLR je nežádoucí jako např. při transplantacích (231, 232).

TLR4 a TLR2 využívají adaptorový protein TIRAP (Mal) ve své MyD88 dependentní dráze (233). TIRAP vykazuje nejvyšší polymorfii ze všech pěti adaptorových proteinů zahrnutých v signálních drahách TLR2 a TLR4 (234). Obsahuje jak TIR doménu, tak TRAF6-vazebný motiv (235). TIR doména proteinu TIRAP je odlišná od TIR domén TLR a MyD88; obsahuje extrémně dlouhou AB smyčku, ale ne BB smyčku nebo $\alpha\beta$ -helix. Struktura této TIR domény umožňuje současnou vazbu TLR a MyD88 (236).

Zatímco se při interakci MyD88 s TLR uplatňuje pouze TIR doména, při interakci MyD88 s kinázou IRAK4 se uplatní jen DD doména (237-239). IRAK4 následně fosforyluje IRAK1 (238, 240). Obě kinázy patří do širší IRAK rodiny, kde jsou v rámci savců řazeny taky IRAK2 a IRAK-M (241). Kinázy IRAK1 a 4 nesou na N-konci DD doménu a centrálně jsou umístěné sekvence zodpovědné za serin/treonin kinázovou aktivitu; nicméně pouze enzymatická aktivita IRAK4 je nezbytná pro finální aktivaci NF- κ B (240, 242). Komplex TLR/MyD88/IRAK4-IRAK1 rekrutuje adaptorový protein TRAF6, který asociuje s fosforylovaným IRAK1 přes TRAF-C doménu na C-konci (243, 244). Fosforylovaný IRAK1 a TRAF6 disociují z původního komplexu, aby vytvořily nový komplex s TAK1, TAB1 a TAB2 v plazmatické membráně, kde dochází k fosforylaci TAB2 a TAK1. IRAK1 je pak v plazmatické membráně degradován a zbývající komplex tvořený TRAF6, TAK1, TAB1 a TAB2 je translokován do cytosolu (244). TAK1 patří do rodiny MAPKKK a její účast na signalizaci TLR je nezbytná (245). TAB1 a 2 jsou adaptorové proteiny. TAB1 působí jako aktivátor a enhancer TAK1 (246, 247). Interakce mezi TAK1 a TRAF6 je zprostředkována TAB2 (246, 248). TAB2 se dále uplatňuje při vytvoření spojení TRAF6-IKK (249). Přítomnost TAB2

může být nahrazena TAB2-like molekulou, tj. TAB3, která má stejnou funkci jako TAB2 a rovněž se účastní translokace NF- κ B (250). Na N-konci TRAF6 se nachází „signální“ (RING finger/zinc finger) doména, díky které TRAF6 nese funkci ubikvitin E3 ligázy. Ubikvitinace TRAF6 má za následek pozměnění funkce tohoto proteinu a probíhá v cytosolu za účasti UBC13 a UEV1A (251, 252). Na ubikvitinaci TRAF6 se podílí i TAB2 (249). Výsledkem je aktivace TAK1, který následně fosforyluje obojí MAP kinázu a IKK komplex (252, 253). IKK komplex se skládá z kináz IKK α a IKK β a regulační podjednotky IKK γ , v literatuře označované také jako IKK1, IKK2 a nukleární faktor (NF)- κ B esenciální modulátor (NEMO). NF- κ B dimery jsou sekvestrovány v cytoplazmě neaktivované buňky a udržovány v inaktivním stavu inhibičními proteiny I κ B (254). I κ B rodina zahrnuje několik členů: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ a Bcl-3, nicméně nejvíce studovanou molekulou je I κ B α . Tyto proteiny obsahují opakující se ankyrinové sekvence, které blokují „signály nukleární lokalizace“, NLS, molekuly NF- κ B (255). Jako I κ B funguje ale i NF- κ B2 (p100) a NF- κ B1 (p105), které na svém C-konci nesou opakující se ankyrinové sekvence (256, 257). K aktivaci NF- κ B je potřeba, aby IKK fosforylovala I κ B; to vede k ubikvitinaci I κ B a následně degradaci. Tím je uvolněn NF- κ B, který se translokuje do jádra a indukuje expresi cílových genů (258).

NF- κ B aktivace, při které se uplatňuje TRAF6 a dochází ke vzniku heterodimeru p50/p65 působením fosforylovaného IKK β , se označuje jako kanonická dráha. Nekanonická dráha zahrnuje TRAF3, který je asociován s TLR adaptory - TRIF a IRAK1. V této dráze dochází k fosforylaci IKK α a následnému vzniku heterodimeru p52/RelB. Výsledkem je nejen inhibice aktivace genů, jejichž prozánětové produkty se uplatňují během akutní fáze, ale i konstitutivní tlumení genů pomocí lokální metylace CpG DNA (259, 260). Nekanonická dráha aktivace NF- κ B se pravděpodobně uplatňuje při navození endotoxinové tolerance, kterou je možné pozorovat např. u septických pacientů. V období akutní fáze dochází po stimulaci TLR4 k aktivaci jak p50/p65, tak p52/RelB, přičemž odpověď zahrnující p50 převládá. Časem ale nabývají převahy proteiny, které jsou zahrnuty v inhibičních mechanismech potlačujících zánět. Zřejmě v této fázi dochází k významné aktivaci alternativní dráhy, kdy RelB za účasti histon H3 lysin metyltransferázy G9a iniciuje tvorbu fakultativního heterochromatinu v oblasti *tnf- α* a *il-1 β* promotoru (259, 261).

TRAF3 se účastní také aktivace kináz TBK1 a IKK- ϵ , které fosforylují faktory IRF3 a IRF7. Výsledkem jejich účinku je transkripce genů kódujících typ I interferonů (262, 263). Tato MyD88 nezávislá dráha je využívána TLR4 a TLR3 (264-266).

TLR aktivace a signální dráha je negativně regulována na mnoha úrovních. Jedním z mechanismů regulace je existence MyD88s; varianty adaptorového proteinu, jejíž exprese monocyty je indukována LPS. MyD88s postrádá prostřední doménu, která odděluje C-terminální TIR a N-terminální DD doménu (267). Vytvářením heterodimerů MyD88s-MyD88 namísto homodimerů MyD88-MyD88 je sice stále přes DD doménu přitahován IRAK1 ke komplexu, ale

nedochází k jeho fosforylaci pomocí IRAK4, který není schopný správné interakce s heterokomplexem. Důsledkem je neschopnost aktivovat NF- κ B a tedy neodpovídavost na přítomnost LPS. Zajímavým faktem je, že v případě signální transdukce IL-1R, kdy je rovněž využíván adaptorový protein MyD88, přítomnost MyD88s varianty stále vede k aktivaci JNK signální dráhy a AP-1 regulovaných genů (268).

Dalším příkladem negativní regulace TLR je TRIM30 α , k jehož indukci dochází při aktivaci TLR. TRIM30 α interaguje s komplexem TAB2-TAB3-TAK1, aby podpořil degradaci TAB2 a TAB3 a zabránil tak aktivaci NF- κ B (269). Signální dráha může být ovlivněna i povrchovými receptory. Vychytávací receptor CD204 interaguje s TRAF-C doménou TRAF6 a brání tak dimerizaci a ubikvitinaci TRAF6. Proto nepřítomnost receptoru CD204 koreluje se zvýšenou sensitivitou k endotoxinu (270).

SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3) je příkladem možnosti regulace genů, aniž by byla ovlivněna TLR4 signální dráha. SOCS3, který je indukován IL-6 a IL-10 v přítomnosti LPS, se váže na SOCS3-binding site (Y759F) na gp130 a brání signalizaci po vazbě IL-6 na receptor. Signální dráha IL-10 však ovlivněna není. U myši s mutací Y759F nebo knockoutovaným genem pro SOCS3 je produkce TNF- α vyvolaná LPS potlačena nejen IL-10, ale také IL-6, jehož signalizace není blokována. Tyto myši jsou odolné proti šoku vyvolanému endotoxinem (271).

1.5.2 Exprese TLR2 a TLR4

TLR jsou exprimovány na rozmanitých buňkách. Jaké TLR jsou exprimovány na kterých buňkách se může lišit i u různých subpopulací. Například lidské naivní B lymfocyty se od paměťových B lymfocytů v periferní krvi liší absencí exprese TLR4 a TLR9 (272, 273). Tento rozdíl však neexistuje mezi naivními a paměťovými B buňkami v germinálních centrech v lidských tonsilách (274). TLR2 a TLR4 jsou exprimovány na lidských myeloidních dendritických buňkách, zatímco plazmacytoidní dendritické buňky exprimují TLR7 a TLR9 (275). Rozdíl je rovněž v expresi TLR mezi nezralými a zralými dendritickými buňkami (276). TLR2 a TLR4 jsou exprimovány nejen na monocytech, ale i na granulocytech, třebaže denzita je mnohem nižší (277). Lidské epiteliální buňky tlustého střeva exprimují TLR3 a v menší míře také TLR2 a TLR4 (278). Epiteliální buňky renálních tubulů nesou TLR2, TLR4 a pravděpodobně exprimují i TLR5 (279, 280). Lidské hepatocyty nesou TLR4 jak na buněčném povrchu, tak intracelulárně lokalizované (281). TLR4 a TLR 2 byly detekovány na lidských kardiomyocytech i na endoteliálních buňkách aorty (282-285).

1.5.3 Funkce TLR2 a TLR4

Hlavní funkcí TLR je identifikace signálů DAMP a PAMP a indukce zánětu a aktivace adaptivní imunity. Ve většině případů je podporována diferenciací Th1 populace. To probíhá tak, že nejprve po spuštění TLR signálních drah v antigen prezentujících buňkách dochází k výrazné produkci prozáněťových cytokinů jako IL-6 a TNF- α a ke zvýšení exprese adhezivních a aktivačních povrchových molekul. V tomto vhodném cytokinovém prostředí za účasti povrchových molekul a při současné prezentaci antigenu jsou aktivovány Th buňky. Th1 odpověď je pravděpodobně závislá na aktivaci MyD88 signální dráhy, protože myši s deficiencí nebo poruchou v adaptorovém proteinu MyD88 nejsou schopné generovat Th1 odpověď (286, 287). Nicméně byly publikovány práce, kde se ukazuje, že MyD88-závislá signální dráha je potřebná také k Th2 odpovědi. Roli v převaze aktivace Th1 nebo Th2 patrně hraje vstupní cesta, dávka a typ TLR agonisty, např. nízké dávky LPS nebo LPS podaný v inhalační formě vede k Th2 odpovědi; TLR2 a TLR5 agonisté spouštějí Th2 odpověď. Th2 odpověď by přitom neměla být automaticky spojována s náchylností k alergické reakci. Th2 subpopulace podporuje produkci IL-10 a zvyšuje aktivitu T regulačních buněk, které mají příznivý vliv na útlum zánětu, alergických nebo autoimunitních projevů. Naopak několik studií dokládá, že indukce typu I interferonů přispívá k rozvoji autoimunitních onemocnění přes stimulaci Th17 populace (286, 287).

TLR2 a TLR4 jsou proteiny nezbytné pro ochranu před invadujícími patogeny. U myšího modelu sepse jsou výsledky studií inhibice TLR2 nebo TLR4 anebo disrupce signalizace přes MyD88 rozdílné, pravděpodobně hlavně z důvodu, že experimenty byly prováděny na různých kmenech myší, v odlišných schématech, sledovaly odlišné patogeny v rozmanitých tělních lokalitách a MyD88 signální dráha byla blokována u různých buněk nebo byl použitý kmen myší s podmíněným vyřazením genu pro MyD88 (288, 289). Průkazně TLR2 a TLR4 ovlivňují vznik ischemicko-reperfuzního poškození, ke kterému dochází např. při infarktu myokardu, mrtvici, transplantacích nebo kardiokirurgických operacích s použitím kardiopulmonálního bypassu. Inhibice signalizace TLR2 a TLR4 vedla ke snížení ischemicko-reperfuzního poškození u myšího modelu (290).

1.6 Fas (CD95)

1.6.1 Charakteristika Fas receptoru

Existence Fas receptoru (dále jen Fas) a jeho souvislost s buněčnou smrtí byla popsána už v roce 1989, kdy byla experimentálně navozena apoptóza nádorové linie B buněk pomocí monoklonální protilátky rozpoznávající tento receptor (291). Samotné jméno Fas, „Factor activating

exoS“, se objevilo později a v současnosti tento protein nese několik názvů označujících tutéž molekulu: v CD systému je mu přiřazeno pořadí CD95, bývá označován jako „apoptosis antigen“ (Apo-1) nebo „death receptor 2“ (DR2), a protože patří do rodiny TNF receptorů, má také název „Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6“ (TNFRSF6) (292-294). Gen pro Fas je umístěn na chromozómu 10q24.1 a kóduje devět exonů (295, 296). Fas je tvořen třemi extracelulárními doménami, hydrofobní transmembránovou doménou a cytoplazmatickou doménou zodpovědnou za signalizaci. Právě homologie v extracelulárních doménách, které jsou bohaté na opakující se cysteiny, řadí Fas do rodiny TNF receptorů. Kterýkoliv člen této rodiny má od dvou do šesti typických extracelulárních domén a homologie mezi jednotlivými členy dosahuje 25 % (297). V rámci TNF-R rodiny existuje podrodina „death“ receptorů (DR), kam patří šest členů, včetně Fas: DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 a DR6. DR se v literatuře objevují i pod dalšími názvy (298, 299). Přestože cysteinové domény jsou charakteristické pro všechny členy TNF-R rodiny, specifická vazba mezi receptorem a ligandem spočívá právě v této oblasti. Všechny tři domény Fas se účastní vazby ligandu – FasL. Podobně jako u TNF-R1-TNF vazba trimetru FasL nebo specifických protilátek vede k agregaci Fas receptorů a konformačním změnám na jejich cytoplazmatickém konci (300, 301). V cytoplazmatické části receptorů se nachází několik domén. Všichni členové rodiny „death“ receptorů jsou navíc homologní v oblasti „death“ domény (DD) (299).

1.6.2 Exprese Fas

Fas existuje v glykosylované (45-52 kDa) i neglykosylované formě (35 kDa) a je přítomen na membráně buněk v lipidových raftech i mimo ně. Nachází se volný, ale i v preasociované podobě (přibližně 110 a >200 kDa), po vazbě ligandu homotrimerizuje (292, 293, 302). Právě deglykosylace Fas ovlivňuje pozitivně redistribuci Fas do glykosfingolipidových mikrodomén lipidových raftů a agregaci receptoru. Tyto procesy pravděpodobně souvisí s předcházející inhibicí fosforylace Akt kinázy a následnou aktivací apoptózy, aniž by byla nutná stimulace Fas ligandem (303-305). Jak na úrovni mRNA, tak na proteinové úrovni byla u člověka popsána existence tří variant Fas, které mají zkrácený extracelulární konec a neobsahují cytoplazmatickou část. Nejzastoupenější je dlouhá varianta, která postrádá pouze transmembránovou část molekuly kódovanou exonem šest (306, 307). Takové Fas molekuly jsou solubilní a souvisí se zánětem a autoimunitními onemocněními, protože jejich přítomnost je provázena zvýšením počtu T i B lymfocytů (308-310). Je možné, že k produkci solubilního receptoru dochází i odštěpením z membrány; experimentální důkaz však zatím předložen nebyl. sFas má zřejmě inhibující účinek na apoptózu (310, 311).

Velké množství Fas se nachází v intracelulárním kompartmentu buňky. Transportem Fas umístěného v Golgi aparátu na povrch buňky je umožněna rychlá změna povrchové exprese bez nutnosti transkripce proteinu (312, 313). Samotná exprese Fas je ovlivňována různými faktory. Na apoptotických buňkách, hepatocytech infikovaných HVC, na makrofázích, Th a Tc lymfocytech infikovaných HIV-1 je exprese Fas zvýšená. Naproti tomu na adenovirem nebo myxoma virem infikovaných buňkách, mnohých nádorových buňkách a u buněk exprimujících molekulu s adhezivní funkcí, CD44, stimulovanou fragmentovaným hyaluronanem je exprese Fas snížena (314-318).

Fas je exprimován ve velké míře i v poškozené nervové tkáni (319). Zajímavé je, že astrocyty, přestože exprimují Fas, jsou rezistentní k apoptóze po aktivaci receptoru (320). Naproti tomu neurony po ischemicko-reperfuzní události zesilují expresi Fas, který vede k apoptóze buněk a následnému poškození mozku (319). Na druhou stranu bylo zjištěno, že exprese Fas je nezbytná pro regeneraci tkáně po poškození kortexu a koreluje se schopností větvení nervových vláken (321).

U nádorových buněk dochází ke snížení exprese membránového Fas, zatímco exprese DcR3 bývá zvýšená; jsou to jedny z mechanismů zajišťujících únik pozměněné buňce před imunitním dohledem (322-325). Protože nádory jsou různorodou skupinou, tento fakt neplatí u všech nádorových buněk, naopak u gastrointestinálních stromálních tumorů byla pozorována zvýšená exprese Fas, aniž by souvisela se zvýšenou frekvencí apoptózy. Přesto jsou tyto nádorové buňky citlivé k apoptóze zprostředkované FasL. Objev by tak mohl být základem cílené léčby těchto jinak obtížně zvládnutelných tumorů (326).

1.6.3 Charakteristika Fas ligandu

„Death“ ligandy (DL) interagují s odpovídajícími „death“ receptory. Do skupiny ligandů patří kromě FasL a TNF i TL1A a TRAIL. DL se neváže pouze na příslušný DR, ale tvoří vazbu také s „decoy“ receptory. Jejich seznam obsahuje proteiny: DcR1, DcR2, DcR3 a osteoprotegerin. „Decoy“ receptory nenesou „death“ doménu a tím brání využití apoptického signálu. DcR3 chybí transmembránová oblast, a tak se na rozdíl DcR1 a DcR2 vyskytuje jen v solubilní podobě. Tento receptor soutěží s Fas o vazbu FasL a blokuje účinky jak solubilního, tak membránového FasL (327, 328). DcR3 je v rámci apoptózy regulační molekulou, nicméně jeho další úloha je při formování osteoklastů; navíc také zvyšuje resorpční aktivitu už zralých osteoklastů (329). DcR3 exprese je vysoká v nádorových buňkách nebo u pacientů s multiorgánovou dysfunkcí (328, 330).

FasL spouští apoptózu u buněk nesoucích povrchový Fas; exprese ligandu je proto striktně regulována. Ke studiu funkce FasL bylo využito *gld* myši; *gld* je autozomálně recesivní bodová mutace zahrnující záměnu T → C v blízkosti oblasti kódující C-konec FasL. Protože receptor-

vazebná doména je lokalizovaná na samotném konci C-konci FasL, v důsledku záměny fenylalaninu za izoleucin není ligand schopen vazby na Fas receptor (331-333). Výsledek je podobný jako u *lpr* mutace postihující Fas, defektní signalizace vede k lymfoproliferaci a splenomegalii (334). Gen *fasl* se nachází na chromozómu 1q23 (335). Také FasL protein najdeme v literatuře pod mnoha názvy. Objevuje pod označením CD95L, CD178, Apo/FasL nebo TNFSF6. FasL se váže na Fas receptor jako trimetr (332). N-glykosylace zvyšuje solubilitu FasL a souvisí s funkčními změnami proteinu. Velikost na membránu vázaného FasL proteinu se pohybuje od 37 kDa do 42 kDa v závislosti na stupni glykosylace. Glykosylovaný membránový FasL je odštěpován Zn^{2+} metaloproteázou a objevuje se jako sekretovaný sFasL o velikosti 23 až 26 kDa. sFas tvoří v extracelulárním prostoru trimerické komplexy, které se váží na Fas receptor. Tím, že je glykosylace lokalizovaná pouze na laterální okraj FasL monomeru, není narušena schopnost vazby mezi Fas-sFasL. Afinita vazby Fas-sFasL je ale nižší. Dříve se předpokládalo, že sFasL působí pouze na krátké vzdálenosti. Nyní se objevují důkazy, že sFasL může působit i na odlehlých místech, kde indukuje apoptózu. sFasL může však mít funkci odlišnou od membránového FasL, kdy apoptóza bude naopak inhibována (336-340).

FasL se nachází na T lymfocytech jednak během zrání, kdy je exprimován na thymocytech, a pak po aktivaci T lymfocytů (341, 342). Exprese FasL u T lymfocytů je ovlivněna glukokortikoidy. V promotorové oblasti *fasl* se nachází dva negativní GRE, které v přítomnosti glukokortikoidů potlačují expresi FasL (343). Exprese FasL je indukována i na NK buňkách po aktivaci FcγRIII/CD16 (344). U T lymfocytů a NK buněk je FasL asociován se sekundárními granulemi; tato vlastnost umožňuje rychle měnit povrchovou expresi ligandu. T lymfocyty a NK buňky jsou proto schopné v několika minutách mnohonásobně zvýšit expresi FasL (345). FasL exprimovaný T a NK buňkami se účastní likvidace virem nakažených a nádorových buněk (346).

FasL je rovněž exprimovaný aktivovanými B lymfocyty a není vyloučeno, že právě tyto buňky mají regulační roli (347).

FasL je na rozdíl od ostatních buněk myeloidní linie konstitutivně exprimován neutrofily. Má se za to, že parakrinní účinek FasL je jedním z mechanismů regulace životnosti neutrofilů, které tak podléhají spontánní apoptóze (348). Zatímco Fas je exprimovaný buňkami různých tkání, exprese FasL je přísně regulovaná. FasL ale můžeme nalézt na neuronech a astrocytech (349, 350). Existuje domněnka, že exprese ligandu v nervové tkáni chrání imunologicky privilegované orgány před aktivovanými T lymfocyty indukci jejich apoptózy po průniku přes hematoencefalickou bariéru (350). Ligand byl detekovaný i na buňkách v přední komoře oční a na nádorových buňkách, které nejsou lymfoidního původu (351, 352). V hepatocytech nemocných s hepatitidou je koexprimován cytoplazmatický FasL s receptorem Fas, který se nachází na povrchové membráně (353).

1.6.4 Funkce FasL/Fas a signalizace

Apoptóza je základní regulační proces, který má nezastupitelnou úlohu ve vývoji a odpovědi imunitního systému. K indukci apoptózy dochází vnější a vnitřní cestou. Zatímco vnější signál je rozpoznán příslušnými receptory na povrchu buňky, vnitřní apoptotický signál primárně aktivuje patologická mitochondrie. Jeden z apoptotických mechanismů, které jsou zprostředkovány TNF receptory, zahrnuje interakci Fas-FasL (354). Apoptóza probíhající po aktivaci Fas se projevuje svrašťením buňky, tvorbou měchýřků z plazmatické membrány a fragmentací DNA. Proteiny FasL a Fas mají ústřední roli při udržení homeostázy imunitního systému. Narušení této úlohy v důsledku přirozeně se vyskytujících mutací Fas proteinů vede k autoimunitním a lymfoproliferativním onemocněním (355). Pro studium role Fas *in vivo* bylo využito *lpr* a *lpr^{cg}* myši. Mutace *lpr* vede k aberantnímu rozřazení mezi exonem jedna a dva u *fas*. Jedná se o tzv. „leaky“ mutaci, kdy je stále možné detekovat minimální expresi funkčního proteinu, zatímco *lpr^{cg}* je bodová mutace zahrnující výměnu A → T v mRNA. V důsledku mutace je zaměněn izoleucin za asparagin v cytoplazmatické oblasti Fas proteinu a receptor tak není schopný signální transdukce (356-358). Obě mutace vedou k lymfadenopatii, splenomegalii a projevům připomínajícím systémový lupus erythematosus (358, 359). Výzkumem Fas-FasL signální dráhy bylo zjištěno, že tato dráha hraje nezastupitelnou roli v delecii autoreaktivních T lymfocytů, které unikly negativní selekci a vstoupily do sekundárních lymfoidních orgánů (334, 360).

Po vazbě ligandu na Fas dochází v intracelulárním prostoru k zformování komplexu proteinů, „death inducing signaling complex” (DISC), kde jsou aktivovány kaspázy (361). Výsledkem aktivace apoptotické dráhy je programová smrt buňky bez imunitní odezvy, která by jinak nastala v případě nekrózy. Bylo pozorováno, že množství zformovaného DISC komplexu závisí na typu buněk, u kterých dojde k aktivaci Fas. U typu I buněk je Fas velmi rychle internalizován a je zformováno velké množství komplexu, u buněk typu II dochází k formaci menšího množství, ale proces je amplifikován zapojením mitochondriální dráhy. Přestože u obou typů buněk dochází k aktivaci mitochondrií, které iniciují fragmentaci DNA, v prvním případě apoptóza není ovlivnitelná přítomností inhibitorů apoptózy z rodiny Bcl-2, zatímco u druhého typu buněk výsledek procesu závisí na změně membránového potenciálu v důsledku translokace proapoptotického proteinu Bid z Bcl-2 rodiny. Apoptóza v druhém případě může být odvrácena zesílenou expresí Bcl-2 nebo Bcl-x_L (362-364). Podle novějších dat se nicméně zdá, že stimulace Fas bez internalizace FasL-Fas neinicuje formaci DISC a vede k aktivaci signálních drah odlišných od apoptotických (365). Proces internalizace FasL-Fas je klathrin mediovaná endocytóza, která závisí na přítomnosti aktinu (366, 367). F-aktin se podílí také na formaci DISC komplexu (367).

Indukce apoptózy není u všech DR-DL členů spojená s internalizací receptoru a ligandu; u TNF-R1-TNF α , β je internalizace nezbytná k tvorbě DISC, u DR4-TRAIL a DR5-TRAIL nikoliv (368).

Aby vůbec došlo k signalizaci, je nutná konformační změna v cytoplazmatické části Fas po vazbě FasL. Poté je exponována DD doména. Všechny DR receptory a tedy i Fas využívají adaptorového proteinu FADD, „Fas-associating protein with a novel death domain protein“. FADD nese jednak DD doménu, homologní s DD doménou DR receptorů, a na N-konci DED doménu, „death effector domain“ homologní k DED inaktivní kaspázy-8 a -10. Tak jako spolu interagují DD domény receptoru a FADD, tak posléze interagují i DED domény FADD a kaspázy-8 nazývané také FLICE, „FADD-like ICE“. Inaktivní proenzym FLICE je autokatalytickým zpracováním přeměněn na heterotetramer – aktivní kaspázu-8 (369-372). Jeho funkce je modulována enzymaticky inaktivním homologem kaspázy-8, c-FLIP, který je součástí DISC, a vyskytuje se ve dvou podobách. Krátká varianta c-FLIP_S obsahující pouze dvě opakování DD domén. c-FLIP_S má kompletně inhibující účinek na aktivaci prokaspázy-8. Stejně tak nízká hladina dlouhé varianty c-FLIP_L v DISC komplexu inhibuje aktivaci prokaspázy. Naproti tomu zvýšená hladina c-FLIP_L zvyšuje štěpení prokaspázy-8 a podporuje apoptózu (373, 374).

Přestože se původně mělo za to, že pouze DD doména FADD interaguje s Fas, je pravděpodobné, že i DED doména se účastní vazby receptoru (375). Do signální dráhy může být zapojen také adaptorový protein TRADD, „TNF-R1-associated death domain protein“, obvykle využívaný TNF-R1. TRADD váže Fas a následně pak FADD za využití DD domén. Dalším krokem je aktivace kaspázy-8. Iniclace apoptózy ale může probíhat i alternativním způsobem, kdy se nezapojuje FADD, zato dochází k translokaci TRADD do jádra. TRADD totiž obsahuje sekvenci pro nukleární import a export, která umožňuje proteinu pohyb mezi jádrem a cytoplazmou. K iniciaci apoptózy pak dochází jednak mechanismem nezávislým na kaspázách, ale i mechanismem zahrnujícím vytvoření apoptozómu a aktivaci kaspázy-9 (376).

Protein FADD není spjatý pouze s apoptózou, ale také s aktivačním signálem (377). Nejznámějším příkladem je proliferace T lymfocytů po aktivaci Fas receptoru. O tom, zda bude po stimulaci Fas následovat apoptóza nebo aktivace transkripčního faktoru NF- κ B a ERK1/2, pravděpodobně rozhoduje poměr mezi kaspázou-8 a cFLIP, který se kompetitivně váže na FADD a slouží tak jako inhibitor kaspázy-8 (378, 379).

Expres Fas není vyhraněna jen buňkám imunitního systému. Buňky mnohých tkání ať už konstitutivně nebo inducibilně exprimují Fas, a to dokonce různě sekundárně modifikovaný v závislosti na okolních podmínkách (380). Přítomnost Fas byla prokázána v srdeční tkáni i ovariích (381). Vysoká exprese Fas byla prokázána na hepatocytech u pacientů s hepatitidou (353). Přestože v tomto případě má Fas proapoptotickou úlohu, hraje v rámci organismu i významnou roli nesouvisející s apoptózou. Takovým důkazem je experiment s jaterní tkání neschopnou exprimovat

Fas. Hepatocyty konstitutivně exprimují vůbec největší množství povrchového receptoru. Nepřítomnost Fas na hepatocytech zabraňuje regeneraci jater po částečné hepatektomii (382). Jiným příkladem je delece Fas na T lymfocytech. Bylo ověřeno, že Fas se uplatňuje při proliferaci T lymfocytů a fibroblastů (377). Delece Fas na lymfocytech pak ústí v lymfopenii (383).

Fas iniciuje signální dráhy nesouvisející s apoptózou. Tyto signální dráhy aktivují NF- κ B a ERK1/2 (384). Kromě toho Fas indukuje další mechanismus, který je zprostředkovaný signalizací FasL. Tento proces je označován jako reverzní signalizace („reverse signaling“). Také reverzní signalizace může být jedním z důvodů, proč Fas a FasL jsou důležitými hráči při neuroprotekcii, neuroregeneraci i jaterní regeneraci (321, 385, 386). Reverzní signalizace může také být důvodem, proč jsou informace o funkci FasL na T lymfocytech konfliktní. Zatímco v některých studiích bylo zjištěno, že ligand působí jako kostimulátor maturace thymocytů a proliferace T buněk, jiné studie hovoří o inhibiční roli FasL (341, 387, 388). Navíc je možné, že reverzní signalizace může spouštět různé signální dráhy a výsledek signalizace je pak naprosto odlišný.

Intracelulární část FasL může být po uvolnění extracelulární části také odštěpena. Štěpení cytoplazmatické části se pravděpodobně účastní proteázy ADAM10 a SPPL2a. Samotný intracelulární fragment FasL je poměrně málo stabilní, přesto je translokován do jádra, kde inhibuje transkripci některých genů (388, 389).

Zatímco u hepatitidy je funkce Fas-FasL jasně spojená s apoptózou, jinak je tomu u zdravé jaterní tkáně nebo v případě nádorově pozměněných buněk. Expres FasL na nádorových buňkách může vyvolat různou odpověď, patrně v závislosti na typu nádorové tkáně. Fas-FasL spouštějící apoptózu u lymfocytů zajistí únik transformovaných buněk před dohledem imunitního systému; Fas-FasL indukující prozánětovou odpověď umožní produkci proteinů, které často mají i funkci růstového faktoru podporujícího růst nádoru (351). Anebo Fas může mít přímo funkci růstového faktoru (reverzní signalizace). Práce Chen a kol. (2010) naznačuje, že schopnost Fas indukovat proliferaci buněk po vazbě ligandu souvisí s růstem a progresí nádoru (390).

Inhibice signalizace Fas-FasL byla zkoumána nejen pro možnost ovlivnění nádorových onemocnění. Bylo zjištěno, že tyto dva proteiny pravděpodobně ovlivňují i vývoj septického stavu a inhibice signalizace může vést k vyššímu přežití (391).

1.7 Interleukin-10 (IL-10)

1.7.1 Charakteristika IL-10

IL-10, dříve označován jako „cytokine synthesis inhibitory factor“, CSIF, je obecně považován za cytokin s imunosupresivním a protizánětovým účinkem (392, 393). Protein je

poměrně malý, velikost dosahuje 18,5 kDa. Gen pro IL-10 je umístěn na chromozómu 1q31–q32 a je tvořen pěti exony a čtyřmi introny (394). Přirozeně se IL-10 vyskytuje ve formě homodimeru, podobně jako IFN- γ , se kterým sdílí i značnou strukturní homologii (395-397). Monomerní IL-10 je tvořen šesti α -helixy (A-F, A'-F'). A, C, D, F' (A', C', D', F) vytvářejí svazky, v jejichž jádru jsou lokalizovány pouze hydrofobní části molekul (asi 86 % všech hydrofobních zbytků molekuly IL-10). Dva monomery IL-10 jsou spojeny v místě helixů E, F (E', F') (398). IL-10 se váže na IL-10 receptor, IL-10R, pouze jako homodimer. Překvapivě lidský rekombinantní rIL-10, který je monomerní, si stále uchovává biologickou aktivitu, i když se váže na receptor s přibližně 60x nižší afinitou (399). Mezi lidským, myším, potkaním, prasečím a hovězím IL-10 byl prokázán vysoký stupeň homologie v sekvenci nukleotidů a aminokyselin (400-402). Účinek IL-10 odlišných druhů nemusí být zachován. Rozdíly mohou být dány nejen přítomností odlišných epitopů, ale také samotnou velikostí molekuly, která není schopna interakce s receptorem odlišného živočišného druhu a tak nedochází k signalizaci (394, 403). Lidský hIL-10 (18,5 kDa) neobsahuje na rozdíl od myšního mLIL-10 (35 kDa) sacharidové struktury. N-glykosylace na N-konci mLIL-10 ale není nezbytná k zachování funkce cytokinu, protože hIL-10 vykazuje supresivní účinek na myší monocytů. mLIL-10 tento účinek pak na lidské monocytů nemá (394, 404).

ORF genomů EBV, CMV a parapoxviru kóduje proteiny sdílející s IL-10 přibližně 73 %, 84 % a 27 % sekvenční homologii, (podle pořadí jmenovaných virů) (403, 405, 406). Tyto virové homologie (vIL-10) rovněž vedou k potlačení produkce prozáněťových cytokinů, snižují expresi adhezivních a kostimulačních molekul, snižují expresi MHC a potlačují zrání a funkci dendritických buněk. hIL-10 však tento primárně supresivní účinek vykazuje u myeloidních buněk, zatímco B lymfocyty, Tc lymfocyty, thymocyty a žírné buňky jsou stimulovány. Naproti tomu ebvIL-10 sice stimuluje proliferaci a diferenciaci B buněk, včetně produkce imunoglobulinů, nicméně nepodporuje současnou proliferaci thymocytů ani žírných buněk, ani expresi MHC II B buňkami. Navíc inhibuje produkci IL-2 Th buňkami. cmvIL-10 je svým účinkem bližší lidskému IL-10, rozdíl je ve výrazné supresi funkce dendritických buněk. Je nasnadě, že vIL-10 jsou přizpůsobeny potřebám konkrétního viru a zajišťují výhody v přežívání a šíření virových částic (407).

ebvIL-10 homologní protein, který je exprimovaný pouze v lytické části cyklu EBV, je kódován genem neobsahujícím introny a existuje hypotéza, že EB virus získal gen ještě od savčího předchůdce myši a člověk (394, 400, 408). Původ genu pro vIL-10 však může být u různých virů odlišný. Rovněž poxvirus neobsahuje ve svém genu pro vIL-10 introny (406), zatímco cytomegalovirový gen nese dva redukované introny (405). Homolog IL-10 se pak vyskytuje i u dalších herpes virů (409). Virové proteiny IL-10 se sice váží téměř stejnou (CMV) i s mnohem nižší (EBV) afinitou, než se váže IL-10 na IL-10R1, ale kvalitativně vykazují podobný účinek (394, 410).

Aktivita virových IL-10 homologů je stejně jako u IL-10 zcela závislá na expresi IL-10R1 a neutralizující protilátky proti-IL10R1 vedou k inhibici účinku (405, 411).

Molekulárním klonováním bylo objeveno několik dalších proteinů, které podobně jako virové homology sdílejí s IL-10 sekvenční homologii; ta u těchto proteinů dosahuje přibližně 25 %. Patří zde IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (MDA-7) a IL-26, dříve označovaný jako AK155 (412-418).

Gen pro IL-10 vykazuje polymorfismus ve dvou oblastech mikrosatelitu bohatých na cytosin a adenin (CA)_n. Další polymorfismus je dán bodovými mutacemi (SNP) v místě promotoru: -1082 (G/A), -819(C/T), and -592(C/A) (419, 420). -1082 A/G polymorfismus se projevuje vyšší produkcí IL-10 jak u monocytů, tak T lymfocytů a může souviset s vyšším výskytem sepse (421). Roli v expresi *il-10* genu přitom zřejmě hraje různá afinita represoru transkripce, poly(ADP-ribóza) polymerázy-1 (PARP-1), k SNP na -1082 pozici (422). Výsledky různých klinických studií jsou nicméně protikladné a je pravděpodobné, že hladina IL-10 bude souviset i s variabilitou v genech pro jiné cytokiny jako je např. TNF- α (423-426).

1.7.2 Exprese IL-10

Exprese *il-10* genu u monocytů/makrofágů a myeloidních dendritických buněk je vyvolána stimulací TLR (hlavní je účast TLR2, TLR4, ale i TLR3 a TLR9 se podílejí na indukci exprese) (427-429). Nezávislá na TLR je produkce IL-10 po stimulaci „nucleotide-binding oligodimerization domain 2“, NOD2, nebo DC-SIGN anebo dektinu-1 (430-432). Ligace CD40, stejně jako přemostění Fc receptorů zvyšuje produkci IL-10 stimulovanou TLR na makrofázích (433, 434). Indukce transkripce je ovlivněná aktivací „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) dráhy, nejvýznamnější roli v produkci IL-10 přitom hraje „extracellular signal-regulated kinases“, ERK a p38 (435-438). Inhibice nebo deficience ERK vede k podstatnému snížení produkce IL-10 (437-439). Podobně inhibice p38 významně sníží hladinu IL-10 (437). Exprese IL-10 je regulována jak na transkripční, tak na postranskripční úrovni. Všudypřítomné transkripční faktory, Sp1 a Sp3, které jsou konstitutivně exprimované, mají klíčovou úlohu pro expresi *il-10* genu (440). *il-10* mRNA je konstitutivně transkribovaná v mnohých buňkách, dostupnost proteinu je ale dána posttranskripčními mechanismy zahrnujícími např. rozdílnou hladinu mikro-RNA (hsa-miR-106a) nebo přítomnost AUF1 proteinu vazajícího „A+U-rich“ element (ARE) v 3'-netranslatované oblasti *il-10* mRNA (441). Vaba AUF1 („AU-rich element binding factor 1“) na *il-10* mRNA zvyšuje rychlost degradace a určuje tak životnost této mRNA (442).

TLR indukovaná exprese IL-10 je inhibovaná účinkem IFN- γ , který blokuje MAPK dráhu a také potlačuje vazebnou aktivitu „activator protein 1“ (AP1) k *il-10* promotoru (427). Další možnost negativní regulace je zprostředkována samotným IL-10 produkovaným makrofágy. IL-10 negativně

reguluje fosforylaci p38 (443). Nicméně IL-10 je schopný i pozitivně regulovat vlastní expresi v monocytech/makrofázích a amplifikovat tak svou produkci (444, 445). Mechanismy rozhodující mezi IL-10 vlastní pozitivní a negativní regulací nejsou známy (444). Zajímavým faktem je, že IL-10 produkovaný makrofágy a dendritickými buňkami zvyšuje diferenciaci T lymfocytů v T regulační lymfocyty. Tyto Treg buňky rovněž produkují IL-10, který má následně autokrinní efekt a je tak pozitivním zpětným regulátorem diferenciaci T buněk (446-448).

IL-10 je produkován různými typy buněk, v největším množství pak monocyty, B a T lymfocyty, přičemž jak Th1, tak Th2 a Th17 populace jsou schopné produkce IL-10 (446). U myši jsou podstatným zdrojem IL-10 i neutrofily (449).

1.7.3 Charakteristika receptoru pro IL-10 (IL-10R, CD210) a signalizace

IL-10 se váže na IL-10 receptor, který je tvořen podjednotkou α (R1) a β (R2). Gen pro lidský IL-10R1 je umístěn na chromozómu 11 (11q23.3), zatímco gen pro lidský IL-10R2 se nachází na 21 chromozómu (21q22.1–q22.2) (450). IL-10R1 je větší peptid 90–120 kDa, IL-10R2 dosahuje přibližně 40 kDa. Sekvence aminokyselin je z 60 % identická u lidského a myšičího IL-10R1. Mezi lidským a myšičím IL-10R2 je identita dokonce o něco vyšší (69 %) (450). Lidský IL-10R1 je glykosylovaný a skládá se ze dvou domén (D1 a D2) propojených spojkou podobnou spojce v makromolekule gp130 (451, 452). D1 nese „WSXWS-like“ motiv, který je důležitý pro vazbu ligandu (452). Exponované smyčky, kterými IL-10R1 interaguje s ligandem, jsou označovány L1-L6 a nachází se na nich tzv. „complementary binding site“, 23 aminokyselin přímo se podílejících na vazbě IL-10. Smyčka L2 obsahuje tyrosiny, které zapadají do kapsy tvořené ohybem helixu F IL-10 molekuly. Tento ohyb, „common fold“ (IFN- γ fold) s konzervovanými aminokyselinovými zbytky, je společný IL-10 a IFN- γ , které jsou jinak strukturně značně odlišné (452).

IL-10R2, dříve CRF2-4, je rovněž složen ze dvou domén (D1, D2). Domény jsou typu fibronectin III a každá je tvořena sedmi β -listy, které jsou spojeny smyčkami, L1-L6, podobně jako v molekule IL-10R1 (453, 454). Odlišnosti smyček IL-10R1 a R2 jsou důvodem rozdílné afinity vazby ligandu mezi oběma podjednotkami (455).

Vazba IL-10/IL-10R1 je vysoce afinní. Komplex IL-10/IL-10R1 se váže na IL-10R2, který je nízko afinním receptorem (456, 457). Komplex IL-10/IL-10R1 je symetrický a obsahuje homodimer IL-10 a dvě molekuly IL-10R1 stejně jako IFN- γ receptorový komplex (396). Aby docházelo k signální transdukcii, celý membránový komplex se musí skládat ještě ze dvou molekul IL-10R2. Stabilní komplex solubilního sIL-10R1 a IL-10 je však odlišný a je tvořen čtyřmi molekulami IL-10R1 a IL-10 homodimerem (458).

Vazba IL-10 vede aktivaci s IL-10R1 asociované Janus kinázy 1 (JAK1) a k fosforylaci dvou tyrosinových zbytků na IL-10R1, které slouží jako kotevní místo pro STAT3. Další Janus kináza Tyk2 je asociovaná s IL-10R2 a katalyzuje trans-fosforylaci IL-10R1 (459). STAT3 vytváří homodimer STAT3-STAT3 nebo heterodimer STAT3-STAT1 (460, 461). STAT3 je jedním z mechanismů, které se uplatňují při inhibici indukované IL-10 u TNF- α aktivovaných genů v makrofázích. Signální dráha zahrnující STAT3 a JAK1 je zodpovědná za antiinflamatorní účinky IL-10 (462).

Obě podjednotky IL-10 receptoru patří do třídy-2 receptorové rodiny, kam jsou řazeny i receptory pro tkáňový faktor (TF), IFN- α , IFN- β a IFN- γ . Tato třída receptorů je charakteristická přítomností jedinečné sekvence cysteinů a absencí motivu WSXWS (463, 464). IL-10R1 podjednotka je exprimována na buňkách hematopoetického i nehematopoetického původu. Lidské monocyty/ makrofágy, dendritické buňky, T a B lymfocyty, NK buňky, žírné buňky, epidermální buňky, keratinocyty i fibroblasty jsou schopné exprimovat IL-10R1 (465-467). Také nádorové buňky jako například buňky melanomu nebo myelomu exprimují IL-10R1 (468, 469). IL-10R1 je téměř nedetekovatelná na neutrofilech zdravých lidí, nicméně inkubační izolovaných neutrofilů s LPS se exprese podjednotky IL-10R1 zvyšuje (470). Podobně je exprese IL-10R1 zvýšená na neutrofilech septických pacientů, zatímco exprese IL-10R2 se nemění (470, 471).

Na rozdíl od IL-10R1 je podjednotka IL-10R2 ubikvitárně exprimovaná a jako receptor využívána i jinými cytokiny. IL-10R2 tvoří receptorový komplex s IL-20R, IL-22R, IL-24R a IL-28R (415, 472-474). Komplexy těchto receptorů pak rozpoznávají více druhů ligandů, z nichž část je zařazena do samostatné podkategorie „IL-10/interferon- λ rodina“ (475). Důležitost podjednotky IL-10R2 dokazují knockoutované myši, které se sice vyvíjejí normálně a jsou fertilní, ale kolem dvanáctého týdnu věku se u nich objevuje chronická kolitida a splenomegalie, klinické příznaky připomínající IL-10 deficit u IL-10 knockoutovaných myši (476, 477).

1.7.4 Funkce IL-10/IL-10R

IL-10 působí na buňky exprimující IL-10R imunosupresivně. Supresivní účinek IL-10 je dán nejen schopností inhibovat odpověď buněk na přítomné prozáněťové cytokiny, ale i schopností tyto cytokiny vyvazovat z prostředí a celkově tak utlumit zánět (478). IL-10 inhibuje Th1 odpověď a rovněž působí tlumivě na Th2 buňky a alergickou reakci (446). Přesto u určitých populací buněk, jako jsou aktivované cytotoxické T lymfocyty, NK buňky nebo B lymfocyty, je účinek IL-10 stimulační a v některých případech, např. u buněk melanomu nebo aktivovaných B buněk anebo thymocytů funguje IL-10 jako růstový faktor (468, 479, 480). IL-10 zvyšuje expresi MHCII molekul u B lymfocytů, přestože u antigen prezentujících buněk působí právě opačně (481). Tento

interleukin je důležitým kofaktorem při proliferaci, diferenciaci B lymfocytů a dále se uplatňuje při izotypovém přesmyku (482, 483).

IL-10 ovlivňuje expresi celé řady genů (tabulka I).

