

**SZISZTÉMÁS ÉS PULMONÁLIS GYULLADÁSOS VÁLASZ SZÍV-TÜDŐ
MOTORRAL VÉGZETT NYÍLT SZÍVMŰTÉTEK UTÁN;
CYTOKIN-EGYENSÚLY ÉS PULMONÁLIS FUNKCIÓ VÁLTOZÁSA**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. KÖVESI TAMÁS



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Gyermekegyógyászati Klinika

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit

Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet

2005.

TARTALOMJEGYZÉK

	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1	BEVEZETÉS	5
1.1	A szívsebészet fejlődése	5
1.2.	A cardio-pulmonális bypass rendszer	6
1.3.	A myocardiális protekció	8
1.4.	A cardio-pulmonális bypass leggyakoribb szövődményei	9
1.5.	A posztoperatív gyulladásos válasz megjelenési formái	10
1.6	Az akut gyulladásos válasz patofiziológiája	14
1.7	Az endogén nitrogén monoxid (NO)	22
1.8	A hemoxigenáz–szénmonoxid (HO–CO) rendszer	24
2	CÉLKITŰZÉSEK	27
2.1	Bevezetés	27
2.2	Célkitűzések	27
3	CYTOKIN EGYENSÚLY SZÍV-TÜDŐ MOTORRAL VÉGZETT „RUTIN” SZÍVSEBÉSZETI MŰTÉTEK KAPCSÁN	28
3.1	Bevezetés	28
3.2	Betegcsoport, aneszteziológiai és műtéti technika	30
3.3	Vérminták levétele és kezelése	31
3.4	Cytokin mérések	32
3.5	Eredmények	32
3.6	Megbeszélés	48

4	PRO-INFLAMMATORIKUS CYTOKINEK ÉS SZÍVMŰTÉTEN ÁTESETT BETEGEK SZÉRUMÁNAK HATÁSA HUMÁN VASZKULÁRIS ENDOTHELSEJTEKRE	54
4.1	Bevezetés	54
4.2	Betegcsoport, módszerek	55
4.3	Eredmények	58
4.4	Megbeszélés	66
5	BAZÁLIS ÉS NITROGLICERYN-INDUKÁLT KILÉGZETT NITROGÉN MONOXID MÉRÉSE SZÍV-TÜDŐ MOTORRAL VÉGZETT „RUTIN” SZÍVMŰTÉTEK SORÁN	70
5.1	Bevezetés	70
5.2	Betegcsoport	72
5.3	Kilégzett gázok mérése	72
5.4	Eredmények	74
5.5	Megbeszélés	81
6	ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	85
	AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉBE TARTOZÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK ÉS ELŐADÁSOK JEGYZÉKE	87
	IRODALOMJEGYZÉK	90
	KÖSZÖNETNYILÁNÍTÁS	100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACT	aktivált alvadási idő
ARDS	fenőtkkori respiratorikus distress szindróma
ARS	American Respiratory Society
ATP	adenin trifoszfát
cGMP	ciklikus guanin monofoszfát
CHX	cikloheximid
CPB	cardio-pulmonális bypass
CO	szénmonoxid
CO ₂	széndioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	etilén diamin tetra ecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliális nitrogén monoxid szintáz
ERS	European Respiratory Society
FDA	Food and Drug Administration (U.S.)
Fe ²⁺	vas ion
GTN	gicerin trinitrát
H ⁺	hidrogén ion
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfon sav
HO	hemoxigenáz
ICE	interleukin konvertáló enzim
IU	international unit; nemzetközi egység
IL-1 β	interleukin-1 béta
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintáz

iv	intravénás
KDa	kilodalton
LPS	lipopolyszaccharid
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
mRNS	messenger ribonukleinsav
NF-κB	nukleáris faktor-κB
NOS	nitrogén monoxid szintáz
O ₂	oxigén
PAF	thrombocyta aktiváló faktor
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCO ₂	széndioxid parciális nyomás
PEEP	pozitív kilégzésvégi nyomás
PIRS	pulmonális gyulladósos válasz szindróma
ppb	pars per billion
ppm	pars per million
PVR	pulmonális vaszkuláris rezisztencia
sGC	szolubilis guanil cikláz
SIRS	szisztémás gyulladósos válasz szindróma
SOD	szuperoxid dizmutáz
sTNF-R	szolubilis tumor nekrosis faktor receptor
SVR	szisztémás vaszkuláris rezisztencia
TNFα	tumor nekrosis faktor alfa
TNF-R	tumor nekrosis faktor receptor
zVAD-fmk	benziloxycarbonil-Valil-Alanil-Aspartil- (O-metil)-fluorometilketon; peptid caspase inhibitor

1. BEVEZETÉS

1. 1 A szívsebészet fejlődése

Az orvostudomány egyik legősibb ága a sebészet, hisz a különféle műtétekről és egyéb sebészi beavatkozásokról tanúskodó rajzok és írásos feljegyzések már az ókortól ismeretesek. Az egyes szakterületek kialakulását és fejlődését tanulmányozva feltűnő a szívsebészet sok évszázados lemaradása a sebészet más ágainak történelméhez képest. Hiányoztak ugyanis az orvostudománynak azon ismeretanyagai, amelyek birtokában lehetővé vált volna a szív megállítása a műtétek idejére és a szív, valamint a nagyerek keringésből történő kirekesztése és megnyitása a beteg életben tartásával.

Az első dokumentált szívműtetre a XIX. század végén (1896, Németország) került sor, mely során Ludwig Rehn német sebész a jobb kamra szúrt sérülését látta el sikerrel a beteg megtartott keringése mellett ⁽¹⁾.

A szív- és mellkas-sebészet iránti, a korábbiaknál nagyobb igényt az I. és II. Világháború lött- és szúrt sebesültjeinek ellátása vetette fel, amely során a tábori orvosok erejükön és koruk színvonalán elvárható tudásukon felül próbálták megmenteni a sérülteket a biztos haláltól. A feljegyzések szerint a II. Világháborúban Dwight Harken amerikai katonai sebész 55 esetben a pericardiumból, és bravúros módon 13 esetben valamelyik szívüregből távolított el sikeresen lövedéket vagy repeszdarabot ^(2,3).

Az orvostudomány dinamikus fejlődése az elmúlt évszázad első felében fokozatosan adta meg a választ azokra a vérkeringéssel, oxigén-szállítással, véralvadással kapcsolatos élettani problémákra, melyek segítségével megteremtődtek a valódi szívsebészet kialakulásának feltételei.

A modern cardio-pulmonalis bypass (CPB) technológia rendszer nélkülözhetetlen összetevő elemeinek egymástól független felfedezésével jött létre. Az első jelentős lépés még az 1880-as években, kezdetben élettani tudományos kutatások céljaira kifejlesztett buborék- és film-oxigenátorok megalkotása volt ⁽⁴⁾. A heparin felfedezése (McLean, 1916) lehetővé tette, hogy a vérben hosszú ideig idegen felszínekkel érintkezve sem induljon el alvadási folyamat ⁽⁵⁾. DeBakey 1930-as években megalkotott roller-pumpa rendszere a vér keringetését egyszerű, megbízható és a vér alakos elemeit jelentősen nem károsító módon volt képes biztosítani ⁽⁶⁾.