Tabulka I. Geny ovlivněné IL-10

Geny se sníženou expresí účinkem IL-10	Geny se zvýšenou expresí účinkem IL-10
LPS-inducibilní geny	<i>fcγr1 (cd64)</i>
<i>il-1</i>	<i>tkáňový inhibitor metaloproteázy-1 (timp-1)</i>
<i>il-6</i>	<i>mcp-1 (monocyte chemoattractant protein-1)</i>
<i>il-8</i>	<i>ccr5</i>
<i>il-10</i>	<i>antagonista il-1 receptoru (il-1ra)</i>
<i>il-12</i>	<i>tnf-receptor 2 (cd120b, p75)</i>
<i>cyklooxygenáza-2 (cox-2)</i>	<i>socs3</i>
<i>g-csf</i>	<i>il-10</i>
<i>gm-csf</i>	
IFN-γ-inducibilní geny	
<i>cd80, cd86</i>	
<i>hla-d</i>	
<i>ip-10</i>	
<i>inos</i>	
<i>icam-1 (cd54)</i>	
Interleukin-4-inducibilní geny	
<i>hla-d</i>	
<i>fcεrIIb (cd23)</i>	
<i>il-1 receptor 1, il-1 receptor 2</i>	

Dalším proteinem, jehož expresi IL-10 indukuje, je HO-1 (484). Na indukci exprese HO-1 se podílí STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) a PI3K (fosfatidylinositol-3 kináza). Tato dráha vedoucí k expresi HO-1 je využívána nejen IL-10, ale i IL-6 (462, 485). Podíl p38-MAPK dráhy na expresi HO-1, ať v případě IL-10 nebo jiného aktivátoru exprese, je nejasný a publikovaná data jsou kontroverzní (486-489). V každém případě HO-1 (a její produkt CO) má na protizánětovém účinku IL-10 jen minimální podíl. Při použití specifického inhibitoru HO-1 Zn-II-protoporfyrin-IX není ovlivněn imunosupresivní účinek IL-10 vedoucí např. ke snížení exprese kostimulačních molekul, sekrece solubilních TNF receptorů nebo supresi produkce IL-6 (462). Nicméně role HO-1 v celkové protizánětové odpovědi není minoritní a může být zřejmě klíčová u některých stavů, jako je sepse (484).

Důležitým genem regulovaným IL-10 je *socs3* gen. Protein SOCS3 je schopný selektivně inhibovat cytokiny indukovanou JAK/STAT signální dráhu, kdy se přes SH2 skupinu váže na fosforylovaný tyrosin na gp130, inaktivuje JAK a zabraňuje tak přístupu STAT3. Na fosforylované tyrosiny IL-10R1 se SOCS3 neváže (490, 491). Výsledkem působení SOCS3 je ubikvitinace signálního proteinu a jeho degradace a tedy inhibice signalizace (492, 493). Podobně jako IL-10 i IL-6 indukuje expresi SOCS3; tento protein je tak vlastně negativní zpětný regulátor IL-6 (459, 494). Signální dráhy indukované řadou cytokinů, hormonů a faktorů jsou inhibovány SOCS3, který

je asociován s těmito receptory: Lck, FGF receptor, PYK2, receptor pro růstový hormon (GHR), erythropoetinový receptor, leptinový receptor, IGF-1 receptor, gp130. Jedná se o tyto aktivátory: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, růstový hormon, prolaktin, erythropoetin, LIF, INF- γ , INF- α , CNTF, leptin, onkostatín M, IGF-1, inzulin (492).

1.8 Interleukin-6 (IL-6)

1.8.1 Charakteristika IL-6

IL-6 tvoří 185 aminokyselin dlouhý polypeptid uspořádaný do čtyř velkých α -helikálních struktur, které se sekundárně nestáčíjí a jsou přímé (495). Polypeptid je kódován chromozómem 7p21 (496). Jako faktor ovlivňující diferenciaci B buněk (označovaný B-cell stimulatory factor 2, BCDF nebo BSF-2) byl izolován pravděpodobně už v r. 1984 (497). Že se skutečně jednalo o BSF-2, bylo potvrzeno r. 1985 dalším japonským týmem, který dokázal ověřit funkci faktoru (498). Klonování cDNA později ukázalo, že jde o stejný cytokin, který byl produkovaný fibroblasty a popisovaný jako interferon β -2. cDNA kódující IL-6 byla poprvé klonována v roce 1986 (499, 500). Nezávisle byla klonována cDNA hepatocyty stimulujícího faktoru produkovaného monocytu a růstového faktoru pro plazmocytomové/hybridomové buňky, která se pak ukázala být totožná s *il-6* cDNA (501).

Promotor *il-6* genu obsahuje místo pro vazbu transkripčního faktoru NF- κ B aktivovaného LPS (502). *il-6* gen obsahuje pět exonů a čtyři introny (503). Variabilita velikosti sekretovaného IL-6 (23 až 30 kDa) je důsledkem různé míry glykosylace a fosforylace (504-506) a souvisí s produkcí IL-6 různými buněčnými liniemi (507, 508). IL-6 patří s dalšími cytokiny, jako např. IL-10, IL-12, a růstovými faktory (erythropoetin, G-CSF atd.) do skupiny „long-chain α -helix-bundle“ proteinů. Společným rysem těchto proteinů není podobnost v sekvenci aminokyselin, pouze strukturní podobnost α -řetězce (509). IL-6 má pleiotropní účinek překrývající se s účinky jiných cytokinů a je s některými ostatními členy výše jmenované skupiny, které se vážou na gp130, řazen do rodiny „IL-6-like“ cytokinů (510, 511). Patří sem onkostatín M, LIF (leukemia inhibitory factor), neurotrofický faktor (CNTF), IL-11, kardiostrofin-1 (CT-1) a CLC (kardiostrofinu podobný cytokin). Přestože signální transdukce těchto proteinů probíhá stejnou signální dráhou, gp130/JAK/STAT, mohou vyvolávat nejen podobnou, ale i velmi odlišnou odpověď cílových buněk (509, 512).

1.8.2 Exprese IL-6

K produkci IL-6 dochází po stimulaci Toll-like receptorů, kdy následuje aktivace NF- κ B transkripčního faktoru (513). Potenciační roli má cAMP, který aktivuje řadu transkripčních faktorů

(CREB, C/EBP a AP-1) uplatňujících se při aktivaci transkripce *il-6* genu (514). IL-6 je produkován i po aktivaci buněk IL-1 β a TNF- α , ať už působících samostatně nebo v kombinaci (515). Sekrece IL-6 monocyty je vyvolána i IL-2 a na rozdíl od indukce pomocí IL-1 β není inhibována IFN- γ (516). Naproti tomu TGF- β snižuje sekreci IL-6 indukovanou jak IL-1 β , tak IL-2 (516). IL-6 je exprimován různými buňkami hematopoetického původu: monocyty/makrofágy, T lymfocyty, dendritické buňky, ale i neutrofilny jsou schopné po stimulaci LPS produkovat IL-6 (517-520). Sekrece IL-6 byla detekována i u buněk nehematopoetického původu jako jsou fibroblasty, epiteliální buňky a astrocyty (504, 521, 522). Adventicie aorty byla zjištěna jako významný zdroj IL-6 po indukci angiotensinem II (523).

1.8.3 Charakteristika receptoru pro IL-6 (IL-6R-gp130) a signalizace

IL-6 je schopný vykonávat svou funkci po navázání na příslušný receptor, který se vyskytuje jak v membránové, tak solubilní formě. Receptorem IL-6 je heterodimer složený z podjednotky IL-6R (α -podjednotka označovaná také jako IL-6R α , CD126) a podjednotky gp130 (524). Jak v případě IL-6, tak IL-6R a gp130 se jedná o desetiletí studované molekuly, přesto panují o složení receptorového komplexu dohady, patrně způsobené odlišnostmi myšího modelu a existencí virového homologu IL-6 (525). Celý aktivní komplex je pravděpodobně hexamer složený ze dvou molekul IL-6, dvou podjednotek IL-6R a dvou gp130 (526, 527). Nejprve dochází k interakci mezi IL-6 a IL-6R (Site I). Tento komplex vytváří vazebná místa (Site II) pro „cytokine binding homology region“ na gp130 (CHR, D2D3). Nakonec Site III reaguje s gp130 „immunoglobulin-like“ aktivační doménou (D1 nebo IGD), čímž je vytvořen signalizační komplex (524, 527).

Asi 100 aminokyselinových zbytků extracelulární části IL-6R tvoří Ig-podobnou doménu, která ale není nezbytná pro vazbu IL-6 (463). Namísto toho přibližně 200 aminokyselin extracelulární části vytváří doménu pro vazbu IL-6 nutnou; tato doména složená ze 4 konzervovaných cysteinových zbytků v N-terminální části molekuly a tryptofan-serin-X (jakákoliv aminokyselina)-tryptofan-serin (WSXWS) motivu charakterizuje celou receptorovou rodinu (463, 528). Motiv WSXWS zajišťuje jednak správné složení proteinu, a dále pak vazbu ligandu. Tento motiv se vyskytuje jak u IL-6R, tak u gp130 (451).

IL-6R je sice transmembránový protein, cytoplazmatické části (82 aminokyselin) však chybí motiv pro signální transdukcii. Aktivační signál o vazbě IL-6 je přenášen homodimerem gp130, u něhož dochází k fosforylaci tyrosinových zbytků v cytoplazmatické části molekuly (511). Extracelulární část gp130, konkrétně CHR (cytokine-binding homology region, D2-D3), je především odpovědná za vazbu ligandu. Právě CHR obsahuje WSXWS motiv. Dále se v tomto místě vyskytuje na prolin bohatá pantová oblast a cysteinové zbytky s charakteristicky

uspořádanými mezerami (529). Na N-konci od CHR se nachází modul (D1) se strukturou sedmi Ig-podobných vláken, na C-konci od CHR jsou tři domény (D4-D6) typu fibronektin III (530). Po vazbě ligandu se C distální část fibronektinových domén dostává do takové pozice, že je umožněna transfosforylace s receptorem asociovaných Janus kináz a tedy signalizace (531).

Vazba IL-6 podobně jako vazba IL-11 na α -podjednotku receptorového komplexu vede k homodimerizaci gp130. Tato vlastnost je dána strukturami IL-6 a IL-11, které neobsahují smyčky. Ostatní cytokiny z rodiny IL-6 díky smyčkovité struktuře své molekuly interagují s gp130 za vzniku heterodimeru (komplex gp130 a LIF-R, popř. také CNTF-R nebo onkostatín M-R) a signál není přenášen pouze gp130 molekulou (532-534). Zatímco podjednotka gp130 je běžně exprimovaná na buňkách, exprese IL-6R je mnohem více regulovaná a vyskytuje se jen na membráně leukocytů a hepatocytů. Nicméně IL-6R je produkován i jako solubilní forma, sIL-6R, kdy vzniká jednak odštěpením povrchového IL-6R (převážně z povrchu neutrofilů), ale hlavně je vytvářena z alternativně složené *il-6r* mRNA (535-538). Role solubilního receptoru spočívá ve vazbě IL-6 a následné interakci s gp130, který není součástí jiného komplexu. Proces se označuje jako trans-signalizace a umožňuje aktivaci buněk interleukinem-6, přestože neexprimují α -podjednotku receptorového komplexu (539). Tento mechanismus se uplatňuje např. při aktivaci endoteliálních buněk, které následně produkovaným IL-8, MCP-1 a zvýšenou expresí adhezivních molekul umožňují vstup neutrofilů do místa zánětu (535). Proces trans-signalizace je významný u neoplastických onemocnění a důležitost role IL-6 a IL-6R byla prokázána podáním protilátek proti IL-6 a IL-6R, kdy docházelo jak u *in vitro* experimentů tak i *in vivo* k inhibici růstu myelomových buněk (540-543).

Podjednotka gp130 se rovněž vyskytuje v solubilní formě jako sgp130 a její aktivita antagonizuje trans-signalizaci sIL-6R (544).

Po vazbě IL-6 na receptor je signální transdukce zprostředkována dvěma hlavními signálními drahami: v první dráze se účastní Jak-STAT tyrozin kinázy, v druhé ras-MAPK – mitogenem aktivované protein kinázy.

Tyroziny v intracelulární části gp130 slouží jako kotevní místo pro STAT proteiny. Vazba ligandu vede k autofosforylaci JAK kináz (JAK1, JAK2, TYK2) a k fosforylaci tyrozinů na gp130. Následně jsou fosforylovány proteiny STAT3 (STAT1). Tyrozin fosfatáza SHP2 se rovněž váže na fosforylovaný gp130 a vytváří spojkou mezi IL-6 a MAPK kinázovou dráhou (545-547).

Bylo prokázáno, že STAT3 signalizace obecně chrání před apoptózou a podporuje proliferaci buněk regulací genů, jako je *bcl-xl*, *mcl-l*, *c-myc* a *cyklin d1* (548-551). Protože aktivace STAT3 je mechanismem řídícím buněčný růst, diferenciaci a přežití, u mnohých nádorů je dysregulace STAT3 příčinou agresivního růstu a proliferace. Z tohoto vztahu také vyplývá možný podíl IL-6 na nádorovém bujení (552).

1.8.4 Funkce IL-6/IL-6R-gp130

I když byl původně objeven jako diferenciační faktor B buněk nezbytný k dozrání v protilátky produkující buňky, IL-6 ovlivňuje celou řadu dalších buněk exprimujících receptor pro IL-6 jako jsou monocyty, lymfocyty, hepatocyty, hemopoetické progenitorové buňky a nervové buňky (553-557). IL-6 má vliv na hypermetabolismus proteinů a inhibuje biosyntézu lipidů v adipocytech. Důsledkem takového účinku systémově produkovaného IL-6 (společně s dalšími proteiny z „IL-6-like“ rodiny) je indukce kachexie (558-560).

Poměrně dlouho je známo, že IL-6 se uplatňuje v počátcích zánětu, kdy indukuje v játrech sekreci proteinů akutní fáze jako je např. γ -fibrinogen nebo C-reaktivní protein (CRP). Vztah mezi IL-6 a CRP je dobře pozorovatelný v případě akutní pankreatidy, kdy IL-6 předchází CRP produkci a může být považován za časný marker závažnosti tohoto onemocnění (561). Chronicky zvýšená hladina IL-6 pak provází zánětová onemocnění jako je ateroskleróza (562). Vysoká hladina byla zjištěna i u mnohých nádorových onemocnění, kde koreluje s agresivitou nemoci a s frekvencí metastáz (563, 564). Všechna tato onemocnění do velké míry souvisí se zvýšením produkce VEGF a exprese povrchových molekul (ICAM,-1, VCAM-1, E-selektin) na endoteliálních buňkách. Výše jmenované povrchové adhezní molekuly jsou zodpovědné za migraci leukocytů přes endotel do místa zánětu (565-567). VEGF pak má nejen přímou souvislost s angiogenezí, ale pravděpodobně také s růstem a vaskularizací aterosklerotického plátu (568, 569). IL-6 rovněž vede k tvorbě ROS, které samotný zánětový proces prohlubují (570).

Diabetes typu II je onemocněním značně ovlivněné IL-6, který interferuje se signální transdukcí insulínu za normálních okolností stimulačím produkci NO přes Akt/eNOS dráhu. Protože NO je důležitý vazodilatátor s antiaterosklerotickým účinkem, jeho nedostatek se uplatňuje při vzniku endotheliální dysfunkce u nemocných s diabetem II (571-573).

Přestože zvýšená hladina IL-6 provází mnohá nádorová onemocnění, a IL-6 je považován za hlavní nádorový kachexin, paradoxně může IL-6 hrát roli i v protinádorové imunitě, protože je společně s TGF- β 1 chemotaktickým faktorem pro NK buňky (574, 575).

IL-6 má nesporný vliv na adaptivní imunitu, jednak stimuluje proliferaci T lymfocytů a produkci IL-2 T lymfocyty, a dále je zodpovědný za diferenciaci Th17 buněk a terminální diferenciaci B buněk v plazmatické buňky (576-580). IL-6 je také potřebným růstovým faktorem pro lidské myelomové a plazmocytomové buňky (581-583). I diferenciaci neuronů je patrně ovlivňována IL-6 (584).

To, že je IL-6 důležitý faktor v počátcích infekce, kdy funguje jako hepatocyty stimulační faktor, a později se uplatňuje v aktivaci adaptivní imunity, dokazují IL-6 deficientní myši, u kterých je narušena jak akutní fáze prozánětové odpovědi, tak protilátková produkce (557, 585).

Zvýšená sérová hladina IL-6 bývá nalezena v souvislosti se septickým šokem, kardiogenním selháváním, multiorgánovou dysfunkcí i jako následek chirurgického trauma, kdy koncentrace cytokinu koreluje s rozsahem poranění v důsledku zákroku (586).

2 CÍLE

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

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Soubor pacientů

Do dvou navazujících studií byli zařazeni pacienti operovaní s použitím mimotělního oběhu za účelem revaskularizace myokardu. Pacienti byli operováni v období od r.2005 – 2006, resp. v období r.2006 – 2008. Do první skupiny bylo zahrnuto 20 pacientů, do druhé skupiny 22 pacientů. Skupiny pacientů byly porovnávány retrospektivně. Všichni pacienti byli operováni stejným chirurgickým postupem s použitím stejných systémů mimotělního oběhu. Anesteziologický postup a pooperační péče se u obou skupin rovněž nelišily. Jedinou změnou v protokolu bylo vyřazení metylprednisolonu z primární náplně mimotělního oběhu u skupiny pacientů operovaných od r.2006 do r.2008. Všichni pacienti byli informováni o účelu studie, zúčastnili se dobrovolně a svou účast potvrdili podpisem. Studie byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice, Hradec Králové.

Do studie byli zařazeni pacienti, u kterých bylo operační riziko spočítané pomocí logistického EUROSCORE I menší než 5 % a kteří neužívali kortikosteroidy. Vylučovacím kritériem pro zařazení do studií byla urgentní operace, reoperace a kombinovaná operace. Rovněž pacienti s akutně probíhající infekcí, poruchou jaterních funkcí nebo funkce ledvin (kreatinin nad 130 $\mu\text{mol/l}$) a maligním onemocněním nebyli do studie zařazeni.

Tabulka II: Demografická a preoperační data

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

Věk, BMI a ejekční frakce jsou uváděny jako medián, ostatní charakteristiky jsou vyjádřeny počtem pozitivních případů (n).

3.2 Operace s mimotělním oběhem

Všechny operace byly provedeny ze střední sternotomie. Před zahájením mimotělního oběhu byl systémově podán heparin (Zentiva, ČR) v dávce 300 IU/kg s cílem udržet ACT > 480 s (Hemochron, Edison, USA). Mimotělní oběh byl zaveden pomocí kanylace vzestupné aorty arteriální kanylou (21 F, Edwards Lifesciences, Německo), pravé síně a dolní duté žíly venózní

dvoustupňovou kanylou (32 F – 34 F) a vzestupné aorty kombinovanou kanylou (vent-kardioplegie). Mimotělní oběh se skládal z membránového oxygenátoru s výměníkem tepla (Dideco Mirandola, Itálie nebo Maquet Cardiopulmonary AG, Německo), rotační válečkové pumpy (Sorin Group, Německo), kardiotoického-venózního rezervoáru a arteriálního filtru 40 µm (Dideco Mirandola, Itálie). Hadice mimotělního oběhu byly z PVC bez hemokompatibilního povrchu. Při návratu krve nebyla použita asistovaná venózní drenáž. Primární náplň mimotělního oběhu obsahovala krystaloidní a koloidní roztoky: 500 ml Hartmanova nebo Ringerova roztoku (B. Braun, Německo), 500 ml 10 % rheodextranu (dextran 40 kDa, Iho-Infusia, ČR), 80 ml 8,4 % hydrogenuhličitanu sodného, 20 ml 10 % síranu hořečnatého, 5000 IU heparinu a manitol v množství 1 g/kg váhy těla. V první skupině pacientů (r.2005–2006, „s metylprednisolonem“) bylo součástí primární náplně i 500 mg methylprednisolonu.

Operace byly prováděny v celkové normotermii s průtokem krve 2,2 – 2,4 l/m² za min a středním arteriálním tlakem mezi 55 – 75 mmHg. Po nasazení svorky na vzestupnou aortu byla do kořene aorty antegrádně aplikována studená krevní kardioplegie – St. Thomasův roztok (Sol. Thomas, Ardeapharma Ševětín, ČR) a krev v poměru 1 : 4. Kardioplegie byla opakována každých 20 min při neustálém vnějším chlazení srce ledovou tříští. Po našití distálních anastomóz, byla odstraněna aortální svorka. Centrální (proximální) anastomózy byly následně během reperfúze srdce zhotoveny za použití tangenciální (nástěnné) svorky na vzestupné aortě. Po ukončení mimotělního oběhu byl heparin vyvážen protamin sulfátem (ICN, ČR) v poměru 1 : 1. Před sešitím měkkých tkání byla drátěnými kličkami provedena osteosyntéza hrudní kosti.

3.3 Anestézie

K úvodu do anestézie byl intravenózně podán sufentanil (1 µg/kg; Torrex Pharma, Rakousko) a propofol (1 mg/kg; FreseniusKabi Deutschland, Německo). Anestézie byla udržována inhalovaným isofluranem (0,7 – 0,8 %) společně s intravenózně podaným sufentanilem (0,5 µg/kg). Svalové relaxace bylo dosaženo aplikací 100 µg/kg cisatrakuria, po celou dobu operace pak podávaným v dávce 40 µg/kg. Perioperační antibiotická profylaxe byla prováděna použitím ampicillin/sulbactam (Pfizer, Německo) podávaným těsně před operací, resp. každých 8 h po dobu 24 h.

3.4 Pooperační péče

Extubace, podání plazmy nebo erymasy proběhlo na JIP dle standardního protokolu. K extubaci došlo při obnovení vědomí a svalové aktivity, při dosažení uspokojivých oxygenačních,

ventilačních a oběhových parametrů (stabilní tlak, normální tepová frekvence, absence známek nízkého srdečního výdeje): $paO_2/FiO_2 > 150$, $paCO_2 < 50$ mm Hg, systola > 100 mm Hg, tepová frekvence < 120 tepů/min, srdeční index > 2 l/min/m², krevní ztráty < 50 ml/h, pH 7,3 – 7,5, tělesná teplota $> 35,5$ °C.

Plazma byla podána při ztrátě krve více než 250 ml/h při předpokládané nebo laboratorně ověřené deficienci koagulačních faktorů, erymasa pak byla podána při poklesu hemoglobinu pod 85 g/l. Glukokortikoidy nebyly v pooperačním období podány.

Komplikace během operace a po operaci byly definovány:

Syndrom nízkého minutového výdeje

- metabolická acidóza
- klinické projevy

Perioperační infarkt myokardu

- poruchy kinetiky myokardu (echokardiografie, EKG)
- zvýšení enzymů myokardiálního poškození (troponin T, kreatinkináza)

Akutní respirační insuficience (při FiO_2 0,6)

- neadekvátní ventilace ($paCO_2 > 50$ mm Hg)
- neadekvátní oxygenace ($paO_2 < 60$ mm Hg)

Akutní plicní poškození

- $paO_2/FiO_2 < 300$
- akutní dechová tíseň
- průkaz na RTG

Oxygenační dysfunkce

- saturace hemoglobinu kyslíkem < 90 %
- nutnost ventilace

Akutní poškození (selhání) ledvin

- diuréza $< 0,5$ ml/kg/h po dobu více než 12 h
- sérový kreatinin > 176 μmol/l

SIRS

- teplota < 36°C nebo > 38°C
- tachypnoe > 20 vdechů/min
- tepová frekvence > 90 tepů/min
- počet leukocytů < 4 x 10⁹/l nebo > 12 x 10⁹/l

Seps

- klinické příznaky jako SIRS
- průkaz mikrobiálního agens

3.5 Sběr vzorků

Krev byla sbírána z podklíčkové žíly před operací, při zavedení a ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace. V pooperačním období – první, třetí a sedmý pooperační den byla krev sbírána z brachiální žíly. Ke sběru krve byly použity odběrové zkumavky Vacutainer (BD, Velká Británie) obsahující nebo neobsahující heparin. Heparinovaná krev byla ihned využita k analýze povrchových znaků pomocí průtokové cytometrie, zatímco krev ve zkumavkách bez heparinu byla koagulována cca 1 h při pokojové teplotě. Sérum bylo odděleno od krevních elementů centrifugací 10 min při 1000 g. Poté byly vzorky séra až do zpracování zamrazeny při -80°C.

3.6 Stanovení počtu buněk

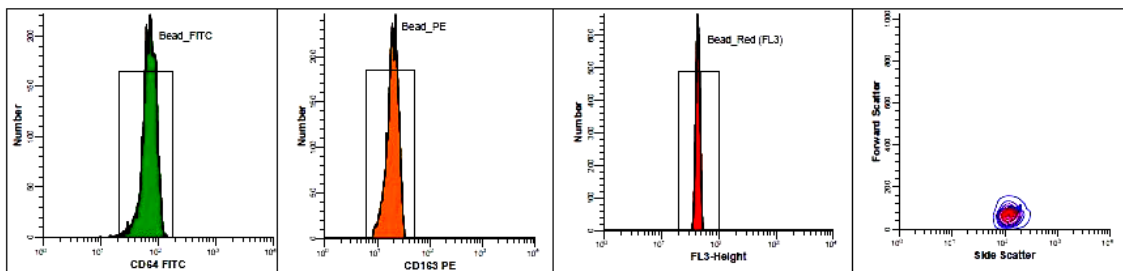
50 µl heparinované krve bylo přidáno k 450 µl Türkova roztoku a počet buněk byl spočítán v Bürkerově komůrce při 40x zvětšení. Postup byl opakován 2x.

3.7 Průtoková cytometrie

3.7.1 Kit Leuko64

Heparinovaná venózní krev (50 µl) byla 10 min inkubována s 50 µl směsi myších protilátek bez přístupu světla, při pokojové teplotě. Jednalo se o protilátky proti lidskému antigenu CD64, klon 22 a 32.2, značené FITC a antigenu CD163, klon Mac-158, značené PE. Poté byly erytrocyty lyzovány 1 ml chloridu amonného (NH₄Cl) 15 min a dále byly přidány fluorescenční kuličky (5 µl). Protilátky, lyzační roztok i kuličky byly součástí kitu Leuko64 (Trillium Diagnostics, USA). Kuličky značené FITC, PE a StarRed byly použity také ke kalibraci přístroje, čímž bylo

dosaženo intra i interlaboratorní reproducibility výsledků. Krev byla výše uvedeným postupem zpracována v nejkratším časovém intervalu po odběru a exprese povrchových znaků byla ihned měřena na průtokovém cytometru FACSCalibur (BD, USA). K analýze dat byl použit výrobcem dodaný program (QuantiCALC software, Trillium Diagnostics, USA). Jednotlivé populace leukocytů byly programem rozlišeny na základě velikosti, morfologie a odlišné exprese CD163, populace kuliček byla odlišena od buněk na základě velikosti a fluorescence StarRed, **obrázek 1, 2, 3**. Hodnoty fluorescence jsou vyjádřeny indexem vycházejícím z porovnání fluorescence kuliček a značených buněk.



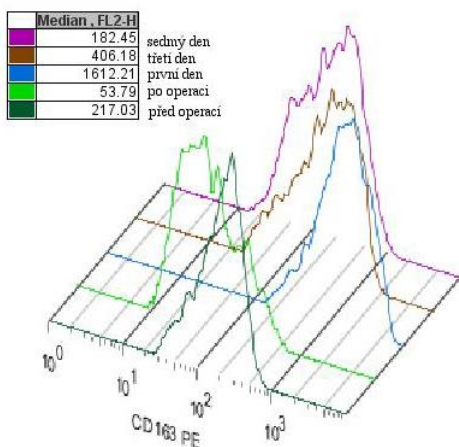
On the FS vs log SS histogram, the bead population should be positioned at the start of the third decade on log side scatter signal and at channel 85-100 on forward or low angle scatter signal (on 256 scale use channel 20-25).

The threshold to exclude platelets and red cell debris will be set on log SS using lymphocytes. The discriminator on log SS should be set just to the left of the lymphocyte population.

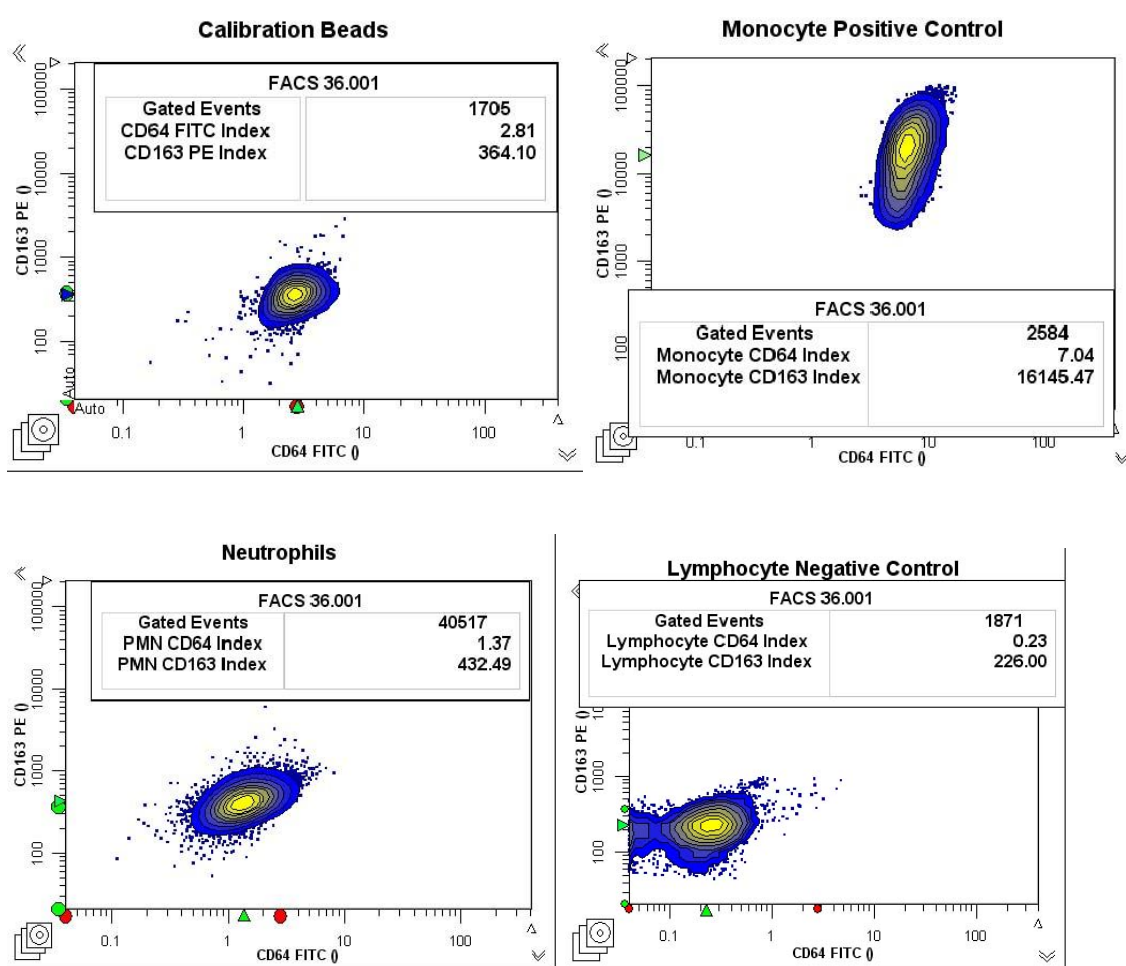
Acquisition and Storage settings should be adjusted to allow for collection of 50,000 ungated events. Setting resolution at 1024 is generally recommended, but is **required** when using Beckman Coulter Cytomics™ FC500 or BD Biosciences FACSCanto™ cytometers.

Obrázek 1: Nastavení cytometru pomocí kalibračních kuliček.

Hodnota fluorescence kuliček V každém detektoru byla nastavena dle protokolu výrobce.



Obrázek 2: Příklad změny exprese CD163 (MFI) na monocytech u pacienta operovaného s MO bez metylprednisolonu

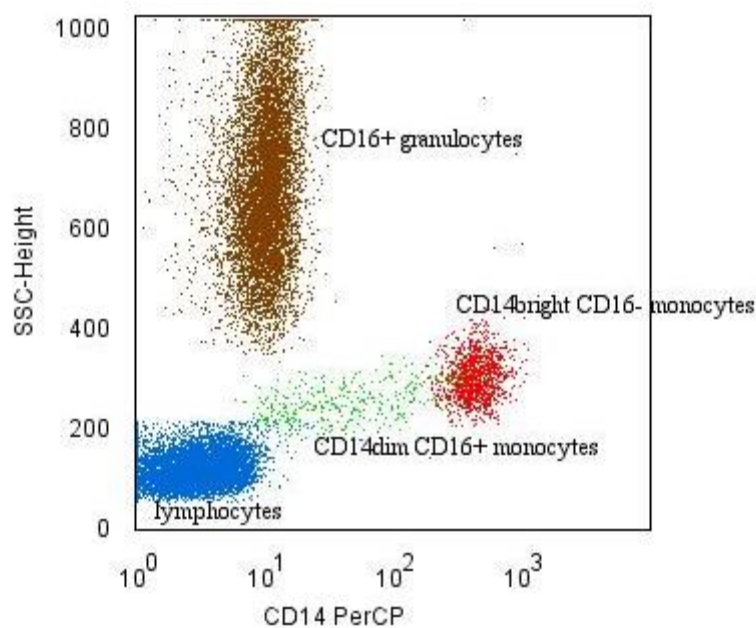


Obrázek 3: Vyhodnocení vzorku v analyzačním protokolu

Indexy fluorescence kuliček jsou stálé hodnoty. Monocyty ve vzorku slouží jako pozitivní kontrola (CD64 index > 3), zatímco lymfocyty jako negativní (CD64 index < 1). Granulocyty s CD64 indexem < 1 se vyskytují u zdravých jedinců, granulocyty s CD64 indexem > 1,5 u sepse.

3.7.2 Stanovení procenta monocytů a granulocytů

Procento monocytů bylo v populaci leukocytů sledováno pomocí myší monoklonální protilátky (IgG2b) proti lidskému antigenu CD14, klon MφP9, značené PerCP (BD, USA). Populace granulocytů byla určena podle morfologie a jako populace slabě exprimující CD14, **obrázek 4**. Inkubace 50 μ l krve s 10 μ l protilátky probíhala 15 min (bez přístupu světla, při pokojové teplotě), poté následovala 10 min lýza 200 μ l roztokem NH_4Cl (Optilyse, Immunotech, Francie) a promytí 5 min při 300 g opět při pokojové teplotě. Vzorek byl ihned měřen na průtokovém cytometru za využití programu CellQuest (BD, USA). Data naměřená u všech pacientů skupiny byla hromadně analyzována programem FlowJo (TreeStar, USA). Pro zajištění intralaboratorní reproducibility byl cytometr kalibrován kuličkami CaliBrite (BD, USA) pomocí programu FACSComp (BD, USA), **obrázek 5**.



Obrázek 4: Exprese povrchových proteinů na monocytech byla stanovena na CD14bright populaci

3.7.3 Stanovení exprese TLR2, TLR4 a CD95

Laboratorní postup a akvizice dat probíhala jako u stanovení procenta monocytů a granulocytů s rozdílem použití jiných monoklonálních protilátek, které byly přidávány k plné krvi v poměru 1:10. K detekci TLR2 byla použita myší protilátka (IgG2a) proti lidskému antigenu TLR2, klon TLR2.3, značená PE (Serotec, UK). K detekci TLR4 byla použita myší protilátka (IgG2a) proti lidskému antigenu TLR4, klon HTA125, značená PE (Serotec, UK). K detekci CD95 byla použita myší protilátka (IgG1) proti lidskému antigenu CD95, klon LT95, značená FITC (Exbio, ČR). Data byla rovněž hodnocena programem FlowJo. Exprese TLR2, TLR4 a CD95 byla vyjádřena střední intenzitou fluorescence (median fluorescence intensity, MFI), příklad – **obrázek 6**.

4-Color Lyse/Wash FACSComp Report

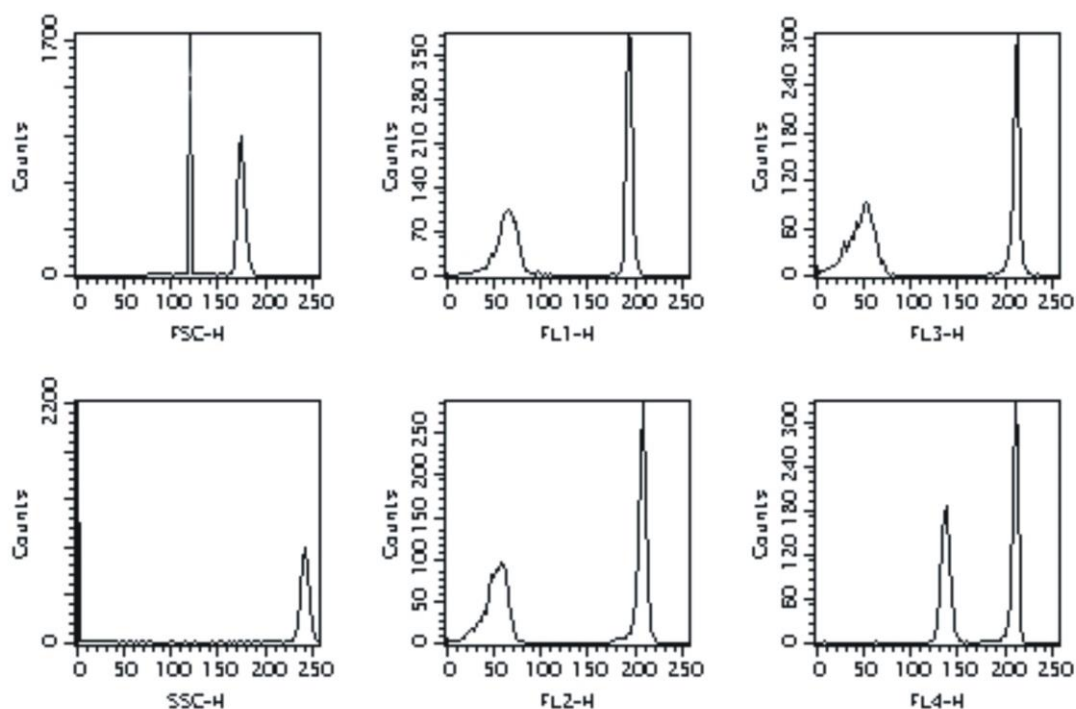
Institution: FN - UKIA Hradec Kralove
Director: Doris
Operator: Petrak

Date: Mon, Dec 7, 2009 2:14 PM
Software: FACSComp 4.2
Cytometer: FACSCalibur E5280

Parameter	High	Low	Separation	Minimum	Result	Lot ID
FSC	172	74	98	100	Fail	32764I
SSC	236	0	236	210	Pass	32764I
FL1	189	62	127	100	Pass	33392N
FL2	203	51	152	135	Pass	33797H
FL3	207	45	162	135	Pass	31257L
FL4	206	134	72	40	Pass	09073K

Parameter	Detector	Amplifier	Threshold	Blue Laser Current	6.60 Amps
FSC	E00	2.00	52	Blue Laser Power	15.05 mWatts
SSC	391	1.00			
FL1	659	Log			
FL2	581	Log			
FL3	689	Log			
FL4	728	Log			

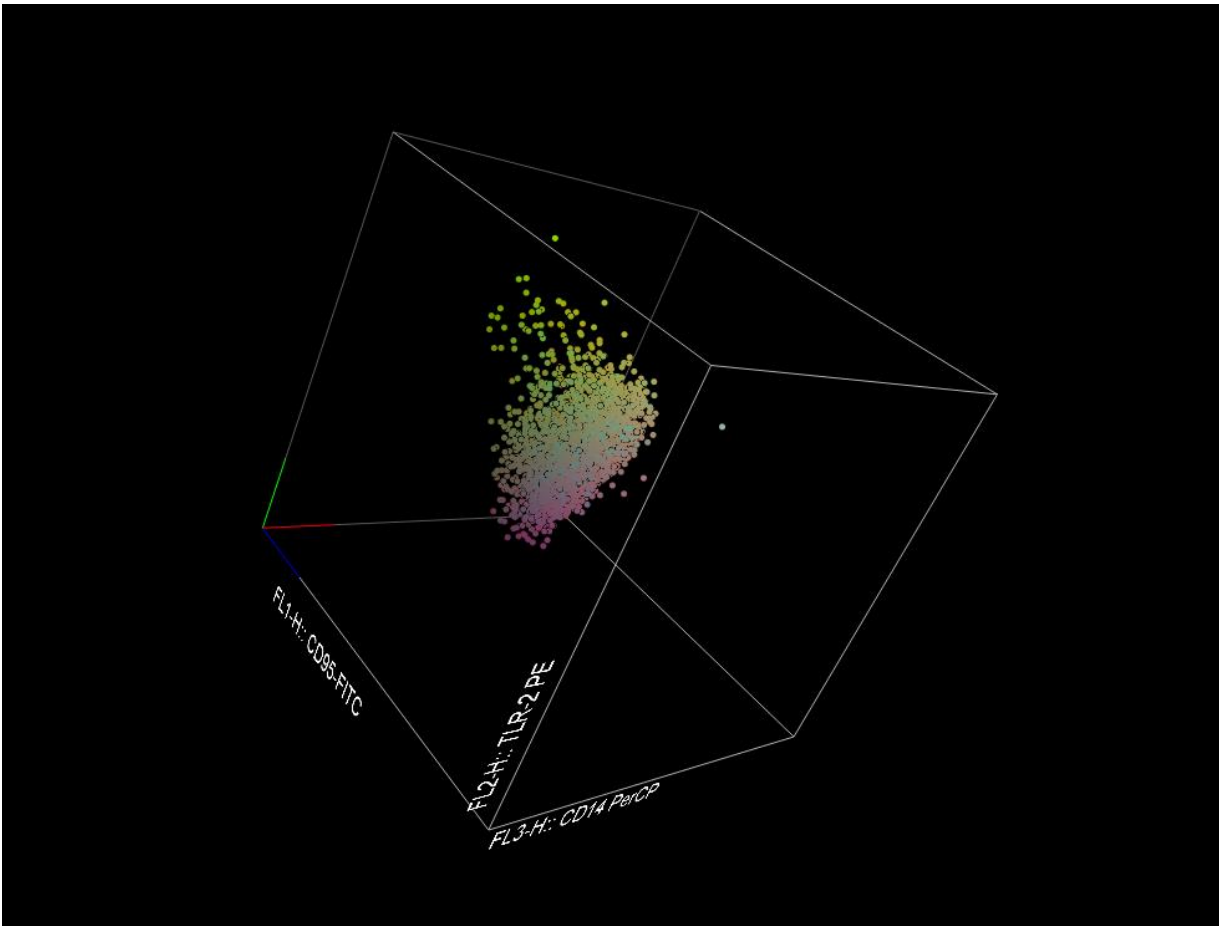
Compensation	FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2	FL3-%FL4	FL4-%FL3
	3.1	19.3	0.0	20.1	3.0	4.9



Comments:

Time Delay Calibration Passed.

Obrázek 5: Použití softwaru FACSComp ke kalibraci přístroje a zjištění přesvitu ve fluorescenčních kanálech



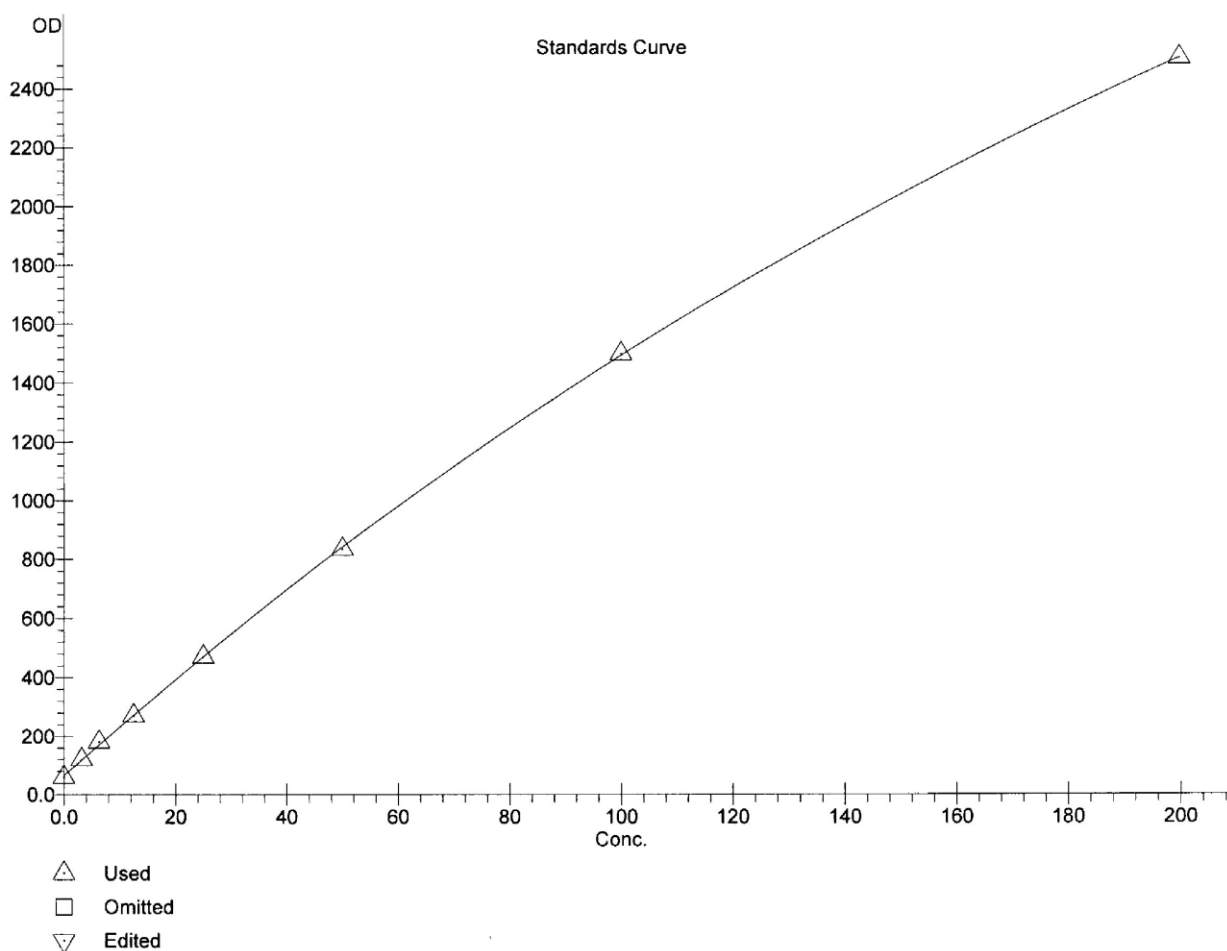
Obrázek 6: Koexprese CD14, TLR2 a CD95 na monocytech u pacienta operovaného s MO bez metylprednisolonu (třetí pooperační den)

LABSYSYSTEMS GENESIS V3.00 Results Tuesday, 12 June 2007 14:58
 Raw data filename : c:\progra~1\genlite\protocol\il6bms\1206071w.
 Processed by Protocol : c:\progra~1\genlite\protocol\il6bms.prt
 Plate layout file : c:\progra~1\genlite\protocol\il6bms.plt
 Reading type : Manual Data Entry

11-6 (1)

Raw data values (calculated):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2504.0	77.000	398.00	249.00	90.000	691.00	92.000	419.00	1768.0	152.00	2672.0	94.000
B	1498.0	578.00	149.00	2073.0	80.000	239.00	401.00	158.00	859.00	250.00	613.00	98.000
C	835.00	1985.0	81.000	517.00	139.00	168.00	1226.0	168.00	545.00	1745.0	126.00	160.00
D	470.00	218.00	605.00	158.00	1568.0	105.00	162.00	954.00	223.00	1408.0	77.000	96.000
E	271.00	172.00	873.00	53.000	495.00	649.00	397.00	1848.0	121.00	497.00	2654.0	93.000
F	181.00	64.000	139.00	87.000	346.00	1747.0	81.000	796.00	1927.0	275.00	1973.0	249.00
G	120.00	157.00	86.000	276.00	108.00	549.00	162.00	432.00	2228.0	91.000	481.00	1292.0
H	60.000	747.00	86.000	167.00	151.00	166.00	2708.0	88.000	467.00	380.00	131.00	411.00



4 parameter Logistic, Signal = B + (A - B) / (1 + (C * Conc^N))
 A = 66.414581, B = 8153.854004, C = 0.002025, N = 1.012088
 Weighted : NO; summed (residuals)² = 0.000038

Standards curve used:

STANDARD	Status	Absorb.	Conc.	Unit	%CV	Std Dev
0.000	Mean	-----	-----		----	----
3.200	Mean	120.00	3.248	Conc.	0.000	0.000
6.300	Mean	181.00	6.934	Conc.	0.000	0.000
12.500	Mean	271.00	12.433	Conc.	0.000	0.000

Obrázek 7: Standardní křivka IL-6 ELISA (pacienti bez metylprednisolonu)
 Kalibrační křivka umožňuje výpočet koncentrace IL-6 podle naměřených absorbancí (raw data values)

3.8 Enzymem řízená imunosorbentní analýza (ELISA)

IL-6 a IL-10 byly detekovány v séru pomocí ELISA kitů, BMS213/2CE a BMS 215/2CE (BenderMedSystems, Rakousko). Postup byl následující: IL-6 a IL-10 obsažené v séru byly zachyceny na vazebnou protilátkou umístěnou 96 jamkové destičce a detekovány přidáním detekční protilátky konjugované s biotinem; inkubace s séra s protilátkami probíhala 2 h na rotátoru (100 rpm) při pokojové teplotě, pak byla destička promyta a bylo přidáno HRP-streptavidin (1 h); po promytí byl přidán bezbarvý TMB substrát měnící se v přítomnosti HRP na barevný produkt (15 min, bez přístupu světla, při pokojové teplotě); reakce byla zastavena 1 M roztokem kyseliny fosforečné. Absorbance byla měřena při 450 nm spektrofotometrem Multiskan RC (Labsystems, USA) za současného použití referenčního filtru 620 nm. Data byla zpracována programem Genesis (Labsystems, USA), **obrázek 7**. Sensitivita kitu v případě IL-6 byla 0,92 pg/ml, v případě IL-10 pak 0,99 pg/ml. U protilátek nebyla zaznamenána zkřížená reaktivita s jinými antigeny.