A fenti ismeretanyagok szintetizálása után 1937-ben John Gibbon oldotta meg sikerrel kísérleti állatok életben tartását mesterséges szív-tüdő motor segítségével úgy, hogy a keringés visszaállítása után az állatok saját szívük és tüdejük segítségével néhány óráig életben maradtak ⁽⁷⁾.

Az 1950-es évek elején Lillihei kongenitális szívfejlődési rendellenesség műtéti megoldásakor a műtét idejére szintén a szív és a kisvérkörü keringés kirekesztésével próbálkozott. A gyermek vérkeringését szülőjének artériás és vénás rendszerével kötötte össze, így a szülő a műtét alatt mint élő szív-tüdő motor szerepelt ⁽⁸⁾.

Dr. Gibbon az általa megalkotott mesterséges szív-tüdő motor tovább tökéletesítését követően, 1953-ban humán betegen is elvégezte az első sikeres szív-műtétet cardio-pulmonalis bypass alkalmazásával, letéve ezzel a modern szívsebészet alapjait. A CPB elterjedése és további tökéletesedése a myocardiális protekció különböző fajtáival az elmúlt fél évszázad során új fejezetet nyitott a cardio-pulmonalis sebészetben, emellett a szív- és tüdőtranszplantáció technikai feltételeit is megteremtette. Napjainkban a CPB alkalmazásával leggyakrabban végzett coronaria bypass műtétek perioperatív morbiditás-mortalitás értéke néhány százalékra süllyedt, a betegek műtétet követő túlélési ideje és életminősége egyaránt jelentősen javult ^(9,10).

1.2 A cardio-pulmonális bypass rendszer

A CPB szerepe a műtét idejére nem dobogó, vértelen szív biztosítása, mialatt a keringésből a vért a szívet és tüdőt mesterséges úton helyettesítő

extracorporális rendszeren vezetik keresztül. A CPB alkalmazása során a szívét és a kisvérkört a keringésből kirekesztik. A coronaria-keringés megszűnésével a bypass idejére a szív teljes ischaemiának van kitéve, míg a tüdő vérellátásának kis részét az aorta kezdeti szakaszából eredő bronchialis artériák biztosítják.

A CPB feladatai vázlatosan az alábbi pontokban foglalhatók össze:

- A vér keringetése a megfelelő áramlás és perfúziós nyomás biztosításával oly módon, hogy a vér alakos elemeinek a pumpa által okozott mechanikus károsodása a lehető legkisebb legyen.

- A szervezet szükségletével arányban álló oxigén-kínálat biztosítása és a keringő vér oxigenizációja.

- A szervezetben keletkező CO₂ adekvát, kontrollálható eliminációja úgy, hogy ez által a vér pCO₂ értéke a kívánt élettani határokon belül maradjon.

- A keringő vér hőmérsékletének befolyásolásával a testhőmérséklet szabályozása, mind a kontrollált hypothermia, mind a normál testhőmérséklet biztosítása.

A CPB alkalmazása során a vénás vér a jobb pitvarból és a véna cava inferiorból az un. vénás kanülön és a hozzá csatlakoztatott vastag PVC csövön keresztül passzív módon, gravitáció segítségével jut a CPB rendszer vénás rezervoár tartályába, ami buborékos oxigenátorok estén egyben a gázcsere helye is. Az újabb fejlesztésű membrán oxigenátorok alkalmazásakor a vénás rezervoár-tartály vérét aktívan, pumpa segítségével áramoltatják át a gázcserét biztosító membránrendszeren. A gázcserét követően az „artériás” vér egy hőszabályozó rendszeren áramlik át, majd a CPB motor pumpájának segítségével az aorta-kanülön keresztül jut vissza megfelelő nyomással a felszálló aortába. A szív és a műtéti terület teljes vértelenségét a felszálló aorta kezdeti szakaszának coronaria-szájadékok feletti lefogásával biztosítják, ami meggátolja a szív-tüdő motorból az aortába pumpált vér bal szívfélbe történő visszaáramlását és a coronaria-keringést is megszünteti.

1.3 A myocardialis protekció

A szívsebészeti műtétek során két fontos cél fogalmazható meg:

- Az operációhoz ideális feltételek megteremtése; mozdulatlan és vértelen műtéti terület biztosítása

- A myocardium műtét alatti, oxigén- és metabolit szubsztrátok hiányából fakadó károsodásának kivédése, illetve minimális szintre csökkentése.

A szívizomsejtek energiaszükségletüket szénhidrátok (glukóz és laktát) és telítetlen szabad zsírsavak lebontásával fedezik. Mindkét energiaforrásból lebontásuk után acetyl-koenzim-A képződik, amiből a Krebs-cikluson keresztül a cytochrom-rendszerben adenzin-trifoszfát (ATP) molekulák képződnek. A folyamat rendkívüli oxigénigényét tükrözi, hogy míg egyetlen glukózmolekula teljes oxidációja során 36 molekula ATP keletkezik, az oxigén hiányában alternatív lebontási útként beinduló anaerob glikolízissel mindössze 2 molekula ATP válik a sejtek számára felhasználhatóvá ⁽¹¹⁾.

Az aorta lefogása után a szív a műtét idejére teljes ischaemiának van kitéve, amely a szívsebészetben a myocardium átmeneti vagy permanens károsodásának fő okozója. A teljes ischaemia nemcsak a működéséhez szükséges, jelentős oxigén- és tápanyagszükséglet megvonását jelenti, hanem a szívizomsejtekben végbemenő biokémiai folyamatok során keletkező metabolitok (CO₂, H⁺, laktát) eltávolításának hiányát is. A felszaporodó anyagcseretermékek a műtét alatti hypoxiával és az aorta felengedését követő reperfúzióval közösen alkotják a szívizom-károsítás egyik fő tényezőjét.

A myocardialis protekció célja ezeknek a károsító tényezőknek a lehetőség szerint minél teljesebb visszazorítása ⁽¹²⁻¹⁴⁾. A szív megállításával nemcsak a műtéti terület mozdulatlansága biztosítható, hanem a szívizomsejtek oxigén- és energiaigénye is jelentősen csökken. A coronaria-keringésbe juttatott hideg cardioplegiás oldatok magas (15-30 mEq/l) káliumtartalma a sejtmembrán depolarizációjával és a repolarizáció gátlásával diasztolés szív megállást okoz. Az oldat izo-ozmolaritása, pufferkapacitása, a hozzáadott glukóz és egyéb anyagok mind a szívizomsejtek ischaemiátűrő

képességét növelik. Mivel más szervekhez hasonlóan a szív oxigénigénye és energiaszükséglete is feleződik a hőmérséklet 10 °C-os csökkenésekor, a myocardialis protekció további lényeges eleme az anyagcsere-folyamatok lelassítása céljából a szív hűtése. Ez hideg (4 – 5 °C-os) cardioplégiás oldat használatával, illetve a szív felszínének jeges vizes, jégkásás borításával biztosítható.

1.4 A cardio-pulmonális bypass leggyakoribb szövődményei

A CPB alkalmazásának számos enyhébb és súlyosabb szövődménye lehet. Ezek egy része technikai jellegű, a CPB rendszert felépítő egységek (tartályok, szűrők, oxigenátor, csövek), illetve a vér keringetését biztosító motor hibájából, vagy műtét közbeni meghibásodásából adódik.

A vér érintkezése a szív-tüdő motor műanyag csöveinek és tartályainak nem endothel-borítású belső felszínével a véralvadási rendszer aktiválódását indítja el ⁽¹⁵⁾. Megakadályozását a beteg vérének CPB előtti teljes heparinizálásával végzik, 300 IU/testsúlykg heparin az aktivált alvadási időt (ACT) általában az extracorporális keringés szempontjából biztonságosnak tartott 450-480 másodperc fölé emeli. A műtét végén, a CPB után a reziduális heparin-hatás közömbösítése protamin adásával történik.

Nyílt szívsebészeti műtétek után a korai posztoperatív szakban gyakoriak a hematológiai eltérések, véralvadási zavarok ^(16,17). Kialakulásában több tényező játszik szerepet: a CPB rendszert feltöltő krisztalloid-kolloid oldat hemodilúciós hatása, a vér alakos elemeinek pumpa által okozott mechanikus károsodása, valamint az alkalmazott gyógyszerek és heparin véralvadást befolyásoló hatása. E szövődmények a műtét alatti folyadékpótlás megszorításával és a folyadék kiválasztás növelésével (veseműködés serkentése, hemofiltráció), valamint a motor-idő lehetőség szerinti redukálásával csökkenthetők. A véralvadáshoz szükséges faktorok és thrombocyták szükség esetén friss fagyasztott plazma és thrombocytakonzentrátum adásával pótolhatók. A perioperatív vérvesztés és az allogén transfúzió csökkentésére többféle gyógyszer-csoport alkalmazható. Az ilyen célra használt szerek közé tartoznak a serine proteáz inhibitorok (aprotinin), a

lysine-analóg antifibrinolitikumok (ϵ -aminokapronsav), a tranexamsav, a desmopressin acetát és az aktivált rekombináns VIIa faktor, bár az aprotinin kivételével e gyógyszerek tényleges transzfúzió-csökkentő hatása nem nyert bizonyítást ⁽¹⁸⁻²¹⁾.

Ugyancsak ellentmondásos adatok jelentek meg a cardio-pulmonális bypass másik gyakran előforduló, a perioperatív morbiditást és mortalitást jelentősen befolyásoló szövődményéről, az egyes szerveket vagy a szervezet egészét károsító gyulladáisos folyamatokról.

1.5 A posztoperatív gyulladáisos válasz megjelenési formái

1.5.1 Szisztémás gyulladáisos válasz szindróma

A szívsebészeti műtétek legnagyobb része CPB alkalmazását követeli meg. A mesterséges szív-tüdő motor napjainkban már rutinszerű használata a megkérdőjelezhetetlen előnyök mellett azonban a szervezetben bonyolult és részben máig tisztázatlan mechanizmusú élettani folyamatok sorát indítja be, melyek egyes szervek, szervrendszerek, vagy a szervezet egészének különböző fokú károsodásához vezethetnek.

Fiziológias körülmények között a vér alakos elemei és proteinjei az ereket bélelő endotheliummal érintkeznek, ahol az endothel sejtek komplex protektív funkciója akadályozza meg a gyulladáisos és véralvadási folyamatok aktiválódását. Az extracorporalis keringés során viszont a vér alkotóelemei kölcsönhatásba kerülnek részben a szív-tüdő motor PVC csöveinek és műanyag tartályainak felületével, részben pedig a szervezet egyéb saját, nem endothel-borítású szöveteivel. Az idegen anyagokkal, felszínekkel történő kontaktus a szervezet egészét érintő védekező immunfolyamatot indít el. Ehhez társul a CPB alkalmazásával szükségszerűen együtt járó ischaemia (az oxigénszükséglet és a rendelkezésre álló oxigénkínálat egyensúlyának felborulása) és az azt követő reperfúzió, mely során a keringésből átmeneti ideig kirekesztett szerv keringése visszaáll. A műtét során elszenvedett mechanikai stimulusok és a beavatkozás következtében fellépő endotoxaemia is különböző utakon, de azonos irányban hatva szintén a

szervezet védekező folyamatait hozzák működésbe. A humorális és celluláris folyamatok aktiválódása klinikailag is manifesztálódó tünetcsoport, a szisztémás gyulladási válasz szindróma (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) megjelenését eredményezheti. A SIRS által leggyakrabban érintett szervek a szív, a tüdő, és a vese, melyek károsodása nagymértékben felelőssé tehető a korai posztoperatív morbiditás-mortalitás növekedéséért. A SIRS összetett klinikai képét az érintett szerv, vagy szervek mérhető funkciózavarai uralják. Ilyenek a korai posztoperatív szakban a vérnyomás és a szisztémás vasculáris rezisztencia (SVR), a pulmonális vaszkuláris rezisztencia (PVR) illetve a tüdő compliance csökkenése és a vér oxigenizációjának romlása, valamint a vizeletelválasztás akut zavara. E tünetekhez vagy tünetcsoportokhoz a vér egyes specifikus biológiai markereinek jól mérhető és folyamatában jól nyomon követhető változásai is társulnak ⁽²²⁻²⁵⁾.

A SIRS kialakulása és lefolyásának súlyossága betegenként különböző lehet. Noha a SIRS által közvetlenül felelőssé tehető perioperatív mortalitás szívsebészeti műtétek után 1% alatt van, még enyhébb formái is kedvezőtlen irányban befolyásolják a műtét utáni gyógyulást a kialakult cardiális, pulmonális, renális és neurológiai zavarok miatt. A szakterület tudományos kutatásainak egyik fő irányvonala napjainkban is annak tisztázása, hogy mitől függ a betegekben a SIRS megjelenése, illetve eltérő fokú klinikai és laboratóriumi manifesztációja ⁽²⁶⁾.

1.5.2 Myocardialis diszfunkció

A szív a műtét alatt hatalmas stressznek van kitéve. Ennek összetevői a közvetlen mechanikai hatások (sebészi stimulus a műtét alatt; a szív nyomása, forgatása, a szívüregek megnyitása és összevarrása, stb.) kémiai inzultusok (hyperkalémias cardioplégiás oldat a szív megállításkor), hideg-meleg hőmérsékleti hatások, valamint a myocardialis ischaemia-reperfúzió szívműködést károsító hatása. Az 1980-es évek kutatásai mutattak rá arra, hogy az ischémiát követő reperfúzió és az oxigénkínálat hirtelen helyreállítása tehető felelőssé a myocardium károsodásáért, mely során a szívben jelentős

funkcionális, morfológiai, elektrofiziológiai és metabolikus változások figyelhetők meg ^(27,28). Emellett az ischaemia-reperfúzió hatására a szívizomsejtekben mérhető pro-inflammatorikus cytokintermelés (elsősorban TNF α és IL-6) és leukocyt-aktiválódás indul meg ^(29,30), amelyek lokális myocardium-károsító ágensként hatva közösen tehetők felelőssé a kontraktilitás és az adrenerg stimulusok iránti csökkent válaszképességért ^(31,32). A gyulladásos válasz jelentőségét a posztoperatív myocardialis diszfunkció kialakulásában számos tanulmány támasztja alá, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak ki a pro-inflammatorikus cytokinek szérumszintjeinek emelkedése és a szívizomzat troponin-1 koncentráció változásával mérhető károsodása között ⁽³³⁾. A laboratóriumi paraméterek mellett más vizsgálati eredmények a szérum IL-6 és IL-8 szintek és a balkamra-funkció hemodinamikai mérésekkel igazolható változása között találtak pozitív korrelációt ⁽³⁴⁾. A cytokinek szérumkoncentrációján túl a szívűtéteket követő myocardialis károsodás kialakulásában a leukocyt-aktiválódás mértékének lehet jelentős szerepe. Ezt mutatja az a megfigyelés is, mely szerint állatkísérletekben a leukocytaszám csökkentésével a balkamra funkció ischaemia-reperfúziós zavara mérsékelhető volt ⁽³⁵⁾.