3.9 Statistické hodnocení

K zjištění dynamiky měřených parametrů byly jejich hodnoty během operace a po operaci porovnávány s předoperační hodnotou u každé skupiny pacientů. Hodnoty parametrů v odpovídajících odběrech byly rovněž porovnány mezi oběma skupinami pacientů. V případě buněčných parametrů TLR2, TLR4, CD95 a sérového IL-6 byly hodnoty během operace a po operaci stanoveny jako procento odvozené od předoperačního odběru pro každého jednotlivého pacienta, výchozí hodnota pak byla považována za 100 %. Sjednocení sloužilo k porovnání obou skupin pacientů.

Normalita dat byla testována Shapiro-Wilksovým testem, homogenita variancí pak Levenovým testem. V rámci skupiny pacientů byla data zhodnocena buď pomocí analýzy variance pro opakovaná měření nebo Friedmanovy analýzy pro znáhodněné bloky. V post hoc analýze byl využitý buď Dunnettův test anebo Wilcoxonův test, popřípadě znaménkový test. K porovnání hodnot mezi oběma skupinami pacientů byl použitý Fisherův LSD test, jestliže v předchozím případě byl výsledek dvoucestné analýzy variance pro opakovaná měření signifikantní, anebo Mann-Whitneyův, popřípadě Kolmogov-Smirnovův test, nebyla-li splněna podmínka normality dat nebo homogenity rozptylů. Korelace byla vyjádřena Pearsonovým nebo Spearmanovým korelačním koeficientem. Demografická data, preoperační, operační a postoperační charakteristiky byly testovány t-testem, Mann-Whitneyovým U testem, Fisherovým exaktním testem a χ^2 testem. Při mnohonásobném porovnání byla uplatněna Bonferroniho korekce. Testy byly prováděny na hladině významnosti 5 %. Typ použitého testu stejně jako dosažená hladina významnosti (pokud byl

výsledek porovnání signifikantní) jsou uváděny vždy u každého jednotlivého porovnání ve výsledkové části práce. Programem použitým pro statistickou analýzu byla Statistica 9 (StatSoft, USA).

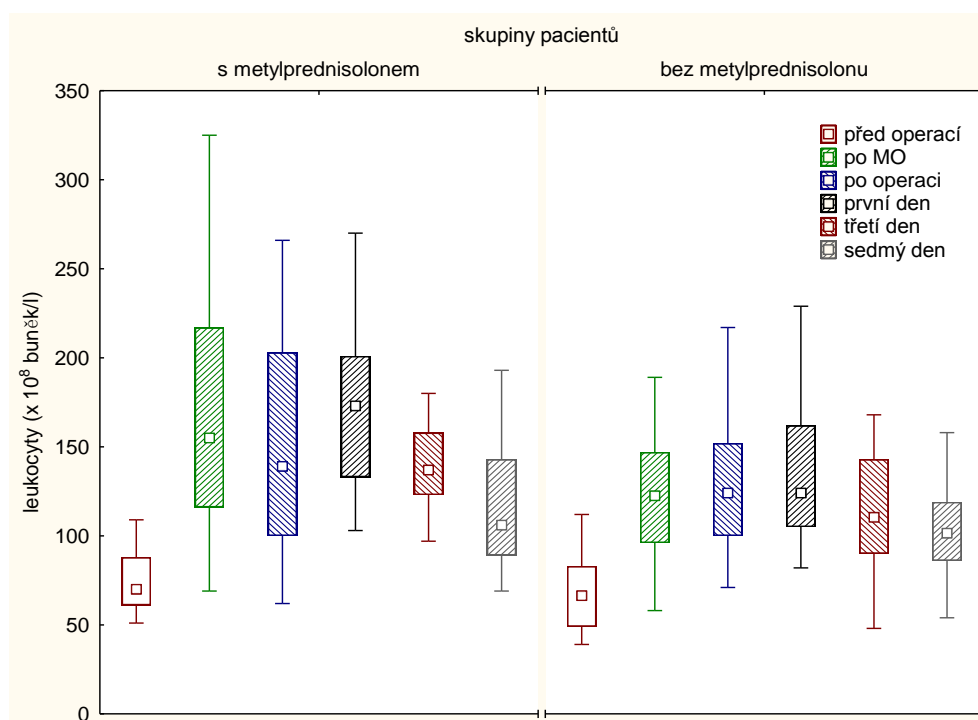
Všechny hodnoty jsou uvedeny jako mediány, není-li napsáno jinak. Grafy obsahují mediány (čtverec), kvartily (obdelník) a rozsah neodlehých hodnot (vousy). Tabulky obsahují kvartily a porovnání v rámci uvedené skupiny pacientů. Při porovnání procent odvozených od skutečných hodnot každého jednotlivého pacienta není výchozí hodnota (100 %) v grafech a tabulkách zobrazena a rozdíly v rámci skupiny nebyly statisticky testovány.

4 VÝSLEDKY

4.1 Detekované parametry

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

4.1.1 Počet leukocytů



Graf 1: Počet leukocytů v periferní krvi

Počet leukocytů byl u obou skupin zvýšený během celého období sledování (znaménkový test) kromě sedmého pooperačního u pacientů dne s metylprednisolonem, kdy nebylo toto zvýšení statisticky významné, **graf 1, tabulka 1**.

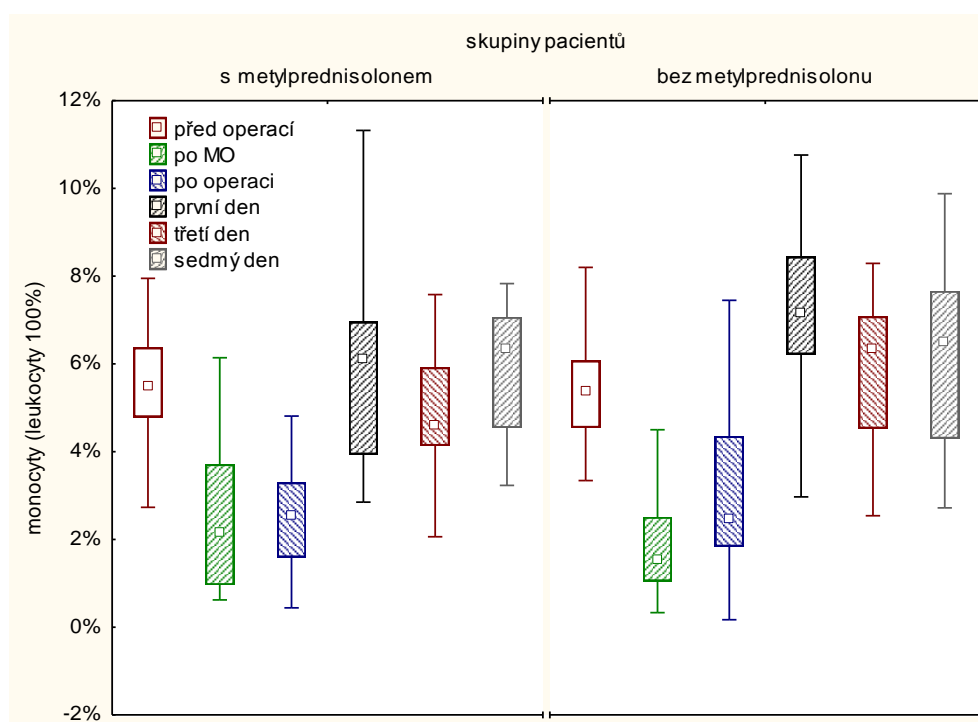
Při porovnání obou skupin byl první pooperační den u pacientů s metylprednisolonem vyšší počet leukocytů než u pacientů bez metylprednisolonu (173 vs. 124 x 10⁸ buněk/l; $p < 0,05$, Mann-Whitneyův U test).

Tabulka 1: Počet leukocytů ($\times 10^8/l$)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	61	116	100	133	123	89
	Q2	70	155	139	173	137	106
	Q3	88	217	203	201	158	143
	p	-	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01	
pacienti bez MP	Q1	50	98	100	105	90	86
	Q2	67	123	124	124	111	102
	Q3	83	146	152	159	142	119
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q) a pravděpodobnost (p), s jakou je výsledek statistického testu signifikantní.

4.1.2 Procento monocytů a granulocytů

**Graf 2:** Procento monocytů

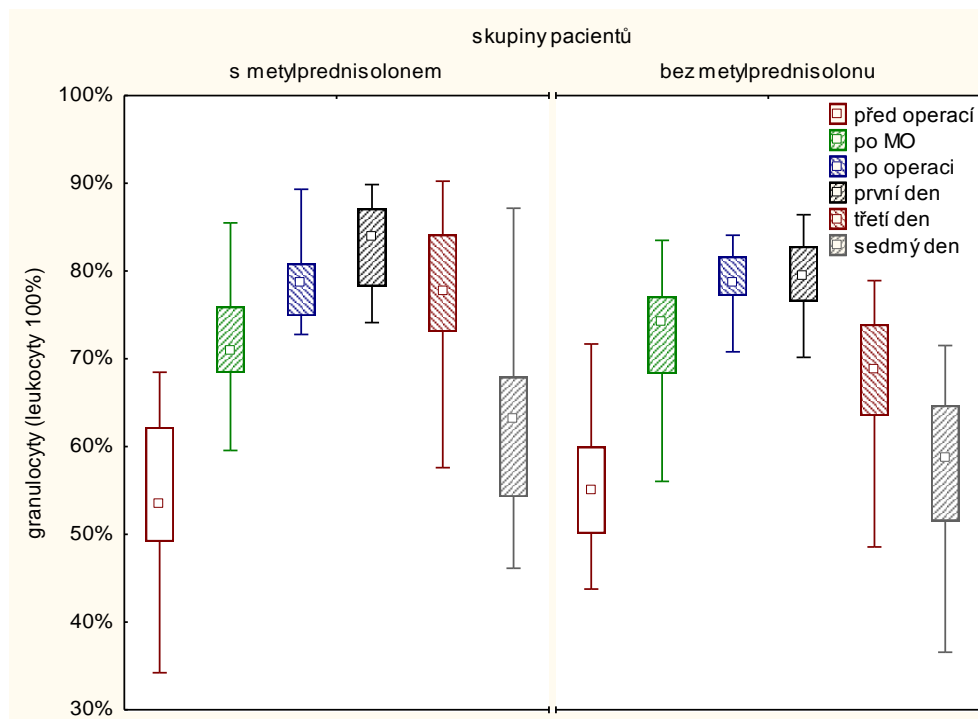
Procento monocytů bylo u pacientů s metylprednisolonem sníženo během i po ukončení operace ($p < 0,001$, Dunnettův test), **graf 2, tabulka 2**. U pacientů bez metylprednisolonu také došlo ke snížení procenta monocytů ve stejných sledovaných časech, navíc bylo ale pozorováno významné zvýšení první den po operaci ($p < 0,01$, znaménkový test), **graf 2, tabulka 2**.

Když byly obě skupiny porovnány, procento monocytů bylo významně vyšší třetí pooperační den u pacientů bez metylprednisolonu než u pacientů s metylprednisolonem (6 vs. 5 %; $p < 0,05$, Mann-Whitneyův U test).

Tabulka 2: Procento monocytů

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	4.8%	1.0%	1.7%	3.9%	4.1%	4.6%
	Q2	5.5%	2.2%	2.5%	6.1%	4.6%	6.4%
	Q3	6.2%	3.7%	3.3%	6.8%	5.8%	7.0%
	p	-	<0.001	<0.001			
pacienti bez metylprednisolonu	Q1	4.8%	3.6%	3.7%	5.5%	4.5%	5.0%
	Q2	5.7%	4.2%	4.5%	6.5%	5.9%	6.1%
	Q3	6.3%	4.6%	5.1%	7.9%	7.3%	7.4%
	p	-	<0.001	<0.01	<0.01		

Popis viz tabulka 1.

**Graf 3:** Procento granulocytů

Procento granulocytů bylo u pacientů s metylprednisolonem významně zvýšené po celé sledované období ($p < 0,001$, Dunnettův test), **graf 3, tabulka 3**. Nejvyšší procento granulocytů pak bylo naměřeno první pooperační den. U pacientů bez metylprednisolonu byla dynamika podobná s rozdílem sedmého pooperačního dne, kdy bylo zvýšení statisticky nevýznamné (znaménkový test), **graf 3, tabulka 3**.

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

Tabulka 3: Procento granulocytů

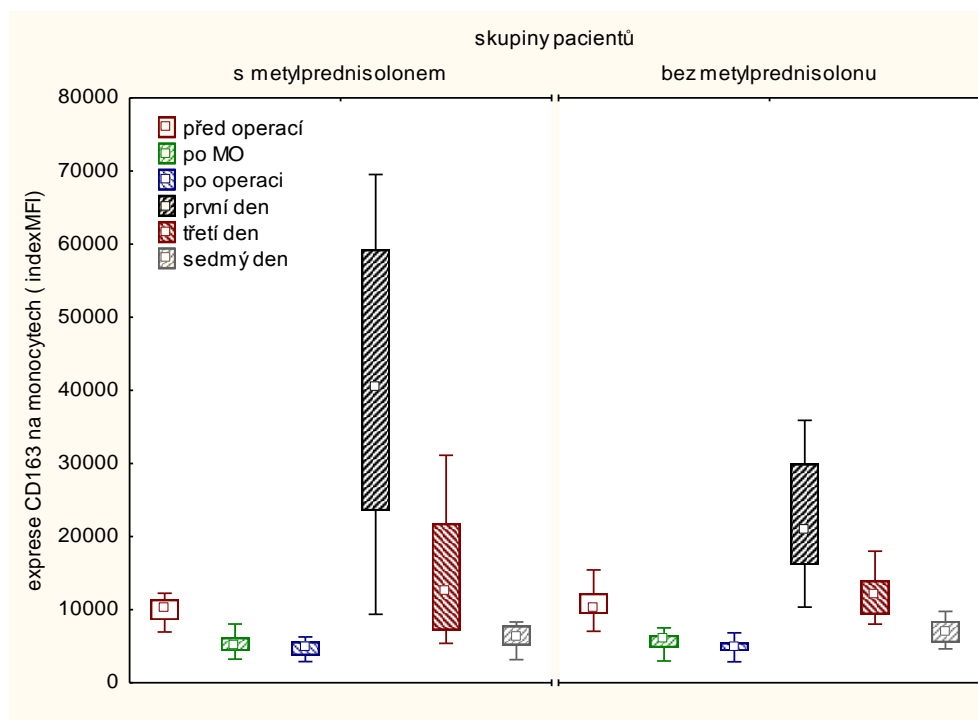
		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	50%	68%	75%	79%	73%	55%
	Q2	53%	71%	79%	84%	78%	63%
	Q3	62%	76%	81%	87%	84%	68%
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
pacienti bez metylprednisolonu	Q1	50%	68%	77%	77%	64%	52%
	Q2	55%	74%	79%	79%	69%	59%
	Q3	60%	77%	82%	83%	74%	64%
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Popis viz tabulka 1.

4.1.3 Povrchová exprese proteinů

4.1.3.1 Exprese CD163

4.1.3.1.1 Exprese CD163 na monocytech (Leuko64 kit)

**Graf 4:** CD163 na monocytech

Exprese CD163 na monocytech byla u obou skupin pacientů významně zvýšená a dosahovala maximálních hodnot první pooperační den ($p < 0,001$, znaménkový test). První pooperační den byla exprese CD163 u pacientů s metylprednisolonem zvýšená téměř 4x oproti počáteční expresi (indexMFI 40449 vs. 10272), zatímco u pacientů bez metylprednisolonu byla exprese zvýšená přibližně 2x (indexMFI 20995 vs. 10938). Naopak během operace a sedmý pooperační den došlo u obou skupin ke statisticky významnému snížení exprese CD163 (znaménkový test), **graf 4, tabulka 4**.

Rozdíl mezi oběma skupinami pacientů byl pozorován první pooperační den, kdy skupina s metylprednisolonem dosahovala vyšších hodnot exprese než skupina bez metylprednisolonu (indexMFI 40449 vs. 20995; $p < 0,05$, Mann-Whitneyův U test).

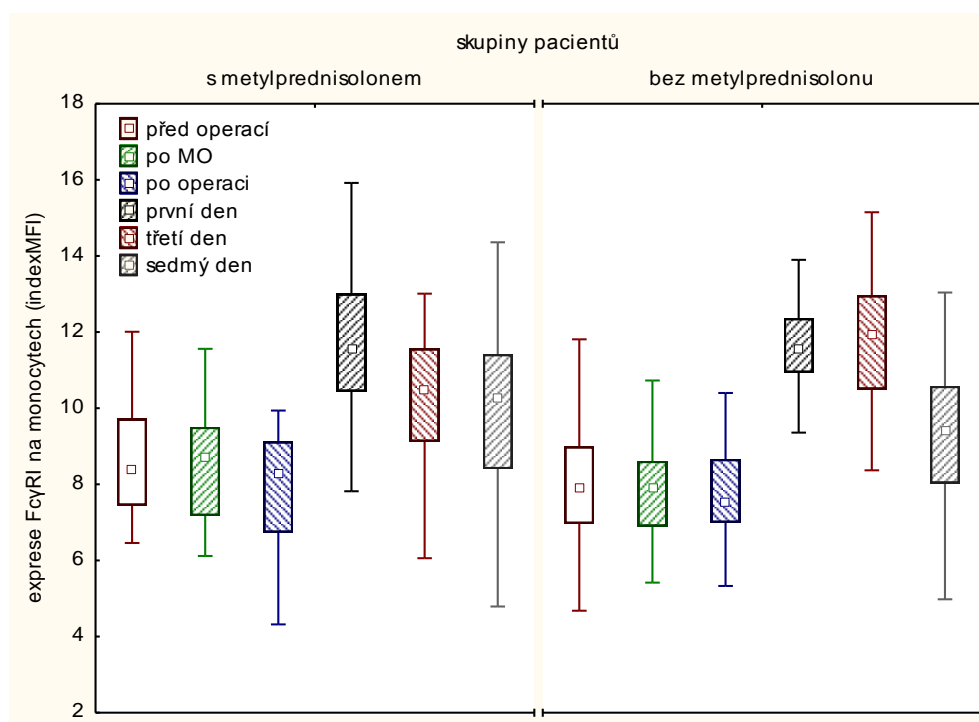
Tabulka 4: CD163 na monocytech (indexMFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	8618	4512	4053	26208	7836	5405
	Q2	10272	5172	4985	40449	12445	6268
	Q3	11321	5980	5480	58222	20299	7561
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001		<0.05
pacienti bez metylprednisolonu	Q1	9464	4989	4372	16321	9510	5653
	Q2	10138	5929	4979	20995	12140	7083
	Q3	11981	6459	5423	29623	13846	8349
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.2 Exprese FcγRI (CD64)

4.1.3.2.1 Exprese FcγRI na monocytech (Leuko64 kit)



Graf 5: FcγRI na monocytech

Expresa FcγRI na monocytech byla významně zvýšená první, třetí pooperační den a sedmý pooperační den u obou skupin pacientů (testováno Dunnettovým testem), **graf 5, tabulka 5**, přičemž maxima dosahovala první pooperační den u pacientů s metylprednisolonem (indexMFI 11,6 vs. 8,4) a třetí pooperační den u pacientů bez metylprednisolonu (indexMFI 11,9 vs. 7,9).

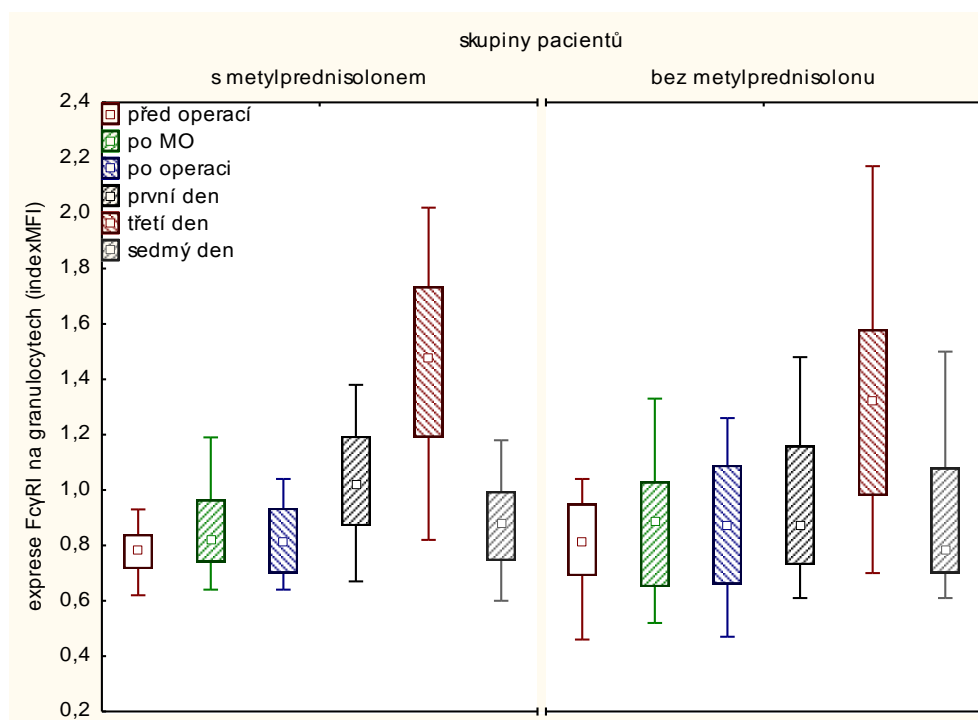
Při porovnání obou skupin byl mezi oběma skupinami pacientů statisticky významný rozdíl v expresi FcγRI třetí pooperační den ($p < 0,05$, Fisherův LSD test). Skupina pacientů bez metylprednisolonu dosahovala třetí pooperační den vyšších hodnot exprese FcγRI na monocytech než skupina s metylprednisolonem (indexMFI 11,9 vs. 10,5).

Tabulka 5: FcγRI na monocytech (indexMFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	7.5	7.2	6.8	10.6	9.2	8.5
	Q2	8.4	8.7	8.3	11.6	10.5	10.3
	Q3	9.7	9.5	9.0	12.9	11.4	11.3
	p	-			<0.001	<0.01	<0.05
pacienti bez MP	Q1	7.0	6.9	7.1	11.0	10.6	8.2
	Q2	7.9	7.9	7.5	11.5	11.9	9.4
	Q3	9.0	8.6	8.6	12.4	12.9	10.6
	p	-			<0.001	<0.001	<0.05

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.2.2 Exprese FcγRI na granulocytech (Leuko64 kit)



Graf 6: FcγRI na granulocytech

Z původní hodnoty 0,8 indexMFI se exprese FcγRI na granulocytech maximálně zvýšila třetí pooperační den u obou skupin ($p < 0,001$, znaménkový test), **graf 6, tabulka 6**; konkrétně u pacientů s metylprednisolonem dosahovala 1,5 a u pacientů bez metylprednisolonu 1,3 indexMFI. U skupiny s metylprednisolonem bylo významné zvýšení exprese pozorováno již první pooperační

den ($p < 0,001$). Při porovnání obou skupin však nebyl mezi oběma skupinami pacientů statisticky významný rozdíl v expresi FcγRI na granulocytech (testováno Mann-Whitneyovým U testem).

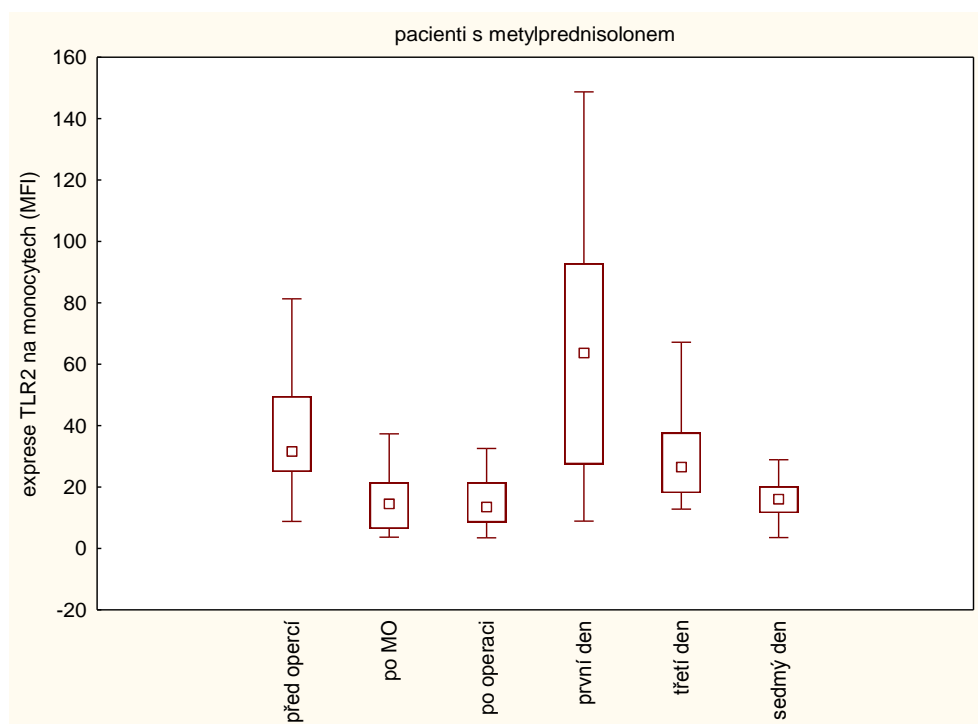
Tabulka 6: FcγRI na granulocytech (indexMFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	0.73	0.75	0.71	0.87	1.22	0.76
	Q2	0.79	0.82	0.82	1.02	1.48	0.88
	Q3	0.84	0.96	0.93	1.19	1.70	0.97
	p	-			<0.001	<0.001	
pacienti bez MP	Q1	0.70	0.66	0.67	0.73	1.00	0.71
	Q2	0.82	0.89	0.88	0.87	1.33	0.79
	Q3	0.93	1.03	1.08	1.15	1.56	1.06
	p	-				<0.001	

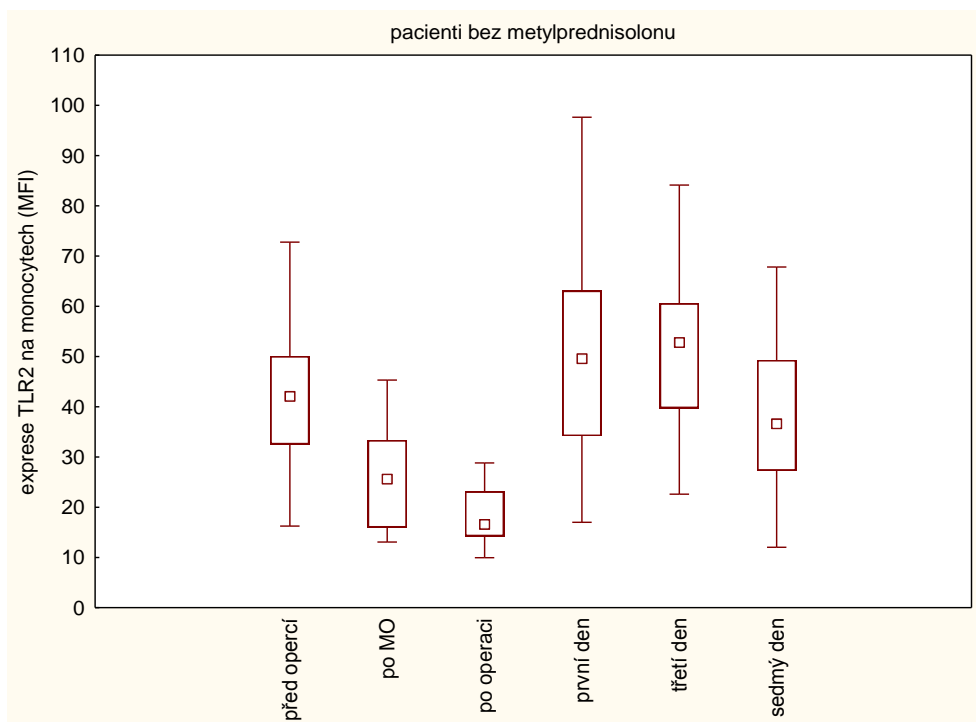
Popis viz tabulka 1.

4.1.3.3 Expres TLR2 (CD282)

4.1.3.3.1 Expres TLR2 na monocytech



Graf 7A: TLR2 na monocytech ve skupině s metylprednisolonem



Graf 7B: TLR2 na monocytech ve skupině bez metylprednisolonu

Skupina pacientů s metylprednisolonem dosahovala nejvyšších hodnot exprese TLR2 první pooperační den (MFI 63 vs. 32). Významná změna u těchto pacientů byla zjištěna po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace, kdy došlo ke snížení povrchové exprese TLR2 ($p < 0,01$), **graf 7A, tabulka 7**. Naopak k významnému zvýšení exprese došlo první pooperační den ($p < 0,05$, testováno znaménkovým testem).

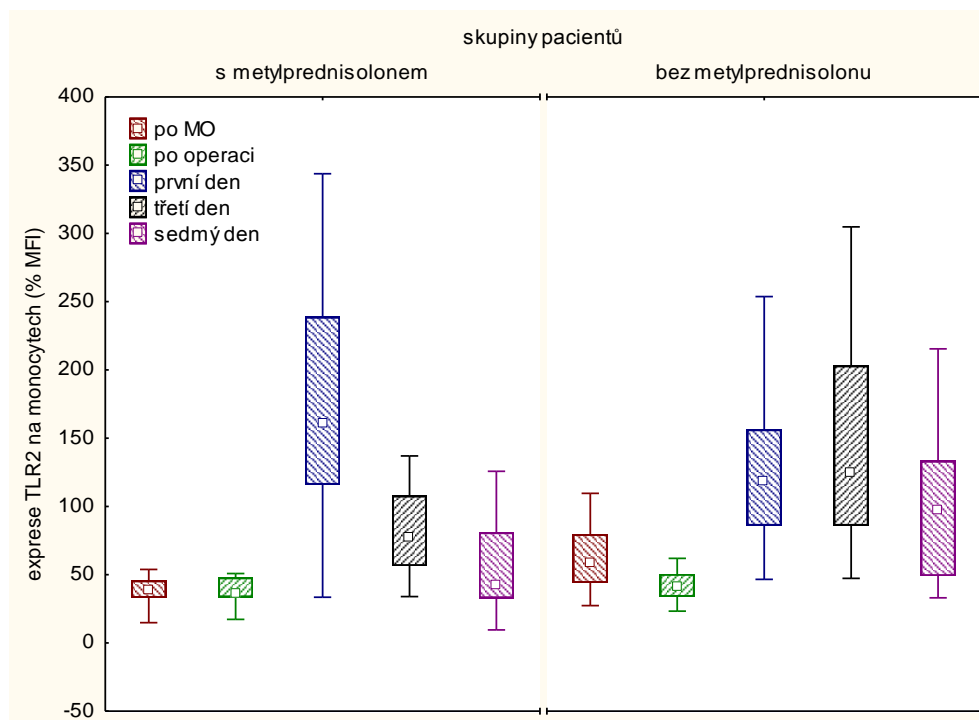
Ve skupině pacientů bez metylprednisolonu nebyla exprese TLR2 na monocytech významně zvýšená v žádném odběrovém čase, pouze po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace došlo ke snížení exprese ($p < 0,001$, testováno Wilcoxonovým testem), **graf 7B, tabulka 7**.

Tabulka 7: TLR2 na monocytech (MFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	26	7	9	28	19	12
	Q2	32	15	14	64	27	16
	Q3	48	21	21	91	37	19
	p	-	<0.01	<0.01	<0.05		
pacienti bez MP	Q1	33	16	14	34	40	27
	Q2	42	26	17	50	53	37
	Q3	49	33	23	63	60	49
	p	-	<0.001	<0.001			

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.3.2 Porovnání exprese TLR2 na monocytech mezi skupinami pacientů



Graf 8: Porovnání TLR2 na monocytech mezi oběma skupinami pacientů

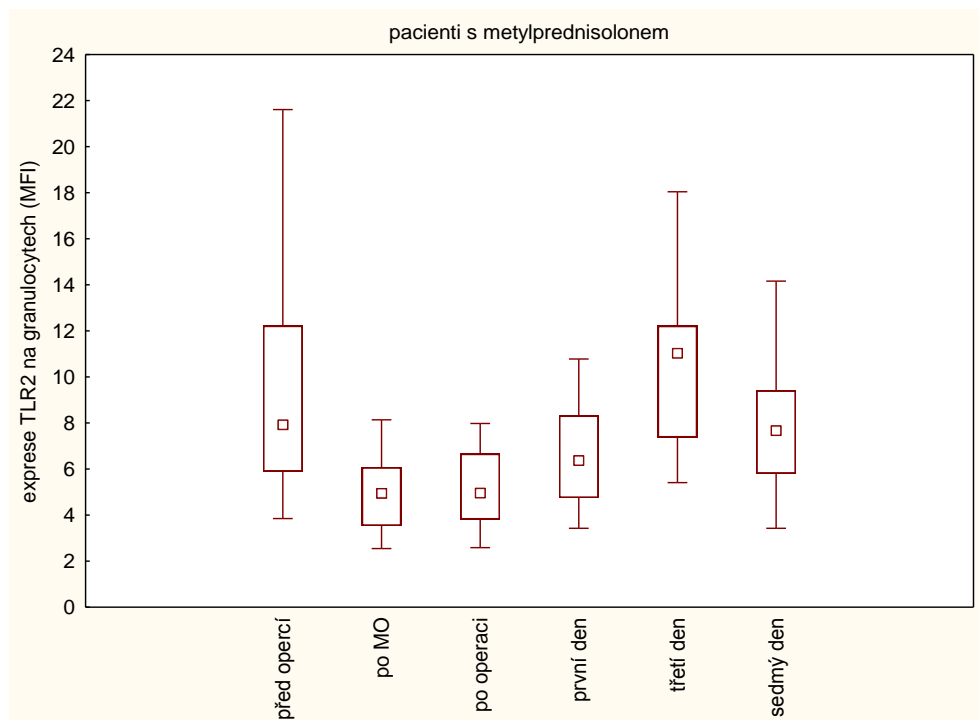
Při porovnání obou skupin se hodnoty exprese TLR2 lišily po ukončení mimotělního oběhu, třetí a sedmý pooperační den ($p < 0,05$, Mann-Whitneyův U test) **graf 8, tabulka 8**. Skupina s metylprednisolonem dosahovala nižších hodnot po ukončení mimotělního oběhu, třetí i sedmý den po operaci při porovnání se skupinou s metylprednisolonem.

Tabulka 8: TLR2 na monocytech (%MFI)

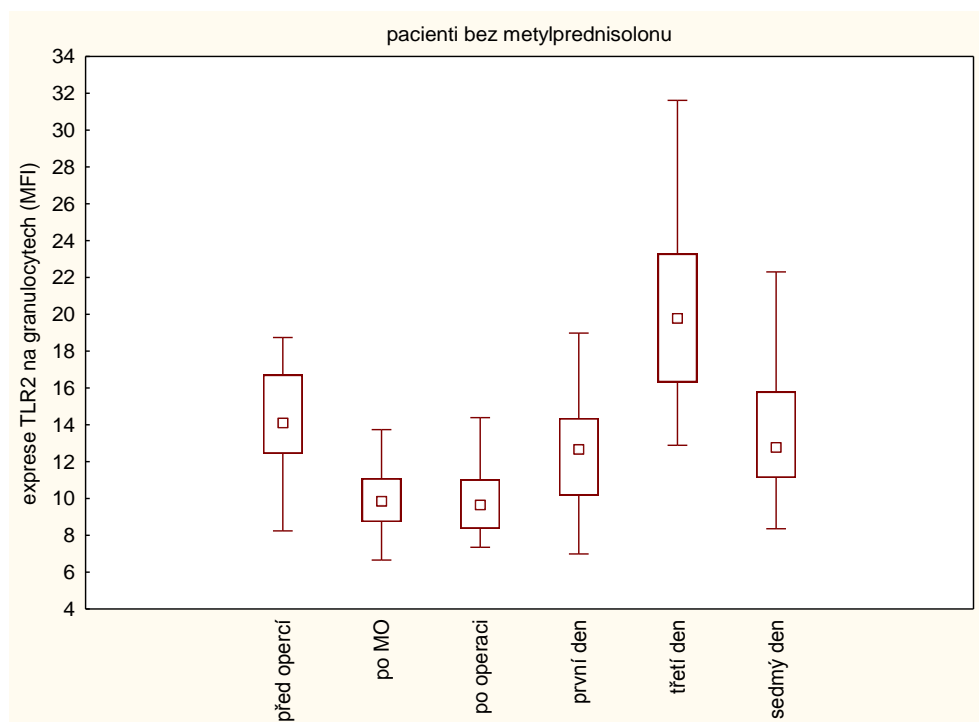
		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	34	34	117	57	34
	Q2	39	37	160	78	43
	Q3	45	48	236	106	73
pacienti bez MP	Q1	44	34	86	89	51
	Q2	59	40	118	124	98
	Q3	79	50	156	200	130

Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.1.3.3 Exprese TLR2 na granulocytech



Graf 9A: TLR2 na granulocytech ve skupině s metylprednisolonem



Graf 9B: TLR2 na granulocytech ve skupině bez metylprednisolonu

U obou skupin došlo ke snížení exprese po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace ($p < 0,001$). U pacientů s metylprednisolonem pokračovalo snížení exprese proti původním hodnotám až do prvního pooperačního dne ($p < 0,05$, znaménkový test), **graf 9A, tabulka 9**. Obě skupiny pacientů dosahovaly maximálních hodnot TLR2 na granulocytech třetí den po operaci,

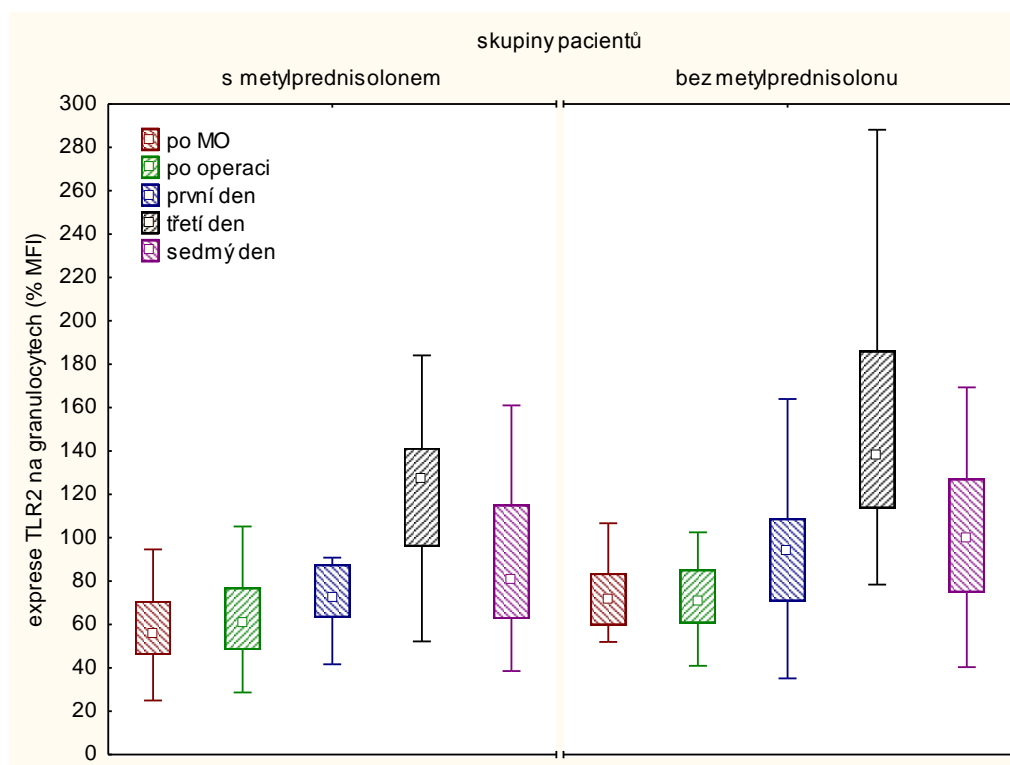
nicméně pouze u pacientů bez metylprednisolonu byla tato změna statisticky významná (MFI 14,1 vs. 1982; $p < 0,001$; Wilcoxonův test), **graf 9B, tabulka 9**.

Tabulka 9: TLR2 na granulocytech (MFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	6	4	4	5	7	6
	Q2	8	5	5	6	11	8
	Q3	12	6	7	8	12	9
	p	-	<0.001	<0.001	<0.05		
pacienti bez MP	Q1	12	9	8	10	16	11
	Q2	14	10	10	13	20	13
	Q3	17	11	11	14	23	16
	p	-	<0.001	<0.001		<0.001	

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.3.4 Porovnání exprese TLR2 na granulocytech mezi skupinami pacientů



Graf 10: Porovnání TLR2 na granulocytech mezi oběma skupinami pacientů

Hodnoty exprese TLR2 na granulocytech se mezi oběma skupinami lišily první ($p < 0,01$), třetí i sedmý den ($p < 0,001$). Pacienti bez metylprednisolonu dosáhli vyšších hodnot než pacienti s metylprednisolonem (Fisherův LSD test), **graf 10, tabulka 10**.

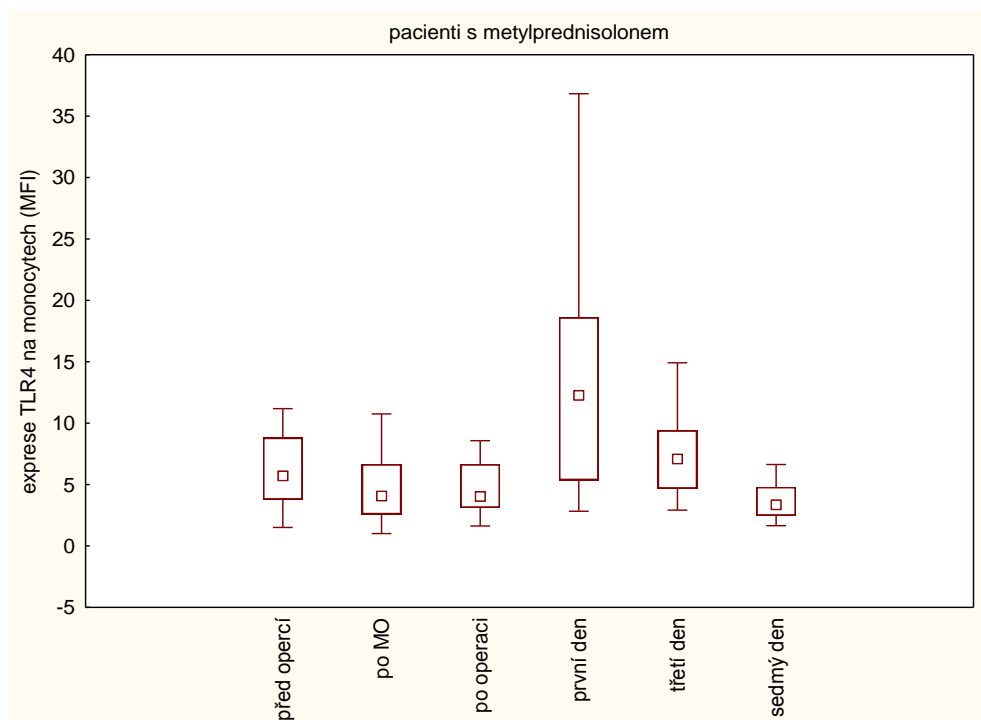
Tabulka 10: TLR2 na granulocytech (%MFI)

		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	47	49	64	97	64
	Q2	56	61	73	127	81
	Q3	70	75	86	141	113
pacienti bez MP	Q1	60	61	71	114	75
	Q2	72	71	94	138	100
	Q3	83	85	108	184	126

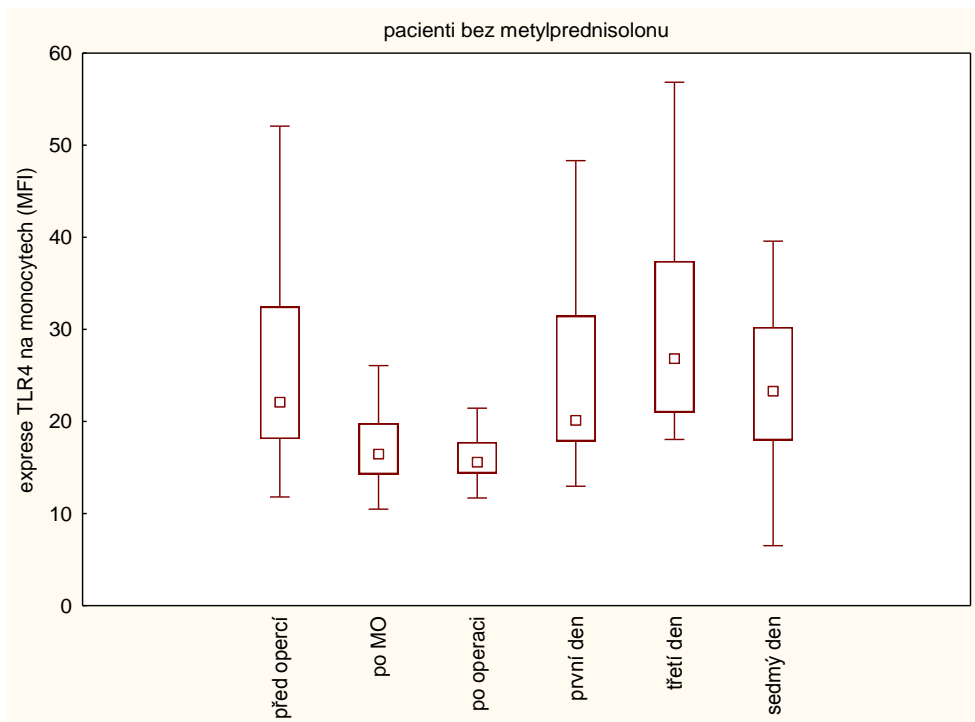
Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.1.3.4 Exprese TLR4 (CD284)

4.1.3.4.1 Exprese TLR4 na monocytech



Graf 11A: TLR4 na monocytech ve skupině s metylprednisolonem



Graf 11B: TLR4 na monocyttech ve skupině bez metylprednisolonu

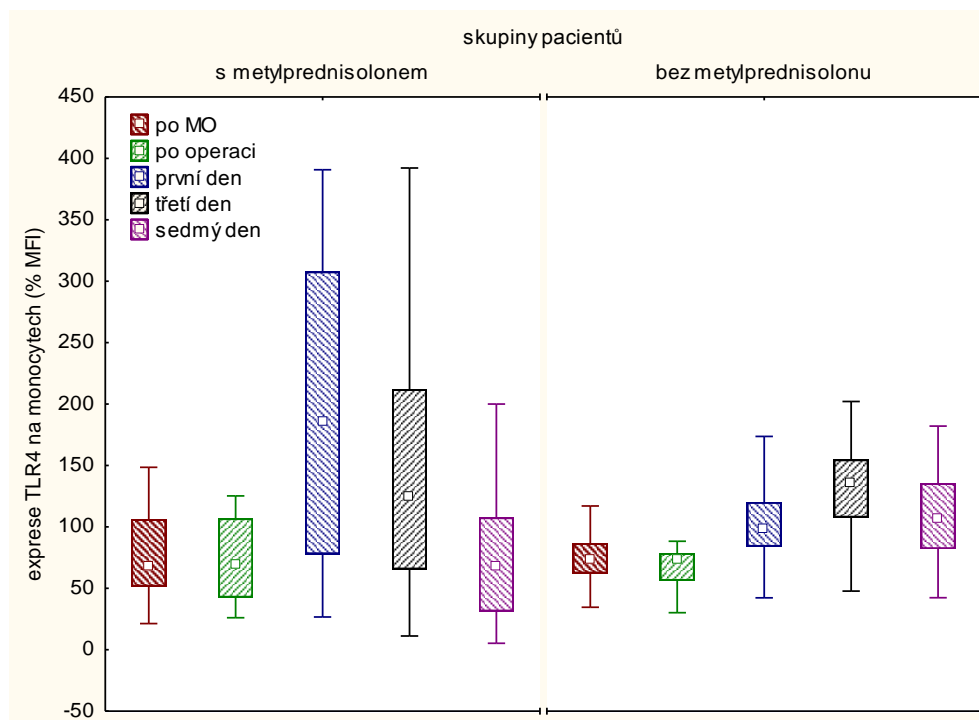
Zatímco u skupiny s metylprednisolonem nebyly pozorovány žádné významné změny v expresi (Wilcoxonův test), **graf 11A, tabulka 11**, u pacientů bez metylprednisolonu došlo v průběhu operace a po ukončení operace ke snížení exprese ($p < 0,001$) a třetí pooperační den ke zvýšení exprese TLR4 na monocyttech ($p < 0,01$, znaménkový test), **graf 11B, tabulka 11**.

Tabulka 11: TLR4 na monocyttech (MFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	3.8	2.7	3.2	5.6	4.8	2.5
	Q2	5.7	4.1	4.0	12.3	7.1	3.4
	Q3	8.8	6.2	6.6	18.3	9.3	4.6
	p	-					
pacienti bez MP	Q1	18	14	14	18	21	18
	Q2	22	16	16	20	27	23
	Q3	32	20	18	31	37	30
	p	-	<0.001	<0.001		<0.01	

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.4.2 Porovnání exprese TLR4 na monocytech mezi skupinami pacientů



Graf 12: Porovnání TLR4 na monocytech mezi oběma skupinami pacientů

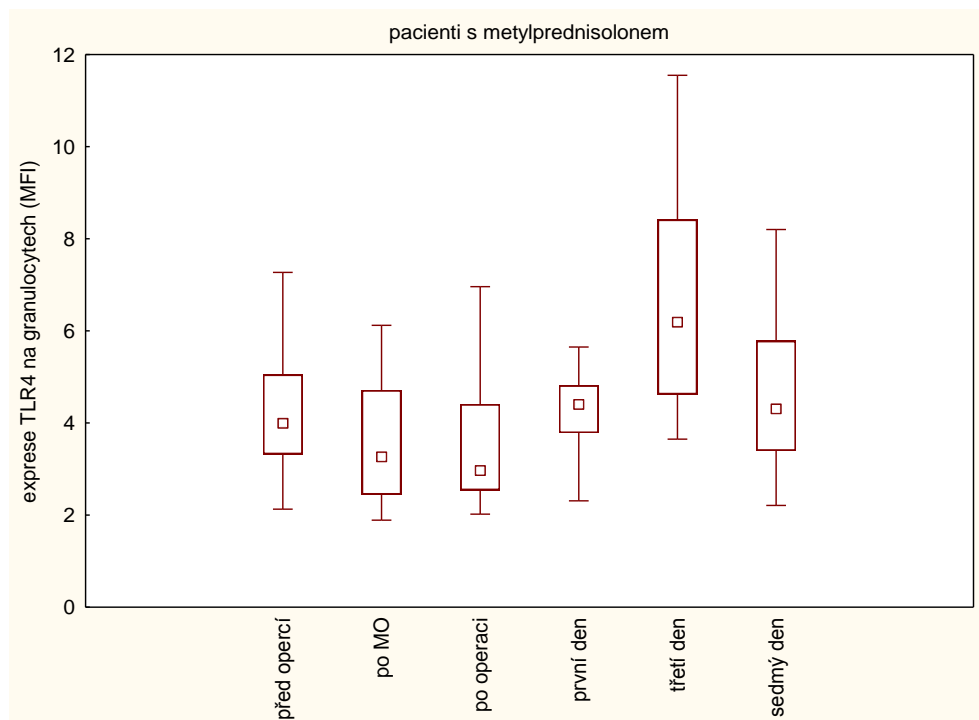
První pooperační den byla neočekávaně vyšší exprese TLR4 na monocytech u pacientů s metylprednisolonem, která se tak lišila od skupiny bez metylprednisolonu ($p < 0,05$, testováno Kolmogorov-Smirnovovým testem), **graf 12, tabulka 12**.

Tabulka 12: TLR4 na monocytech (%MFI)

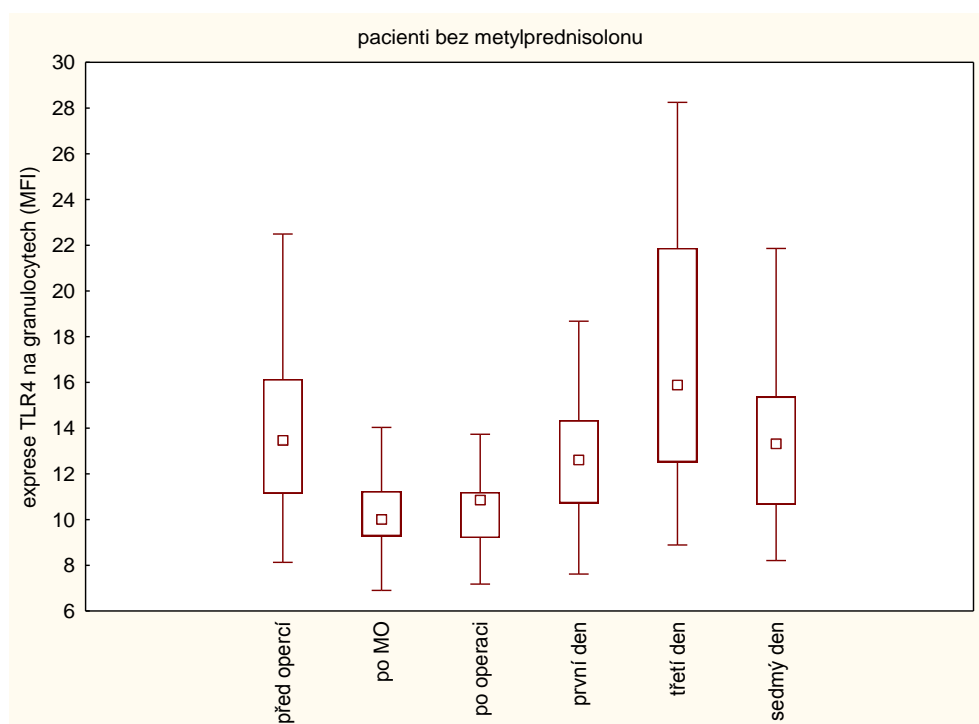
		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	52	43	81	66	33
	Q2	67	69	186	124	68
	Q3	106	106	298	193	106
pacienti bez MP	Q1	63	57	84	109	83
	Q2	74	73	98	136	106
	Q3	86	79	120	155	135

Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.1.3.4.3 Exprese TLR4 na granulocytech



Graf 13A: TLR4 na granulocytech ve skupině s metylprednisolonem



Graf 13B: TLR4 na granulocytech ve skupině bez metylprednisolonu

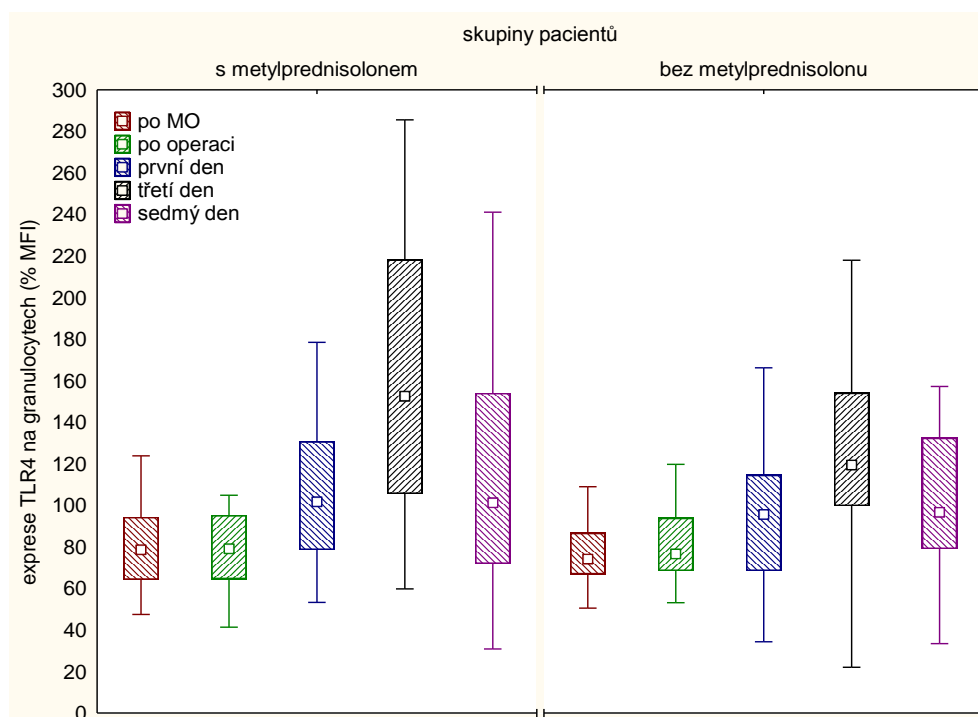
Expresa TLR4 na granulocytech je maximálně zvýšená třetí pooperační den u obou skupin pacientů, nicméně jen u pacientů s metylprednisolonem je tato změna statisticky významná (MFI 6,2 vs 4; $p < 0,01$, Wilcoxonův test), **graf 13A, tabulka 13**. U obou skupin pak dochází během operace k poklesu exprese, který u pacientů bez metylprednisolonu přetrvává až do doby po ukončení operace (znaménkový test), **graf 13B, tabulka 13**.

Tabulka 13: TLR4 na granulocytech (MFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	3.4	2.5	2.6	3.9	4.7	3.5
	Q2	4.0	3.3	3.0	4.4	6.2	4.3
	Q3	5.0	4.7	4.3	4.8	8.3	5.7
	p	-	<0.001	<0.001			
pacienti bez MP	Q1	11.2	9.3	9.2	10.7	12.7	10.7
	Q2	13.5	10.0	10.9	12.6	15.9	13.3
	Q3	16.1	11.2	11.2	14.3	21.5	15.2
	p	-	<0.01			<0.01	

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.4.4 Porovnání exprese TLR4 na granulocytech mezi skupinami pacientů



Graf 14: Porovnání TLR4 na granulocytech mezi oběma skupinami pacientů

Mezi oběma skupinami nebyl v žádném odběrovém čase statisticky významný rozdíl v hodnotách exprese TLR4 na granulocytech (Mann-Whitneyův U test), **graf 14, tabulka 14**.

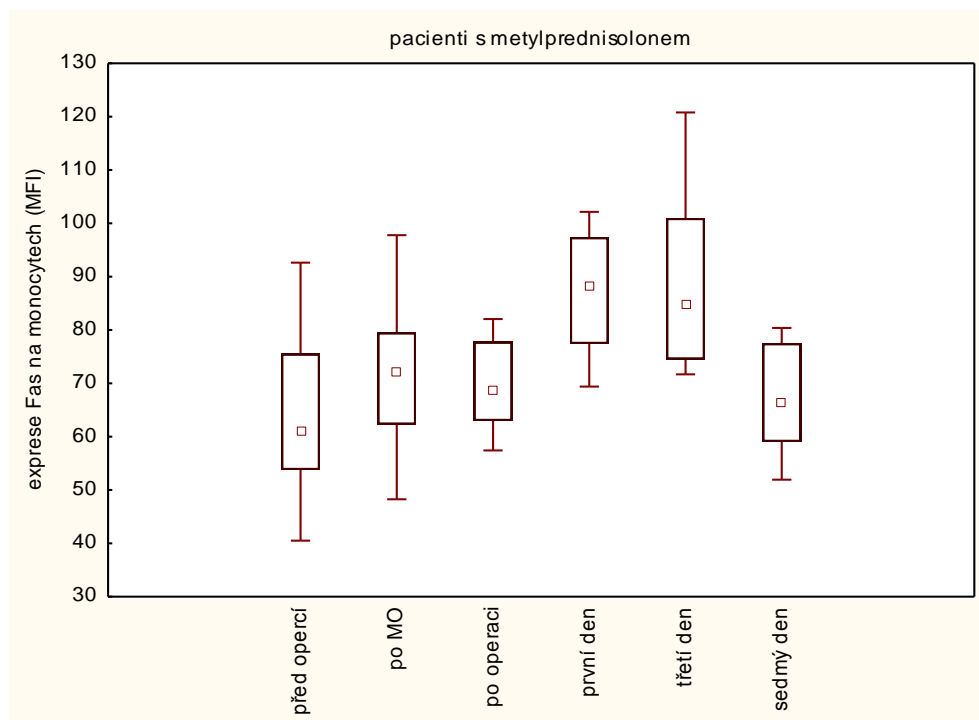
Tabulka 14: TLR4 na granulocytech (%MFI)

		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	65	65	81	106	73
	Q2	79	79	102	153	101
	Q3	94	95	128	216	148
pacienti bez MP	Q1	67	69	70	101	79
	Q2	74	77	96	119	97
	Q3	87	92	113	152	131

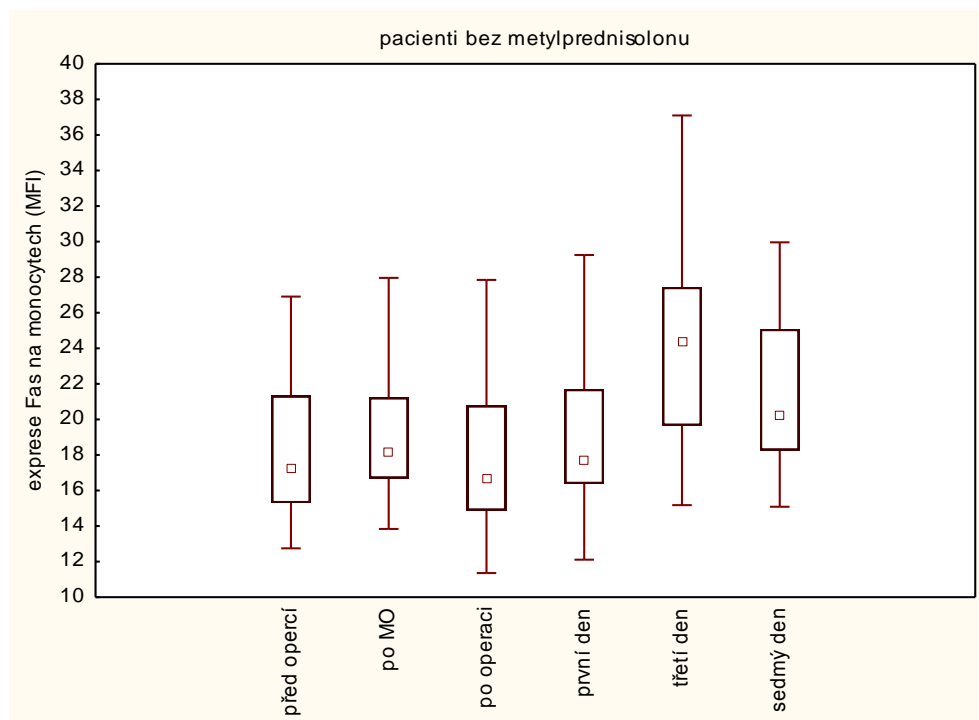
Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.1.3.5 Expres Fas (CD95)

4.1.3.5.1 Expres Fas na monocytech



Graf 15A: Fas na monocytech ve skupině s metylprednisolonem



Graf 15B: Fas na monocytech ve skupině bez metylprednisolonu

U pacientů s metylprednisolonem byla exprese Fas na monocytech nejvyšší první pooperační den (MFI 88 vs. 61; $p < 0,05$, Wilcoxonův test), **graf 15A, tabulka 15**, zatímco u pacientů bez metylprednisolonu byla exprese maximálně zvýšená třetí pooperační den (MFI 24 vs.

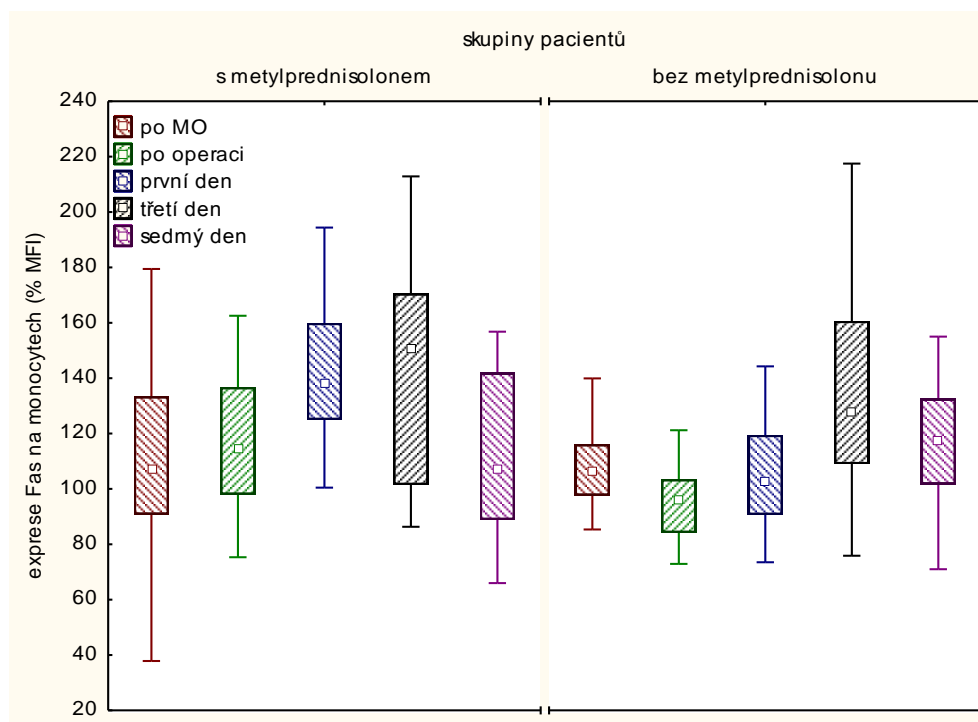
17; $p < 0,001$) a zůstala zvýšená i sedmý pooperační den ($p < 0,01$, Wilcoxonův test), **graf 15B**, **tabulka 15**.

Tabulka 15: Fas na monocytech (MFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	54	64	64	78	75	59
	Q2	61	72	69	88	85	67
	Q3	73	79	78	95	99	77
	p	-			<0.05		
pacienti bez metylprednisolonu	Q1	15	17	15	16	20	18
	Q2	17	18	17	18	24	20
	Q3	21	21	21	22	27	24
	p	-				<0.001	<0.01

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.5.2 Porovnání exprese Fas na monocytech mezi skupinami pacientů



Graf 16: Porovnání Fas na monocytech mezi oběma skupinami pacientů

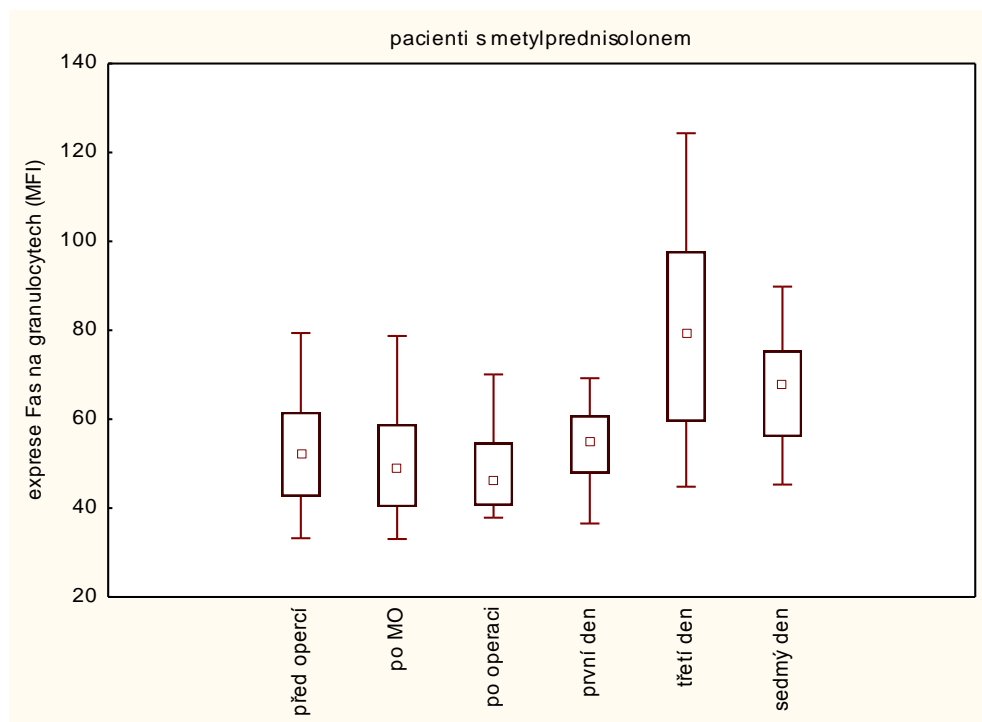
Skupina pacientů s metylprednisolonem dosahovala první pooperační den vyšších hodnot při porovnání Fas mezi skupinami ($p < 0,001$, Mann-Whitneyův U test), **graf 16**, **tabulka 16**.

Tabulka 16: Fas na monocytech (% MFI)

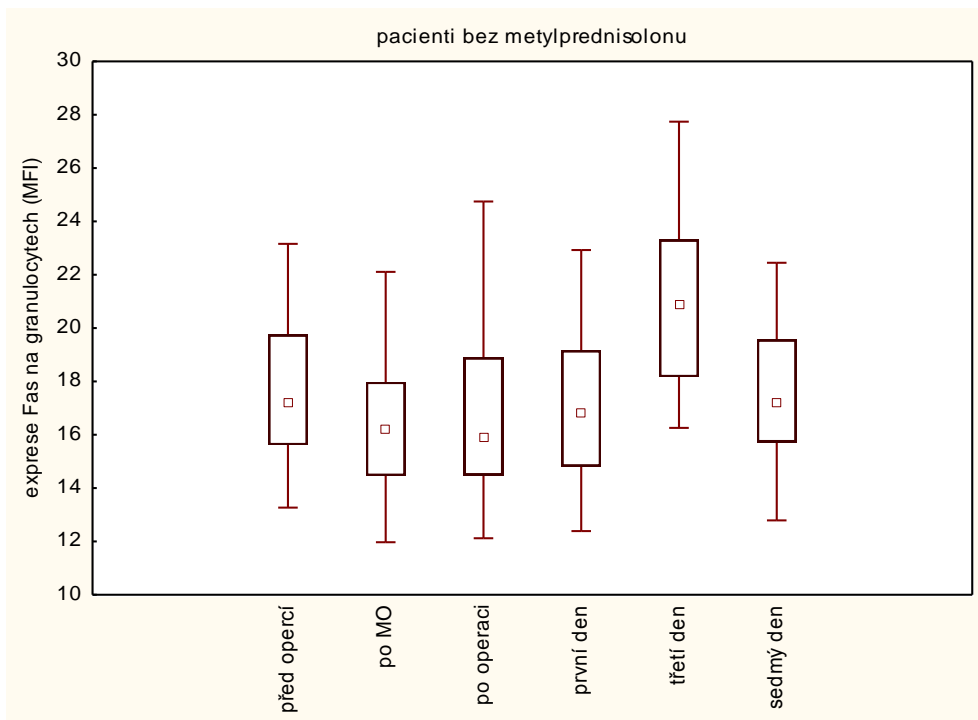
		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	92	102	129	105	90
	Q2	107	115	138	151	107
	Q3	127	136	154	167	141
pacienti bez MP	Q1	98	85	91	110	102
	Q2	107	96	103	128	118
	Q3	116	103	119	159	132

Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.1.3.5.3 Exprese Fas na granulocytech



Graf 17A: Fas na granulocytech ve skupině s metylprednisolonem



Graf 17B: Fas na granulocytech ve skupině bez metylprednisolonu

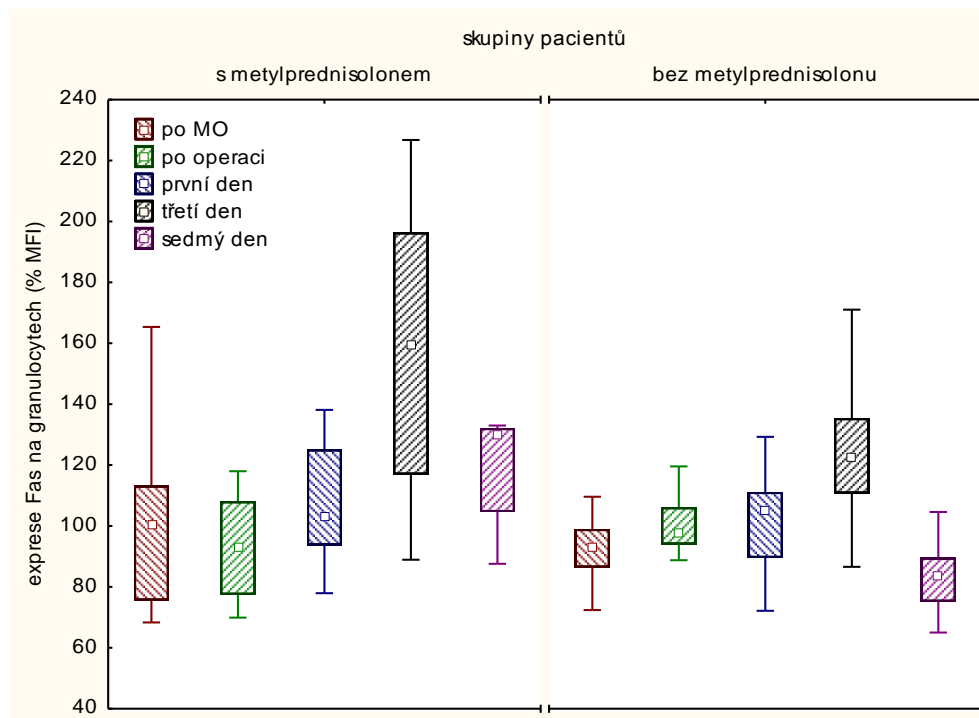
U obou skupin pacientů byla exprese Fas na granulocytech zvýšená třetí pooperační den ($p < 0,001$). U pacientů s metylprednisolonem představovalo zvýšení exprese jedinou významnou změnu v expresi Fas (Dunnettův test), **graf 17A, tabulka 17**. U pacientů bez metylprednisolonu však došlo po ukončení mimotělního oběhu také ke snížení exprese ($p < 0,01$, Wilcoxonův test), **graf 17B, tabulka 17**.

Tabulka 17: Fas na granulocytech (MFI)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	44	41	42	48	62	57
	Q2	52	49	46	55	80	68
	Q3	61	57	54	60	94	73
	p	-				<0.001	
pacienti bez MP	Q1	16	14	15	15	18	16
	Q2	17	16	16	17	21	17
	Q3	20	18	19	19	23	20
	p	-	<0.01			<0.001	

Popis viz tabulka 1.

4.1.3.5.4 Porovnání exprese Fas na granulocytech mezi oběma skupinami pacientů



Graf 18: Porovnání Fas na granulocytech mezi oběma skupinami pacientů

Při porovnání obou skupin bylo zjištěno, že pacienti s metylprednisolonem dosahovali vyšší exprese Fas na granulocytech třetí a sedmý pooperační den, avšak pouze hodnoty sedmý pooperační den byly zvýšeny významně ($p < 0,01$, Kolmogorov-Smirnovův test), **graf 18, tabulka 18**.

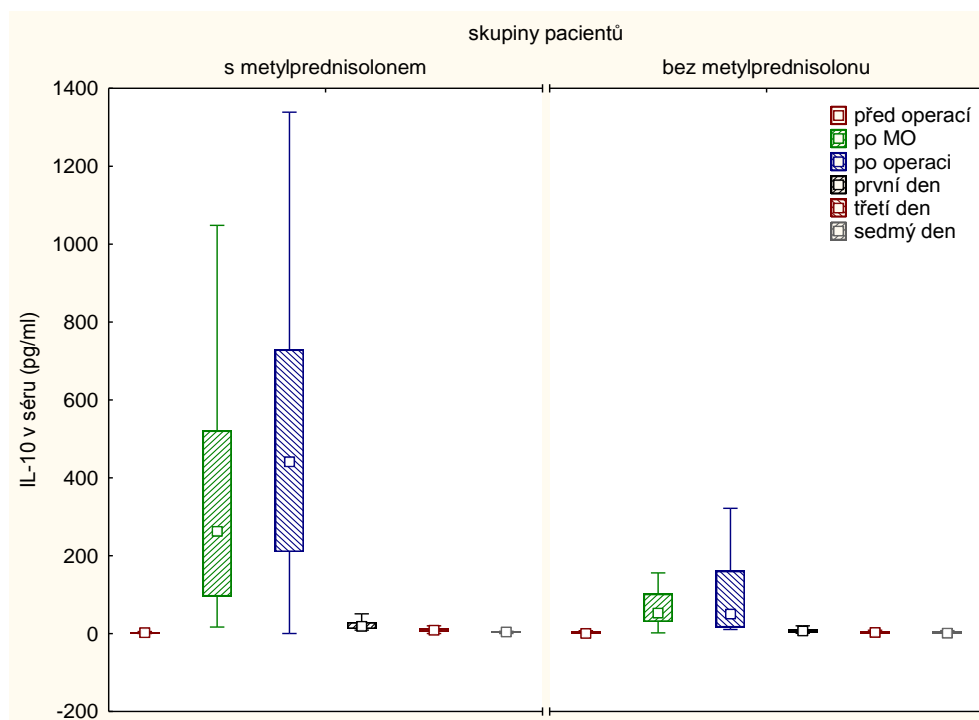
Tabulka 18: Fas na granulocytech (%MFI)

		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	76	80	96	124	108
	Q2	100	93	103	159	130
	Q3	113	108	121	193	132
pacienti bez MP	Q1	87	94	91	111	75
	Q2	93	98	105	123	84
	Q3	98	105	111	135	90

Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.1.4 Sérové parametry

4.1.4.1 Interleukin-10



Graf 19: Porovnání IL-10 u obou skupin pacientů

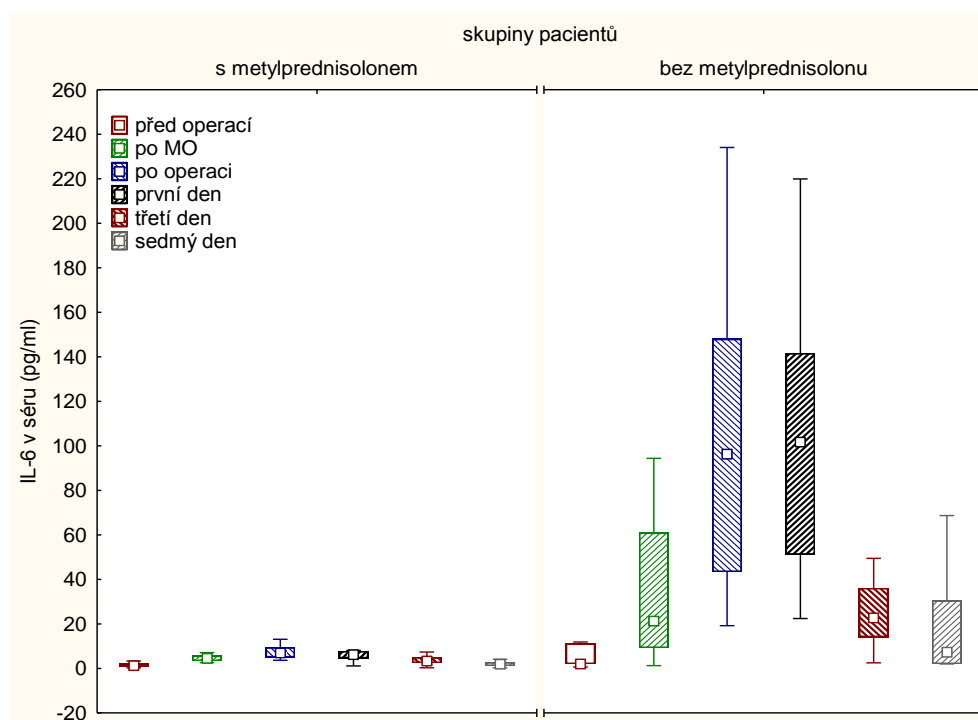
Hladina IL-10 byla významně zvýšená u obou skupin pacientů po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace a první pooperační den (znaménkový test), **graf 19, tabulka 19**. U pacientů s metylprednisolonem byla hladina zvýšená rovněž třetí pooperační den ($p < 0,05$, znaménkový test). Nejvyššího zvýšení IL-10 bylo dosaženo po ukončení operace u pacientů s metylprednisolonem (441 pg/ml), u pacientů bez metylprednisolonu dosahovala hladina IL-10 jen o málo vyšší hodnoty po ukončení mimotělního oběhu (53 pg/ml) než po ukončení operace (51 pg/ml). Hodnoty IL-10 se mezi oběma skupinami lišily po ukončení MO ($p < 0,01$), ukončení operace ($p < 0,01$), první pooperační den ($p < 0,05$) a třetí pooperační den ($p < 0,05$, testováno Kolmogorov-Smirnovovým testem). Největší rozdíly v hodnotách IL-10 byly mezi oběma skupinami pozorovány po ukončení mimotělního oběhu (pacienti s metylprednisolonem vs. pacienti bez metylprednisolu: 263 pg/ml vs. 53 pg/ml) a po ukončení operace (441 pg/ml vs. 51 pg/ml).

Tabulka 19: IL-10 v séru (pg/ml)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	0.5	95.8	209.8	12.4	5.5	3.5
	Q2	2.8	262.8	441.2	19.1	8.5	4.3
	Q3	4.0	521.1	729.3	28.9	13.1	5.9
	p	-	<0.001	<0.01	<0.001	<0.05	
pacienti bez MP	Q1	1.0	30.9	16.7	3.6	1.1	1.0
	Q2	1.0	52.7	50.5	7.3	3.0	1.3
	Q3	5.8	93.4	140.3	10.6	5.0	5.4
	p	-	<0.001	<0.001	<0.001		

Popis viz tabulka 1.

4.1.4.2 Interleukin-6

**Graf 20:** Porovnání IL-6 u obou skupin pacientů

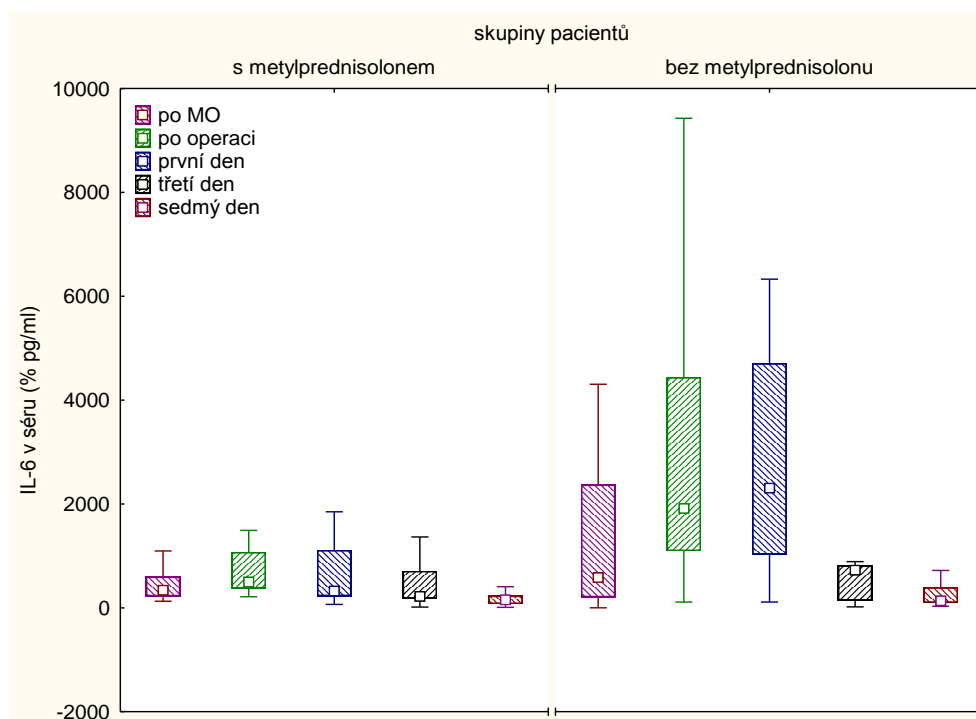
Hladina IL-6 byla významně zvýšená u obou skupin pacientů po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace, první pooperační den a třetí pooperační den (znaménkový test), **graf 20, tabulka 20**. U pacientů s metylprednisolonem bylo nejvyššího zvýšení dosaženo po ukončení operace (6,9 vs. 1,3 pg/ml), u pacientů bez metylprednisolonu pak první pooperační den (102 vs. 2 pg/ml). Při porovnání obou skupin pacientů se hladina IL-6 lišila ve všech odběrech ($p < 0,05$, Kolmogorov-Smirnovův test). Pacienti bez metylprednisolonu dosahovali výrazně vyšších hodnot IL-6 v séru než pacienti s metylprednisolonem. Protože do studie v r. 2006-2008 byli zařazeni pacienti, kteří měli již v počátku významně vyšší hladinu IL-6 ($p < 0,05$, Kolmogorov-Smirnovův test), byla hodnota IL-6 vyjádřena procentuální změnou (viz Materiál a metody). Tímto byly vyloučeny rozdíly v předoperačním odběru a bylo možné porovnat dynamiku IL-6 mezi skupinami. Srovnání pak ukázalo, že se obě skupiny liší po ukončení operace a první pooperační den, kdy

pacienti bez metylprednisolonu dosahují vyšších hodnot než pacienti s metylprednisolonem ($p < 0,05$, Mann-Whitneyův U test), **graf 21, tabulka 21**.

Tabulka 20: IL-6 v séru (pg/ml)

		před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	1	3	5	5	2	1
	Q2	1	5	7	6	3	2
	Q3	2	6	9	8	5	3
	p	-	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01	
pacienti bez MP	Q1	2	10	44	51	14	2
	Q2	2	21	96	102	23	7
	Q3	11	58	146	138	36	30
	p	-	<0.05	<0.001	<0.001	<0.05	

Popis viz tabulka 1.



Graf 21: Porovnání IL-6 u obou skupin pacientů

Hladina IL-6 byla významně zvýšená u obou skupin pacientů po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace, první pooperační den a třetí pooperační den (znaménkový test; graf 20, tabulka 20). U pacientů s metylprednisolonem bylo nejvyššího zvýšení dosaženo po ukončení operace (6,9 vs. 1,3 pg/ml), u pacientů bez metylprednisolonu pak první pooperační den (102 vs. 2 pg/ml). Při porovnání obou skupin pacientů se hladina IL-6 lišila ve všech odběrech ($p < 0,05$, Kolmogorov-Smirnovův test). Pacienti bez metylprednisolonu dosahovali výrazně vyšších hodnot IL-6 v séru než pacienti s metylprednisolonem. Protože do studie v r. 2006-2008 byli zařazeni pacienti, kteří měli již v počátku významně vyšší hladinu IL-6 ($p < 0,05$, Kolmogorov-Smirnovův test), byla hodnota IL-6 vyjádřena procentuální změnou (viz Materiál a metody). Tímto byly

vyloučeny rozdíly v předoperačním odběru a bylo možné porovnat dynamiku IL-6 mezi skupinami. Srovnání pak ukázalo, že se obě skupiny liší po ukončení operace a první pooperační den, kdy pacienti bez metylprednisolonu dosahují vyšších hodnot než pacienti s metylprednisolonem ($p < 0,05$, Mann-Whitneyův U test), **graf 21, tabulka 21**.

Tabulka 21: IL-6 v séru (% pg/ml)

		po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacienti s MP	Q1	223	374	229	181	76
	Q2	339	498	327	222	156
	Q3	601	1071	1111	709	232
pacienti bez MP	Q1	232	1142	1051	146	100
	Q2	585	1913	2305	725	135
	Q3	2255	4381	4502	810	367

Výchozí hodnota pacienta před operací je 100 %, hodnoty v ostatních odběrových časech jsou od ní odvozeny. Ve sloupcích jsou zobrazeny hodnoty kvartilů (Q).

4.2 Klinická data

Tabulka 22: Operační a pooperační charakteristiky

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

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

4.3 Vztah parametrů k pre- a pooperačním charakteristikám

4.3.1 Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů se selháním orgánů

Tabulka 23: Expres CD163 na monocytech (indexMFI) první pooperační den

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

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

Tabulka 24: IL-10 v séru (pg/ml) po ukončení mimotělního oběhu

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

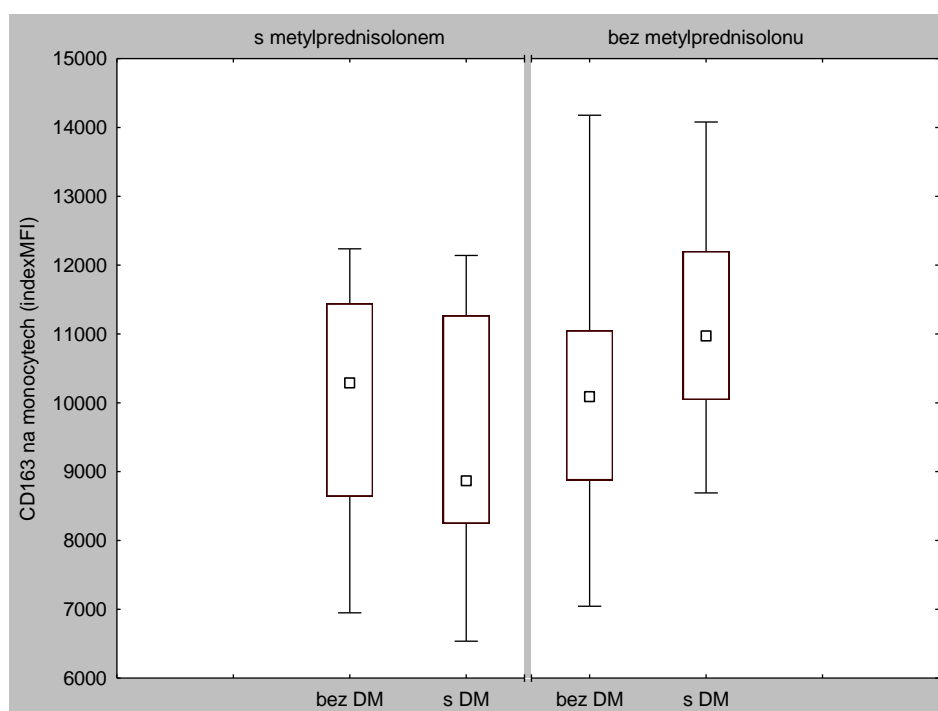
Popis viz tabulka 23. Koncentrace IL-10 v každé podskupině je dána mediánovou hodnotou.