Irodalmi adatok alapján motoros szívűtéteket követően a myocardialis károsodás a betegek mintegy 10%-ánál manifesztálódik átmeneti vagy tartós arrhythmia és/vagy kontraktilis diszfunkció formájában. A lokális károsító hatás mellett a gyulladáskeltő cytokinek a helyreállt keringésben a szervezet egyéb részeibe jutva más szerv funkciózavarát, esetleg a szervezet egészét érintő szisztémás gyulladásos válasz (SIRS) kialakulását is előidézhetik.

1.5.3 Vesekárosodás

CPB alkalmazásával végzett szívűtéteket követően a klinikailag manifesztálódó, eltérő súlyosságú vesekárosodás mértéke irodalmi adatok alapján 7-11% ^(36,37). Kiváltó okként elsődlegesen a SIRS kialakulásával a szervezetben nagy mennyiségben termelődő pro-inflammatorikus cytokinek glomeruláris filtrációja során kifejtett proximális vesetubulus-károsító hatását

jelölik meg, a kialakult funkciózavar arányos a gyulladásos válasz mértékével⁽³⁸⁾. A gyulladásos válasz során aktiválódott leukocyták szerepe a vesekárosodásnál is kimutatható: leukocyta deplációval a posztoperatív renális diszfunkció foka szignifikánsan mérsékelhető⁽³⁹⁾. Míg az esetek nagy részében a vese működészavara a mindössze a szérum urea, kreatinin és káliumszintek átmeneti ideig tartó emelkedésében mutatkozik meg, a vesekárosodást elszenvedett betegek mintegy tíz százaléka átmeneti időre vagy tartósan dialízisre szorul. E betegcsoport posztoperatív mortalitása igen magas, felmérések szerint a 28-62%-ot is elérheti^(40,41).

1. 5.4 Pulmonális gyulladásos válasz szindróma

Motoros szívműtétek után a korai posztoperatív periódus egyik legjelentősebb szövődményét a tüdő akut károsodása jelenti. Jelentőségét mutatja, hogy a témával foglalkozó tudomány külön tünetcsoportként tartja számon (Pulmonary Inflammatory Response Syndrome; PIRS). Kialakulását korábbi coronaria- vagy más szívműtét, rossz műtét előtti balkamra-funkció illetve a régebbi típusú buborék-oxigenátorok használata egyaránt elősegítheti. A PIRS a tüdőben élettani-kórélettani, funkcióbeli, hisztológiai és biokémiai változások összetett képében mutatkozik meg. Szövettanilag a CPB után a pulmonális epithel, az endothel és az interstitium károsodása egyaránt látható, jelentős tüdőbeli granulocyta-akkumuláció kíséretében^(42,43). A CPB után, az összes műtétek kb. 1-3%-ában súlyos klinikai kép formájában fellépő PIRS mortalitása a 30-70%-ot is elérheti. A szindróma klinikai tünettanát a légzés-mechanika változásában a compliance csökkenése, a ventilációban az oxigenizáció romlása uralja. A tüdő akut károsodása azonban az enyhe vagy tünetmentes esetekben is nyomon követhető egyes érzékeny markerek meghatározásával, mint például a pulmonális protein akkumulációs index mérése, vagy a broncho-alveolaris lavage mosófolyadékából a neutrophyl granulocyta vagy a myeloperoxidáz enzim koncentrációjának mérése⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. A tüdőben és a szisztémás keringésben felszaporodó pro-inflammatorikus mediátorok koncentrációja az irodalmi adatok alapján korrelál a CPB utáni pulmonális diszfunkció fokával^(47,48).

1. 6 Az akut gyulladásos válasz patofiziológiája

A gyulladás kialakulása a szervezet speciális válasza különböző eredetű behatásokra. A gyulladás oka olyan mechanikai, kémiai vagy mikrobiológiai ágensek által keltett stimulus, amely a szervezet védekezőrendszerének beindulásához vezet. Ennek során a szöveti ártalmat a szervezet felismeri, lokalizálja és megsemmisíti, végül helyreállítja a folyamat során károsodott szöveteket. Az immunválasz kiterjedése számos tényező által szabályozott folyamat, amely a károsító noxa eliminálása után gyengülni kezd, majd magától megszűnik. Az önszabályozó mechanizmus károsodása vagy megszűnése azonban a gyulladásos válaszfolyamat immáron kontroll nélküli felerősödését okozza, ami az érintett szervek vagy a szervezet egészének súlyos károsodását vonja maga után.

A gyulladás klasszikus tünetegyüttesét (rubor, calor, tumor, dolor) a károsító behatás környezetében futó kapilláris érhálózatban bekövetkező változások (vazodiatáció és érfali permeabilitás-fokozódás) hozzák létre. Ehhez társul a vaszkuláris endothelium és a leukocyta-makrofág rendszer lokális aktiválódása a gyulladást kiváltó faktor megsemmisítéséhez és a sérült szövetek helyreállításához.

Az akut gyulladásos válasz szindróma bonyolult és egymással szoros összefüggő történések láncolata. Kialakulásában és lefolyásában celluláris és humorális-molekuláris komponensek egyaránt szerepet játszanak.

1. 6. 1 A gyulladásos válasz folyamata

1. 6. 1. 1 Az endothelialis felszín aktiválódása

A vaszkuláris endothelium dinamikus struktúra, amely különféle vazóaktív faktorok és kémiai anyagok szintézisével képes az érfal tónusának, az átáramló vér mennyiségének finom szabályozására. Emellett jól ismert a gyulladásos válasz helyi megjelenésének és lefolyásának irányításában

betöltött szerepe is. A gyulladáskeltő ágensek megjelenése az endothel sejtek funkciójának megváltozásához, az endothelium aktiválódásához vezet. Az aktiválódott endothel-sejtek felszínén elhelyezkedő receptoroknak a sejt fenotípusától, a kiváltó ágens formájától, a stimulus nagyságától és idejétől egyaránt függő változása pontos információkat szolgáltat a leukocyták számára. Az aktiválódott sejtek által szintetizált pro-inflammatorikus faktorok (cytokinek, kemokinek, thrombocytá aktiváló faktor, adhézións molekulák, szöveti faktorok) a károsító ágens lokalizálásában, a gyulladós válasz beindításában és lefolyásában jutnak lényeges szerephez. Az endothelsejtek ilyen irányú aktiválódása elsősorban a posztkapilláris venulákban megy végbe, ami az érfali permeabilitás-fokozódás és a leukocyták extravazációjának is elsődleges helye röviddel a gyulladáskeltő ágens megjelenése után ⁽⁴⁹⁾.