Tabulka 25: IL-10 v séru (pg/ml) po ukončení operace

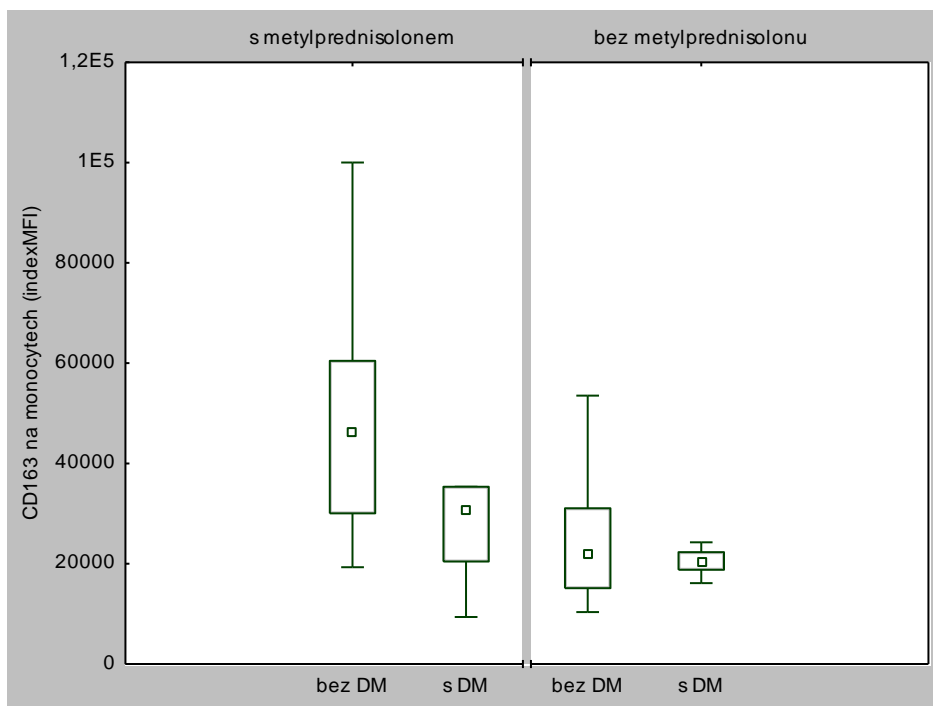
IL-10	bez selhání	jeden orgán	dva a více orgánů
s metylprednisolonem (20)	428 (16)	1571 (2)	1154 (2)
bez metylprednisolonu (22)	30 (16)	49 (3)	163 (3)

Popis viz tabulka 24.

4.3.2 Hodnoty CD163 a IL-10 u pacientů s diabetes mellitus

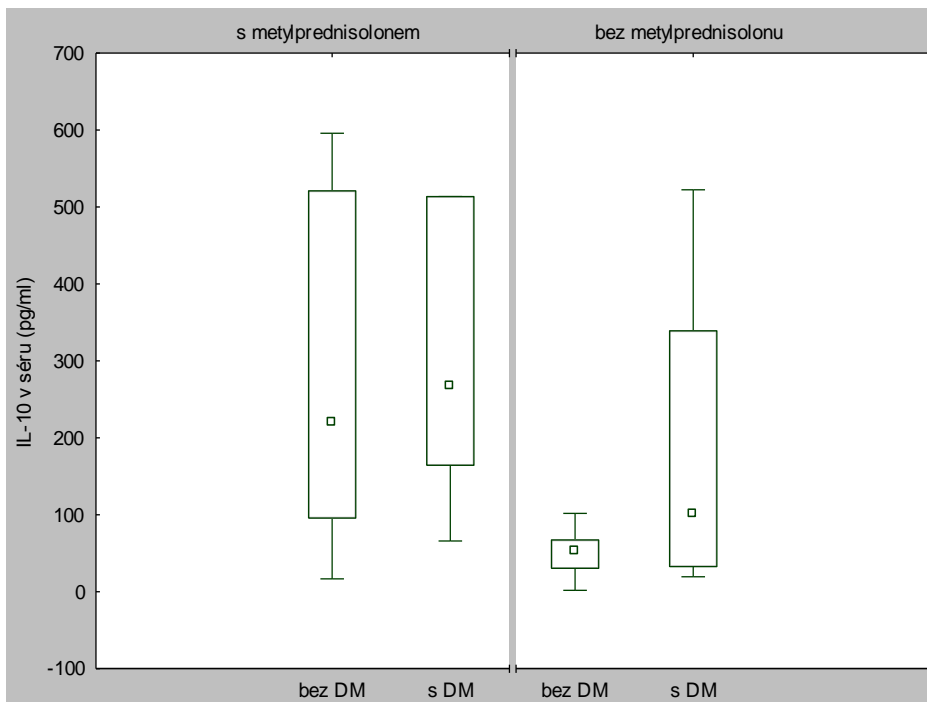


Graf 22: Porovnání předoperačních hodnot CD163 na monocyttech u obou skupin pacientů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti onemocnění diabetes mellitus, viz Materiál a metody, tabulka II.

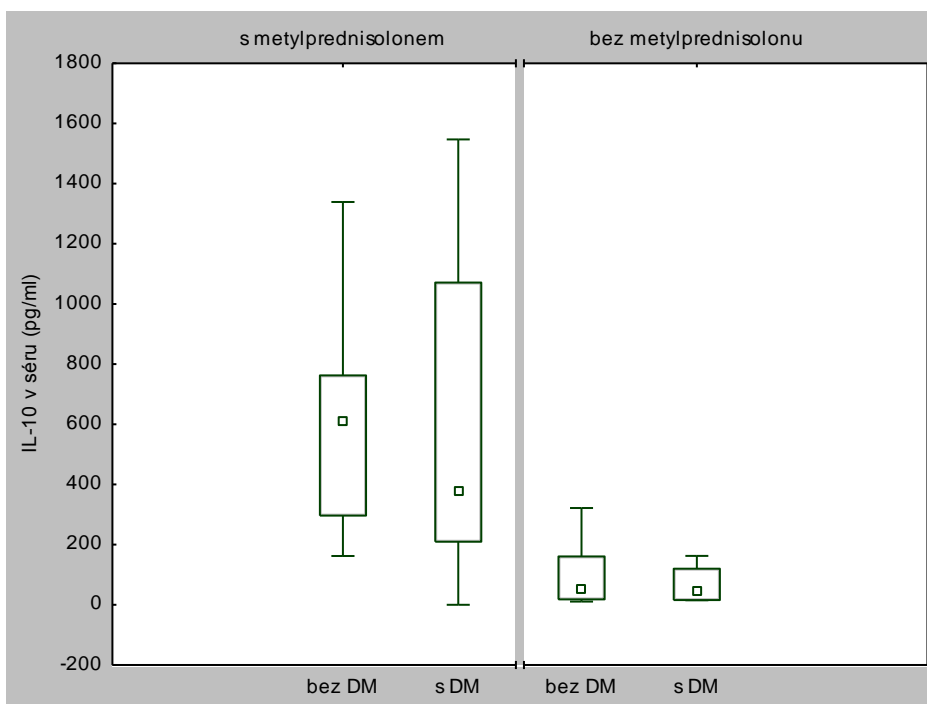


Graf 23: Porovnání hodnot CD163 na monocyttech první pooperační den u obou skupin pacientů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti onemocnění diabetes mellitus, viz Materiál a metody, tabulka II.

Expresí CD163 byla předoperačně statisticky nevýznamně vyšší u diabetických pacientů, kteří byli následně operováni bez použití metylprednisolonu v primární náplni, **graf 22**. Pooperační exprese CD163 ve skupině s metylprednisolonem byla ovlivněna onemocněním diabetes mellitus. V této skupině byly hodnoty pacientů bez diabetu ($n = 14$) první pooperační den nevýznamně vyšší než u pacientů s diabetem ($n = 6$). Vliv diabetu ukazuje i porovnání obou skupin pacientů. Zatímco mezi pacienty s diabetem nebyly rozdíly v hodnotách CD163, při porovnání pacientů bez diabetu byla pooperační exprese CD163 statisticky významně zvýšena při použití metylprednisolonu ($p = 0,008$, t-test), **graf 23**. Skupina bez metylprednisolonu zahrnovala devět pacientů s diabetem a třináct pacientů bez diabetu.



Graf 24: Porovnání hodnot IL-10 po ukončení mimotělního oběhu u obou skupin pacientů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti onemocnění diabetes mellitus, viz Materiál a metody, tabulka II.



Graf 25: Porovnání hodnot IL-10 po ukončení operace u obou skupin pacientů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti onemocnění diabetes mellitus, viz Materiál a metody, tabulka II.

Při porovnání nediabetických pacientů v obou skupinách (s/bez metylprednisolonu) jsou sérové hodnoty IL-10 po ukončení mimotělního oběhu i po ukončení operace ve skupině s metylprednisolonem zvýšené ($p < 0,025$ a $p < 0,001$ Kolmogorov-Smirnovův test), **graf 24, 25**. Podobné zvýšení hladiny IL-10 je pozorováno i po ukončení operace u pacientů s diabetem ve skupině s metylprednisolonem při porovnání s pacienty s diabetem bez metylprednisolonu ($p <$

0,025, Kolmogorov-Smirnovův test), **graf 25**. Rozdíly mezi pacienty s diabetem a bez v jednotlivých skupinách nebyly signifikantní. Počet pacientů s diabetem a bez diabetu je uveden výše v textu.

5 DISKUZE

Kardiochirurgická operace prováděná s kardiopulmonálním bypassesem představuje výrazný podnět pro imunitní systém. Během operace i v pooperačním období jsou produkovány proteiny, které se účastní jak prozáněťové, tak protizáněťové odpovědi. Produkce proteinů je měřitelná a často dosahuje výrazných kvalitativních i kvantitativních změn při porovnání s předoperačními hodnotami. Během operace dochází k největším změnám hladin protizáněťových solubilních markerů, nicméně se zvolna zvyšují i prozáněťové solubilní markery zánětu. U leukocytů je detekováno snížení povrchové exprese proteinů, mnohdy v důsledku odštěpování (shedding) molekuly proteinu. V pooperačním období se exprese jak prozáněťových, tak protizáněťových proteinů na leukocytárních buňkách zvyšuje.

5.1 Počet leukocytů

Změna počtu leukocytů je známkou probíhajícího zánětu. V kardiochirurgických studiích je popsáno, že k nárůstu počtu leukocytů dochází již při reperfúzi (587). Aktivované leukocyty jsou jednak zdrojem cytokinů podílejících se na zánětu a pak při přímém kontaktu stimulují jiné typy buněk. Proto byly mnohé studie věnovány efektu leukocytární deplece během operace s kardiopulmonálním bypassesem. Hypotéza, že použití arteriálního filtru depletujícího leukocyty povede ke snížení pooperačních komplikací, se nepotvrdila (588). Konkrétně ve studii zabývající se vlivem deplece na plicní funkce nebyl zjištěn pozitivní účinek přítomnosti filtru, naopak bylo paradoxně pozorováno zvýšení elastázy (neutrophil elastase) ve skupině s filtrem (589). Mnohem lepších výsledků bylo dosaženo, jestliže bylo během operace použito separátoru krevních buněk, který odstraňoval společně s leukocyty také trombocyty. Ve skupině se separátorem byly signifikantně nižší hodnoty elastázy, eikosanoidů, thrombin-antithrombin III komplexu a D-dimerů; navíc tato skupina vyžadovala pooperačně nižší dávky katecholaminů a vazodilatačních látek (590). V našem souboru obou skupin pacientů jsme po ukončení mimotělního oběhu až do třetího pooperačního dne pozorovali zvýšený počet leukocytů, který významně poklesl až sedmý pooperační den, kdy se nadále statisticky nelišil od bazálních hodnot před operací, **graf 1, tabulka 1**. U pacientů s metylprednisolonem bylo možné pozorovat výraznější zvýšení počtu leukocytů než u pacientů, jimž nebyl metylprednisolon podán. Tento rozdíl mezi oběma skupinami byl dokonce statisticky významný první pooperační den. Nejpočetnější leukocytární populací jsou granulocyty, proto by rozdíl mohl být dán zvýšením počtu granulocytů účinkem metylprednisolonu. Není vyloučeno, že pooperační rozdíl v počtu leukocytů byl způsoben statisticky nevýznamně vyšším předoperačním počtem leukocytů ve skupině pacientů s metylprednisolonem.

5.2 Procento monocytů

Monocyty jsou důležitými fagocytárními buňkami, které díky expresi receptorů schopných rozpoznávat mikrobiální vzory citlivě reagují na přítomnost takových molekul. Po stimulaci mikrobiálními produkty, se monocyty a makrofágy stávají zdrojem celé řady cytokinů podílejících se na rozvoji i ukončení zánětové odpovědi.

V literatuře je u kardiochirurgických pacientů uváděno operační snížení počtu monocytů s následnou monocytózou první pooperační den. Během operace se snižuje i povrchová exprese markerů charakteristických pro monocyty jako je CD14 a HLA-DR (591, 592). Obnovení exprese probíhá v pooperačním období, v jehož časně fázi je však funkčnost monocytů narušená a projevuje se neschopností monocytů reagovat na podněty jako stimulace LPS (*ex vivo*) nebo bakteriální infekce (*in vivo*) (593-595). Bylo zjištěno, že pacienti s přetrvávající nízkou expresí HLA-DR jsou ve větší míře náchylní pooperačním komplikacím (596). Neschopnost obnovit expresi HLA-DR se objevovala hlavně u pacientů vyššího věku (nad 75 let) (597).

Na druhou stranu během operace dochází ke zvyšování exprese proteinu CD11b, který se podílí na adhezi mezi monocyty a trombocyty (598, 599). Dlouhotrvající zvýšený počet monocytů a zvýšená exprese CD11b na monocytech jsou v pooperačním období spojeny s fibrilací síní (600).

Rapidní snížení procenta monocytů během operace jsme pozorovali u obou našich skupin pacientů, **graf 2, tabulka 2**. Přestože rozdíl v průběhu operace není mezi oběma skupinami významný, u pacientů bez metylprednisolonu byla tendence k menšímu poklesu procenta monocytů než u pacientů s metylprednisolonem. V pooperačním období se hodnoty příliš nevzdalují od hodnot výchozích, i když zvýšení je první pooperační den u pacientů bez metylprednisolonu statisticky významné. Při porovnání obou skupin dosahují pacienti bez metylprednisolonu významně vyšších hodnot třetí pooperační den. Můžeme se proto domnívat, že metylprednisolon v primární náplni negativně ovlivňuje procento monocytů v periferní krvi a to ve prospěch granulocytů. Děje se tak nejen během operace, ale i v pooperačním období.

5.3 Procento granulocytů

Granulocyty představují další populaci fagocytujících buněk. Většinu granulocytů přitom tvoří neutrofilů. Zvýšení počtu neutrofilů provází zánětové stavy. Aktivované neutrofilů migrují do místa zánětu, kde se podílejí na zánětové odpovědi. Použití kardiopulmonálního bypassu je provázeno neutrofilii přetrvávající až do třetího pooperačního dne (601). V našich skupinách pacientů jsme detekovali zvýšené procento granulocytů již v průběhu operace **graf 3, tabulka 3**. Maxima bylo dosaženo první pooperační den. U pacientů bez metylprednisolonu se zvýšené

procento vrací k výchozím hodnotám rychleji a to je zřejmě důvodem detekovaného rozdílu, kdy procento granulocytů bylo třetí pooperační den významně vyšší u pacientů s metylprednisolonem. Navíc ve skupině bez metylprednisolonu se sedmý pooperační den hodnoty neliší od předoperačních, zatímco v metylprednisolonové skupině zůstávají stále významně zvýšené (statistický rozdíl mezi oběma skupinami je ale nevýznamný). K podobnému výsledku, kdy metylprednisolon vede ke zvýšení počtu granulocytů, došla i skandinávská skupina srovnávající použití metylprednisolonu během kardiochirurgické operace s mimotělním oběhem (602). Toto pozorování je experimentálně podpořené pracemi zabývajícími se účinkem kortikoidů na granulocyty. Kortikoidy podporují vyplavování granulocytů z kostí dřene, proliferaci granulocytárních progenitorových buněk a potlačují apoptózu granulocytů (603, 604).

Přestože u pacientů dochází ke zvýšení počtu granulocytů v důsledku kardiochirurgického zákroku, schopnost fagocytovat je u těchto buněk narušená a k jejímu obnovení dochází zhruba do 24 hodin po operaci (601, 605). Bylo také potvrzeno, že schopnost oxidativního vzplanutí se u granulocytů snižuje a to až do pátého pooperačního dne. Přitom je nepravděpodobné, že je funkční inhibice granulocytů způsobená účinkem metylprednisolonu. Jak četné studie ukazují, metylprednisolon v množství používaném při kardiochirurgických výkonech neinhibuje fagocytární a baktericidní schopnosti granulocytů (606, 607). Lze předpokládat, že fagocytární aktivita je snížena v důsledku změny povrchové exprese proteinů. Je známo, že použití mimotělního oběhu sice vede k odštěpování proteinů z povrchu membrány, exprese některých proteinů však může být velmi rychle obnovena. Bohužel podle literárních zdrojů jsou údaje o expresi proteinů charakteristických pro populaci neutrofilů, CD11b, CD16, CD18 a CD62L často v protikladu. Např. zatímco Fung a kol. (2008) popisují pooperační snížení CD11b a nevýznamné změny exprese CD62L, Macey a kol. (1997) nachází zvýšenou expresi CD11b a CD62L na neutrofilech již po hodině, kdy byl započat kardiopulmonální bypass (608, 609). Zůstává tak otázkou, které proteiny ovlivňují schopnost fagocytózy neutrofilů.

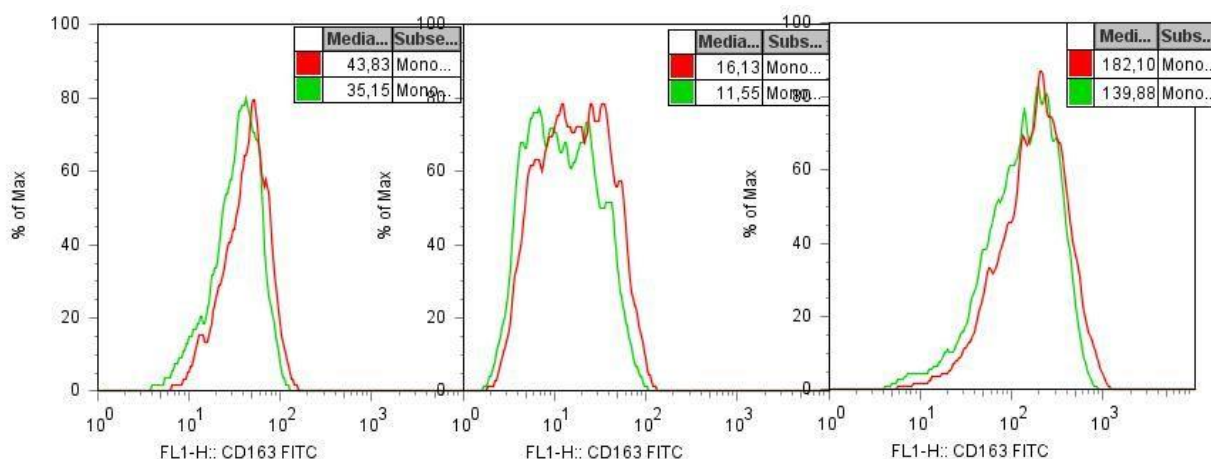
5.4 Povrchová exprese proteinů

5.4.1 Exprese CD163

5.4.1.1 Exprese CD163 na monocytech

CD163 je vycytávací receptor pro komplex haptoglobinu s hemoglobinem. Změny exprese povrchového CD163 se vyskytují v souvislosti s krvácivými stavy. Proto i v souvislosti s použitím mimotělního oběhu dochází k výrazným změnám exprese CD163 a to jak ve smyslu snížení, tak

zvýšení. Expres se mění u obou skupin pacientů, **graf 4, tabulka 4**. Operace s mimotělním oběhem indukuje snížení exprese CD163 na monocytech v průběhu operace. Snížení je dáno hlavně odštěpováním (shedding) povrchové formy CD163. Proporcionálně hodnoty solubilní formy (sCD163) narůstají. K identifikaci CD163 jsme použili klon Mac2-158 protilátky, která se váže jak na receptor v komplexu s ligandem, tak i na receptor bez navázaného ligandu (127). Po dodatečných experimentech, při kterých byl detekován intracelulární CD163/CD163-ligand, **obrázek 8**, je možné říct, že snížení povrchové exprese během operace není dáno internalizací CD163.



Obrázek 8: Rozdíly mezi povrchovou a cytoplazmatickou expresí CD163. Expres je vyjádřena jako median fluorescence intensity. Expres CD163 na monocytech byla detekována průtokovou cytometrií, kdy bylo použito kombinace povrchového a cytoplazmatického značení. Buňky byly před permeabilizací 0,5 % saponinem fixovány ve 2 % paraformaldehydu. Obrázek zleva do prava ukazuje expresi na monocytech před operací, po ukončení operace a první pooperační den. Zeleně je označená povrchová exprese, červená barva zobrazuje jak povrchovou, tak intracelulární expresi CD163.

Z našich výsledků je zřejmé, že snížení exprese CD163, ke kterému docházelo v průběhu operace a po ukončení operace, bylo u obou skupin pacientů podobné. Zajímavé je, že v tomto období data v našich souborech pacientů vykazují velmi malý rozptyl. Dá se proto shrnout, že použití kortikoidů nevede k ochraně povrchového CD163 před odštěpováním indukovaným mimotělním oběhem (610). K podobnému výsledku došel i Goldstein a kol. (2003), který pozoroval, že u CABG pacientů s mimotělním oběhem dochází k rychlému uvolnění CD163 do plazmy (sCD163) asi hodinu po deklampáži aorty (611). V této studii šest pacientů obdrželo bolus 500 mg metylprednisolonu při úvodu do anestézie, kdežto dvanácti pacientům nebyly podány žádné glukokortikoidy. U obou skupin použití metylprednisolonu nemělo vliv na koncentraci sCD163 v plazmě.

Přestože zvýšené množství sCD163 je spojováno se septickým stavem (612), žádná klinická souvislost u našich pacientů nalezena nebyla. Důvodem může být fakt, že koncentrace sCD163 nebyla stanovena přímo, nýbrž byla odvozena na základě poklesu povrchového CD163.

Stejně jako skupina vedená Goldsteinem (2003) (611) i my jsme změřili významně zvýšenou expresi CD163 první pooperační den, u pacientů s metylprednisolonem pak mnohonásobně. V tomto odběrovém čase se obě skupiny významně liší, ($p < 0,05$). Z toho lze vyvodit, že použití metylprednisolonu pozitivně ovlivňuje expresi receptoru pro hemoglobin-haptoglobin na monocitech. Zvýšení exprese CD163 při použití mimotělního oběhu je zdokumentováno také dalšími studii (613, 614). Quimby a kol. (2010) charakterizoval fenotyp monocytů, u kterých dochází po operaci s MO k aktivaci. Jedná se o monocyty měnící se z fenotypu $CD14^{high}CD163^{low}HLA-DR^{high}$ na $CD14^{high}CD163^{high}HLA-DR^{low}$ (615). Protože funkcí CD163 je pohlcovat hemoglobin, takového účinku metylprednisolonu lze využít u hemolytických onemocnění (616). Vzhledem ke krvácení provázející kardiochirurgické operace, může být účinek metylprednisolonu na pacienty považován za přínosný.

Hladina sCD163 je zvýšená u diabetiků a obézních lidí (617). Takovému zjištění odpovídá skutečnost, že hodnoty membránového CD163 jsou u těchto pacientů naopak sniženy. Nižší exprese CD163 se předoperačně vyskytovala u našich diabetických pacientů ($n = 6$) ve skupině s metylprednisolonem, nicméně podobné snížení nebylo patrné u diabetických pacientů ($n = 9$) ve skupině bez metylprednisolonu. Naopak exprese byla vysoká, **graf 22**. Důvodem však mohl být nízký počet subjektů v našich souborech.

U diabetiků se navíc vyskytuje ve zvýšeném množství glykosylovaný hemoglobin (z největší části HbA1c), který si uchovává pro-oxidační aktivitu i po vazbě na haptoglobin (Hp) (618). Glykosylovaný hemoglobin je spojený s aterosklerózou a škodlivost jeho přítomnosti nepřímo dokazují i studie týkající se zvýšené frekvence kolorektálního karcinomu (619, 620). Navíc bylo zjištěno, že u diabetiků homozygotních pro Hp2 alelu je clearance Hp2-2-Hb snižena a mnohonásobně vzrůstá riziko kardiovaskulárního onemocnění (618). U diabetických pacientů v našich skupinách (**graf 23**) je zřetelně vidět, že exprese CD163 je pooperačně zvýšená jako u ostatních pacientů. Účinek metylprednisolonu však expresi nezvyšuje, jako je tomu u pacientů bez diabetu.

U pacientů s multiorganovým pooperačním selháváním se rozdíly v expresi CD163 projevily jen ve skupině s metylprednisolonem, **tabulka 23**. Nicméně povrchově exprimovaný CD163 by mohl v budoucnu sloužit jako prognostický marker u kardiochirurgických pacientů s pooperační sepsí. Takový poznatek jsme bohužel nemohli ověřit statisticky, protože v našich skupinách se vyskytovaly pouze dvě osoby. Ve skupině s metylprednisolonem dosahoval septický pacient první den po operaci nejvyšších hodnot CD163 vůbec - 100022 indexMFI (medián hodnoty

CD163 ve skupině s metylprednisolonem byl první pooperační den roven 40449 indexMFI; použití jednotky indexMFI je vysvětleno v metodické části práce). Vzhledem k následnému úmrtí pacienta během prvního pooperačního dne, nebyl zařazen do statistického hodnocení. Ve skupině bez metylprednisolonu septická pacientka dosahovala první pooperační den hodnoty 53526 indexMFI (medián ve skupině byl 20995 indexMFI). Tato pacientka zemřela třetí pooperační týden a vzhledem ke kompletním laboratorním parametrům byla zařazena do statistického zpracování naměřených dat. Z rozdílu hodnot CD163 mezi oběma septickými pacienty a hodnotami naměřenými u jednotlivých skupin pacientů vyplývá, že hodnota CD163 bude ovlivněná podmínkami jako je použití kortikosteroidů a tento fakt bude ztěžovat standardizaci hodnot pro případné klinické využití. Navíc je pravděpodobné, že exprese CD163 bude odlišná u různých věkových skupin, jak naznačuje studie Groselj-Grenc a kol. (2008). V této práci používající Leuko64 kit ke stanovení exprese CD163 došli k jinému výsledku, kdy exprese na monocytech nebyla zvýšená u pacientů se SIRS a sepsí v porovnání se skupinou se SIRS a bez sepse (621). Pokud však exprese CD163 na monocytech nebyla kvantifikována pomocí Leuko64, ale byla vyjádřena pouze střední intenzitou fluorescence, rozdíl mezi oběma skupinami pacientů byl shledán statisticky významný. Na rozdíl od našich pacientů se zmíněná studie zabývala věkově odlišnou skupinou (novorozenci a děti se SIRS se sepsí a bez sepse).

Dosud neexistuje model, který by navrhoval, jakým způsobem se CD163 podílí na septickém stavu pacientů. Domníváme se, že zvýšení exprese CD163 může představovat mechanismus, jak se vyrovnat s hemolýzou provázející septický stav. Důležitost přítomnosti CD163 pozitivních monocytů dokládají případy nemocných léčených pro AML pomocí anti-CD33 protilátky konjugované s kelichemicinem (gemtuzumab ozogamicin). Asi u 16 % takových pacientů se objevuje sepse v důsledku vážné imunosuprese spojené s infekcí. Je-li septický stav provázen hemolýzou, nemůže být uvolněný hemoglobin odstraňován v důsledku nepřítomnosti CD163 pozitivních monocytů koexprimujících CD33. Toxický efekt hemoglobinu pak vede k selhávání orgánů a smrti (622, 623).

V literatuře bylo popsáno, že aktivace CD163 receptoru vede k produkci cytokinů. Kromě indukce IL-6, IL-1 β , GM-CSF Philippidis a kol. (2004) detekoval také zvýšení hladiny IL-10 s maximem 48 h po stimulaci monocytárního CD163 pomocí komplexů Hp-Hb. Tento účinek byl inhibován použitím blokující protilátky RM3/1 proti CD163. Práce Philippidis a kol. (2004) experimentálně potvrdila, že se vždy jednalo o komplex Hb-Hp1-1, který byl schopen indukovat tvorbu IL-10, zatímco samotný haptoglobin nebo hemoglobin takový účinek na produkci IL-10 neměly (614). Ve zmíněné studii se nepodařilo vysvětlit mechanismus signální dráhy, jakým docházelo k produkci IL-10 po stimulaci CD163 pomocí Hb-Hp. Při prováděných pokusech vyšlo nicméně najevo, že při jednodenní inkubaci Hb-Hp s monocyty získanými z preoperativního

vzorku periferní krve pacienta před operací s mimotělním oběhem docházelo k nízké produkci IL-10. Zato při jednodenní inkubaci s monocyty získanými 24 h po operaci, tedy monocyty, které intenzivně exprimují CD163, byla produkce IL-10 mnohonásobně zvýšená (613, 614). Protože k nejvyšší produkci IL-10 u našich pacientů docházelo v poměrně krátkém časovém intervalu po ukončení mimotělního oběhu (přibližně 1,5 h) a operace (přibližně 4 h), tzn. takovými monocyty, na jejichž povrchu byla exprese CD163 snižena v důsledku odštěpování, zdá se nepravděpodobné, že by IL-10 byla indukována Hb-Hp/CD163 a pokud ano, pak byl efekt pouze minimální. Lze se spíše domnívat, že u kardiochirurgických pacientů hrály důležitější roli v produkci IL-10 TLR4 agonisté.

Práce Philippidis a kol. (2004) a studie dalších výzkumných týmů potvrdily, že zvýšení exprese CD163 na monocyttech je následováno zvýšením hemoxigenázy HO-1 (65, 615). HO-1 (Hsp32) je inducibilní enzym, jehož produkce je vyvolána celou řadou faktorů, kde na prvním místě stojí molekula hemu a oxidativní stres. Proto při kardiochirurgickém výkonu, který je provázen hemolýzou a ischemicko-reperfúzním poškozením, dochází k výrazné produkci HO-1. Tento enzym má důležitou úlohu v protizáněťové odpovědi, přesto je zajímavým faktem, že promotorová oblast *ho-1* genu pravděpodobně nese negativní (supresivní) GRE (glucocorticoid response element). Naproti tomu promotorová oblast konstitutivní isoformy hemoxigenázy *ho-2* nese standardní GRE. Takový GRE v přítomnosti kortikosteroidů zvyšuje produkci HO-2, zatímco negativní GRE způsobuje snížení produkce HO-1 (624-626); podobné snížení však *in vivo* pozorováno dosud nebylo. Přeměnou hemu katalyzovanou HO-1 za přítomnosti NADPH, O₂ a cytochromu P450 vzniká CO a biliverdin, který je dále za účasti biliverdin reduktázy přeměněn na bilirubin. Jak CO, tak biliverdin i bilirubin mají antiinflamatorní účinek. Protizáněťové vlastnosti CD163 jsou tak dány nejen schopností pohlcovat hemoglobin, ale také indukovat produkci antiinflamatorních molekul.

5.4.2 Exprese FcγRI (CD64)

5.4.2.1 Exprese FcγRI na monocyttech

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

Exprese FcγRI se na monocyttech zvyšuje první pooperační den a zůstává významně zvýšená do konce sledovaného období u obou skupin pacientů, **graf 5, tabulka 5**. Na rozdíl od CD163 je exprese FcγRI na monocyttech vyšší u pacientů bez metylprednisolonu (třetí pooperační den). Protože exprese FcγRI na monocyttech je regulovaná IL-10 a IFN-γ, můžeme předpokládat, že produkce interferonu byla vyšší u pacientů bez metylprednisolonu (627, 628)

Při srovnání s výše zmíněnou prací Groselj-Grenc a kol. (2008) (621), kdy u septických novorozenců a dětí bylo zjištěno signifikantní zvýšení FcγRI na monocytech, bylo u našich septických pacientů takové zvýšení exprese FcγRI na monocytech nejednoznačné. U pacienta ve skupině s metylprednisolonem hodnota exprese FcγRI zvýšená nebyla (7,8 indexMFI první pooperační den, přičemž medián ve skupině byl 11,6 indexMFI). Naproti tomu pacientka bez metylprednisolonu dosahovala po celou dobu vyšších hodnot než byly hodnoty charakteristické pro tuto skupinu, viz **tabulka III**.

Tabulka III: Exprese FcγRI (MFI) na monocytech ve skupině pacientů bez metylprednisolonu

	před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacientka se sepsí	11.6	13.1	12.6	13.9	12.4	14.7
medián.hodnota skupiny	7.9	7.9	7.5	11.5	11.9	9.4
min.- max. hodnot skupiny	4.7 - 12.6	5.4 - 13.1	5.3 - 12.6	9.4 - 14.8	8.4 - 15.2	5 - 14.7

5.4.2.2 Exprese FcγRI na granulocytech

Expresí tohoto znaku na granulocytech je minimální u zdravých jedinců. Expresí FcγRI se ale zvyšuje na kvantifikovatelnou úroveň při infekcích. Toho je využíváno např. při detekci sepse (629).

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

Mezi skupinami pacientů s a bez metylprednisolonu nebyl nalezen rozdíl v expresi FcγRI na granulocytech, přestože v jedné práci bylo pozorováno zvýšení FcγRI na granulocytech po aplikaci metylprednisolonu (630). Práce se však týkala vysokých dávek metylprednisolonu. Zdá se tedy, že použití nízké dávky metylprednisolonu, jaké bylo použito v náplni mimotělního oběhu, neovlivňuje expresi tohoto parametru na granulocytech. Ani jiná práce nezjistila vliv podávaných kortikosteroidů na expresi FcγRI na granulocytech. Expresí byla zvyšována pouze při infekci bakteriemi, viry, houbami a mykobaktériemi (631). Další práce pak zjistila, že je výrazný rozdíl v indukci exprese FcγRI, pokud se jedná o bakteriální nebo virovou infekci (632). Na rozdíl od virových infekcí při bakteriálních dochází k mnohonásobnému zvýšení exprese FcγRI a proto je u nechirurgických pacientů možné využít tohoto znaku k detekci bakteriálních sepsí.

5.4.3 Expresí Toll-like receptoru 2 (CD282)

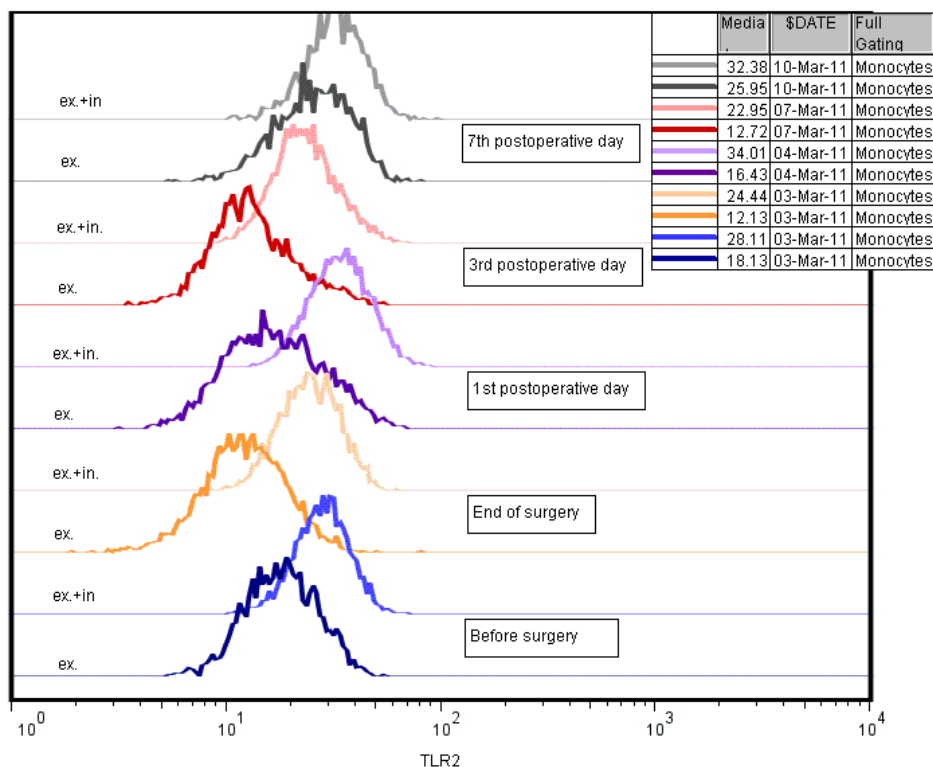
5.4.3.1 Expresí TLR2 na monocytech

TLR2 rozpoznává hlavně struktury PAMP na grampozitivních baktériích, např. peptidoglykan a muramyl dipeptid, a kvasinkový zymosan. Škála rozpoznávaných ligandů je širší

díky schopnosti TLR2 tvořit receptorové komplexy s TLR1 a TLR6. Dokonce se v literatuře objevuje pozorování, kdy TLR2 kooperuje i s jiným receptorem – CD14 (633). Určitá forma spolupráce byla popsána rovněž mezi TLR2 a NOD1 a TLR2 a TLR9 (634, 635).

Lidské monocyty exprimují na svém povrchu TLR2 s vysokou intenzitou při porovnání s expresí TLR4. Existuje několik publikací zabývajících se expresí TLR u pacientů operovaných s mimotělním oběhem, přičemž se zdá, že preoperační charakteristiky pacientů a operační protokol mohou podstatně ovlivnit expresi TLR na monocyttech. Podobně jako Dybdhal a kol., 2002 i my jsme pozorovali významné snížení exprese v průběhu operace a krátce po operaci. První pooperační den došlo pak ke zvýšení exprese **graf 7A, 7B, 8, tabulka 7, 8** (636).

Na dalším modelu pak bylo popsáno odštěpování TLR4 z povrchu buněk následující po ischemicko-reperfúzním poškození (637). Je proto pravděpodobné, že ke snížení exprese TLR2 na monocyttech dochází stejně jako u TLR4 odštěpování molekuly receptoru z povrchu, protože rovněž hodnoty intracelulárního TLR2 se v průběhu operace a krátce po operaci snižují, **obrázek 9** (638).



Obrázek 9: Příklad exprese TLR2 v monocytární populaci u kardiochirurgického pacienta operovaného s MP. Rozdíly mezi povrchovou (ex.) a celkovou expresí (ex.+in.) TLR2 jsou zachyceny graficky i vyjádřením intenzity fluorescence. Značení bylo provedenou shodným postupem jako v případě CD163 (obrázek 8).

Jako ve studii autorů Dybdhal a kol. (2002) (636) bylo i u obou našich skupin první pooperační den zjištěno zvýšení exprese, ale jen u pacientů s metylprednisolonem bylo zvýšení statisticky významné. Takové pozorování může být vysvětleno zvýšeným uvolňováním IL-10 při

použití metylprednisolonu. Experimentálně bylo podloženo, že IL-10 zvyšuje expresi TLR2 na monocyttech (639). Vzhledem k maximálním hodnotám IL-10 po ukončení mimotělního oběhu a po ukončení operace se můžeme domnívat, že metylprednisolon nepřímo ovlivňuje expresi TLR2 na monocyttech.

Regulace exprese TLR2 na monocyttech se při použití, nebo nepoužití metylprednisolonu liší i v dalších pooperačních dnech. Třetí pooperační den byly hodnoty u pacientů bez metylprednisolonu stále nevýznamně zvýšené, zatímco hodnoty druhé skupiny klesaly pod výchozí úroveň. Takové monocyty s velmi nízkou expresí TLR2 by mohly při stimulacích vykazovat nižší odpověď, a u pacientů bychom mohli očekávat zvýšený výskyt infekcí.

5.4.3.2 Exprese TLR2 na granulocytech

Lidské granulocyty exprimují TLR2 v mnohem nižších hodnotách než monocyty. Je možné, že regulace exprese TLR2 je odlišná u monocytů a granulocytů. V této souvislosti se v literatuře objevují konfliktní data, která mohou být způsobena buď jen minimální kontaminací izolovaných granulocytů monocytů. Některé studie uvádějí, že LPS a GM-CSF zvyšují expresi TLR2 na monocyttech, ale na granulocytech je jimi snižována. Prodloužená životnost neutrofilů a odpověď na LPS má pak být závislá na přítomnosti LPS a aktivovaných monocyttech (640, 641). Naproti tomu Kurt-Jones a kol. (2002) zjistili, že exprese TLR2 na granulocytech je účinkem GM-CSF zvyšována a dochází k produkci IL-8 a superoxid dismutázy (642). Protože produkce GM-CSF je pooperačně u kardiochirurgických pacientů zvýšená, může se tento růstový faktor podílet i na pooperačním zvýšení exprese TLR2, které je popisováno při *in vitro* pokusech (643).

IL-10 působí podobně na granulocyty i monocyty. Účinkem IL-10 je exprese TLR2 v obou populacích zvyšována, na granulocytech je ale efekt mnohem méně výrazný (639). Je proto možné, že se během operace produkovaný IL-10 také podílí na zvýšení exprese TLR2 u našich pacientů v pooperačním období. Toto zvýšení jsme pozorovali u obou skupin pacientů třetí pooperační den, **graf 9A, 9B, 10, tabulka 9, 10**. Rozdíl proti výchozím hodnotám byl statisticky významný jen u pacientů bez metylprednisolonu.

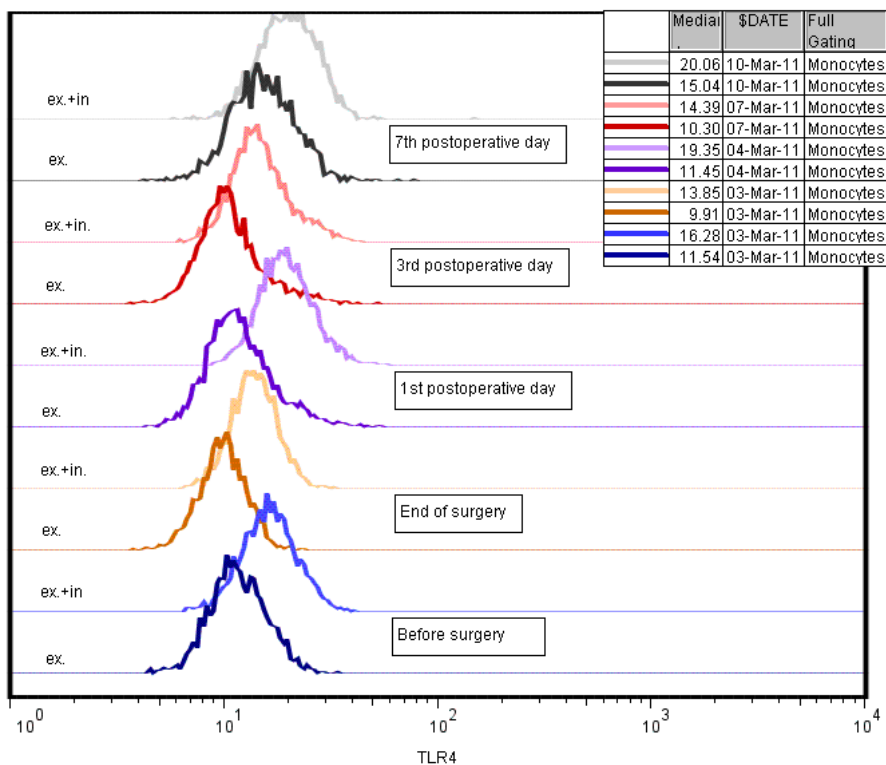
V průběhu operace bylo zaznamenáno snížení exprese také na granulocytech, je tedy pravděpodobné, že granulocyty vedle monocytů mohou dalším zdrojem solubilního receptoru TLR2.

5.4.4 Expresse Toll-like receptoru 4 (CD284)

5.4.4.1 Expresse TLR4 na monocytech

TLR4 tvoří receptorový komplex s CD14 a MD2 a v tomto komplexu rozpoznává LPS (lipid A), který je charakteristickým stavebním prvkem buněčné stěny gram-negativních bakterií. LPS je při rozpoznání navázaný na plazmatickou bílkovinu LBP. Přítomnost TLR4/MD2/CD14 receptorového komplexu je typická pro monocyty a makrofágy. Přestože po rozpoznání LPS dochází k rozvoji zánětu provázeného produkcí cytokinů (TNF α , IL-6, IL-10) a ke změnám exprese povrchových proteinů, intenzita exprese TLR4 se v počáteční fázi nemění (644). Opakované nebo vysoké dávky LPS často vedou k neodpovídavosti buněk. Rozdíly v odpovědi monocytů nejsou ovlivněny jen množstvím LPS, ale jsou dány taky různým charakterem lipidů A a rozdíly v aminokyselinových sekvencích rozpoznávacích receptorů, stejně jako polymorfismy molekul účastnících se příslušných signálních drah (645).

Shodně se studií Dybdahl a kol. (2002) (636) i my jsme naměřili snížení exprese TLR4 na monocytech v průběhu operace a krátce po ukončení operace, **obrázek 10**. Podobně jako u jiných typů uvolňovaných receptorů, i v případě TLR4 je odštěpování pravděpodobně indukováno aktivací příslušných enzymů při použití mimotělního oběhu. První pooperační den byla exprese TLR4 na monocytech upregulována, tak jako ve zmíněné studii Dybdahl a kol. (2002). U pacientů bez metylprednisolonu však bylo maximálních hodnot dosaženo třetí pooperační den stejně jako u exprese TLR2 na monocytech, **graf 11A, B, 12, tabulka 11, 12**.



Obrázek 10: Příklad exprese TLR4 v monocytární populaci u kardiochirurgického pacienta operovaného s MP. Rozdíly mezi povrchovou (ex.) a celkovou expresí (ex.+in.) TLR4 jsou zachyceny graficky i vyjádřením intenzity fluorescence. Značení bylo provedeno shodným postupem jako v případě CD163 (obrázek 8). TLR4 není v intracelulárním prostoru monocytů lokalizován zdaleka v takovém množství jako TLR2.

5.4.4.2 Expese TLR4 na granulocytech

Granulocyty stejně jako monocyty exprimují TLR4 a CD14. Oproti monocytům je však expese obou molekul na granulocytech nižší. Nicméně i v granulocytární populaci jsme pozorovali změny expese v průběhu operace a v pooperačním období. Podobně jako TLR2 na granulocytech i expese TLR4 je snížena v průběhu operace, pravděpodobně díky odštěpování TLR4 z povrchu granulocytů, a nejvyšších hodnot je u obou skupin pacientů dosaženo třetí pooperační den, **graf 13A, B, 14, tabulka 13, 14.**

Studium TLR2 a TLR4 pomocí koimunoprecipitace a „enzyme fragment complementation“ sice prokázalo interakci těchto dvou receptorů, nicméně dostupná literatura nezmiňuje koexpresi obou molekul na nativních buňkách (646). Důkaz se vyskytuje jen nepřímý, kdy docházelo k inhibici absorpce HCO_3^- působením LPS, jen když byl zároveň s TLR4 koexprimován TLR2 na buňkách specifických renálních tubulů (647). Přesto jsme v jedné z našich prací zahrnující skupinu pacientů bez metylprednisolonu pozorovali korelaci hodnot TLR2 a TLR4 na monocytech a granulocytech po ukončení mimotělního oběhu, po ukončení operace, první a třetí pooperační den, **tabulka IV.** Je tedy možné, že oba geny regulovány velmi podobnými mechanismy (638).

Tabulka IV. Korelace TLR2 a TLR4 (MFI) ve skupině pacientů bez metylprednisolonu

	po MO	po operaci	první den	třetí den
granulocyty	0.57	0.51	0.72	0.69
monocyty	0.73	0.73	0.74	0.77

Korelace je vyjádřena Spearmanovým korelačním koeficientem, $p < 0,05$

5.4.5 Expese Fas

5.4.5.1 Expese Fas na monocytech

Fas rozpoznává Fas ligand, a u buněk nesoucích Fas dochází k navození programované buněčné smrti. Aktivovány ale mohou být i alternativní dráhy, které k apoptóze nutně vést nemusí. O spuštění signalizačních drah vedoucích k apoptóze po vazbě FasL rozhoduje jednak množství Fas molekul na buněčném povrchu a také přítomnost jiných molekul, jako je třeba DcR3. DcR3 rovněž váže FasL, a přestože je nejčastěji tento receptor spojován s inhibicí apoptózy, lze jej považovat za molekulu s antiinflamatorními vlastnostmi (329, 648). Nově bývá tento receptor spojován se

schopností odlišení SIRS od septických stavů a prognózy u nemocných s akutním respiračním syndromem (649, 650).

Signalizace Fas je také závislá na typu buněk, u kterého dochází ke stimulaci receptoru. V případě kardiomyocytů Fas indukuje apoptózu alternativní cestou, kdy dochází k aktivaci kaspázy-3. Ligace Fas na kardiomyocytech je přitom kostimulačním signálem, který samostatně nevede k apoptóze. Pouze současná inhibice transkripce má za následek apoptózu kardiomyocytů. Z toho vyplývá, že kardiomyocyty během ischemicko-reperfúzního poškození potřebují další signály jako např. aktivaci TLR, protože ligace Fas receptoru není dostatečným impulsem pro navození jejich smrti (651). V případě lymfocytů v periferní krvi bylo při *in vitro* pokusech zjištěno, že sice IL-1 β , IL-2, TNF- α , IFN- γ vedou ke zvýšení exprese Fas, ale buňky nepodléhají apoptóze, pravděpodobně z důvodu zvýšené exprese antiapoptotické molekuly Bcl-2 (652). Obvykle je však zvýšená exprese Fas spojená s aktivací buněk, jejichž funkce v zánětové odpovědi může být regulována právě apoptózou. Proto není překvapující, že kardiochirurgická operace s mimotělním oběhem, která je vždy provázena intenzivním zánětem, vede ke zvýšení exprese Fas. U našich pacientů jsme pozorovali stimulační vliv metylprednisolonu na pooperační zvýšení exprese Fas na monocytech, **graf 16, tabulka 16**. Ve skupině s metylprednisolonem došlo k časnému zvýšení exprese Fas na monocytech a to první pooperační den. Exprese v této skupině zůstala zvýšená i třetí pooperační den, třebaže nevýznamně, **graf 15A, tabulka 15**. Ve skupině bez metylprednisolonu došlo k podobnému zvýšení o den později a exprese zůstala zvýšená až do sedmého pooperačního dne, **graf 15B, tabulka 15**. Mezi oběma skupinami byl rozdíl právě první pooperační den, kdy pacienti s metylprednisolonem dosahovali mnohem vyšších hodnot v expresi. Skupina Schmidt a kol. (2001) popisuje mechanismus účinku metylprednisolonu na stimulaci exprese Fas u monocytů. Podobné zvýšení tato skupina pozorovala i u exprese FasL a následnou zvýšenou incidenci apoptózy (653). Vzhledem k tomu, že *fasl* gen nese dva negativní GRE, je otázkou, zda je toto pozorování relevantní.

Exprese Fas na monocytech se v průběhu operace nemění ani u jedné skupiny pacientů. I když je známa existence sFas, kdy ke zvýšení v plazmě dochází u některých onemocnění, u kardiochirurgických pacientů ke snížení exprese na monocytech nedošlo a to přes fakt, že celá řada povrchových receptorů je v průběhu operace z monocytů odštěpována.

U pacientů se SIRS a multiorgánovou nedostatečností byla zjištěna zvýšená exprese jak Fas, tak FasL na monocytech (330). Je pravděpodobné, že Fas signalizace hraje určitou roli i u septických pacientů. Hodnoty Fas na monocytech jsou u našich septických pacientů vyjádřeny v tabulkách. Zatímco septická pacientka zařazená ve skupině bez metylprednisolonu dosahovala po celé období nejvyšších hodnot Fas na monocytech, u pacienta ve skupině s metylprednisolonem

byly naměřeny nejvyšší hodnoty pouze před operací a po ukončení mimotělního oběhu, poté klesaly, **tabulka V a VI**.

Tabulka V: Expres Fas (MFI) na monocytech ve skupině pacientů s metylprednisolonem

	před operací	po MO	po operaci	první den
pacient se sepsí	122	91	70	58
medián.hodnota skupiny	61	72	69	88

Tabulka VI: Expres Fas (MFI) na monocytech ve skupině pacientů bez metylprednisolonu

	před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacientka se sepsí	37	35	28	30	41	27
medián.hodnota skupiny	17	18	17	18	24	20

Během sepse bylo prokázáno zvýšení exprese Fas na monocytech. Interakce Fas-FasL se zřejmě podílí i na lymfopenii. Při studiu sepse bývá využíváno zvířecího modelu CLIP, „caecal ligation and puncture“, který nejlépe připomíná odpověď u septických pacientů. Právě na tomto modelu bylo zjištěno, že zablokování signální dráhy Fas v pozdější fázi (12 h po indukci) sepse vede k zvýšení přežití. Zablokování se projevovalo potlačením apoptózy Kupfferových buněk, snížením koncentrace IL-10 produkovaného Kupfferovými buňkami a snížením hodnot jaterních enzymů. Proto existuje domněnka, že tato ochrana je tkáňově specifická (391, 654).

5.4.5.2 Expres Fas na granulocytech

Fas je exprimovaný celou řadou buněk včetně granulocytů. Protože podstatnou část granulocytů tvoří krátce žijící neutrofile, dá se předpokládat, že Fas bude hrát významnou úlohu v regulaci počtu neutrofilů a bude se ve zvýšené míře objevovat na neutrofilech směřujících k apoptóze. Na rozdíl od monocytů exprese Fas na granulocytech během operace s mimotělním oběhem klesá a třetí pooperační den dosahuje maxima u obou skupin pacientů, **graf 17A, B, tabulka 17**. Je zajímavé, že také u granulocytů vede metylprednisolon k vyšší expresi Fas, která oproti skupině bez glukokortoidů zůstává významně zvýšená i sedmý pooperační den, **graf 18, tabulka 18**.

Uvádí se, že neutrofile septických pacientů jsou necitlivé k Fas indukované apoptóze. V literatuře jsou dostupné informace týkající se zvýšené koncentrace sFas v séru pacientů se sepsí (655). V **tabulce VII a VIII** je zachycena exprese Fas na granulocytech septických pacientů a exprese Fas na granulocytech charakteristická pro danou skupinu kardiochirurgických pacientů. Zatímco z první tabulky je patrné, že exprese Fas u pacienta se sepsí nebyla výrazně odlišná od exprese Fas ve skupině, septická pacientka v následující tabulce dosahovala nejvyšších hodnot Fas v rámci skupiny bez metylprednisolonu.

Tabulka VII: Exprese Fas (MFI) na granulocytech ve skupině pacientů s metylprednisolonem

	před operací	po MO	po operaci	první den
pacient se sepsí	60	57	42	71
medián.hodnota skupiny	52	49	46	55

Tabulka VIII: Exprese Fas (MFI) na granulocytech ve skupině pacientů bez metylprednisolonu

	před operací	po MO	po operaci	první den	třetí den	sedmý den
pacientka se sepsí	33	22	20	22	33	22
medián.hodnota skupiny	17	16	16	17	21	17

5.5 Sérové parametry

5.5.1 Interleukin-10

Hlavním zdrojem IL-10 jsou monocyty, ze kterých je tento interleukin uvolňován po stimulaci receptorového komplexu TLR4/MD2/CD14. Důležitou úlohou IL-10 je utlumení zánětu, které probíhá několika různými mechanismy. Zajímavým faktem je, že buňky pod vlivem IL-10 nezůstávají pasivní, ale jsou stále schopny vyvazovat cytokiny v okolí, aniž by došlo ke spuštění příslušných signálních drah (478, 656). Tato vlastnost představuje další úroveň protizáněťového účinku IL-10. Není překvapující, že produkce IL-10 je zvyšována působením glukokortikoidů. Jak však bylo zjištěno u skupiny, kde nebyl použit metylprednisolon, IL-10 je uvolňován již při použití samotného mimotělního oběhu během kardiochirurgické operace. Koncentrace IL-10 přitom velmi rychle reaguje na typ chirurgického zákroku a hodnoty IL-10 se zvyšují již po ukončení mimotělního oběhu, **graf 19, tabulka 19**. U pacientů s metylprednisolonem zůstává hladina IL-10 zvýšená až do třetího pooperačního dne. Hodnoty IL-10 ve skupině s metylprednisolonem jsou mnohem vyšší a významné rozdíly nacházíme od ukončení mimotělního oběhu až do prvního pooperačního dne.

U pacientů s metylprednisolonem je pooperační koncentrace IL-10 ovlivněná přítomností onemocnění diabetes mellitus. U diabetických pacientů pooperačně nenastává natolik výrazné zvýšení hladiny IL-10 jako je tomu u pacientů bez diabetu, **graf 25**.

Zvýšená hladina IL-10 bývá u kardiochirurgických pacientů spojována se sepsí a s pooperačním selháváním orgánů. Tato korelace byla vztažena k polymorfismu na pozici -1082 (A/G substituce) v promotorové oblasti IL-10. G alela bývá spojována s nižší produkcí IL-10 a nižší pravděpodobností rozvoje sepse (423, 425). Korelaci mezi vysokou koncentrací IL-10 a sepsí jsme u našich skupin pacientů nepozorovali – hodnoty IL-10 u septických pacientů nebyly vyšší než hodnoty typické pro danou skupinu. Přestože data v **tabulkách 24 a 25** postrádají statistickou signifikanci pro malý počet pozorování, ukazují, že u pacientů s pooperačním selháváním orgánů byla koncentrace IL-10 vyšší už po ukončení mimotělního oběhu. Výrazně zvýšená koncentrace

pak byla změřena po ukončení operace v obou skupinách pacientů. Přitom není jisté, jakou roli v pooperačních komplikacích IL-10 sehrává. Výsledky různých klinických studií jsou v protikladu (657, 658). Podobně je tomu u zvířecích modelů, kde se objevují konfliktní data. Některé studie přisuzují IL-10 ochranou roli, např. před nástupem ireverzibilního šokového stavu, zatímco další studie považují IL-10 za příčinu septického šoku (659, 660).

5.5.2 Interleukin-6

Stejně jako IL-10 také IL-6 je produkován po stimulaci komplexu TLR4/MD2/CD14. K produkci IL-6 dochází také po stimulaci FcγRI (661). IL-6 je považován za převážně prozáněťový cytokin, nicméně jeho účinkem je indukována exprese rovněž protizáněťových molekul, jako je např. haptoglobin (101). Hlavním zdrojem IL-6 jsou buňky monocyto-makrofágové linie a endoteliální buňky (662).

IL-6 v séru během operace stoupá a nejvyšších hodnot dosahuje po ukončení operace a první pooperační den v obou skupinách pacientů, **graf 20, tabulka 20**. Přitom se zdá, že použití metylprednisolonu snižuje produkci IL-6. Mezi oběma skupinami pacientů je po ukončení operace a první pooperační den významný rozdíl v dosažených hodnotách IL-6, které jsou u pacientů bez metylprednisolonu značně vyšší, **graf 21, tabulka 21**. K podobnému výsledku dospěla i studie Kawamura a kol. (1995). V této studii však byly pacientům před zavedením mimotělního oběhu podávány vysoké dávky metylprednisolonu – 30 mg/kg (663).

Dřívější práce týkající se IL-6 vznikaly s předpokladem, že tento prozáněťový cytokin by mohl být vhodným predikčním markerem u pacientů se selháváním orgánů, popř. sepsí po kardiochirurgické operaci. Takový předpoklad se ne zcela naplnil, i když u jiných typů pacientů byl podobně využitý, např. u dětí s meningitidou byl IL-6 zvýšený v případě septického šoku, a přestože po 24 h sledování hladina klesla, byla stále významně zvýšená proti kontrole ($p < 0,01$) (664). U kardiochirurgických pacientů byl IL-6 použitý v kombinaci s hladinou IL-10 jako prognostický marker u pacientů s pooperačními komplikacemi nebo časnou infekcí (665). Faktem zůstává, že jak IL-10, tak IL-6 jsou zvýšeny u velké části pacientů, kteří pooperačními komplikacemi nebo infekcí netrpí.

Jedním z důvodů, proč samotná IL-6 nemusí být vhodným diagnostickým markerem je, že hladina IL-6 je regulována vlastním IL-6 na mnoha úrovních. Jednak je to ovlivnění signální dráhy supresivními nebo inhibujícími molekulami, kam patří SOCS3, který se váže na fosforylované tyroziny podjednotky gp130 receptoru pro IL-6. SOCS3 navíc není indukován jen IL-6, ale např. také IL-10 (666). Dalším inhibítorem je PIAS3 blokuje STAT3 zprostředkovanou aktivaci genové exprese. STAT3 přitom tímto mechanismem nazývaným „negative feedback loop“ autoreguluje

svou funkci; PIAS3 se váže jen na aktivovaný (fosforylovaný) STAT3 (667, 668). Mezi modulátory odpovědi na přítomnost IL-6 patří i PTPázy (protein-tyrozin fosfatázy), které svými SH2 skupinami interagují s proteiny a jsou tak schopné měnit signalizaci (669). Další regulace je na úrovni IL-6 receptoru, který může být odštěpován a účastnit se transsignalizace nebo být endocytován společně s navázaným ligandem (670, 671). Při internalizaci je klíčová přítomnost cytoplazmatické části podjednotky gp130 (672). K významnému snížení exprese IL-6R/gp130 dochází během 30 – 60 min po navázání IL-6 (673). Internalizace je nevratná, IL-6 receptorový komplex musí být syntetizován *de novo* (674).

Přesto snaha o ovlivnění hladiny IL-6 může mít určitý terapeutický potenciál. Bylo zjištěno, že kombinace protilátek proti IL-6 a IL-6R je schopna redukovat systémový zánět a snížit mortalitu u experimentálně indukované sepse na myším modelu (675).

6 ZÁVĚR

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

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

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

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

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

7 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Spagnoli L.G., Bonanno E., Sangiorgi G., Mauriello A.: Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med* (2007), 48 (11), 1800-1815.
- (2) Hansson G.K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* (2005), 352 (16), 1685-1695.
- (3) Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W., Jr., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W.: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* (1995), 92 (5), 1355-1374.
- (4) Jones C.B., Sane D.C., Herrington D.M.: Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* (2003), 59 (4), 812-823.
- (5) Liu J., Sukhova G.K., Sun J.S., Xu W.H., Libby P., Shi G.P.: Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004), 24 (8), 1359-1366.
- (6) Zaman A.G., Helft G., Worthley S.G., Badimon J.J.: The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* (2000), 149 (2), 251-266.
- (7) Kolodgie F.D., Burke A.P., Farb A., Gold H.K., Yuan J., Narula J., Finn A.V., Virmani R.: The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* (2001), 16 (5), 285-292.
- (8) Tracy R.P.: Inflammation markers and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* (1999), 10 (5), 435-441.
- (9) Majello B., Arcone R., Toniatti C., Ciliberto G.: Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J* (1990), 9 (2), 457-465.
- (10) Rodondi N., Marques-Vidal P., Butler J., Sutton-Tyrrell K., Cornuz J., Satterfield S., Harris T., Bauer D.C., Ferrucci L., Vittinghoff E., Newman A.B.: Markers of atherosclerosis and inflammation for prediction of coronary heart disease in older adults. *Am J Epidemiol* (2010), 171 (5), 540-549.
- (11) Singh S.K., Suresh M.V., Voleti B., Agrawal A.: The connection between C-reactive protein and atherosclerosis. *Ann Med* (2008), 40 (2), 110-120.
- (12) Greenland P., Gidding S.S., Tracy R.P.: Commentary: lifelong prevention of atherosclerosis: the critical importance of major risk factor exposures. *Int J Epidemiol* (2002), 31 (6), 1129-1134.
- (13) Malinin T.I.: Remembering Alexis Carrel and Charles A. Lindbergh. *Tex Heart Inst J* (1996), 23 (1), 28-35.
- (14) DeBakey M.E.: A simple continuous-flow blood transfusion instrument. *New Orleans Med Surg J* (1934), 87, 386-389.

- (15) Jorpes E.: The chemistry of heparin. *Biochem J* (1935), 29 (8), 1817-1830.
- (16) Linhardt R.J., al-Hakim A., Liu J.A., Hoppensteadt D., Mascellani G., Bianchini P., Fareed J.: Structural features of dermatan sulfates and their relationship to anticoagulant and antithrombotic activities. *Biochem Pharmacol* (1991), 42 (8), 1609-1619.
- (17) Cohn L.H.: Fifty years of open-heart surgery. *Circulation* (2003), 107 (17), 2168-2170.
- (18) Lonsky V.: *Mimotelni obeh v klinicke praxi*. Grada Publishing (2004), 19-20.
- (19) Borst H.G., Mohr F.W.: The history of coronary artery surgery -- a brief review. *Thorac Cardiovasc Surg* (2001), 49 (4), 195-198.
- (20) Buxton B.F., Galvin S.D.: The history of arterial revascularization: from Kolesov to Tector and beyond. *Ann Cardiothorac Surg* (2013), 2 (4), 419-426.
- (21) Aydin S., Aydin S., Nesimi E.M., Sahin I., Yilmaz M., Kalayci M., Gungor O.: The cardiovascular system and the biochemistry of grafts used in heart surgery. *Springerplus* (2013), 2, 612.
- (22) Raja S.G., Haider Z., Ahmad M., Zaman H.: Saphenous vein grafts: to use or not to use? *Heart Lung Circ* (2004), 13 (2), 150-156.
- (23) Benetti F.J., Ballester C., Sani G., Doonstra P., Grandjean J.: Video assisted coronary bypass surgery. *J Card Surg* (1995), 10 (6), 620-625.
- (24) Buffolo E., de Andrade C.S., Branco J.N., Teles C.A., Aguiar L.F., Gomes W.J.: Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* (1996), 61 (1), 63-66.
- (25) Calafiore A.M., Giammarco G.D., Teodori G., Bosco G., D'Annunzio E., Barsotti A., Maddestra N., Paloscia L., Vitolla G., Sciarra A., Fino C., Contini M.: Left anterior descending coronary artery grafting via left anterior small thoracotomy without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* (1996), 61 (6), 1658-1663.
- (26) Machin D., Allsager C.: Principles of cardiopulmonary bypass. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* (2006), 6 (5), 176-181.
- (27) Ailawadi G., Zacour R.K.: Cardiopulmonary bypass/extracorporeal membrane oxygenation/left heart bypass: indications, techniques, and complications. *Surg Clin North Am* (2009), 89 (4), 781-viii.
- (28) Ginsberg S., Solina A., Papp D., Krause T., Pantin E., Scott G., Chuzhin Y., Cody R., Israel A.: A prospective comparison of three heat preservation methods for patients undergoing hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* (2000), 14 (5), 501-505.
- (29) Achneck H.E., Sileshi B., Parikh A., Milano C.A., Welsby I.J., Lawson J.H.: Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface. *Circulation* (2010), 122 (20), 2068-2077.
- (30) Esmon C.T.: The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* (2005), 131 (4), 417-430.

- (31) Tidball J.G.: Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005), 288 (2), R345-R353.
- (32) Nakanishi K., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J., Lewis J.C., McGee D.S., Hammon J.W., Jr.: Coronary artery endothelial dysfunction after global ischemia, blood cardioplegia, and reperfusion. *Ann Thorac Surg* (1994), 58 (1), 191-199.
- (33) Yellin A., Refaely Y., Paley M., Simansky D.: Major bleeding complicating deep sternal infection after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2003), 125 (3), 554-558.
- (34) Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C., Edwards S.W.: Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* (2010), 49 (9), 1618-1631.
- (35) Middleton J., Patterson A.M., Gardner L., Schmutz C., Ashton B.A.: Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* (2002), 100 (12), 3853-3860.
- (36) Singh S., Singh P., Singh G.: Systemic inflammatory response syndrome outcome in surgical patients. *Indian J Surg* (2009), 71 (4), 206-209.
- (37) Beyrau M., Bodkin J.V., Nourshargh S.: Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol* (2012), 2 (11), 120134.
- (38) Coutinho A.E., Chapman K.E.: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* (2011), 335 (1), 2-13.
- (39) Peiser L., Gordon S.: The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* (2001), 3 (2), 149-159.
- (40) Law S.K., Micklem K.J., Shaw J.M., Zhang X.P., Dong Y., Willis A.C., Mason D.Y.: A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* (1993), 23 (9), 2320-2325.
- (41) Aruffo A., Melnick M.B., Linsley P.S., Seed B.: The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *J Exp Med* (1991), 174 (4), 949-952.
- (42) Jones N.H., Clabby M.L., Dialynas D.P., Huang H.J., Herzenberg L.A., Strominger J.L.: Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* (1986), 323 (6086), 346-349.
- (43) Wijngaard P.L., Metzelaar M.J., MacHugh N.D., Morrison W.I., Clevers H.C.: Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* (1992), 149 (10), 3273-3277.
- (44) Gebe J.A., Kiener P.A., Ring H.Z., Li X., Francke U., Aruffo A.: Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins. *J Biol Chem* (1997), 272 (10), 6151-6158.
- (45) Mayer W.E., Tichy H.: A cDNA clone from the sea lamprey *Petromyzon marinus* coding for a scavenger receptor Cys-rich (SRCR) domain protein. *Gene* (1995), 164 (2), 267-271.

- (46) Li X.J., Snyder S.H.: Molecular cloning of Ebnerin, a von Ebner's gland protein associated with taste buds. *J Biol Chem* (1995), 270 (30), 17674-17679.
- (47) Takito J., Hikita C., Al-Awqati Q.: Hensin, a new collecting duct protein involved in the in vitro plasticity of intercalated cell polarity. *J Clin Invest* (1996), 98 (10), 2324-2331.
- (48) Cheng H., Bjercknes M., Chen H.: CRP-ductin: a gene expressed in intestinal crypts and in pancreatic and hepatic ducts. *Anat Rec* (1996), 244 (3), 327-343.
- (49) Nunes D.P., Keates A.C., Afdhal N.H., Offner G.D.: Bovine gall-bladder mucin contains two distinct tandem repeating sequences: evidence for scavenger receptor cysteine-rich repeats. *Biochem J* (1995), 310 (Pt 1), 41-48.
- (50) Sarrias M.R., Gronlund J., Padilla O., Madsen J., Holmskov U., Lozano F.: The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* (2004), 24 (1), 1-37.
- (51) Stover C.M., Schleypen J., Gronlund J., Speicher M.R., Schwaeble W.J., Holmskov U.: Assignment of CD163B, the gene encoding M160, a novel scavenger receptor, to human chromosome 12p13.3 by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Cytogenet Cell Genet* (2000), 90 (3-4), 246-247.
- (52) Van G.H., Van B.W., Van D.J., Delputte P.L., Nauwynck H.J.: Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* (2010), 84 (6), 3101-3105.
- (53) Van G.H., Delputte P.L., Nauwynck H.J.: Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* (2010), 47 (7-8), 1650-1660.
- (54) Holm D., Fink D.R., Gronlund J., Hansen S., Holmskov U.: Cloning and characterization of SCART1, a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule. *Mol Immunol* (2009), 46 (8-9), 1663-1672.
- (55) Kisielow J., Kopf M., Karjalainen K.: SCART scavenger receptors identify a novel subset of adult gammadelta T cells. *J Immunol* (2008), 181 (3), 1710-1716.
- (56) Schaer D.J., Boretti F.S., Hongegger A., Poehler D., Linnscheid P., Staeger H., Muller C., Schoedon G., Schaffner A.: Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics* (2001), 53 (2), 170-177.
- (57) Ritter M., Buechler C., Langmann T., Orso E., Klucken J., Schmitz G.: The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization. *Pathobiology* (1999), 67 (5-6), 257-261.
- (58) Ritter M., Buechler C., Langmann T., Schmitz G.: Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* (1999), 260 (2), 466-474.
- (59) Herzig C.T., Baldwin C.L.: Genomic organization and classification of the bovine WC1 genes and expression by peripheral blood gamma delta T cells. *BMC Genomics* (2009), 10, 191.

- (60) Graversen J.H., Madsen M., Moestrup S.K.: CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol* (2002), 34 (4), 309-314.
- (61) Nielsen M.J., Madsen M., Moller H.J., Moestrup S.K.: The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukoc Biol* (2006), 79 (4), 837-845.
- (62) Van Den Heuvel M.M., Tensen C.P., van As J.H., van den Berg T.K., Fluitsma D.M., Dijkstra C.D., Dopp E.A., Droste A., Van Gaalen F.A., Sorg C., Hogger P., Beelen R.H.: Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* (1999), 66 (5), 858-866.
- (63) Ritter M., Buechler C., Kapinsky M., Schmitz G.: Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C. *Eur J Immunol* (2001), 31 (4), 999-1009.
- (64) Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T.: The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* (2005), 293 (13), 1653-1662.
- (65) Schaer C.A., Schoedon G., Imhof A., Kurrer M.O., Schaer D.J.: Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res* (2006), 99 (9), 943-950.
- (66) Knutson M.D., Vafa M.R., Haile D.J., Wessling-Resnick M.: Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* (2003), 102 (12), 4191-4197.
- (67) Knutson M., Wessling-Resnick M.: Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (2003), 38 (1), 61-88.
- (68) Schaer D.J., Alayash A.I., Buehler P.W.: Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor. *Antioxid Redox Signal* (2007), 9 (7), 991-999.
- (69) Zwadlo G., Voegeli R., Osthoff K.S., Sorg C.: A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol* (1987), 55 (6), 295-304.
- (70) Buechler C., Ritter M., Orso E., Langmann T., Klucken J., Schmitz G.: Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* (2000), 67 (1), 97-103.
- (71) Weaver L.K., Hintz-Goldstein K.A., Pioli P.A., Wardwell K., Qureshi N., Vogel S.N., Guyre P.M.: Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* (2006), 80 (1), 26-35.
- (72) Boyle J.J., Johns M., Lo J., Chiodini A., Ambrose N., Evans P.C., Mason J.C., Haskard D.O.: Heme induces heme oxygenase 1 via Nrf2: role in the homeostatic macrophage response to intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011), 31 (11), 2685-2691.

- (73) Schaer C.A., Vallelian F., Imhof A., Schoedon G., Schaer D.J.: CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J Leukoc Biol* (2007), 82 (1), 106-110.
- (74) Moss M.L., Jin S.L., Milla M.E., Bickett D.M., Burkhart W., Carter H.L., Chen W.J., Clay W.C., Didsbury J.R., Hassler D., Hoffman C.R., Kost T.A., Lambert M.H., Leesnitzer M.A., McCauley P., McGeehan G., Mitchell J., Moyer M., Pahel G., Rocque W., Overton L.K., Schoenen F., Seaton T., Su J.L., Becherer J.D., .: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* (1997), 385 (6618), 733-736.
- (75) Hintz K.A., Rassias A.J., Wardwell K., Moss M.L., Morganelli P.M., Pioli P.A., Givan A.L., Wallace P.K., Yeager M.P., Guyre P.M.: Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* (2002), 72 (4), 711-717.
- (76) Etzerodt A., Maniecki M.B., Moller K., Moller H.J., Moestrup S.K.: Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* (2010), 88 (6), 1201-1205.
- (77) Davis B.H., Zarev P.V.: Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom* (2005), 63 (1), 16-22.
- (78) Timmermann M., Buck F., Sorg C., Hogger P.: Interaction of soluble CD163 with activated T lymphocytes involves its association with non-muscle myosin heavy chain type A. *Immunol Cell Biol* (2004), 82 (5), 479-487.
- (79) Frings W., Dreier J., Sorg C.: Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett* (2002), 526 (1-3), 93-96.
- (80) Hogger P., Sorg C.: Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* (2001), 288 (4), 841-843.
- (81) Fjeldborg K., Christiansen T., Bennetzen M., Ller J.M., Pedersen S.B., Richelsen B.R.: The Macrophage-Specific Serum Marker, Soluble CD163, Is Increased in Obesity and Reduced After Dietary-Induced Weight Loss. *Obesity (Silver Spring)* (2013).
- (82) Williams I.L., Wheatcroft S.B., Shah A.M., Kearney M.T.: Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2002), 26 (6), 754-764.
- (83) Moore K.J., Tabas I.: Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* (2011), 145 (3), 341-355.
- (84) Moller H.J., Frikke-Schmidt R., Moestrup S.K., Nordestgaard B.G., Tybjaerg-Hansen A.: Serum Soluble CD163 Predicts Risk of Type 2 Diabetes in the General Population. *Clin Chem* (2011), 57 (2), 291-297.
- (85) Fabriek B.O., Polfliet M.M., Vloet R.P., van der Schors R.C., Ligtenberg A.J., Weaver L.K., Geest C., Matsuno K., Moestrup S.K., Dijkstra C.D., van den Berg T.K.: The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood* (2007), 109 (12), 5223-5229.

- (86) Maxwell P.: HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney. *J Am Soc Nephrol* (2003), 14 (11), 2712-2722.
- (87) Moller H.J., Gronbaek H., Schiodt F.V., Holland-Fischer P., Schilsky M., Munoz S., Hassanein T., Lee W.M.: Soluble CD163 from activated macrophages predicts mortality in acute liver failure. *J Hepatol* (2007), 47 (5), 671-676.
- (88) Gaini S., Pedersen S.S., Koldkaer O.G., Pedersen C., Moestrup S.K., Moller H.J.: New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol* (2008), 151 (3), 423-431.
- (89) Perutz M.F.: Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Annu Rev Physiol* (1990), 52, 1-25.
- (90) Neer E.J., Konigsberg W., Guidotti G.: The interactions between alpha and beta chains of human hemoglobin. *J Biol Chem* (1968), 243 (8), 1971-1978.
- (91) Baron J.F.: Blood substitutes. Haemoglobin therapeutics in clinical practice. *Crit Care* (1999), 3 (5), R99-102.
- (92) Schaer D.J., Schaer C.A., Buehler P.W., Boykins R.A., Schoedon G., Alayash A.I., Schaffner A.: CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* (2006), 107 (1), 373-380.
- (93) Buehler P.W., Abraham B., Vallelian F., Linnemayr C., Pereira C.P., Cipollo J.F., Jia Y., Mikolajczyk M., Boretti F.S., Schoedon G., Alayash A.I., Schaer D.J.: Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood* (2009), 113 (11), 2578-2586.
- (94) Nagababu E., Rifkind J.M.: Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry* (2000), 39 (40), 12503-12511.
- (95) Reiter C.D., Wang X., Tanus-Santos J.E., Hogg N., Cannon R.O., III, Schechter A.N., Gladwin M.T.: Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* (2002), 8 (12), 1383-1389.
- (96) Gladwin M.T., Sachdev V., Jison M.L., Shizukuda Y., Plehn J.F., Minter K., Brown B., Coles W.A., Nichols J.S., Ernst I., Hunter L.A., Blackwelder W.C., Schechter A.N., Rodgers G.P., Castro O., Ognibene F.P.: Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* (2004), 350 (9), 886-895.
- (97) Melamed-Frank M., Lache O., Enav B.I., Szafrank T., Levy N.S., Ricklis R.M., Levy A.P.: Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* (2001), 98 (13), 3693-3698.
- (98) Mowri H.O., Frei B., Keaney J.F., Jr.: Glucose enhancement of LDL oxidation is strictly metal ion dependent. *Free Radic Biol Med* (2000), 29 (9), 814-824.
- (99) Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K.: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* (2001), 409 (6817), 198-201.

- (100) Venerando B., Fiorilli A., Croci G., Tringali C., Goi G., Mazzanti L., Curatola G., Segalini G., Massaccesi L., Lombardo A., Tettamanti G.: Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients. *Blood* (2002), 99 (3), 1064-1070.
- (101) Marinkovic S., Baumann H.: Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol Cell Biol* (1990), 10 (4), 1573-1583.
- (102) Maeda N., Yang F., Barnett D.R., Bowman B.H., Smithies O.: Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* (1984), 309 (5964), 131-135.
- (103) Kalmovarin N., Friedrichs W.E., O'Brien H.V., Linehan L.A., Bowman B.H., Yang F.: Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. *Inflammation* (1991), 15 (5), 369-379.
- (104) Yang F., Friedrichs W.E., Navarijo-Ashbaugh A.L., deGraffenried L.A., Bowman B.H., Coalson J.J.: Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. *Lab Invest* (1995), 73 (3), 433-440.
- (105) Maeda N.: Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. The haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. *J Biol Chem* (1985), 260 (11), 6698-6709.
- (106) Bowman B.H., Kurosky A.: Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet* (1982), 12, 189-4.
- (107) Kurosky A., Barnett D.R., Lee T.H., Touchstone B., Hay R.E., Arnott M.S., Bowman B.H., Fitch W.M.: Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980), 77 (6), 3388-3392.
- (108) Lustbader J.W., Arcoletto J.P., Birken S., Greer J.: Hemoglobin-binding site on haptoglobin probed by selective proteolysis. *J Biol Chem* (1983), 258 (2), 1227-1234.
- (109) Nielsen M.J., Petersen S.V., Jacobsen C., Thirup S., Enghild J.J., Graversen J.H., Moestrup S.K.: A unique loop extension in the serine protease domain of haptoglobin is essential for CD163 recognition of the haptoglobin-hemoglobin complex. *J Biol Chem* (2007), 282 (2), 1072-1079.
- (110) Wejman J.C., Hovsepian D., Wall J.S., Hainfeld J.F., Greer J.: Structure and assembly of haptoglobin polymers by electron microscopy. *J Mol Biol* (1984), 174 (2), 343-368.
- (111) Asleh R., Marsh S., Shilkrot M., Binah O., Guetta J., Lejbkowitz F., Enav B., Shehadeh N., Kanter Y., Lache O., Cohen O., Levy N.S., Levy A.P.: Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* (2003), 92 (11), 1193-1200.
- (112) Moller H.J., Nielsen M.J., Maniecki M.B., Madsen M., Moestrup S.K.: Soluble macrophage-derived CD163: a homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin-hemoglobin binding. *Immunobiology* (2010), 215 (5), 406-412.
- (113) Schaer D.J., Boretti F.S., Schoedon G., Schaffner A.: Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol* (2002), 119 (1), 239-243.

- (114) Langlois M.R., Delanghe J.R.: Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* (1996), 42 (10), 1589-1600.
- (115) Anderton R.: Hemolysis and haptoglobin levels. *N Engl J Med* (1971), 284 (18), 1044.
- (116) Hvidberg V., Maniecki M.B., Jacobsen C., Hojrup P., Moller H.J., Moestrup S.K.: Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* (2005), 106 (7), 2572-2579.
- (117) Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Calabrese V., Clark J.E., Green C.J.: Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem* (2000), 275 (18), 13613-13620.
- (118) Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H., Takeuchi K., Halliday N., Khan Y., Warley A., McCann F.E., Hider R.C., Frazer D.M., Anderson G.J., Vulpe C.D., Simpson R.J., McKie A.T.: Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* (2005), 122 (5), 789-801.
- (119) Schaer C.A., Vallelian F., Imhof A., Schoedon G., Schaer D.J.: Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol* (2008), 83 (2), 325-333.
- (120) Maines M.D., Ibrahim N.G., Kappas A.: Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver. *J Biol Chem* (1977), 252 (16), 5900-5903.
- (121) Raju V.S., McCoubrey W.K., Jr., Maines M.D.: Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta* (1997), 1351 (1-2), 89-104.
- (122) Maines M.D.: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* (1988), 2 (10), 2557-2568.
- (123) Shibahara S., Muller R.M., Taguchi H.: Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* (1987), 262 (27), 12889-12892.
- (124) Chang S.H., Garcia J., Melendez J.A., Kilberg M.S., Agarwal A.: Haem oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain. *Biochem J* (2003), 371 (Pt 3), 877-885.
- (125) Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R.: Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* (1969), 244 (23), 6388-6394.
- (126) Kikuchi G., Yoshida T., Noguchi M.: Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* (2005), 338 (1), 558-567.
- (127) Madsen M., Moller H.J., Nielsen M.J., Jacobsen C., Graversen J.H., van den Berg T., Moestrup S.K.: Molecular characterization of the haptoglobin-hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J Biol Chem* (2004), 279 (49), 51561-51567.
- (128) Fabriek B.O., van B.R., Deng D.M., Ligtenberg A.J., Nazmi K., Schornagel K., Vloet R.P., Dijkstra C.D., van den Berg T.K.: The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* (2009), 113 (4), 887-892.

- (129) Bover L.C., Cardo-Vila M., Kuniyasu A., Sun J., Rangel R., Takeya M., Aggarwal B.B., Arap W., Pasqualini R.: A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol* (2007), 178 (12), 8183-8194.
- (130) Moreno J.A., Munoz-Garcia B., Martin-Ventura J.L., Madrigal-Matute J., Orbe J., Paramo J.A., Ortega L., Egido J., Blanco-Colio L.M.: The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2009), 207 (1), 103-110.
- (131) Grundy H.O., Peltz G., Moore K.W., Golbus M.S., Jackson L.G., Lebo R.V.: The polymorphic Fc gamma receptor II gene maps to human chromosome 1q. *Immunogenetics* (1989), 29 (5), 331-339.
- (132) Sammartino L., Webber L.M., Hogarth P.M., McKenzie I.F., Garson O.M.: Assignment of the gene coding for human FcRII (CD32) to bands q23q24 on chromosome 1. *Immunogenetics* (1988), 28 (5), 380-381.
- (133) Seldin M.F., Morse H.C., LeBoeuf R.C., Steinberg A.D.: Establishment of a molecular genetic map of distal mouse chromosome 1: further definition of a conserved linkage group syntenic with human chromosome 1q. *Genomics* (1988), 2 (1), 48-56.
- (134) Peltz G., Frederick K., Anderson C.L., Peterlin B.M.: Characterization of the human monocyte high affinity Fc receptor (hu FcRI). *Mol Immunol* (1988), 25 (3), 243-250.
- (135) van de Winkel J.G., Ernst L.K., Anderson C.L., Chiu I.M.: Gene organization of the human high affinity receptor for IgG, Fc gamma RI (CD64). Characterization and evidence for a second gene. *J Biol Chem* (1991), 266 (20), 13449-13455.
- (136) Allen J.M., Seed B.: Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* (1989), 243 (4889), 378-381.
- (137) Ernst L.K., Duchemin A.M., Miller K.L., Anderson C.L.: Molecular characterization of six variant Fc gamma receptor class I (CD64) transcripts. *Mol Immunol* (1998), 35 (14-15), 943-954.
- (138) Ernst L.K., van de Winkel J.G., Chiu I.M., Anderson C.L.: Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* (1992), 267 (22), 15692-15700.
- (139) Hulett M.D., Hogarth P.M.: The second and third extracellular domains of Fc gamma RI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* (1998), 35 (14-15), 989-996.
- (140) Johnson P.F., McKnight S.L.: Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* (1989), 58, 799-839.
- (141) Le C.M., Kinet J.P., Berger R.: The human genes for the alpha and gamma subunits of the mast cell receptor for immunoglobulin E are located on human chromosome band 1q23. *Immunogenetics* (1990), 32 (3), 183-186.
- (142) Weissman A.M., Baniyash M., Hou D., Samelson L.E., Burgess W.H., Klausner R.D.: Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* (1988), 239 (4843), 1018-1021.

- (143) Bodman-Smith K.B., Gregory R.E., Harrison P.T., Raynes J.G.: FcγRIIIa expression with FcγRI results in C-reactive protein- and IgG-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* (2004), 75 (6), 1029-1035.
- (144) Cameron A.J., Harnett M.M., Allen J.M.: Differential recruitment of accessory molecules by FcγRI during monocyte differentiation. *Eur J Immunol* (2001), 31 (9), 2718-2725.
- (145) McKenzie S.E., Schreiber A.D.: Fc γ receptors in phagocytes. *Curr Opin Hematol* (1998), 5 (1), 16-21.
- (146) Lowry M.B., Duchemin A.M., Robinson J.M., Anderson C.L.: Functional separation of pseudopod extension and particle internalization during Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* (1998), 187 (2), 161-176.
- (147) Davis W., Harrison P.T., Hutchinson M.J., Allen J.M.: Two distinct regions of FC γ RI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis. *EMBO J* (1995), 14 (3), 432-441.
- (148) Davis W., Harrison P.T., Allen J.M.: Functional necessity for binding of monomeric IgG to permit internalisation of Fc γ RI. *Biochem Soc Trans* (1995), 23 (1), 120S.
- (149) Edberg J.C., Qin H., Gibson A.W., Yee A.M., Redecha P.B., Indik Z.K., Schreiber A.D., Kimberly R.P.: The CY domain of the FcγRIα chain (CD64) alters γ-chain tyrosine-based signaling and phagocytosis. *J Biol Chem* (2002), 277 (43), 41287-41293.
- (150) Coccia E.M., Del R.N., Stellacci E., Testa U., Marziali G., Battistini A.: STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesion molecules. *Int Immunol* (1999), 11 (7), 1075-1083.
- (151) Wiener E., Allen D., Porter R.J., Wickramasinghe S.N., Porter J.B., Chinprasertsuk S., Siripanyaphinyo U., Pattanapanyasat K., Fucharoen S., Wanachiwanawin W.: Role of FcγRI (CD64) in erythrocyte elimination and its up-regulation in thalassaemia. *Br J Haematol* (1999), 106 (4), 923-930.
- (152) Bovolenta C., Gasperini S., McDonald P.P., Cassatella M.A.: High affinity receptor for IgG (Fc γ RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-γ response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10. *J Immunol* (1998), 160 (2), 911-919.
- (153) Petroni K.C., Shen L., Guyre P.M.: Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-γ and glucocorticoids. *J Immunol* (1988), 140 (10), 3467-3472.
- (154) Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A.: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* (1992), 80 (8), 2012-2020.
- (155) Erbe D.V., Collins J.E., Shen L., Graziano R.F., Fanger M.W.: The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol* (1990), 27 (1), 57-67.

- (156) Goulding N.J., Knight S.M., Godolphin J.L., Guyre P.M.: Increase in neutrophil Fc gamma receptor I expression following interferon gamma treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (1992), 51 (4), 465-468.
- (157) Gericke G.H., Ericson S.G., Pan L., Mills L.E., Guyre P.M., Ely P.: Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol* (1995), 57 (3), 455-461.
- (158) Fanger N.A., Wardwell K., Shen L., Tedder T.F., Guyre P.M.: Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* (1996), 157 (2), 541-548.
- (159) Tanaka M., Krutzik S.R., Sieling P.A., Lee D.J., Rea T.H., Modlin R.L.: Activation of Fc gamma RI on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses. *J Immunol* (2009), 183 (4), 2349-2355.
- (160) Devaraj S., Du Clos T.W., Jialal I.: Binding and internalization of C-reactive protein by Fc gamma receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005), 25 (7), 1359-1363.
- (161) Li L., Roumeliotis N., Sawamura T., Renier G.: C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* (2004), 95 (9), 877-883.
- (162) Woollard K.J., Phillips D.C., Griffiths H.R.: Direct modulatory effect of C-reactive protein on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* (2002), 130 (2), 256-262.
- (163) Chang M.K., Binder C.J., Torzewski M., Witztum J.L.: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), 99 (20), 13043-13048.
- (164) Singh U., Dasu M.R., Yancey P.G., Afify A., Devaraj S., Jialal I.: Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res* (2008), 49 (5), 1015-1023.
- (165) Fujita Y., Kakino A., Nishimichi N., Yamaguchi S., Sato Y., Machida S., Cominacini L., Delneste Y., Matsuda H., Sawamura T.: Oxidized LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects. *Clin Chem* (2009), 55 (2), 285-294.
- (166) Fujita Y., Kakino A., Harada-Shiba M., Sato Y., Otsui K., Yoshimoto R., Sawamura T.: C-reactive protein uptake by macrophage cell line via class-A scavenger receptor. *Clin Chem* (2010), 56 (3), 478-481.
- (167) van de Winkel J.G., Anderson C.L.: Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol* (1991), 49 (5), 511-524.
- (168) Koolwijk P., Spierenburg G.T., Frasa H., Boot J.H., van de Winkel J.G., Bast B.J.: Interaction between hybrid mouse monoclonal antibodies and the human high-affinity IgG FcR, huFc gamma RI, on U937. Involvement of only one of the mIgG heavy chains in receptor binding. *J Immunol* (1989), 143 (5), 1656-1662.