1.6.1.2 Endothelsejt – leukocytá interakciók

Az aktiválódott endothelsejt és a keringő leukocyták közötti interakció egymás utáni történései a gyulladós immunválasz kaszkádjának korai, meghatározó jelentőséggel bíró folyamata, melynek eredményeként a gyulladáskeltő ágens környezetében felszaporodott leukocyták számára az endothel fala a gyulladáskeltő noxa környezetében átjárhatóvá válik.

A fehérvérsejtek fiziológiás körülmények között szabadon sodródnak a vérben 1 mm/sec sebességgel a kapilláris véráramlás középső részében. Az aktiválódott endothelsejtek által a sejt felszínre kiválasztott adhézións molekulák –szelektinek- hatására a keringő leukocyták sebessége jelentősen lelassul, és a véráram külső részére sodródva kapcsolatba kerülnek az endotheliummal. A hisztaminnal, vagy thrombinnal aktivált endothelsejtekben szintetizált P-selectin adhézións molekula a sejt felszínére kerülve a leukocyták felszínén lévő specifikus receptorhoz (P-selectin glikoprotein ligand-1; PSGL-1) kötődve horgonyozza le az áramló leukocytát. Az endothelsejt pro-inflammatorikus ágensekkel (IL-1 β , TNF α , bakteriális LPS, stb.) történő aktiválása a P-selectin mellett már a gyulladás korai fázisában egy másik adhézións molekula, az E-selectin gén transzkripcióját is indukálja ⁽⁵⁰⁾.

1.6.1.3 A leukocyták aktivációja

Az endothelsejtek aktiválódásukkor a szelektinek mellett olyan jelző molekulákat is szintetizálnak, melyek feladata a leukocyták szoros sejtfelszínhez kötése és a megkötött fehérvérsejtek aktiválása. Az elsőként azonosított ilyen molekula a thrombocyták aktiváló faktora (Platelet Activating Factor; PAF). A PAF az endothelsejt hisztaminnal vagy thrombinnal történő aktiválása után a P-selectinnel együtt percek alatt megjelenik a sejt felszínén. A P-szelektin által az endothelhez horgonyzott leukocyták felszínén a PAF hatására a $\beta 2$ integrinek szerkezetváltozását okozza, amely a kezdetben laza endothel-leukocyták kötésének megerősödéséhez vezet ^(51,52). Hasonló összehangolt adhéziónak és leukocyták-aktiválódásnak figyelhető meg akkor is, ha gyulladást pro-inflammatorikus citokinekkel váltjuk ki, ilyenkor az E-selectin mellett megjelenő C-X-C kemokinek végzik a sejttel kapcsolatba került fehérvérsejt aktiválását ⁽⁵³⁾.

1.6.1.4 A leukocyták transzmigrációja

Az endothellel szoros adhézióba került aktiválódott fehérvérsejtek a gyulladástól való végső fázisában gyors – in vitro mintegy másfél-két perc alatt lezajló - folyamat során áthatolnak az endothel rétegen. A folyamat a leukocyták citoszkkeleton felbomlásával majd újraformálódásával jár. A transzmigrációt a leukocytával kapcsolódott endothelsejt összehangolása is elősegíti, mivel az így megnövekedett intercelluláris térben a leukocyták átjutása könnyebben és gyorsabban mehet végbe ^(54,55).

1.6.2. A gyulladáshos válasz celluláris komponensei

1.6.2.1 Neutrophyl granulocyták

A gyulladáshos válasz beindulása után az elsőként megjelenő és legfontosabb sejtek a neutrophyl granulocyták. Szerepük a gyulladáshskeltő ágens eliminálása, a gyulladt és nekrotikus szövetek eltávolítása, majd a gyógyulási folyamat beindítása. A granulocyták aktiválódásának hatására a sejtek degranulálódnak, mely során a különböző intracelluláris granulák tartalma – antimikrobiális, cytotoxikus anyagok, proteinázok, savas hydrolázok, cytoplazmatikus membrán receptorok – meghatározott rend szerint a sejten kívüli térbe kerül. Ezen felül az aktiválódott neutrophyl pro-inflammtorikus cytokinek és kemokinek termelésével további fehérvérsejtek aktiválásért is felelősek. A degranulációs folyamat során a neutrophyl granulocyták apoptózisa és a szöveti makrofágok általi phagocytosisa következik be ^(56,57).

1.6.2.2 Monocyta-makrofág rendszer

A monocyták a szöveti makrofágok keringő prekursorai, számos cytokin, kemokin, komplement stb. felületi receptorral rendelkeznek. A keringő monocyták akitválódása e receptorokon keresztül vagy idegen felszínnel történő érintkezés nyomán megy végbe, és szöveti faktorok, pro-inflammtorikus cytokinek (többek között IL-1 β , TNF α , IL-8), illetve adhézións molekulák fokozott szintézisét váltja ki. A gyulladás helyszínén a monocyták elhagyják a keringést és specifikus szöveti faktorok hatására fenotípusukat megváltoztatva szöveti makrofággá differenciálódnak. A szöveti makrofágok a szubakut/krónikus gyulladás predomináns sejtsjei, melyek számos mediátor anyag (cytokinek, komplement és koagulációs faktorok, plazma proteinek, enzimek, hormonok, lipid mediátorok) szintézisére és kibocsátására képesek. A makrofágok fontos feladata a bakteriális és/vagy sérült sejt részek, valamint az apoptotikus neutrophyl granulocyták phagocytosis útján történő eltávolítása. A T-lymphocyták számára antigént szolgáltatva az

immunvédekezésben játszanak szerepet, cytokinek, egyes kemokinek és növekedési faktorok szekréciójával pedig a sérült szövetek helyreállításában résztvevő sejtek aktiválódását segítik elő.

1.6.3 A gyulladásos válasz molekuláris komponensei

1.6.3.1 A komplement rendszer

A komplement rendszer a plazmában inaktív formában jelenlevő proteinek olyan csoportja, melyek klasszikus, vagy alternatív módon aktiválódva az infammatorikus válasz során kemotaxis, anaphylaxis, sejt-lízis, stb. mediátoraként szerepelhetnek. A komplement rendszer klasszikus úton történő aktiválódását a gyulladásos válasz során a nekrotikus szövetekből felszabaduló enzimek, vagy a keletkezett antigén-antitest komplexek indítják meg, míg a Gram-negatív endotoxinok az alternatív út beindulásához vezetnek ^(58,59). A komplement rendszer elemei az akut gyulladásos válaszban jelentős szerepet játszanak a neutrophyl kemotaxisban (C3a, C5a, C567), az ér-permeabilitás fokozódásában (C3a, C5a), hisztamin felszabadításban (C3a, C5a), a thrombocyta aggregáció fokozódásában (C3a), a cytolitikus aktivitásban (C56789) és a baktériumok macrophagok által történő phagocytosisában (C2a, C3b, C4b).