- (169) Ha S., Ou Y., Vlasak J., Li Y., Wang S., Vo K., Du Y., Mach A., Fang Y., Zhang N.: Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology* (2011), 21 (8), 1087-1096.
- (170) van Vugt M.J., Van den Herik-Oudijk IE, van de Winkel J.G.: FcγRIa-gamma-chain complexes trigger antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in CD5+ B cell/macrophage IIA1.6 cells. *Clin Exp Immunol* (1998), 113 (3), 415-422.
- (171) Butchar J.P., Mehta P., Justiniano S.E., Guentherberg K.D., Kondadasula S.V., Mo X., Chemudupati M., Kanneganti T.D., Amer A., Muthusamy N., Jarjoura D., Marsh C.B., Carson W.E., III, Byrd J.C., Tridandapani S.: Reciprocal regulation of activating and inhibitory Fcγ receptors by TLR7/8 activation: implications for tumor immunotherapy. *Clin Cancer Res* (2010), 16 (7), 2065-2075.
- (172) van Ojik H.H., Bevaart L., Dahle C.E., Bakker A., Jansen M.J., van Vugt M.J., van de Winkel J.G., Weiner G.J.: CpG-A and B oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of antibody therapy by activating different effector cell populations. *Cancer Res* (2003), 63 (17), 5595-5600.
- (173) Cooper N.R., Nemerow G.R.: The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J Invest Dermatol* (1984), 83 (1 Suppl), 121s-127s.
- (174) Bodman-Smith K.B., Melendez A.J., Campbell I., Harrison P.T., Allen J.M., Raynes J.G.: C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (FcγRI). *Immunology* (2002), 107 (2), 252-260.
- (175) Gewurz H., Zhang X.H., Lint T.F.: Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* (1995), 7 (1), 54-64.
- (176) Mold C., Du Clos T.W.: C-reactive protein increases cytokine responses to *Streptococcus pneumoniae* through interactions with Fc γ receptors. *J Immunol* (2006), 176 (12), 7598-7604.
- (177) Mittal R., Sukumaran S.K., Selvaraj S.K., Wooster D.G., Babu M.M., Schreiber A.D., Verbeek J.S., Prasadarao N.V.: Fcγ receptor I alpha chain (CD64) expression in macrophages is critical for the onset of meningitis by *Escherichia coli* K1. *PLoS Pathog* (2010), 6 (11), e1001203.
- (178) Rodriguez W., Mold C., Marnell L.L., Hutt J., Silverman G.J., Tran D., Du Clos T.W.: Prevention and reversal of nephritis in MRL/lpr mice with a single injection of C-reactive protein. *Arthritis Rheum* (2006), 54 (1), 325-335.
- (179) Szalai A.J.: The antimicrobial activity of C-reactive protein. *Microbes Infect* (2002), 4 (2), 201-205.
- (180) Thompson D., Pepys M.B., Wood S.P.: The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* (1999), 7 (2), 169-177.
- (181) Narkates A.J., Volanakis J.E.: C-reactive protein binding specificities: artificial and natural phospholipid bilayers. *Ann N Y Acad Sci* (1982), 389, 172-182.

- (182) Volanakis J.E., Kaplan M.H.: Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* (1971), 136 (2), 612-614.
- (183) Gershov D., Kim S., Brot N., Elkon K.B.: C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* (2000), 192 (9), 1353-1364.
- (184) Rodriguez W., Mold C., Kataranovski M., Hutt J., Marnell L.L., Du Clos T.W.: Reversal of ongoing proteinuria in autoimmune mice by treatment with C-reactive protein. *Arthritis Rheum* (2005), 52 (2), 642-650.
- (185) Du Clos T.W., Zlock L.T., Hicks P.S., Mold C.: Decreased autoantibody levels and enhanced survival of (NZB x NZW) F1 mice treated with C-reactive protein. *Clin Immunol Immunopathol* (1994), 70 (1), 22-27.
- (186) Xia D., Samols D.: Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 94 (6), 2575-2580.
- (187) Szalai A.J., Weaver C.T., McCrory M.A., van Ginkel F.W., Reiman R.M., Kearney J.F., Marion T.N., Volanakis J.E.: Delayed lupus onset in (NZB x NZW)F1 mice expressing a human C-reactive protein transgene. *Arthritis Rheum* (2003), 48 (6), 1602-1611.
- (188) Szalai A.J., Nataf S., Hu X.Z., Barnum S.R.: Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. *J Immunol* (2002), 168 (11), 5792-5797.
- (189) Mold C., Rodriguez W., Rodic-Polic B., Du Clos T.W.: C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. *J Immunol* (2002), 169 (12), 7019-7025.
- (190) Shephard E.G., Anderson R., Rosen O., Fridkin M.: C-reactive protein (CRP) peptides inactivate enolase in human neutrophils leading to depletion of intracellular ATP and inhibition of superoxide generation. *Immunology* (1992), 76 (1), 79-85.
- (191) Zhong W., Zen Q., Tebo J., Schlottmann K., Coggeshall M., Mortensen R.F.: Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *J Immunol* (1998), 161 (5), 2533-2540.
- (192) Khreiss T., Jozsef L., Potempa L.A., Filep J.G.: Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* (2004), 110 (17), 2713-2720.
- (193) Hoffmeyer F., Witte K., Schmidt R.E.: The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology* (1997), 92 (4), 544-552.
- (194) Chuang F.Y., Sassaroli M., Unkeless J.C.: Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* (2000), 164 (1), 350-360.
- (195) Indik Z.K., Hunter S., Huang M.M., Pan X.Q., Chien P., Kelly C., Levinson A.I., Kimberly R.P., Schreiber A.D.: The high affinity Fc gamma receptor (CD64) induces phagocytosis in

the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of Fc gamma RIIIA imparts phagocytic function to Fc gamma RI. *Exp Hematol* (1994), 22 (7), 599-606.

- (196) Krutmann J., Kirnbauer R., Kock A., Schwarz T., Schopf E., May L.T., Sehgal P.B., Luger T.A.: Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation. *J Immunol* (1990), 145 (5), 1337-1342.
- (197) Jefferis R., Lund J.: Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol Lett* (2002), 82 (1-2), 57-65.
- (198) Zheng X.X., Steele A.W., Hancock W.W., Kawamoto K., Li X.C., Nickerson P.W., Li Y., Tian Y., Strom T.B.: IL-2 receptor-targeted cytolytic IL-2/Fc fusion protein treatment blocks diabetogenic autoimmunity in nonobese diabetic mice. *J Immunol* (1999), 163 (7), 4041-4048.
- (199) Powers D.B., Amersdorfer P., Poul M., Nielsen U.B., Shalaby M.R., Adams G.P., Weiner L.M., Marks J.D.: Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* (2001), 251 (1-2), 123-135.
- (200) Moore G.L., Chen H., Karki S., Lazar G.A.: Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs* (2010), 2 (2), 181-189.
- (201) Diniz S.N., Nomizo R., Cisalpino P.S., Teixeira M.M., Brown G.D., Mantovani A., Gordon S., Reis L.F., Dias A.A.: PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol* (2004), 75 (4), 649-656.
- (202) Kaisho T., Akira S.: Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* (2000), 20 (5), 393-405.
- (203) Janeway C.A., Jr.: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1989), 54 Pt 1, 1-13.
- (204) Medzhitov R., Janeway C.A., Jr.: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* (1997), 91 (3), 295-298.
- (205) Janeway C.A., Jr., Medzhitov R.: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* (2002), 20, 197-216.
- (206) Matzinger P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science* (2002), 296 (5566), 301-305.
- (207) Haehnel V., Schwarzfischer L., Fenton M.J., Rehli M.: Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* (2002), 168 (11), 5629-5637.
- (208) Rehli M., Poltorak A., Schwarzfischer L., Krause S.W., Andreesen R., Beutler B.: PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem* (2000), 275 (13), 9773-9781.
- (209) Hoffmann J.A., Reichhart J.M., Hetru C.: Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* (1996), 8 (1), 8-13.

- (210) Williams M.J., Rodriguez A., Kimbrell D.A., Eldon E.D.: The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J* (1997), 16 (20), 6120-6130.
- (211) Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V.: The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* (1988), 52 (2), 269-279.
- (212) Hultmark D.: Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet* (1993), 9 (5), 178-183.
- (213) Morrison D.C., Ryan J.L.: Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* (1979), 28, 293-450.
- (214) Brownlie R., Allan B.: Avian toll-like receptors. *Cell Tissue Res* (2011), 343 (1), 121-130.
- (215) Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y.: Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* (2007), 8, 124.
- (216) Matsushima N., Tachi N., Kuroki Y., Enkhbayar P., Osaki M., Kamiya M., Kretsinger R.H.: Structural analysis of leucine-rich-repeat variants in proteins associated with human diseases. *Cell Mol Life Sci* (2005), 62 (23), 2771-2791.
- (217) Dolan J., Walshe K., Alsbury S., Hokamp K., O'Keeffe S., Okafuji T., Miller S.F., Tear G., Mitchell K.J.: The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. *BMC Genomics* (2007), 8, 320.
- (218) Mistry J., Finn R.: Pfam: a domain-centric method for analyzing proteins and proteomes. *Methods Mol Biol* (2007), 396, 43-58.
- (219) Kajava A.V.: Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol* (1998), 277 (3), 519-527.
- (220) Kobe B., Kajava A.V.: The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* (2001), 11 (6), 725-732.
- (221) Gay N.J., Gangloff M.: Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* (2007), 76, 141-165.
- (222) Bell J.K., Botos I., Hall P.R., Askins J., Shiloach J., Segal D.M., Davies D.R.: The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005), 102 (31), 10976-10980.
- (223) Jin M.S., Kim S.E., Heo J.Y., Lee M.E., Kim H.M., Paik S.G., Lee H., Lee J.O.: Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* (2007), 130 (6), 1071-1082.
- (224) Kim H.M., Park B.S., Kim J.I., Kim S.E., Lee J., Oh S.C., Enkhbayar P., Matsushima N., Lee H., Yoo O.J., Lee J.O.: Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* (2007), 130 (5), 906-917.

- (225) Slack J.L., Schooley K., Bonnert T.P., Mitcham J.L., Qwarnstrom E.E., Sims J.E., Dower S.K.: Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* (2000), 275 (7), 4670-4678.
- (226) Burns K., Martinon F., Esslinger C., Pahl H., Schneider P., Bodmer J.L., Di M.F., French L., Tschopp J.: MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* (1998), 273 (20), 12203-12209.
- (227) Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C.A., Jr.: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* (1998), 2 (2), 253-258.
- (228) Underhill D.M., Ozinsky A., Hajjar A.M., Stevens A., Wilson C.B., Bassetti M., Aderem A.: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* (1999), 401 (6755), 811-815.
- (229) Norris J.L., Manley J.L.: Selective nuclear transport of the *Drosophila* morphogen dorsal can be established by a signaling pathway involving the transmembrane protein Toll and protein kinase A. *Genes Dev* (1992), 6 (9), 1654-1667.
- (230) Xu Y., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J.L., Tong L.: Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* (2000), 408 (6808), 111-115.
- (231) Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van H.C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* (1998), 282 (5396), 2085-2088.
- (232) Gao Q., Ma L.L., Gao X., Yan W., Williams P., Yin D.P.: TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. *Am J Transplant* (2010), 10 (7), 1588-1596.
- (233) Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S.: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* (2002), 420 (6913), 324-329.
- (234) Nagpal K., Plantinga T.S., Wong J., Monks B.G., Gay N.J., Netea M.G., Fitzgerald K.A., Golenbock D.T.: A TIR domain variant of MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling. *J Biol Chem* (2009), 284 (38), 25742-25748.
- (235) Verstak B., Nagpal K., Bottomley S.P., Golenbock D.T., Hertzog P.J., Mansell A.: MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for. *J Biol Chem* (2009), 284 (36), 24192-24203.
- (236) Lin Z., Lu J., Zhou W., Shen Y.: Structural insights into TIR domain specificity of the bridging adaptor Mal in TLR4 signaling. *PLoS One* (2012), 7 (4), e34202.
- (237) Muzio M., Ni J., Feng P., Dixit V.M.: IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* (1997), 278 (5343), 1612-1615.
- (238) Wesche H., Henzel W.J., Shillinglaw W., Li S., Cao Z.: MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* (1997), 7 (6), 837-847.

- (239) Burns K., Martinon F., Esslinger C., Pahl H., Schneider P., Bodmer J.L., Di M.F., French L., Tschopp J.: MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* (1998), 273 (20), 12203-12209.
- (240) Li S., Strelow A., Fontana E.J., Wesche H.: IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), 99 (8), 5567-5572.
- (241) Janssens S., Beyaert R.: Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* (2003), 11 (2), 293-302.
- (242) Li X., Commane M., Burns C., Vithalani K., Cao Z., Stark G.R.: Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol Cell Biol* (1999), 19 (7), 4643-4652.
- (243) Cao Z., Xiong J., Takeuchi M., Kurama T., Goeddel D.V.: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* (1996), 383 (6599), 443-446.
- (244) Qian Y., Commane M., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., Li X.: IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem* (2001), 276 (45), 41661-41667.
- (245) Takaesu G., Surabhi R.M., Park K.J., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., Gaynor R.B.: TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol* (2003), 326 (1), 105-115.
- (246) Takaesu G., Kishida S., Hiyama A., Yamaguchi K., Shibuya H., Irie K., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K.: TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* (2000), 5 (4), 649-658.
- (247) Shibuya H., Yamaguchi K., Shirakabe K., Tonegawa A., Gotoh Y., Ueno N., Irie K., Nishida E., Matsumoto K.: TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* (1996), 272 (5265), 1179-1182.
- (248) Takaesu G., Ninomiya-Tsuji J., Kishida S., Li X., Stark G.R., Matsumoto K.: Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* (2001), 21 (7), 2475-2484.
- (249) Kishida S., Sanjo H., Akira S., Matsumoto K., Ninomiya-Tsuji J.: TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway. *Genes Cells* (2005), 10 (5), 447-454.
- (250) Ishitani T., Takaesu G., Ninomiya-Tsuji J., Shibuya H., Gaynor R.B., Matsumoto K.: Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J* (2003), 22 (23), 6277-6288.
- (251) Weissman A.M.: Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001), 2 (3), 169-178.
- (252) Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C., Chen Z.J.: Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* (2000), 103 (2), 351-361.

- (253) Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J.: TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* (2001), 412 (6844), 346-351.
- (254) Akira S., Takeda K.: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* (2004), 4 (7), 499-511.
- (255) Jacobs M.D., Harrison S.C.: Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* (1998), 95 (6), 749-758.
- (256) Dobrzanski P., Ryseck R.P., Bravo R.: Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* (1995), 10 (5), 1003-1007.
- (257) Basak S., Kim H., Kearns J.D., Tergaonkar V., O'Dea E., Werner S.L., Benedict C.A., Ware C.F., Ghosh G., Verma I.M., Hoffmann A.: A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* (2007), 128 (2), 369-381.
- (258) Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S.: Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* (2011), 12 (8), 695-708.
- (259) Chen X., El G.M., Yoza B.K., McCall C.E.: The NF-kappaB factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *J Biol Chem* (2009), 284 (41), 27857-27865.
- (260) Yoza B.K., Hu J.Y., Cousart S.L., Forrest L.M., McCall C.E.: Induction of RelB participates in endotoxin tolerance. *J Immunol* (2006), 177 (6), 4080-4085.
- (261) El G.M., Yoza B.K., Chen X., Garcia B.A., Young N.L., McCall C.E.: Chromatin-specific remodeling by HMGB1 and linker histone H1 silences proinflammatory genes during endotoxin tolerance. *Mol Cell Biol* (2009), 29 (7), 1959-1971.
- (262) Oganessian G., Saha S.K., Guo B., He J.Q., Shahangian A., Zarnegar B., Perry A., Cheng G.: Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* (2006), 439 (7073), 208-211.
- (263) Hacker H., Karin M.: Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* (2006), 2006 (357), re13.
- (264) Kawai T., Takeuchi O., Fujita T., Inoue J., Muhlradt P.F., Sato S., Hoshino K., Akira S.: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* (2001), 167 (10), 5887-5894.
- (265) Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S.: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* (2003), 301 (5633), 640-643.
- (266) Hoebe K., Du X., Georgel P., Janssen E., Tabet K., Kim S.O., Goode J., Lin P., Mann N., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Han J., Beutler B.: Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* (2003), 424 (6950), 743-748.
- (267) Janssens S., Burns K., Tschopp J., Beyaert R.: Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* (2002), 12 (6), 467-471.

- (268) Janssens S., Burns K., Vercammen E., Tschopp J., Beyaert R.: MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett* (2003), 548 (1-3), 103-107.
- (269) Shi M., Deng W., Bi E., Mao K., Ji Y., Lin G., Wu X., Tao Z., Li Z., Cai X., Sun S., Xiang C., Sun B.: TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol* (2008), 9 (4), 369-377.
- (270) Yu X., Yi H., Guo C., Zuo D., Wang Y., Kim H.L., Subjeck J.R., Wang X.Y.: Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates Toll-like receptor 4-induced NF-kappaB activation by directly inhibiting ubiquitination of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6. *J Biol Chem* (2011), 286 (21), 18795-18806.
- (271) Yasukawa H., Ohishi M., Mori H., Murakami M., Chinen T., Aki D., Hanada T., Takeda K., Akira S., Hoshijima M., Hirano T., Chien K.R., Yoshimura A.: IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* (2003), 4 (6), 551-556.
- (272) Huggins J., Pellegrin T., Felgar R.E., Wei C., Brown M., Zheng B., Milner E.C., Bernstein S.H., Sanz I., Zand M.S.: CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of. *Blood* (2007), 109 (4), 1611-1619.
- (273) Bernasconi N.L., Onai N., Lanzavecchia A.: A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* (2003), 101 (11), 4500-4504.
- (274) Mansson A., Adner M., Hockerfelt U., Cardell L.O.: A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* (2006), 118 (4), 539-548.
- (275) Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y.J.: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* (2001), 194 (6), 863-869.
- (276) Kokkinopoulos I., Jordan W.J., Ritter M.A.: Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Mol Immunol* (2005), 42 (8), 957-968.
- (277) Sabroe I., Jones E.C., Usher L.R., Whyte M.K., Dower S.K.: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* (2002), 168 (9), 4701-4710.
- (278) Furrie E., Macfarlane S., Thomson G., Macfarlane G.T.: Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* (2005), 115 (4), 565-574.
- (279) Backhed F., Soderhall M., Ekman P., Normark S., Richter-Dahlfors A.: Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cell Microbiol* (2001), 3 (3), 153-158.
- (280) Samuelsson P., Hang L., Wullt B., Irjala H., Svanborg C.: Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* (2004), 72 (6), 3179-3186.

- (281) Wei X.Q., Guo Y.W., Liu J.J., Wen Z.F., Yang S.J., Yao J.L.: The significance of Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in patients with chronic hepatitis B. *Clin Invest Med* (2008), 31 (3), E123-E130.
- (282) Frantz S., Kobzik L., Kim Y.D., Fukazawa R., Medzhitov R., Lee R.T., Kelly R.A.: Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* (1999), 104 (3), 271-280.
- (283) Frantz S., Kelly R.A., Bourcier T.: Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* (2001), 276 (7), 5197-5203.
- (284) Panaro M.A., Gagliardi N., Saponaro C., Calvello R., Mitolo V., Cianciulli A.: Toll-like receptor 4 mediates LPS-induced release of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by embryonal cardiomyocytes: biological significance and clinical implications in human pathology. *Curr Pharm Des* (2010), 16 (7), 766-774.
- (285) Yumoto H., Chou H.H., Takahashi Y., Davey M., Gibson F.C., III, Genco C.A.: Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. *Infect Immun* (2005), 73 (12), 8050-8059.
- (286) Akira S., Takeda K., Kaisho T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* (2001), 2 (8), 675-680.
- (287) Tipping P.G.: Toll-like receptors: the interface between innate and adaptive immunity. *J Am Soc Nephrol* (2006), 17 (7), 1769-1771.
- (288) Cristofaro P., Opal S.M.: The Toll-like receptors and their role in septic shock. *Expert Opin Ther Targets* (2003), 7 (5), 603-612.
- (289) Doi K., Leelahavanichkul A., Yuen P.S., Star R.A.: Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* (2009), 119 (10), 2868-2878.
- (290) Arslan F., Keogh B., McGuirk P., Parker A.E.: TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators Inflamm* (2010), 2010, 704202.
- (291) Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K.M., Krammer P.H.: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* (1989), 245 (4915), 301-305.
- (292) Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* (1991), 66 (2), 233-243.
- (293) Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., : Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* (1992), 267 (15), 10709-10715.
- (294) Fu H., Coburn J., Collier R.J.: The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993), 90 (6), 2320-2324.

- (295) Cheng J., Liu C., Koopman W.J., Mountz J.D.: Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region. *J Immunol* (1995), 154 (3), 1239-1245.
- (296) Inazawa J., Itoh N., Abe T., Nagata S.: Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* (1992), 14 (3), 821-822.
- (297) Nagata S.: Apoptosis by death factor. *Cell* (1997), 88 (3), 355-365.
- (298) Ashkenazi A., Dixit V.M.: Death receptors: signaling and modulation. *Science* (1998), 281 (5381), 1305-1308.
- (299) Krammer P.H.: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* (2000), 407 (6805), 789-795.
- (300) Boldin M.P., Mett I.L., Varfolomeev E.E., Chumakov I., Shemer-Avni Y., Camonis J.H., Wallach D.: Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* (1995), 270 (1), 387-391.
- (301) Song H.Y., Dunbar J.D., Donner D.B.: Aggregation of the intracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system. *J Biol Chem* (1994), 269 (36), 22492-22495.
- (302) Kamitani T., Nguyen H.P., Yeh E.T.: Activation-induced aggregation and processing of the human Fas antigen. Detection with cytoplasmic domain-specific antibodies. *J Biol Chem* (1997), 272 (35), 22307-22314.
- (303) Beneteau M., Pizon M., Chaigne-Delalande B., Daburon S., Moreau P., De G.F., Ichas F., Rebillard A., Dimanche-Boitrel M.T., Taupin J.L., Moreau J.F., Legembre P.: Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res* (2008), 6 (4), 604-613.
- (304) Garcia-Fuster M.J., Ferrer-Alcon M., Miralles A., Garcia-Sevilla J.A.: Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2003), 368 (5), 421-431.
- (305) Garcia-Fuster M.J., Ferrer-Alcon M., Miralles A., Garcia-Sevilla J.A.: Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain. *Eur J Pharmacol* (2004), 496 (1-3), 63-69.
- (306) Jodo S., Kobayashi S., Kayagaki N., Ogura N., Feng Y., Amasaki Y., Fujisaku A., Azuma M., Yagita H., Okumura K., Koike T.: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* (1997), 107 (1), 89-95.
- (307) Cascino I., Fiucci G., Papoff G., Ruberti G.: Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* (1995), 154 (6), 2706-2713.
- (308) Papoff G., Cascino I., Eramo A., Starace G., Lynch D.H., Ruberti G.: An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* (1996), 156 (12), 4622-4630.

- (309) Cheng J., Zhou T., Liu C., Shapiro J.P., Brauer M.J., Kiefer M.C., Barr P.J., Mountz J.D.: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* (1994), 263 (5154), 1759-1762.
- (310) Hughes D.P., Crispe I.N.: A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J Exp Med* (1995), 182 (5), 1395-1401.
- (311) Liu J.H., Wei S., Lamy T., Li Y., Epling-Burnette P.K., Djeu J.Y., Loughran T.P., Jr.: Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia. *Blood* (2002), 100 (4), 1449-1453.
- (312) Sodeman T., Bronk S.F., Roberts P.J., Miyoshi H., Gores G.J.: Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2000), 278 (6), G992-G999.
- (313) Bennett M., Macdonald K., Chan S.W., Luzio J.P., Simari R., Weissberg P.: Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* (1998), 282 (5387), 290-293.
- (314) Yasuda M., Tanaka Y., Fujii K., Yasumoto K.: CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol* (2001), 13 (10), 1309-1319.
- (315) El Bassiouny A.E., El-Bassiouni N.E., Nosseir M.M., Zoheiry M.M., El-Ahwany E.G., Salah F., Omran Z.S., Ibrahim R.A.: Circulating and hepatic Fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Medscape J Med* (2008), 10 (6), 130.
- (316) Sloand E.M., Young N.S., Kumar P., Weichold F.F., Sato T., Maciejewski J.P.: Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* (1997), 89 (4), 1357-1363.
- (317) Elsing A., Burgert H.G.: The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998), 95 (17), 10072-10077.
- (318) Badley A.D., McElhinny J.A., Leibson P.J., Lynch D.H., Alderson M.R., Paya C.V.: Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* (1996), 70 (1), 199-206.
- (319) Felderhoff-Mueser U., Taylor D.L., Greenwood K., Kozma M., Stibenz D., Joashi U.C., Edwards A.D., Mehmet H.: Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* (2000), 10 (1), 17-29.
- (320) Song J.H., Bellail A., Tse M.C., Yong V.W., Hao C.: Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *J Neurosci* (2006), 26 (12), 3299-3308.

- (321) Beier C.P., Kolbl M., Beier D., Woertgen C., Bogdahn U., Brawanski A.: CD95/Fas mediates cognitive improvement after traumatic brain injury. *Cell Res* (2007), 17 (8), 732-734.
- (322) Pitti R.M., Marsters S.A., Lawrence D.A., Roy M., Kischkel F.C., Dowd P., Huang A., Donahue C.J., Sherwood S.W., Baldwin D.T., Godowski P.J., Wood W.I., Gurney A.L., Hillan K.J., Cohen R.L., Goddard A.D., Botstein D., Ashkenazi A.: Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* (1998), 396 (6712), 699-703.
- (323) Viard-Leveugle I., Veyrenc S., French L.E., Brambilla C., Brambilla E.: Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma. *J Pathol* (2003), 201 (2), 268-277.
- (324) Shibakita M., Tachibana M., Dhar D.K., Kotoh T., Kinugasa S., Kubota H., Masunaga R., Nagasue N.: Prognostic significance of Fas and Fas ligand expressions in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* (1999), 5 (9), 2464-2469.
- (325) Tai S.K., Chang H.C., Lan K.L., Lee C.T., Yang C.Y., Chen N.J., Chou T.Y., Tarng D.C., Hsieh S.L.: Decoy Receptor 3 Enhances Tumor Progression via Induction of Tumor-Associated Macrophages. *J Immunol* (2012), 188 (5), 2464-2471.
- (326) Rikhs B., van der Graaf W.T., Meijer C., Le P.T., Meersma G.J., de J.S., Fletcher J.A., Suurmeijer A.J.: Abundant Fas expression by gastrointestinal stromal tumours may serve as a therapeutic target for MegaFasL. *Br J Cancer* (2008), 99 (10), 1600-1606.
- (327) Lin W.W., Hsieh S.L.: Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol* (2011), 81 (7), 838-847.
- (328) Pitti R.M., Marsters S.A., Lawrence D.A., Roy M., Kischkel F.C., Dowd P., Huang A., Donahue C.J., Sherwood S.W., Baldwin D.T., Godowski P.J., Wood W.I., Gurney A.L., Hillan K.J., Cohen R.L., Goddard A.D., Botstein D., Ashkenazi A.: Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* (1998), 396 (6712), 699-703.
- (329) Tang C.H., Hsu T.L., Lin W.W., Lai M.Z., Yang R.S., Hsieh S.L., Fu W.M.: Attenuation of bone mass and increase of osteoclast formation in decoy receptor 3 transgenic mice. *J Biol Chem* (2007), 282 (4), 2346-2354.
- (330) Papathanassoglou E.D., Moynihan J.A., McDermott M.P., Ackerman M.H.: Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med* (2001), 29 (4), 709-718.
- (331) Takahashi T., Tanaka M., Brannan C.I., Jenkins N.A., Copeland N.G., Suda T., Nagata S.: Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* (1994), 76 (6), 969-976.
- (332) Orlinick J.R., Elkon K.B., Chao M.V.: Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *J Biol Chem* (1997), 272 (51), 32221-32229.

- (333) Starling G.C., Bajorath J., Emswiler J., Ledbetter J.A., Aruffo A., Kiener P.A.: Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *J Exp Med* (1997), 185 (8), 1487-1492.
- (334) Nagata S., Suda T.: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* (1995), 16 (1), 39-43.
- (335) Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S.: Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* (1994), 6 (10), 1567-1574.
- (336) Schneider P., Bodmer J.L., Thome M., Hofmann K., Holler N., Tschopp J.: Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* (1997), 416 (3), 329-334.
- (337) Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T., Ohmoto H., Ikeda S., Inoue S., Yoshino K., Okumura K., Yagita H.: Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* (1995), 182 (6), 1777-1783.
- (338) Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* (1993), 75 (6), 1169-1178.
- (339) Tanaka M., Suda T., Takahashi T., Nagata S.: Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* (1995), 14 (6), 1129-1135.
- (340) Mariani S.M., Matiba B., Baumler C., Krammer P.H.: Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* (1995), 25 (8), 2303-2307.
- (341) Boursalian T.E., Fink P.J.: Mutation in fas ligand impairs maturation of thymocytes bearing moderate affinity T cell receptors. *J Exp Med* (2003), 198 (2), 349-360.
- (342) Brunner T., Kasibhatla S., Pinkoski M.J., Frutschi C., Yoo N.J., Echeverri F., Mahboubi A., Green D.R.: Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J Biol Chem* (2000), 275 (13), 9767-9772.
- (343) Baumann S., Dostert A., Novac N., Bauer A., Schmid W., Fas S.C., Krueger A., Heinzl T., Kirchhoff S., Schutz G., Krammer P.H.: Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood* (2005), 106 (2), 617-625.
- (344) Chua H.L., Serov Y., Brahmi Z.: Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum Immunol* (2004), 65 (4), 317-327.
- (345) Lettau M., Qian J., Kabelitz D., Janssen O.: Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and natural killer cells. *Signal Transduction* (2004), 4 (5-6), 206-211.
- (346) Trambas C.M., Griffiths G.M.: Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* (2003), 4 (5), 399-403.
- (347) Lundy S.K.: Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflamm Res* (2009).
- (348) Liles W.C., Kiener P.A., Ledbetter J.A., Aruffo A., Klebanoff S.J.: Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* (1996), 184 (2), 429-440.

- (349) Choi C., Park J.Y., Lee J., Lim J.H., Shin E.C., Ahn Y.S., Kim C.H., Kim S.J., Kim J.D., Choi I.S., Choi I.H.: Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol* (1999), 162 (4), 1889-1895.
- (350) Bechmann I., Mor G., Nilsen J., Eliza M., Nitsch R., Naftolin F.: FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* (1999), 27 (1), 62-74.
- (351) Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., Ferguson T.A.: Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* (1995), 270 (5239), 1189-1192.
- (352) O'Connell J., Bennett M.W., O'Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F.: The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* (1999), 20 (1), 46-52.
- (353) Roskams T., Libbrecht L., Van D.B., Desmet V.: Fas and Fas ligand: strong co-expression in human hepatocytes surrounding hepatocellular carcinoma; can cancer induce suicide in peritumoural cells? *J Pathol* (2000), 191 (2), 150-153.
- (354) Li-Weber M., Krammer P.H.: Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* (2003), 15 (3), 145-157.
- (355) Nagata S.: Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* (1999), 33, 29-55.
- (356) Adachi M., Watanabe-Fukunaga R., Nagata S.: Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993), 90 (5), 1756-1760.
- (357) Kobayashi S., Hirano T., Kakinuma M., Uede T.: Transcriptional repression and differential splicing of Fas mRNA by early transposon (ETn) insertion in autoimmune *lpr* mice. *Biochem Biophys Res Commun* (1993), 191 (2), 617-624.
- (358) Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S.: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* (1992), 356 (6367), 314-317.
- (359) Russell J.H., Rush B., Weaver C., Wang R.: Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993), 90 (10), 4409-4413.
- (360) Siegel R.M., Muppidi J., Roberts M., Porter M., Wu Z.: Death receptor signaling and autoimmunity. *Immunol Res* (2003), 27 (2-3), 499-512.
- (361) Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* (1995), 14 (22), 5579-5588.
- (362) Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E.: Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* (1998), 17 (6), 1675-1687.
- (363) Algeciras-Schimmich A., Pietras E.M., Barnhart B.C., Legembre P., Vijayan S., Holbeck S.L., Peter M.E.: Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100 (20), 11445-11450.

- (364) Barnhart B.C., Alappat E.C., Peter M.E.: The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* (2003), 15 (3), 185-193.
- (365) Lee K.H., Feig C., Tchikov V., Schickel R., Hallas C., Schutze S., Peter M.E., Chan A.C.: The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* (2006), 25 (5), 1009-1023.
- (366) Algeciras-Schimmich A., Peter M.E.: Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett* (2003), 546 (2-3), 185-188.
- (367) Algeciras-Schimmich A., Shen L., Barnhart B.C., Murmann A.E., Burkhardt J.K., Peter M.E.: Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* (2002), 22 (1), 207-220.
- (368) Kohlhaas S.L., Craxton A., Sun X.M., Pinkoski M.J., Cohen G.M.: Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2007), 282 (17), 12831-12841.
- (369) Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M.: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* (1995), 81 (4), 505-512.
- (370) Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M.: FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* (1996), 271 (9), 4961-4965.
- (371) Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M.: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* (1996), 85 (6), 817-827.
- (372) Tewari M., Dixit V.M.: Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* (1995), 270 (7), 3255-3260.
- (373) Chang D.W., Xing Z., Pan Y., Algeciras-Schimmich A., Barnhart B.C., Yaish-Ohad S., Peter M.E., Yang X.: c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* (2002), 21 (14), 3704-3714.
- (374) Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P.H., Kirchhoff S.: Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* (2001), 276 (23), 20633-20640.
- (375) Thomas L.R., Stillman D.J., Thorburn A.: Regulation of Fas-associated death domain interactions by the death effector domain identified by a modified reverse two-hybrid screen. *J Biol Chem* (2002), 277 (37), 34343-34348.
- (376) Bender L.M., Morgan M.J., Thomas L.R., Liu Z.G., Thorburn A.: The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ* (2005), 12 (5), 473-481.
- (377) Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H., Winoto A.: Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* (1998), 392 (6673), 296-300.

- (378) Wallach D.: Apoptosis. Placing death under control. *Nature* (1997), 388 (6638), 123, 125-123, 126.
- (379) Ahn J.H., Park S.M., Cho H.S., Lee M.S., Yoon J.B., Vilcek J., Lee T.H.: Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* (2001), 276 (50), 47100-47106.
- (380) Leon-Bollotte L., Subramaniam S., Cauvard O., Plenchette-Colas S., Paul C., Godard C., Martinez-Ruiz A., Legembre P., Jeannin J.F., Bettaieb A.: S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* (2011), 140 (7), 2009-18, 2018.
- (381) Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Itoh N., Yonehara S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S.: The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* (1992), 148 (4), 1274-1279.
- (382) Desbarats J., Newell M.K.: Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med* (2000), 6 (8), 920-923.
- (383) Hao Z., Hampel B., Yagita H., Rajewsky K.: T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J Exp Med* (2004), 199 (10), 1355-1365.
- (384) Tran S.E., Holmstrom T.H., Ahonen M., Kahari V.M., Eriksson J.E.: MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* (2001), 276 (19), 16484-16490.
- (385) Zuliani C., Kleber S., Klussmann S., Wenger T., Kenzelmann M., Schreglmann N., Martinez A., del Rio J.A., Soriano E., Vodrazka P., Kuner R., Groene H.J., Herr I., Krammer P.H., Martin-Villalba A.: Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* (2006), 13 (1), 31-40.
- (386) Lambert C., Landau A.M., Desbarats J.: Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* (2003), 8 (6), 551-562.
- (387) Suzuki I., Fink P.J.: Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med* (1998), 187 (1), 123-128.
- (388) Luckerath K., Kirkin V., Melzer I.M., Thalheimer F.B., Siele D., Milani W., Adler T., Aguilar-Pimentel A., Horsch M., Michel G., Beckers J., Busch D.H., Ollert M., Gailus-Durner V., Fuchs H., Hrabe de A.M., Staal F.J., Rajalingam K., Hueber A.O., Strobl L.J., Zimmer-Strobl U., Zornig M.: Immune modulation by Fas ligand reverse signaling: lymphocyte proliferation is attenuated by the intracellular Fas ligand domain. *Blood* (2011), 117 (2), 519-529.
- (389) Kirkin V., Cahuzac N., Guardiola-Serrano F., Huault S., Luckerath K., Friedmann E., Novac N., Wels W.S., Martoglio B., Hueber A.O., Zornig M.: The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ* (2007), 14 (9), 1678-1687.

- (390) Chen L., Park S.M., Tumanov A.V., Hau A., Sawada K., Feig C., Turner J.R., Fu Y.X., Romero I.L., Lengyel E., Peter M.E.: CD95 promotes tumour growth. *Nature* (2010), 465 (7297), 492-496.
- (391) Chung C.S., Song G.Y., Lomas J., Simms H.H., Chaudry I.H., Ayala A.: Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol* (2003), 74 (3), 344-351.
- (392) Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R.: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* (1989), 170 (6), 2081-2095.
- (393) Mosmann T.R., Moore K.W.: The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* (1991), 12 (3), A49-A53.
- (394) Vieira P., de Waal-Malefyt R., Dang M.N., Johnson K.E., Kastelein R., Fiorentino D.F., deVries J.E., Roncarolo M.G., Mosmann T.R., Moore K.W.: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991), 88 (4), 1172-1176.
- (395) Zdanov A., Schalk-Hihi C., Gustchina A., Tsang M., Weatherbee J., Wlodawer A.: Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* (1995), 3 (6), 591-601.
- (396) Walter M.R., Nagabhushan T.L.: Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold. *Biochemistry* (1995), 34 (38), 12118-12125.
- (397) Walter M.R., Windsor W.T., Nagabhushan T.L., Lundell D.J., Lunn C.A., Zauodny P.J., Narula S.K.: Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* (1995), 376 (6537), 230-235.
- (398) Zdanov A., Schalk-Hihi C., Wlodawer A.: Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci* (1996), 5 (10), 1955-1962.
- (399) Josephson K., DiGiacomo R., Indelicato S.R., Iyo A.H., Nagabhushan T.L., Parker M.H., Walter M.R.: Design and analysis of an engineered human interleukin-10 monomer. *J Biol Chem* (2000), 275 (18), 13552-13557.
- (400) Hsu D.H., de Waal M.R., Fiorentino D.F., Dang M.N., Vieira P., de V.J., Spits H., Mosmann T.R., Moore K.W.: Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* (1990), 250 (4982), 830-832.
- (401) Blancho G., Gianello P., Germana S., Baetscher M., Sachs D.H., LeGuern C.: Molecular identification of porcine interleukin 10: regulation of expression in a kidney allograft model. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995), 92 (7), 2800-2804.
- (402) den H.G., Savelkoul H.F., Schoemaker R., Tijhaar E., Westphal A.H., de R.T., Weg-Schrijver E., van Neerven R.J.: Modulation of human immune responses by bovine interleukin-10. *PLoS One* (2011), 6 (3), e18188.
- (403) Moore K.W., Vieira P., Fiorentino D.F., Trounstein M.L., Khan T.A., Mosmann T.R.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* (1990), 248 (4960), 1230-1234.

- (404) Jinquan T., Larsen C.G., Gesser B., Matsushima K., Thestrup-Pedersen K.: Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. *J Immunol* (1993), 151 (9), 4545-4551.
- (405) Kotenko S.V., Saccani S., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., Pestka S.: Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), 97 (4), 1695-1700.
- (406) Fleming S.B., McCaughan C.A., Andrews A.E., Nash A.D., Mercer A.A.: A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* (1997), 71 (6), 4857-4861.
- (407) Slobedman B., Barry P.A., Spencer J.V., Avdic S., Abendroth A.: Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol* (2009), 83 (19), 9618-9629.
- (408) Moore K.W., O'Garra A., de Waal M.R., Vieira P., Mosmann T.R.: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* (1993), 11, 165-190.
- (409) Rode H.J., Janssen W., Rosen-Wolff A., Bugert J.J., Thein P., Becker Y., Darai G.: The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene. *Virus Genes* (1993), 7 (1), 111-116.
- (410) Jones B.C., Logsdon N.J., Josephson K., Cook J., Barry P.A., Walter M.R.: Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), 99 (14), 9404-9409.
- (411) Liu Y., de Waal M.R., Briere F., Parham C., Bridon J.M., Banchereau J., Moore K.W., Xu J.: The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* (1997), 158 (2), 604-613.
- (412) Gallagher G., Dickensheets H., Eskdale J., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., Peat J.D., Vazquez N., Pestka S., Donnelly R.P., Kotenko S.V.: Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun* (2000), 1 (7), 442-450.
- (413) Blumberg H., Conklin D., Xu W.F., Grossmann A., Brender T., Carollo S., Eagan M., Foster D., Haldeman B.A., Hammond A., Haugen H., Jelinek L., Kelly J.D., Madden K., Maurer M.F., Parrish-Novak J., Prunkard D., Sexson S., Sprecher C., Waggle K., West J., Whitmore T.E., Yao L., Kuechle M.K., Dale B.A., Chandrasekher Y.A.: Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* (2001), 104 (1), 9-19.
- (414) Dumoutier L., Van R.E., Ameye G., Michaux L., Renauld J.C.: IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* (2000), 1 (8), 488-494.
- (415) Xie M.H., Aggarwal S., Ho W.H., Foster J., Zhang Z., Stinson J., Wood W.I., Goddard A.D., Gurney A.L.: Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* (2000), 275 (40), 31335-31339.
- (416) Jiang H., Lin J.J., Su Z.Z., Goldstein N.I., Fisher P.B.: Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* (1995), 11 (12), 2477-2486.

- (417) Knappe A., Hor S., Wittmann S., Fickenscher H.: Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J Virol* (2000), 74 (8), 3881-3887.
- (418) Goris A., Marrosu M.G., Vandebroek K.: Novel polymorphisms in the IL-10 related AK155 gene (chromosome 12q15). *Genes Immun* (2001), 2 (5), 284-286.
- (419) Eskdale J., Kube D., Tesch H., Gallagher G.: Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* (1997), 46 (2), 120-128.
- (420) Hurme M., Lahdenpohja N., Santtila S.: Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Ann Med* (1998), 30 (5), 469-473.
- (421) Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D., Lazarus M., Sinnott P.J., Hutchinson I.V.: An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* (1997), 24 (1), 1-8.
- (422) Kang X., Kim H.J., Ramirez M., Salameh S., Ma X.: The septic shock-associated IL-10 -1082 A > G polymorphism mediates allele-specific transcription via poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol* (2010), 184 (7), 3718-3724.
- (423) Shu Q., Fang X., Chen Q., Stuber F.: IL-10 polymorphism is associated with increased incidence of severe sepsis. *Chin Med J (Engl)* (2003), 116 (11), 1756-1759.
- (424) Gong M.N., Thompson B.T., Williams P.L., Zhou W., Wang M.Z., Pothier L., Christiani D.C.: Interleukin-10 polymorphism in position -1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* (2006), 27 (4), 674-681.
- (425) Galley H.F., Lowe P.R., Carmichael R.L., Webster N.R.: Genotype and interleukin-10 responses after cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* (2003), 91 (3), 424-426.
- (426) Fijen J.W., Tulleken J.E., Hepkema B.G., van der Werf T.S., Ligtenberg J.J., Zijlstra J.G.: The influence of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter polymorphism on the inflammatory response in experimental human endotoxemia. *Clin Infect Dis* (2001), 33 (9), 1601-1603.
- (427) Hu X., Paik P.K., Chen J., Yarilina A., Kockeritz L., Lu T.T., Woodgett J.R., Ivashkiv L.B.: IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* (2006), 24 (5), 563-574.
- (428) Boonstra A., Rajsbaum R., Holman M., Marques R., Asselin-Paturel C., Pereira J.P., Bates E.E., Akira S., Vieira P., Liu Y.J., Trinchieri G., O'Garra A.: Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* (2006), 177 (11), 7551-7558.
- (429) Jang S., Uematsu S., Akira S., Salgame P.: IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* (2004), 173 (5), 3392-3397.
- (430) Rogers N.C., Slack E.C., Edwards A.D., Nolte M.A., Schulz O., Schweighoffer E., Williams D.L., Gordon S., Tybulewicz V.L., Brown G.D., Reis e Sousa: Syk-dependent cytokine

induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* (2005), 22 (4), 507-517.

- (431) Geijtenbeek T.B., van Vliet S.J., Koppel E.A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C.M., Appelmek B., van K.Y.: Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* (2003), 197 (1), 7-17.
- (432) Moreira L.O., El Kasmi K.C., Smith A.M., Finkelstein D., Fillon S., Kim Y.G., Nunez G., Tuomanen E., Murray P.J.: The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol* (2008), 10 (10), 2067-2077.
- (433) Gerber J.S., Mosser D.M.: Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* (2001), 166 (11), 6861-6868.
- (434) Edwards A.D., Manickasingham S.P., Sporri R., Diebold S.S., Schulz O., Sher A., Kaisho T., Akira S., Reis e Sousa: Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* (2002), 169 (7), 3652-3660.
- (435) Ma W., Lim W., Gee K., Aucoin S., Nandan D., Kozlowski M., Diaz-Mitoma F., Kumar A.: The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* (2001), 276 (17), 13664-13674.
- (436) Jarnicki A.G., Conroy H., Brereton C., Donnelly G., Toomey D., Walsh K., Sweeney C., Leavy O., Fletcher J., Lavelle E.C., Dunne P., Mills K.H.: Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol* (2008), 180 (6), 3797-3806.
- (437) Yi A.K., Yoon J.G., Yeo S.J., Hong S.C., English B.K., Krieg A.M.: Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol* (2002), 168 (9), 4711-4720.
- (438) Dillon S., Agrawal A., Van D.T., Landreth G., McCauley L., Koh A., Maliszewski C., Akira S., Pulendran B.: A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* (2004), 172 (8), 4733-4743.
- (439) Agrawal A., Dillon S., Denning T.L., Pulendran B.: ERK1^{-/-} mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (2006), 176 (10), 5788-5796.
- (440) Tone M., Powell M.J., Tone Y., Thompson S.A., Waldmann H.: IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* (2000), 165 (1), 286-291.
- (441) Sharma A., Kumar M., Aich J., Hariharan M., Brahmachari S.K., Agrawal A., Ghosh B.: Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009), 106 (14), 5761-5766.