A komplement kaszkád elemei az akut gyulladásos válaszban tehát számos, jelentős szerepet játszó folyamat mediátoraként szerepelnek. Miután Kirklin és munkatársai kimutatták, hogy a CPB más gyulladáskeltő behatásokhoz hasonlóan kiváltja a komplement rendszer aktiválódását ⁽¹⁵⁾, e terület került a szívsebészeti műtéteket követő gyulladásos immunválasz (SIRS, PIRS) kutatásának központjába. A további kísérletek eredményei azonban megcáfolták a komplement rendszernek a gyulladásos folyamatokban betöltött nélkülözhetetlen voltát. Kimutatták, hogy gyulladáskeltő ágens hatására komplement rendszerrel nem rendelkező kísérleti állatokban is kialakul szöveti gyulladásos reakció ⁽⁶⁰⁾.

1.6.3.2 Cytokinek

A cytokinek olyan kis molekulású (15-40 kDa) polypeptidek, amelyek humorális faktorként fő szerepet játszanak a gyulladásos immunválasz lefolyásában. Rendkívül alacsony, mindössze nano-, illetve picomoláris koncentrációban szabályozzák az egyes sejtek és szövetek működését mind normál, mind kóros körülmények között ⁽⁶¹⁾. A cytokinokkal hozható összefüggésbe a pro- és anti-inflammatorikus egyensúly fenntartása mellett a sejt különböző irányú differenciálódása, apoptózisa vagy fokozott életképessége, prekursor sejtek kialakulásának serkentése vagy gátlása, illetve a daganatsejtek szaporodása vagy elpusztulása is.

A cytokinek a szöveti sérülés, vagy fertőzés metabolikus hatásának fontos szabályozói. Saját hatásuk mellett potenciózzák más pro-inflammatorikus cytokinek termelődését is tovább erősítve ezzel a kialakuló gyulladásos kaszkádot ⁽⁶²⁾, de különböző sejtek aktiválásának, differenciálódásának és proliferációjának serkentésével, vagy gátlásával a gyulladásos immunválasz intenzitását és hosszát is befolyásolják.

A pro-inflammatorikus cytokinek szerepe a gyulladásos válasz elindításában és progressziójában van. E tábor két meghatározó képviselője a TNF α és az IL-1 β cytokinek, jelentőségüket a szintézisükre képes sejtípusok nagy száma és a termelődést kiváltó stimulusok sokfélesége adja. Az endogén cytokin inhibitorok a kialakult gyulladásos válasz terminálását végzik specifikus módon, az adott pro-inflammatorikus cytokin hatásának ellensúlyozásával.

A cytokinek szerepe a CPB-t kísérő gyulladásos válasz kialakulásában és lefolyásában hosszú évek óta képezi intenzív kutatások tárgyát ^(63,64). A pro-inflammatorikus cytokinek jelentőségét az endothel-sejtek aktiválásában számos irodalmi adat támasztotta alá az aktiválódott monocyták által kiválasztott TNF α és IL-1 β emelkedett szérumkoncentrációinak mérésével. Bár ezen eredményekre alapozva több tanulmány jelöli meg az aktiválódott pro-inflammatorikus cytokin hálózatot a CPB-t kísérő SIRS kiváltó okaként ^(65,66), legalább ugyanilyen számban jelentek meg olyan közlemények, amelyekben a CPB-t követően nem találtak TNF-szint emelkedést ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Más tanulmányok a nyílt szívűműtétek után a pro- és anti-inflammatorikus

tulajdonságokkal egyaránt rendelkező IL-6 és IL-8 szérumszintek növekedését írták le ⁽⁶⁸⁾. A szerteágazó és egymásnak sokszor ellentmondó eredmények világosan mutatták, hogy a CPB-t kísérő szisztémás gyulladáso s válasz kiváltásáért önmagában egyetlen cytokin sem tehető felelőssé. Ezt támasztották alá azok a klinikai tapasztalatok is, amelyek szeptikus betegekben az emelkedett TNF α és IL-1 β cytokinek közömbösítésével nem tudtak szignifikáns javulást kimutatni a betegség kimenetelében ⁽⁷⁰⁾. Más in vivo vizsgálatok hasonló következtetésre jutottak, mivel az egyes izolált cytokinek szérumszintjének mérése a szepszis különböző fázisaiban nem minden esetben korrelált a klinikai tünetek súlyosságával és a betegség lefolyásával ⁽⁷¹⁻⁷³⁾. A cytokinek szerepének megítélését a gyulladáso s válasz kialakulásában tovább színesítette a gyulladás ellen ható cytokinek vizsgálata ^(74,75). Több tanulmány mutatta ki az anti-inflammatorikus cytokinek (IL-10, IL-6, IL-8), szolubilis receptorok és receptor antagonisták szérumkoncentrációjának emelkedését nemcsak motoros, hanem extracorporalis keringés nélkül végzett szív-műtétet követően egyaránt. A megfigyelés azt sugallja, hogy a szívsebészeti műtétet kísérő cytokinváltozások kiváltó okaként a CPB-től független mechanizmusok is szerepet játszanak ⁽⁷⁶⁾.

1.6.3.2.1 Tumor necrosis factor (TNF)

A pro-inflamatorikus TNF két izoformja közül a potensebb tulajdonságokkal rendelkező TNF α szintézisét neutrophyl granulocyták, T és B lymphocyták, endothel-sejtek és simaizom sejtek egyaránt végzik, míg a TNF β termelésében főként a T-lymphocyták játszanak szerepet. Szintézisüket számos specifikus és nem specifikus stimulus (stressz, gyulladás, endotoxin-expozíció) beindíthatja. A TNF α biológiai hatása több faktor függvénye; az adott sejt típusa és aktiválódásának foka mellett a cytokin lokális koncentrációja is befolyásolja. A TNF α fokozza a thrombotikus aktivitást, a thrombocyta aktiváló faktor (PAF), prosztaglandinok és a NO szintézisét ⁽⁷⁷⁾. Számos sejt típusban stimulálja szabad gyökök termelődését, amelyek hatásukat a NF- κ B transzkripciós faktoron keresztül fejtik ki. A TNF α direkt

sejtkárosító hatásként pro-apoptotikus folyamatokat indít be, a cytokin neutralizálásával a gyulladásos állapot javulása mutatható ki ⁽⁷⁸⁾. Ezzel párhuzamosan a TNF α hatására az apoptózis ellen védő folyamatok is aktiválódnak, a cytoprotektív géneknek indukciója cytokin-érzékeny intracelluláris jelátviteli utakon (protein kináz C, NF- κ B, SAPK) keresztül valósul meg ⁽⁷⁹⁾. Az állatkísérletes modelleken túl a TNF α emberi szervezetre gyakorolt hatását is tanulmányozták önkéntes alanyok bevonásával: egészséges személyekben a parenterális endotoxin által indukált magas TNF α koncentráció hypotenziót, a vaszkuláris permeabilitás növekedését és myocardialis depressziót váltott ki ⁽⁸⁰⁾.