- (442) Brewer G., Sacconi S., Sarkar S., Lewis A., Pestka S.: Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1. *J Interferon Cytokine Res* (2003), 23 (10), 553-564.
- (443) Hammer M., Mages J., Dietrich H., Schmitz F., Striebel F., Murray P.J., Wagner H., Lang R.: Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur J Immunol* (2005), 35 (10), 2991-3001.
- (444) Staples K.J., Smallie T., Williams L.M., Foey A., Burke B., Foxwell B.M., Ziegler-Heitbrock L.: IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol* (2007), 178 (8), 4779-4785.
- (445) Lang R., Patel D., Morris J.J., Rutschman R.L., Murray P.J.: Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* (2002), 169 (5), 2253-2263.
- (446) Hawrylowicz C.M., O'Garra A.: Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* (2005), 5 (4), 271-283.
- (447) Roncarolo M.G., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., Levings M.K.: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* (2006), 212, 28-50.
- (448) Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A.: In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* (2002), 195 (5), 603-616.
- (449) Siewe L., Bollati-Fogolin M., Wickenhauser C., Krieg T., Muller W., Roers A.: Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol* (2006), 36 (12), 3248-3255.
- (450) Moore K.W., de Waal M.R., Coffman R.L., O'Garra A.: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* (2001), 19, 683-765.
- (451) Bravo J., Staunton D., Heath J.K., Jones E.Y.: Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J* (1998), 17 (6), 1665-1674.
- (452) Josephson K., Logsdon N.J., Walter M.R.: Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity* (2001), 15 (1), 35-46.
- (453) Jones B.C., Logsdon N.J., Walter M.R.: Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure* (2008), 16 (9), 1333-1344.
- (454) Pletnev S., Magracheva E., Wlodawer A., Zdanov A.: A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors. *BMC Struct Biol* (2005), 5, 10.
- (455) Yoon S.I., Jones B.C., Logsdon N.J., Harris B.D., Deshpande A., Radaeva S., Halloran B.A., Gao B., Walter M.R.: Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure* (2010), 18 (5), 638-648.
- (456) Liu Y., Wei S.H., Ho A.S., de Waal M.R., Moore K.W.: Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* (1994), 152 (4), 1821-1829.

- (457) Kotenko S.V., Krause C.D., Izotova L.S., Pollack B.P., Wu W., Pestka S.: Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* (1997), 16 (19), 5894-5903.
- (458) Tan J.C., Braun S., Rong H., DiGiacomo R., Dolphin E., Baldwin S., Narula S.K., Zavodny P.J., Chou C.C.: Characterization of recombinant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. *J Biol Chem* (1995), 270 (21), 12906-12911.
- (459) Donnelly R.P., Dickensheets H., Finbloom D.S.: The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* (1999), 19 (6), 563-573.
- (460) Wehinger J., Gouilleux F., Groner B., Finke J., Mertelsmann R., Weber-Nordt R.M.: IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* (1996), 394 (3), 365-370.
- (461) Weber-Nordt R.M., Riley J.K., Greenlund A.C., Moore K.W., Darnell J.E., Schreiber R.D.: Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* (1996), 271 (44), 27954-27961.
- (462) Ricchetti G.A., Williams L.M., Foxwell B.M.: Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* (2004), 76 (3), 719-726.
- (463) Bazan J.F.: Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990), 87 (18), 6934-6938.
- (464) Bazan J.F.: Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell* (1990), 61 (5), 753-754.
- (465) Weber-Nordt R.M., Meraz M.A., Schreiber R.D.: Lipopolysaccharide-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts. *J Immunol* (1994), 153 (8), 3734-3744.
- (466) Denning T.L., Campbell N.A., Song F., Garofalo R.P., Klimpel G.R., Reyes V.E., Ernst P.B.: Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int Immunol* (2000), 12 (2), 133-139.
- (467) Michel G., Mirmohammadsadegh A., Olasz E., Jarzebska-Deussen B., Muschen A., Kemeny L., Abts H.F., Ruzicka T.: Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. *J Immunol* (1997), 159 (12), 6291-6297.
- (468) Yue F.Y., Dummer R., Geertsen R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S., Burg G.: Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* (1997), 71 (4), 630-637.
- (469) Otsuki T., Yamada O., Yata K., Sakaguchi H., Kurebayashi J., Yawata Y., Ueki A.: Expression and production of interleukin 10 in human myeloma cell lines. *Br J Haematol* (2000), 111 (3), 835-842.

- (470) Crepaldi L., Gasperini S., Lapinet J.A., Calzetti F., Pinarci C., Liu Y., Zurawski S., de Waal M.R., Moore K.W., Cassatella M.A.: Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. *J Immunol* (2001), 167 (4), 2312-2322.
- (471) Tamassia N., Calzetti F., Menestrina N., Rossato M., Bazzoni F., Gottin L., Cassatella M.A.: Circulating neutrophils of septic patients constitutively express IL-10R1 and are promptly responsive to IL-10. *Int Immunol* (2008), 20 (4), 535-541.
- (472) Sheikh F., Baurin V.V., Lewis-Antes A., Shah N.K., Smirnov S.V., Anantha S., Dickensheets H., Dumoutier L., Renaud J.C., Zdanov A., Donnelly R.P., Kotenko S.V.: Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol* (2004), 172 (4), 2006-2010.
- (473) Kotenko S.V., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., Esterova E., Dickensheets H., Donnelly R.P., Pestka S.: Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* (2001), 276 (4), 2725-2732.
- (474) Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore T.E., Kuestner R., Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrand C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant F.J., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D., Klucher K.M.: IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* (2003), 4 (1), 63-68.
- (475) Witte K., Witte E., Sabat R., Wolk K.: IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev* (2010), 21 (4), 237-251.
- (476) Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W.: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* (1993), 75 (2), 263-274.
- (477) Spencer S.D., Di M.F., Hooley J., Pitts-Meek S., Bauer M., Ryan A.M., Sordat B., Gibbs V.C., Aguet M.: The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* (1998), 187 (4), 571-578.
- (478) D'Amico G., Frascaroli G., Bianchi G., Transidico P., Doni A., Vecchi A., Sozzani S., Allavena P., Mantovani A.: Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol* (2000), 1 (5), 387-391.
- (479) MacNeil I.A., Suda T., Moore K.W., Mosmann T.R., Zlotnik A.: IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* (1990), 145 (12), 4167-4173.
- (480) Rousset F., Garcia E., Defrance T., Peronne C., Vezzio N., Hsu D.H., Kastelein R., Moore K.W., Banchereau J.: Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), 89 (5), 1890-1893.
- (481) Go N.F., Castle B.E., Barrett R., Kastelein R., Dang W., Mosmann T.R., Moore K.W., Howard M.: Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* (1990), 172 (6), 1625-1631.
- (482) Saeland S., Duvert V., Moreau I., Banchereau J.: Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *J Exp Med* (1993), 178 (1), 113-120.

- (483) Burdin N., Van K.C., Galibert L., Abrams J.S., Wijdenes J., Banchereau J., Rousset F.: Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* (1995), 154 (6), 2533-2544.
- (484) Lee T.S., Chau L.Y.: Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* (2002), 8 (3), 240-246.
- (485) Tron K., Samoylenko A., Musikowski G., Kobe F., Immenschuh S., Schaper F., Ramadori G., Kietzmann T.: Regulation of rat heme oxygenase-1 expression by interleukin-6 via the Jak/STAT pathway in hepatocytes. *J Hepatol* (2006), 45 (1), 72-80.
- (486) Ning W., Song R., Li C., Park E., Mohsenin A., Choi A.M., Choi M.E.: TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2002), 283 (5), L1094-L1102.
- (487) Naidu S., Vijayan V., Santoso S., Kietzmann T., Immenschuh S.: Inhibition and genetic deficiency of p38 MAPK up-regulates heme oxygenase-1 gene expression via Nrf2. *J Immunol* (2009), 182 (11), 7048-7057.
- (488) Denys A., Udalova I.A., Smith C., Williams L.M., Ciesielski C.J., Campbell J., Andrews C., Kwaitkowski D., Foxwell B.M.: Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. *J Immunol* (2002), 168 (10), 4837-4845.
- (489) Kontoyiannis D., Kotlyarov A., Carballo E., Alexopoulou L., Blakeshear P.J., Gaestel M., Davis R., Flavell R., Kollias G.: Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J* (2001), 20 (14), 3760-3770.
- (490) Schmitz J., Weissenbach M., Haan S., Heinrich P.C., Schaper F.: SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* (2000), 275 (17), 12848-12856.
- (491) Nicholson S.E., De S.D., Fabri L.J., Corbin J., Willson T.A., Zhang J.G., Silva A., Asimakis M., Farley A., Nash A.D., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A., Baca M.: Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), 97 (12), 6493-6498.
- (492) Krebs D.L., Hilton D.J.: SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* (2001), 19 (5), 378-387.
- (493) Hansen J.A., Lindberg K., Hilton D.J., Nielsen J.H., Billestrup N.: Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* (1999), 13 (11), 1832-1843.
- (494) Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J.: A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* (1997), 387 (6636), 917-921.
- (495) Somers W., Stahl M., Seehra J.S.: 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* (1997), 16 (5), 989-997.

- (496) Sehgal P.B., Zilberstein A., Ruggieri R.M., May L.T., Ferguson-Smith A., Slate D.L., Revel M., Ruddle F.H.: Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1986), 83 (14), 5219-5222.
- (497) Yoshizaki K., Nakagawa T., Fukunaga K., Tseng L.T., Yamamura Y., Kishimoto T.: Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *J Immunol* (1984), 132 (6), 2948-2954.
- (498) Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu K., Nakajima K., Pyun K.H., Kishimoto T.: Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* (1985), 82 (16), 5490-5494.
- (499) Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsuda T., Kashiwamura S., Nakajima K., Koyama K., Iwamatsu A., .: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* (1986), 324 (6092), 73-76.
- (500) Zilberstein A., Ruggieri R., Korn J.H., Revel M.: Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* (1986), 5 (10), 2529-2537.
- (501) Brakenhoff J.P., de Groot E.R., Evers R.F., Pannekoek H., Aarden L.A.: Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in *Escherichia coli*. *J Immunol* (1987), 139 (12), 4116-4121.
- (502) Libermann T.A., Baltimore D.: Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* (1990), 10 (5), 2327-2334.
- (503) Yasukawa K., Hirano T., Watanabe Y., Muratani K., Matsuda T., Nakai S., Kishimoto T.: Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* (1987), 6 (10), 2939-2945.
- (504) May L.T., Ghrayeb J., Santhanam U., Tatter S.B., Stoeber Z., Helfgott D.C., Chiorazzi N., Grieninger G., Sehgal P.B.: Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* (1988), 263 (16), 7760-7766.
- (505) Santhanam U., Ghrayeb J., Sehgal P.B., May L.T.: Post-translational modifications of human interleukin-6. *Arch Biochem Biophys* (1989), 274 (1), 161-170.
- (506) Runkel L., Meier W., Pepinsky R.B., Karpusas M., Whitty A., Kimball K., Brickelmaier M., Muldowney C., Jones W., Goelz S.E.: Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res* (1998), 15 (4), 641-649.
- (507) May L.T., Shaw J.E., Khanna A.K., Zabriskie J.B., Sehgal P.B.: Marked cell-type-specific differences in glycosylation of human interleukin-6. *Cytokine* (1991), 3 (3), 204-211.
- (508) May L.T., Sehgal P.B.: Phosphorylation of interleukin-6 at serine54: an early event in the secretory pathway in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (1992), 185 (2), 524-530.

- (509) Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L.: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* (1998), 334 (Pt 2), 297-314.
- (510) Kishimoto T.: Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* (2005), 23, 1-21.
- (511) Taga T., Narazaki M., Yasukawa K., Saito T., Miki D., Hamaguchi M., Davis S., Shoyab M., Yancopoulos G.D., Kishimoto T.: Functional inhibition of hematopoietic and neurotrophic cytokines by blocking the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), 89 (22), 10998-11001.
- (512) Senaldi G., Varnum B.C., Sarmiento U., Starnes C., Lile J., Scully S., Guo J., Elliott G., McNinch J., Shaklee C.L., Freeman D., Manu F., Simonet W.S., Boone T., Chang M.S.: Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999), 96 (20), 11458-11463.
- (513) Schilling D., Thomas K., Nixdorff K., Vogel S.N., Fenton M.J.: Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages. *J Immunol* (2002), 169 (10), 5874-5880.
- (514) Hershko D.D., Robb B.W., Luo G., Hasselgren P.O.: Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2002), 283 (5), R1140-R1148.
- (515) Shalaby M.R., Waage A., Aarden L., Espevik T.: Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* (1989), 53 (3), 488-498.
- (516) Musso T., Espinoza-Delgado I., Pulkki K., Gusella G.L., Longo D.L., Varesio L.: IL-2 induces IL-6 production in human monocytes. *J Immunol* (1992), 148 (3), 795-800.
- (517) Liu J., Li X., Yue Y., Li J., He T., He Y.: The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol* (2005), 2 (6), 455-460.
- (518) Horii Y., Muraguchi A., Suematsu S., Matsuda T., Yoshizaki K., Hirano T., Kishimoto T.: Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J Immunol* (1988), 141 (5), 1529-1535.
- (519) Zhou L.J., Tedder T.F.: A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* (1995), 86 (9), 3295-3301.
- (520) Ericson S.G., Zhao Y., Gao H., Miller K.L., Gibson L.F., Lynch J.P., Landreth K.S.: Interleukin-6 production by human neutrophils after Fc-receptor cross-linking or exposure to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* (1998), 91 (6), 2099-2107.
- (521) Planck S.R., Dang T.T., Graves D., Tara D., Ansel J.C., Rosenbaum J.T.: Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1992), 33 (1), 78-82.
- (522) Van Wagoner N.J., Oh J.W., Repovic P., Benveniste E.N.: Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci* (1999), 19 (13), 5236-5244.

- (523) Han Y., Runge M.S., Brasier A.R.: Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* (1999), 84 (6), 695-703.
- (524) Taga T., Hibi M., Hirata Y., Yamasaki K., Yasukawa K., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T.: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* (1989), 58 (3), 573-581.
- (525) Dela Cruz C.S., Lee Y., Viswanathan S.R., El-Guindy A.S., Gerlach J., Nikiforow S., Shedd D., Gradoville L., Miller G.: N-linked glycosylation is required for optimal function of Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded, but not cellular, interleukin 6. *J Exp Med* (2004), 199 (4), 503-514.
- (526) Simpson R.J., Hammacher A., Smith D.K., Matthews J.M., Ward L.D.: Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* (1997), 6 (5), 929-955.
- (527) Boulanger M.J., Chow D.C., Brevnova E.E., Garcia K.C.: Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* (2003), 300 (5628), 2101-2104.
- (528) Yamasaki K., Taga T., Hirata Y., Yawata H., Kawanishi Y., Seed B., Taniguchi T., Hirano T., Kishimoto T.: Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* (1988), 241 (4867), 825-828.
- (529) Cosman D.: The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* (1993), 5 (2), 95-106.
- (530) Xu Y., Kershaw N.J., Luo C.S., Soo P., Pocock M.J., Czabotar P.E., Hilton D.J., Nicola N.A., Garrett T.P., Zhang J.G.: Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *J Biol Chem* (2010), 285 (28), 21214-21218.
- (531) Murakami M., Hibi M., Nakagawa N., Nakagawa T., Yasukawa K., Yamanishi K., Taga T., Kishimoto T.: IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* (1993), 260 (5115), 1808-1810.
- (532) Gearing D.P., Thut C.J., VandeBos T., Gimpel S.D., Delaney P.B., King J., Price V., Cosman D., Beckmann M.P.: Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* (1991), 10 (10), 2839-2848.
- (533) Mosley B., De I.C., Friend D., Boiani N., Thoma B., Park L.S., Cosman D.: Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* (1996), 271 (51), 32635-32643.
- (534) Taga T., Kishimoto T.: Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* (1997), 15, 797-819.
- (535) Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van H., V, Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A.: Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* (1997), 6 (3), 315-325.
- (536) Holub M.C., Szalai C., Polgar A., Toth S., Falus A.: Generation of 'truncated' interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R. *Immunol Lett* (1999), 68 (1), 121-124.

- (537) Hurst S.M., Wilkinson T.S., McLoughlin R.M., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Fuller G.M., Topley N., Jones S.A.: Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* (2001), 14 (6), 705-714.
- (538) Althoff K., Mullberg J., Aasland D., Voltz N., Kallen K., Grotzinger J., Rose-John S.: Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem J* (2001), 353 (Pt 3), 663-672.
- (539) Lust J.A., Donovan K.A., Kline M.P., Greipp P.R., Kyle R.A., Maihle N.J.: Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* (1992), 4 (2), 96-100.
- (540) Rose-John S., Scheller J., Elson G., Jones S.A.: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* (2006), 80 (2), 227-236.
- (541) Rose-John S., Heinrich P.C.: Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* (1994), 300 (Pt 2), 281-290.
- (542) Mullberg J., Althoff K., Jostock T., Rose-John S.: The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* (2000), 11 (1), 27-38.
- (543) Jones S.A., Richards P.J., Scheller J., Rose-John S.: IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* (2005), 25 (5), 241-253.
- (544) Scheller J., Ohnesorge N., Rose-John S.: Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* (2006), 63 (5), 321-329.
- (545) Stahl N., Farruggella T.J., Boulton T.G., Zhong Z., Darnell J.E., Jr., Yancopoulos G.D.: Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* (1995), 267 (5202), 1349-1353.
- (546) Stahl N., Boulton T.G., Farruggella T., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Barbieri G., Pellegrini S., .: Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* (1994), 263 (5143), 92-95.
- (547) Gerhartz C., Heesel B., Sasse J., Hemmann U., Landgraf C., Schneider-Mergener J., Horn F., Heinrich P.C., Graeve L.: Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* (1996), 271 (22), 12991-12998.
- (548) Bowman T., Broome M.A., Sinibaldi D., Wharton W., Pledger W.J., Sedivy J.M., Irby R., Yeatman T., Courtneidge S.A., Jove R.: Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), 98 (13), 7319-7324.
- (549) Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C., Darnell J.E., Jr.: Stat3 as an oncogene. *Cell* (1999), 98 (3), 295-303.
- (550) Grandis J.R., Drenning S.D., Zeng Q., Watkins S.C., Melhem M.F., Endo S., Johnson D.E., Huang L., He Y., Kim J.D.: Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), 97 (8), 4227-4232.

- (551) Sinibaldi D., Wharton W., Turkson J., Bowman T., Pledger W.J., Jove R.: Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* (2000), 19 (48), 5419-5427.
- (552) Inghirami G., Chiarle R., Simmons W.J., Piva R., Schlessinger K., Levy D.E.: New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle* (2005), 4 (9), 1131-1133.
- (553) Caracciolo D., Clark S.C., Rovera G.: Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. *Blood* (1989), 73 (3), 666-670.
- (554) Bulgarini D., Scalzo S., Boccoli G., Petrini M., Quaranta M.T., Camagna A., Isacchi G., Testa U., Peschle C.: IL-6/BSF-2 selectively stimulates the G0---S progression of CD8+ lymphocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* (1991), 5 (1), 23-33.
- (555) Biswas P., Delfanti F., Bernasconi S., Mengozzi M., Cota M., Polentarutti N., Mantovani A., Lazzarin A., Sozzani S., Poli G.: Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood* (1998), 91 (1), 258-265.
- (556) Islam O., Gong X., Rose-John S., Heese K.: Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Mol Biol Cell* (2009), 20 (1), 188-199.
- (557) Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., David M., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C.: Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* (1988), 232 (2), 347-350.
- (558) Gregor M.F., Hotamisligil G.S.: Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* (2007), 48 (9), 1905-1914.
- (559) Barton B.E.: IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation. *Immunol Res* (2001), 23 (1), 41-58.
- (560) Barton B.E., Murphy T.F.: Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine* (2001), 16 (6), 251-257.
- (561) Heath D.I., Cruickshank A., Gudgeon M., Jehanli A., Shenkin A., Imrie C.W.: Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* (1993), 34 (1), 41-45.
- (562) Brasier A.R.: The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* (2010), 86 (2), 211-218.
- (563) Pelliniemi T.T., Irjala K., Mattila K., Pulkki K., Rajamaki A., Tienhaara A., Laakso M., Lahtinen R.: Immunoreactive interleukin-6 and acute phase proteins as prognostic factors in multiple myeloma. Finnish Leukemia Group. *Blood* (1995), 85 (3), 765-771.
- (564) Goydos J.S., Brumfield A.M., Frezza E., Booth A., Lotze M.T., Carty S.E.: Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Ann Surg* (1998), 227 (3), 398-404.

- (565) Zhang J., Alcaide P., Liu L., Sun J., He A., Lusinskas F.W., Shi G.P.: Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS One* (2011), 6 (1), e14525.
- (566) Watson C., Whittaker S., Smith N., Vora A.J., Dumonde D.C., Brown K.A.: IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol* (1996), 105 (1), 112-119.
- (567) Wei L.H., Kuo M.L., Chen C.A., Chou C.H., Lai K.B., Lee C.N., Hsieh C.Y.: Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* (2003), 22 (10), 1517-1527.
- (568) Celletti F.L., Hilfiker P.R., Ghafouri P., Dake M.D.: Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol* (2001), 37 (8), 2126-2130.
- (569) Celletti F.L., Waugh J.M., Amabile P.G., Brendolan A., Hilfiker P.R., Dake M.D.: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* (2001), 7 (4), 425-429.
- (570) Spickett C.M., Smith W.E., Reglinski J., Wilson R., Walker J.J.: Oxidation of erythrocyte glutathione by monocytes stimulated with interleukin-6. Analysis by 1H spin echo NMR. *Clin Chim Acta* (1998), 270 (2), 115-124.
- (571) Montagnani M., Chen H., Barr V.A., Quon M.J.: Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* (2001), 276 (32), 30392-30398.
- (572) Andreozzi F., Laratta E., Procopio C., Hribal M.L., Sciacqua A., Perticone M., Miele C., Perticone F., Sesti G.: Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biol* (2007), 27 (6), 2372-2383.
- (573) Lusis A.J.: Atherosclerosis. *Nature* (2000), 407 (6801), 233-241.
- (574) Oldenburg H.S., Rogy M.A., Lazarus D.D., Van Zee K.J., Keeler B.P., Chizzonite R.A., Lowry S.F., Moldawer L.L.: Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6. *Eur J Immunol* (1993), 23 (8), 1889-1894.
- (575) Delens N., Torreele E., Savelkool H., De B.P., Bouwens L.: Tumor-derived transforming growth factor-beta 1 and interleukin-6 are chemotactic for lymphokine-activated killer cells. *Int J Cancer* (1994), 57 (5), 696-700.
- (576) Garman R.D., Jacobs K.A., Clark S.C., Raulet D.H.: B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1987), 84 (21), 7629-7633.
- (577) Houssiau F.A., Coulie P.G., Olive D., Van S.J.: Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. *Eur J Immunol* (1988), 18 (4), 653-656.
- (578) Takai Y., Wong G.G., Clark S.C., Burakoff S.J., Herrmann S.H.: B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* (1988), 140 (2), 508-512.

- (579) Korn T., Mitsdoerffer M., Croxford A.L., Awasthi A., Dardalhon V.A., Galileos G., Vollmar P., Stritesky G.L., Kaplan M.H., Waisman A., Kuchroo V.K., Oukka M.: IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008), 105 (47), 18460-18465.
- (580) Muraguchi A., Hirano T., Tang B., Matsuda T., Horii Y., Nakajima K., Kishimoto T.: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* (1988), 167 (2), 332-344.
- (581) Sonderegger I., Kisielow J., Meier R., King C., Kopf M.: IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol* (2008), 38 (7), 1833-1838.
- (582) Kishimoto T.: The biology of interleukin-6. *Blood* (1989), 74 (1), 1-10.
- (583) Akira S., Taga T., Kishimoto T.: Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* (1993), 54, 1-78.
- (584) Satoh T., Nakamura S., Taga T., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T., Kaziro Y.: Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol* (1988), 8 (8), 3546-3549.
- (585) Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H., Kohler G.: Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* (1994), 368 (6469), 339-342.
- (586) Geppert A., Steiner A., Zorn G., Delle-Karth G., Koreny M., Haumer M., Siostrzonek P., Huber K., Heinz G.: Multiple organ failure in patients with cardiogenic shock is associated with high plasma levels of interleukin-6. *Crit Care Med* (2002), 30 (9), 1987-1994.
- (587) Diegeler A., Tarnok A., Rauch T., Haberer D., Falk V., Battellini R., Autschbach R., Hamsch J., Schneider P., Mohr F.W.: Changes of leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: cardiopulmonary bypass versus 'off-pump' techniques. *Thorac Cardiovasc Surg* (1998), 46 (6), 327-332.
- (588) Leal-Noval S.R., Amaya R., Herruzo A., Hernandez A., Ordonez A., Marin-Niebla A., Camacho P.: Effects of a leukocyte depleting arterial line filter on perioperative morbidity in patients undergoing cardiac surgery: a controlled randomized trial. *Ann Thorac Surg* (2005), 80 (4), 1394-1400.
- (589) Mihaljevic T., Tonz M., von Segesser L.K., Pasic M., Grob P., Fehr J., Seifert B., Turina M.: The influence of leukocyte filtration during cardiopulmonary bypass on postoperative lung function. A clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1995), 109 (6), 1138-1145.
- (590) Chiba Y., Morioka K., Muraoka R., Ihaya A., Kimura T., Uesaka T., Tsuda T., Matsuyama K.: Effects of depletion of leukocytes and platelets on cardiac dysfunction after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* (1998), 65 (1), 107-113.
- (591) Borgermann J., Friedrich I., Scheubel R., Kuss O., Lendemann S., Silber R.E., Kreuzfelder E., Flohe S.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) restores decreased monocyte HLA-DR expression after cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg* (2007), 55 (1), 24-31.

- (592) Fingerle-Rowson G., Auers J., Kreuzer E., Labeta M., Schmidt B., Samtleben W., Ziegler-Heitbrock H.W., Blumenstein M.: Down-regulation of surface monocyte lipopolysaccharide-receptor CD14 in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aorta-coronary bypass operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1998), 115 (5), 1172-1178.
- (593) Borgermann J., Flohe S., Scheubel R.J., Kuss O., Simm A., Schade F.U., Friedrich I.: Regulation of cytokine synthesis in cardiac surgery: Role of extracorporeal circuit and humoral mediators in vivo and in vitro. *Inflamm Res* (2007), 56 (3), 126-132.
- (594) Flohe S., Borgermann J., Dominguez F.E., Majetschak M., Lim L., Kreuzfelder E., Obertacke U., Nast-Kolb D., Schade F.U.: Influence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on whole blood endotoxin responsiveness following trauma, cardiopulmonary bypass, and severe sepsis. *Shock* (1999), 12 (1), 17-24.
- (595) Munoz C., Carlet J., Fitting C., Misset B., Bleriot J.P., Cavaillon J.M.: Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* (1991), 88 (5), 1747-1754.
- (596) Franke A., Lante W., Zoeller L.G., Kurig E., Weinhold C., Markewitz A.: Delayed recovery of human leukocyte antigen-DR expression after cardiac surgery with early non-lethal postoperative complications: only an epiphenomenon? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* (2008), 7 (2), 207-211.
- (597) Rinder C.S., Mathew J.P., Rinder H.M., Tracey J.B., Davis E., Smith B.R.: Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender. *J Lab Clin Med* (1997), 129 (6), 592-602.
- (598) Rinder C.S., Gaal D., Student L.A., Smith B.R.: Platelet-leukocyte activation and modulation of adhesion receptors in pediatric patients with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1994), 107 (1), 280-288.
- (599) Rinder C.S., Rinder H.M., Johnson K., Smith M., Lee D.L., Tracey J., Polack G., Higgins P., Yeh C.G., Smith B.R.: Role of C3 cleavage in monocyte activation during extracorporeal circulation. *Circulation* (1999), 100 (5), 553-558.
- (600) Fontes M.L., Mathew J.P., Rinder H.M., Zelterman D., Smith B.R., Rinder C.S.: Atrial fibrillation after cardiac surgery/cardiopulmonary bypass is associated with monocyte activation. *Anesth Analg* (2005), 101 (1), 17-23, table.
- (601) Iwasaka H., Kitano T., Miyakawa H., Unoshima M., Shinguu C., Matsumoto S., Noguchi T.: Neutrophilia and granulocyte colony-stimulating factor levels after cardiopulmonary bypass. *Can J Anaesth* (2001), 48 (1), 81-84.
- (602) Fosse E., Mollnes T.E., Osterud A., Aasen A.O.: Effects of methylprednisolone on complement activation and leukocyte counts during cardiopulmonary bypass. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* (1987), 21 (3), 255-261.
- (603) Joyce R.A., Chervenick P.A.: Corticosteroid effect on granulopoiesis in mice after cyclophosphamide. *J Clin Invest* (1977), 60 (2), 277-283.
- (604) Nakagawa M., Terashima T., D'yachkova Y., Bondy G.P., Hogg J.C., van Eeden S.F.: Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation* (1998), 98 (21), 2307-2313.

- (605) Hamano K., Ito H., Katoh T., Fujimura Y., Tsuboi H., Esato K.: Granulocyte phagocytic function is impaired during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* (1996), 62 (6), 1820-1824.
- (606) Olds J.W., Reed W.P., Eberle B., Kisch A.L.: Corticosteroids, serum, and phagocytosis: in vitro and in vivo studies. *Infect Immun* (1974), 9 (3), 524-529.
- (607) Kaplan J.E.: Influence of methylprednisolone on reticuloendothelial phagocytic and opsonic function during traumatic and septic shock. *Adv Shock Res* (1980), 4, 11-25.
- (608) Fung Y.L., Silliman C.C., Minchinton R.M., Wood P., Fraser J.F.: Cardiopulmonary bypass induces enduring alterations to host neutrophil physiology: a single-center longitudinal observational study. *Shock* (2008), 30 (6), 642-648.
- (609) Macey M.G., McCarthy D.A., Trivedi U.R., Venn G.E., Chambers D.J., Brown K.A.: Neutrophil adhesion molecule expression during cardiopulmonary bypass: a comparative study of roller and centrifugal pumps. *Perfusion* (1997), 12 (5), 293-301.
- (610) Krejsek J., Mandak J., Kunes P., Lonsky V., Kolackova M., Jankovicova K., Andrys C.: Impact of methylprednisolone in priming solution of cardiopulmonary bypass on anti-inflammatory CD163 receptor during cardiac surgery. *Perfusion* (2012), 27 (4), 284-291.
- (611) Goldstein J.I., Goldstein K.A., Wardwell K., Fahrner S.L., Goonan K.E., Cheney M.D., Yeager M.P., Guyre P.M.: Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Atherosclerosis* (2003), 170 (2), 325-332.
- (612) Gaini S., Pedersen S.S., Koldkaer O.G., Pedersen C., Moestrup S.K., Moller H.J.: New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol* (2008), 151 (3), 423-431.
- (613) Philippidis P., Athanasiou T., Nadra I., Ashrafian H., Haskard D.O., Landis R.C., Taylor K.M.: Anti-inflammatory haemoglobin scavenging monocytes are induced following coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* (2010), 37 (6), 1360-1366.
- (614) Philippidis P., Mason J.C., Evans B.J., Nadra I., Taylor K.M., Haskard D.O., Landis R.C.: Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* (2004), 94 (1), 119-126.
- (615) Quimby K.R., Greenidge A., Harris A., Landis R.C.: Phenotypic commitment of monocytes towards a protective hemoglobin scavenging phenotype (CD14(pos)CD163(high)HLA-DR(low))following cardiopulmonary bypass. *Cytometry B Clin Cytom* (2010), 78 (5), 357-360.
- (616) Vallelian F., Schaer C.A., Kaempfer T., Gehrig P., Duerst E., Schoedon G., Schaer D.J.: Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and antioxidant capacity. *Blood* (2010), 116 (24), 5347-5356.

- (617) Fjeldborg K., Christiansen T., Bennetzen M., Moller J., Pedersen S.B., Richelsen B.: The macrophage-specific serum marker, soluble CD163, is increased in obesity and reduced after dietary-induced weight loss. *Obesity (Silver Spring)* (2013), 21 (12), 2437-2443.
- (618) Asleh R., Marsh S., Shilkrot M., Binah O., Guetta J., Lejbkowitz F., Enav B., Shehadeh N., Kanter Y., Lache O., Cohen O., Levy N.S., Levy A.P.: Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* (2003), 92 (11), 1193-1200.
- (619) Singh A.S., Atam V., Chaudhary S.C., Sawlani K.K., Patel M.L., Saraf S., Yathish B.E., Das L.: Relation of glycated hemoglobin with carotid atherosclerosis in ischemic stroke patients: An observational study in Indian population. *Ann Indian Acad Neurol* (2013), 16 (2), 185-189.
- (620) Rinaldi S., Rohrmann S., Jenab M., Biessy C., Sieri S., Palli D., Tumino R., Mattiello A., Vineis P., Nieters A., Linseisen J., Pischon T., Boeing H., Hallmans G., Palmqvist R., Manjer J., Wirfalt E., Crowe F.L., Khaw K.T., Bingham S., Tjonneland A., Olsen A., Overvad K., Lund E., Skeie G., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M.C., de Lauzon-Guillain B., Ardanaz E., Jakszyn P., Ramon Q.J., Chirlaque M.D., Sanchez M.J., Dorronsoro M., Trichopoulou A., Lagiou P., Trichopoulos D., Bueno-de-Mesquita H.B., van Duijnhoven F.J., Peeters P.H., Slimani N., Ferrari P., Byrnes G.B., Riboli E., Kaaks R.: Glycosylated hemoglobin and risk of colorectal cancer in men and women, the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2008), 17 (11), 3108-3115.
- (621) Groselj-Grenc M., Ihan A., Derganc M.: Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm* (2008), 2008, 202646.
- (622) Nemeto S., Aoki M., Dehua C., Imai Y.: Free hemoglobin impairs cardiac function in neonatal rabbit hearts. *Ann Thorac Surg* (2000), 69 (5), 1484-1489.
- (623) Maniecki M.B., Hasle H., Friis-Hansen L., Lausen B., Nielsen O.J., Bendix K., Moestrup S.K., Moller H.J.: Impaired CD163-mediated hemoglobin-scavenging and severe toxic symptoms in patients treated with gemtuzumab ozogamicin. *Blood* (2008), 112 (4), 1510-1514.
- (624) Lavrovsky Y., Drummond G.S., Abraham N.G.: Downregulation of the human heme oxygenase gene by glucocorticoids and identification of 56b regulatory elements. *Biochem Biophys Res Commun* (1996), 218 (3), 759-765.
- (625) Cantoni L., Rossi C., Rizzardini M., Gadina M., Ghezzi P.: Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids. *Biochem J* (1991), 279 (Pt 3), 891-894.
- (626) Raju V.S., McCoubrey W.K., Jr., Maines M.D.: Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta* (1997), 1351 (1-2), 89-104.
- (627) Fanger N.A., Voigtlaender D., Liu C., Swink S., Wardwell K., Fisher J., Graziano R.F., Pfefferkorn L.C., Guyre P.M.: Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J Immunol* (1997), 158 (7), 3090-3098.

- (628) Li Y., Lee P.Y., Kellner E.S., Paulus M., Switanek J., Xu Y., Zhuang H., Sobel E.S., Segal M.S., Satoh M., Reeves W.H.: Monocyte surface expression of Fcγ receptor RI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* (2010), 12 (3), R90.
- (629) Hoffmann J.J.: Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem Med (Zagreb)* (2011), 21 (3), 282-290.
- (630) Torkildsen O., Vedeler C.A., Ulvestad E., Aarseth J.H., Nyland H.I., Myhr K.M.: High dose methylprednisolone induces FcγRI on granulocytes in MS-patients. *J Neuroimmunol* (2005), 167 (1-2), 138-142.
- (631) Matsui T., Ohsumi K., Ozawa N., Shimada K., Sumitomo S., Shimane K., Kawakami M., Nakayama H., Sugii S., Ozawa Y., Tohma S.: CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (2006), 33 (12), 2416-2424.
- (632) Rudensky B., Sirota G., Erlichman M., Yinnon A.M., Schlesinger Y.: Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker of bacterial infection in febrile children presenting to a hospital emergency department. *Pediatr Emerg Care* (2008), 24 (11), 745-748.
- (633) Janot L., Secher T., Torres D., Maillet I., Pfeilschifter J., Quesniaux V.F., Landmann R., Ryffel B., Erard F.: CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of *Listeria monocytogenes* infection. *J Infect Dis* (2008), 198 (1), 115-124.
- (634) Bafica A., Scanga C.A., Feng C.G., Leifer C., Cheever A., Sher A.: TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* (2005), 202 (12), 1715-1724.
- (635) Mercier B.C., Ventre E., Fogeron M.L., Debaud A.L., Tomkowiak M., Marvel J., Bonnefoy N.: NOD1 cooperates with TLR2 to enhance T cell receptor-mediated activation in CD8 T cells. *PLoS One* (2012), 7 (7), e42170.
- (636) Dybdahl B., Wahba A., Lien E., Flo T.H., Waage A., Qureshi N., Sellevold O.F., Espevik T., Sundan A.: Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* (2002), 105 (6), 685-690.
- (637) Zager R.A., Johnson A.C., Lund S., Randolph-Habecker J.: Toll-like receptor (TLR4) shedding and depletion: acute proximal tubular cell responses to hypoxic and toxic injury. *Am J Physiol Renal Physiol* (2007), 292 (1), F304-F312.
- (638) Krejsek J., Kolackova M., Mand'ak J., Kunes P., Holubcova Z., Holmannova D., AbuAttieh M., Andrys C.: TLR2 and TLR4 expression on blood monocytes and granulocytes of cardiac surgical patients is not affected by the use of cardiopulmonary bypass. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2013), 56 (2), 57-66.
- (639) Flo T.H., Halaas O., Torp S., Ryan L., Lien E., Dybdahl B., Sundan A., Espevik T.: Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* (2001), 69 (3), 474-481.
- (640) Schilling E., Wehrhahn J., Klein C., Raulien N., Ceglarek U., Hauschildt S.: Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase modifies LPS-induced inflammatory responses of human monocytes. *Innate Immun* (2012), 18 (3), 518-530.

- (641) Sabroe I., Jones E.C., Usher L.R., Whyte M.K., Dower S.K.: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* (2002), 168 (9), 4701-4710.
- (642) Kurt-Jones E.A., Mandell L., Whitney C., Padgett A., Gosselin K., Newburger P.E., Finberg R.W.: Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* (2002), 100 (5), 1860-1868.
- (643) Koch A., Hamann L., Schott M., Boehm O., Grotemeyer D., Kurt M., Schwenke C., Schumann R.R., Bornstein S.R., Zacharowski K.: Genetic variation of TLR4 influences immunoendocrine stress response: an observational study in cardiac surgical patients. *Crit Care* (2011), 15 (2), R109.
- (644) Lichte P., Grigoleit J.S., Steiner E.M., Kullmann J.S., Schedlowski M., Oberbeck R., Kobbe P.: Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine* (2013), 63 (1), 74-80.
- (645) Maeshima N., Fernandez R.C.: Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol* (2013), 3, 3.
- (646) Lee H.K., Dunzendorfer S., Tobias P.S.: Cytoplasmic domain-mediated dimerizations of toll-like receptor 4 observed by beta-lactamase enzyme fragment complementation. *J Biol Chem* (2004), 279 (11), 10564-10574.
- (647) Good D.W., George T., Watts B.A., III: Toll-like receptor 2 is required for LPS-induced Toll-like receptor 4 signaling and inhibition of ion transport in renal thick ascending limb. *J Biol Chem* (2012), 287 (24), 20208-20220.
- (648) You R.I., Chang Y.C., Chen P.M., Wang W.S., Hsu T.L., Yang C.Y., Lee C.T., Hsieh S.L.: Apoptosis of dendritic cells induced by decoy receptor 3 (DcR3). *Blood* (2008), 111 (3), 1480-1488.
- (649) Hou Y.Q., Xu P., Zhang M., Han D., Peng L., Liang D.Y., Yang S., Zhang Z., Hong J., Lou X.L., Zhang L., Kim S.: Serum decoy receptor 3, a potential new biomarker for sepsis. *Clin Chim Acta* (2012), 413 (7-8), 744-748.
- (650) Chen C.Y., Yang K.Y., Chen M.Y., Chen H.Y., Lin M.T., Lee Y.C., Perng R.P., Hsieh S.L., Yang P.C., Chou T.Y.: Decoy receptor 3 levels in peripheral blood predict outcomes of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* (2009), 180 (8), 751-760.
- (651) Aoyama T., Takemura G., Maruyama R., Kosai K., Takahashi T., Koda M., Hayakawa K., Kawase Y., Minatoguchi S., Fujiwara H.: Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* (2002), 55 (4), 787-798.
- (652) Kawakami A., Eguchi K., Matsuoka N., Tsuboi M., Koji T., Urayama S., Nakashima T., Kawabe Y., Nagataki S.: Expression and function of Fas and Fas ligand on peripheral blood lymphocytes in normal subjects. *J Lab Clin Med* (1998), 132 (5), 404-413.
- (653) Schmidt M., Lugering N., Lugering A., Pauels H.G., Schulze-Osthoff K., Domschke W., Kucharzik T.: Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* (2001), 166 (2), 1344-1351.

- (654) Turrel-Davin F., Guignant C., Lepape A., Mouglin B., Monneret G., Venet F.: Upregulation of the pro-apoptotic genes BID and FAS in septic shock patients. *Crit Care* (2010), 14 (4), R133.
- (655) Paunel-Gorgulu A., Flohe S., Scholz M., Windolf J., Logters T.: Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Crit Care* (2011), 15 (1), R20.
- (656) Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C.: Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* (1991), 174 (6), 1549-1555.
- (657) Musleh G.S., Datta S.S., Yonan N.N., Grotte G.J., Prendergast B.A., Hasan R.I., Deyrania A.K.: Association of IL6 and IL10 with renal dysfunction and the use of haemofiltration during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* (2009), 35 (3), 511-514.
- (658) Dominguez R.A., Abreu G.P., Garcia Gonzalez M.J., Ferrer H.J.: [Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty]. *Rev Esp Cardiol* (2005), 58 (6), 626-630.
- (659) Latifi S.Q., O'Riordan M.A., Levine A.D.: Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* (2002), 70 (8), 4441-4446.
- (660) Steinhauser M.L., Hogaboam C.M., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Strieter R.M., Standiford T.J.: IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* (1999), 162 (1), 392-399.
- (661) Edberg J.C., Qin H., Gibson A.W., Yee A.M., Redecha P.B., Indik Z.K., Schreiber A.D., Kimberly R.P.: The CY domain of the Fc γ RIa alpha-chain (CD64) alters gamma-chain tyrosine-based signaling and phagocytosis. *J Biol Chem* (2002), 277 (43), 41287-41293.
- (662) Majello B., Arcone R., Toniatti C., Ciliberto G.: Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *EMBO J* (1990), 9 (2), 457-465.
- (663) Kawamura T., Inada K., Okada H., Okada K., Wakusawa R.: Methylprednisolone inhibits increase of interleukin 8 and 6 during open heart surgery. *Can J Anaesth* (1995), 42 (5 Pt 1), 399-403.
- (664) Arranz E., Blanco-Quiros A., Solis P., Garrote J.A.: Lack of correlation between soluble CD14 and IL-6 in meningococcal septic shock. *Pediatr Allergy Immunol* (1997), 8 (4), 194-199.
- (665) Sander M., von H.C., von D., V, Spaethe C., Konertz W.F., Jain U., Spies C.D.: Increased interleukin-6 after cardiac surgery predicts infection. *Anesth Analg* (2006), 102 (6), 1623-1629.
- (666) Cassatella M.A., Gasperini S., Bovolenta C., Calzetti F., Vollebregt M., Scapini P., Marchi M., Suzuki R., Suzuki A., Yoshimura A.: Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood* (1999), 94 (8), 2880-2889.
- (667) Chung C.D., Liao J., Liu B., Rao X., Jay P., Berta P., Shuai K.: Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* (1997), 278 (5344), 1803-1805.

- (668) Levy C., Lee Y.N., Nechushtan H., Schueler-Furman O., Sonnenblick A., Hacohen S., Razin E.: Identifying a common molecular mechanism for inhibition of MITF and STAT3 by PIAS3. *Blood* (2006), 107 (7), 2839-2845.
- (669) Shen S.H., Bastien L., Posner B.I., Chretien P.: A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* (1991), 352 (6337), 736-739.
- (670) Rose-John S., Scheller J., Elson G., Jones S.A.: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* (2006), 80 (2), 227-236.
- (671) Sonne O., Davidsen O., Moller B.K., Munck P.C.: Cellular targets and receptors for interleukin-6. I. In vivo and in vitro uptake of IL-6 in liver and hepatocytes. *Eur J Clin Invest* (1990), 20 (4), 366-376.
- (672) Dittrich E., Haft C.R., Muys L., Heinrich P.C., Graeve L.: A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem* (1996), 271 (10), 5487-5494.
- (673) Zohnhofer D., Graeve L., Rose-John S., Schooltink H., Dittrich E., Heinrich P.C.: The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett* (1992), 306 (2-3), 219-222.
- (674) Graeve L., Korolenko T.A., Hemmann U., Weiergraber O., Dittrich E., Heinrich P.C.: A complex of the soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. *FEBS Lett* (1996), 399 (1-2), 131-134.
- (675) Pallua N., Low J.F., von H.D.: Pathogenic role of interleukin-6 in the development of sepsis. Part II: Significance of anti-interleukin-6 and anti-soluble interleukin-6 receptor-alpha antibodies in a standardized murine contact burn model. *Crit Care Med* (2003), 31 (5), 1495-1501.

8 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

8.1 Původní články

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8.2 Přehledové články

Kunes P., Mandak J., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: The long pentraxin PTX3: a candidate anti-inflammatory mediator in cardiac surgery. *Perfusion* (2013), 28 (5), 377-389, **IF = 0,94**.

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

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

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

Kunes P., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm* (2012), 2012, 920517, **IF = 3,882**.

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

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

Kunes P., Holubcova Z., **Kolackova M.**, Krejsek J.: Interleukin-33, a novel member of the IL-1/IL-18 cytokine family, in cardiology and cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* (2010), 58 (8), 443-449, **IF = 0,925**.

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

Kunes P., Mandak J., **Kolackova M.**, Krejsek J.: Mystery of pentraxin-3 not yet resolved: still a long way to its prime time in surgery. *Nephrol Dial Transplant* (2009), 24 (3), 1064-1065, **IF = 3,371**.

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

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

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

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

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

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

Krejsek J., Kunes P., Andrys C., Holicka M., Novosad J., Kudlova M., **Kolackova M.**: [Innate immunity, receptors for exogenous and endogenous danger patterns in immunopathogenesis of atherosclerosis--part 1: identification of danger signals by innate immunity]. *Cas Lek Cesk* (2005), 144 (12), 785-789.

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

9 PŘÍLOHY