A TNF α szintézisének és aktivitásának mértékét a cytokin szekréció mellett a specifikus TNF receptorok befolyásolják. A TNF receptoroknak két altípusa ismert, az I-es (TNF RI vagy p55) és II-es (TNF RII vagy p75). Mindkét receptortípus magas affinitással, szelektíven képes kötődni a TNF α és β cytokinekhez. Szinte az összes sejttípus sejtmembránjában kimutatható az egyik vagy mindkét transzmembrán receptor, melyek a cytokinnel történő kapcsolódás után az intracelluláris pro-inflammatorikus jelátviteli folyamatok aktiválását végzik. A kétfajta TNF receptor a sejtek felszínén kívül szabad formában, a szérumban és a vizeletben is kimutatható ⁽⁸¹⁾. E szolubilis fehérjék (sTNF RI és sTNF RII) a TNF receptorkötő-helyeit blokkolva kompetitív módon gátolják a cytokin transzmembrán receptorokhoz kapcsolódását és biológiai aktivitásának kifejtését ⁽⁸²⁾.

1.6.3.2.2 Interleukin-1 (IL-1)

Az IL-1 családba sorolt proteinek állatkísérletes modellekben és humán beteganyagban egyaránt bizonyítottan a gyulladásos folyamatok és a különböző szervekben kialakuló szöveti károsodások fontos mediátorai, szerepük a coronariabetegségek patofiziológiájában is bizonyított ⁽⁸³⁾.

A pro-inflammatorikus tulajdonságú IL-1 α és IL-1 β cytokin szintézise sokféle sejt cytoplazmájában megy végbe. A folyamat során először 31-33 kDa molekulásúlyú glykozilált pro-cytokinek, majd a membránban konvertáló

enzimek (ICE vagy caspase 1) hatására 17 kDa molekulású „érett” cytokinek képződnek ⁽⁸⁴⁾.

Az IL-1 β biológiai hatását a TNF-hez hasonlóan, a pro-inflammatorikus jelátviteli mechanizmusok beindításáért felelős specifikus membrán-receptoraihoz kötődve fejt ki. Két IL-1 β receptort ismerünk, az IL-1 RI aktív forma, míg az IL-1 RII biológiai aktivitással nem rendelkezik. Az IL-1 cytokinek IL-1 RI receptorhoz kötődése a receptor struktúrájának megváltozását eredményezi, amely a sejtben az NF- κ B, p38 MAP-kináz és más jelátviteli utak aktiválásával pro-inflammatorikus gének (IL-6, IL-8, MCP-1, stb.) transzkripcióját indítja be ⁽⁸⁵⁾.

Az IL-1 RI receptor természetes antagonistája (IL-1ra) az IL-1 β cytokinhez hasonló affinitással kötődik az IL-1 RI receptorhoz, de szignál-transzdukciós biológiai hatással nem rendelkezik. Miután az IL-1 RI receptor kötőhelyéhez kapcsolódva kompetitív módon csökkenti az IL-1 cytokinek számára hozzáférhető aktív receptorok mennyiségét, az IL-1ra fontos szereppel bír az IL-1 inflammatorikus potenciáljának kontrollálásában ^(86,87).

1.7 Az endogén nitrogén monoxid (NO)

1.7.1 A nitrogén monoxid szintézise és élettani hatásai

A nitrogén monoxid (NO) jelentős élettani szerepet játszik az erek relaxációjának biztosításában, így a pulmonális keringés szabályozásában is ⁽⁸⁸⁾. A tüdőerek endothel sejtjeiben (eNOS) és a légúti epithel sejtekben (iNOS) található NO-synthase (NOS) enzimek folyamatosan szintetizálják a NO-t az L-arginin terminális guanidin csoportjából ^(89,90). A tüdőben a NO vaszkuláris és légúti funkciókat szabályzó tevékenysége - protektív szerepe a pulmonális vazokonstrikció és a légúti túlérzékenység ellen - részben direkt hatással, részben pedig a vaszkuláris és légúti simaizom sejtekben lévő szolubilis guanilát-cikláz (sGC) által szintetizált ciklikus guanilát monofoszfáton (cGMP) keresztül érvényesül ⁽⁹¹⁾ (1. ábra). A tüdőerek és a légutak sejtjeiben a NO meghatározó jelentőségű a sejtek fenotípusa,

kinetikája, proliferációja, vagy apoptózisa szempontjából ⁽⁹²⁾. A tüdő különböző eredetű, az ereket és/vagy a légutakat érintő kórfolyamataiban a NO termelése, valamint a képződött NO hatékonysága is jelentősen változhat.

Noha a kilégzett NO szintézisének pontos anatómiai helye kétséget kizáróan máig nem bizonyított, mind több megfigyelés támasztja alá a NO tüdőben történő szintézisét. A pulmonális keringés megszűnése a kilégzett CO₂ koncentrációjával ellentétben nem vonja maga után a légúti NO szint csökkenését, bizonyítva ezzel a kilégzett NO pulmonális eredetét. ^(93,94).

A légutakban mérhető NO folyamatos termeléséért elsősorban a bronchioláris epithel sejtek II. típusú NOS enzime felelős ^(95,96). A vaszkuláris endothelben működő eNOS által termelt jóval alacsonyabb, mindössze picomoláris nagyságrendű NO-t a vérben lévő oxihemoglobin megköti és elszállítja. A különböző NOS-izoenzimek által termelt NO fent említett nagyságrendbeli különbségéből következik, hogy az alveoláris és mikrovaszkuláris diszfunkcióval jellemezhető akut tüdőkárosodás során a kilégzett NO döntően az epitheliális NO képződés-felhasználás dinamikáját tükrözi, elfedve a vaszkuláris NO szintézis és metabolizmus történéseit.

Az endothelben végbemenő NO termelés azonban felerősíthető exogén NO donor nitroglicerinnel parenterális adásával. Nitroglicerinnel (glicerinnel trinitrát; GTN) parenterális adása után az a vaszkuláris endotheliumban metabolizálódik ^(97,98). A metabolizmus során keletkező NO egy része a kapillárisokból a tüdő alveolusokba diffundálva a kilégzett levegőben megjelenik és detektálhatóvá válik ⁽⁹⁹⁾, mértéke függ a beadott GTN mennyiségétől, valamint a vaszkuláris endothel és az alveolo-kapilláris egység funkciójától. Ezen ún. indukált NO szintézis nyomán követésével képet kaphatunk a vaszkuláris endothel finom történéseiről, átmeneti funkciózavaráról, vagy végleges károsodásáról.

Az akut tüdőkárosodás során az adott betegség patológiájára jellemző elváltozások a kilégzett levegőben mérhető NO szintjét pozitív és negatív irányban egyaránt befolyásolhatják. A gyulladásos folyamatokat a pro-inflammatorikus citokin rendszer aktivációja kíséri, amelyek képesek az indukálható gének és enzimek, így a II. típusú NOS aktivitásának növelésére is ⁽¹⁰⁰⁾. Ezzel magyarázható például az asztmás betegekben mérhető magasabb légúti NO értékek ⁽¹⁰¹⁾, de ugyanez a jelenség egy másik

gyulladásos tüdőfolyamat, a tüdő-transzplantáció egyik súlyos szövődeményeként fellépő obliteratív bronchitisben is megfigyelhető ⁽¹⁰²⁾.

A légúti NO szintjének csökkenését okozhatják a NO termelődése ellen ható tényezők: a folyamatos NOS aktivitás gátlása, a II. típusú NOS aktivitás-fokozódásának hiánya, a képződött NO hemoglobin által történő fokozott felvétele, valamint a keletkezett NO alveolusokba jutásának nehezítettsége. Emellett a pro-inflammatorikus cytokinek a mRNS destabilizálásával gátolják a III. típusú (endothelialis) NOS aktivitását ⁽¹⁰³⁾. Látható tehát, hogy a gyulladásos cytokinek NO termelésre kifejtett hatását a II. típusú NOS indukciójának és a III. típusú NOS gátlásának bonyolult egyensúlya határozza meg.

A keletkezett NO biológiai aktivitását és inaktiválódását a folyadék fázisban számos kémiai folyamat befolyásolhatja. Ezek közül a legfontosabb, az akut tüdőkárosodásoknál is fokozott jelentőséggel bír az a reakció, mely során a termelődött szabad gyökök NO-val reakcióba lépve peroxinitritet képeznek ⁽¹⁰⁴⁾. Ezáltal csökken a termelődött NO bioaktivitása, a keletkezett végtermék pedig az eredeti szabad gyöknél is potensebb oxidáns lesz.

1.8 A hemoxigenáz–szénmonoxid (HO–CO) rendszer

Az oxidatív stressz számos biológiai történés mellett az ischaemia-reperfúziós szövetkárosodás és az akut vagy krónikus gyulladásos betegségek kialakulásában és lezajlásában játszik fontos szerepet. Az oxigén szabad gyökök sejt- és szövetkárosító hatásai ellen a szervezet non-enzimikus és enzimikus védekező rendszerek sokaságát alkotta meg. Az előbbi csoportból jól ismert a glutation, az E- és C-vitamin, a transferrin, a bilirubin vagy a ceruloplazmin antioxidáns hatása. A szabadgyök-semlegesítő enzimrendszereknél a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a glutation-peroxidáz mellett fontos szerepe van a stressz-válasz fehérjék (heat shock protein; HSP) csoportjába sorolt a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzimnek.

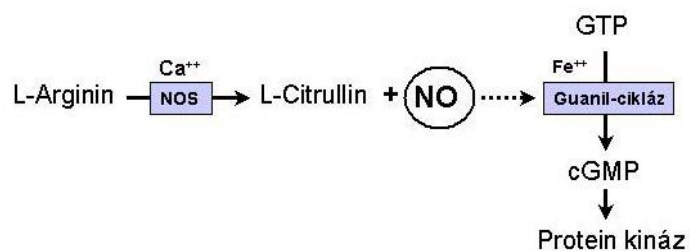
A hem molekula lebomlása során a hemoxigenáz enzimhez kötődik, a reakció eredményeképpen equimoláris mennyiségű szabad vas (Fe^{2+}), biliverdin és szén-monoxid (CO) keletkezik. A szabad vasmolekulákat a

ferritin köti meg, a biliverdint a biliverdin reduktáz enzim bilirubinná alakítja át⁽¹⁰⁵⁾ (2. ábra).

A hemoxigenáz enzimnek három ismert izoformja közül a HO-2 és a HO-3 konstitutív működésű, a HO-1 számos stimulus által (hypoxia, hyperoxia, hidrogén peroxid, cytokinek, endotoxin, UV-sugárzás, nehézfémek, stb.) indukálható, és cytoprotektív molekulaként fontos szerepet játszik a sejtek oxidatív károsodásának kivédésében⁽¹⁰⁶⁾. A képződött bilirubin magas koncentrációban neurotoxikus hatású, antioxidánsként azonban a peroxilgyökök megkötésével az agy védelmét biztosítja az oxidatív stressz okozta károsodásokkal szemben⁽¹⁰⁷⁾.

Miután a szénmonoxid affinitása a hemoglobinhoz jóval erősebb, mint az oxigéné, az O₂-t a kötőhelyekről leszorítva szöveti hypoxiát/anoxiát okoz. Alacsony (0.01% alatti) koncentrációban viszont a nitrogén monoxidhoz hasonlóan a guanil-cikláz – cGMP út aktiválásával a vazomotor tónus szabályozásában játszik szerepet^(108,109). Emellett a CO a trombocytaktiválódás- és aggregáció gátlása révén anti-inflammatorikus hatással rendelkezik, és a gyulladásos folyamatok során befolyásolja a pro- és anti-inflammatorikus cytokinek termelődését is. Mind in vitro laboratóriumi modellek, mind in vivo állatkísérletes vizsgálatok igazolták az alacsony koncentrációban adott CO protektív hatását hyperoxia vagy LPS-indukált endotoxémia által kiváltott gyulladás esetén⁽¹¹⁰⁾.

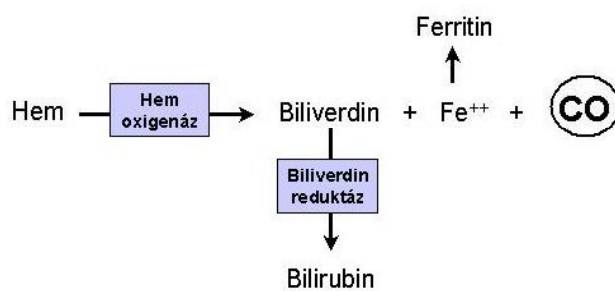
A klinikai diagnosztikában a kilégzett levegő CO szintje az oxidatív stressz és a szisztémás, vagy pulmonális gyulladásos válasz jól mérhető markere, a terápiában CO adása akár direkt bevitellel, akár a HO-1 működésének génindukcióval történő fokozása révén a jövőben effektív eszköz lehet az oxidatív stressz és a gyulladásos állapotok által előidézett szöveti károsodások kivédésére.



1. ábra

A nitrogén monoxid (NO) szintézise és működése.

(NOS=nitrogén monoxid szintáz; GTP= guanil trifoszfát; cGMP= ciklikus guanil monofoszfát)



2. ábra

A szénmonoxid (CO) keletkezése a szervezetben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1 Bevezetés

A szív-tüdő motorral végzett nyílt szívsebészeti műtétek közismerten jelentős szerepet játszanak mind szisztémás, mind szervspecifikus gyulladási folyamatok beindításában, amelyek azután helyük és kiterjedésük függvényében különböző szervek-szervrendszerek működészavarán keresztül a posztoperatív morbiditás és mortalitás meghatározó tényezőivé válhatnak. Noha a gyulladási válasz kifejlődésében szerepet játszó citokinek tanulmányozása szív-műtétek kapcsán a témával foglalkozó kutatások egyik fő területe, sok kérdés napjainkig vita tárgyát képezi. Ilyen például a CPB következtében párhuzamosan aktiválódó anti-inflammatorikus oldal jelentősége a gyulladási válasz kimenetelében.

Munkánkban a szív-tüdő motorral végzett nyílt szívsebészeti rutin műtétek (coronaria artéria bypass) során bekövetkező gyulladási válasz meghatározó komponenseinek szerepét, valamint az általuk kialakult vaszkuláris és pulmonális szöveti károsodások in vitro és in vivo tanulmányozását terveztük.

2.2 Célkitűzések

2.2.1

Motoros szív-műtéteket követően a korai posztoperatív szakban megjelenő pro-inflammatorikus citokinek, valamint azok ellenregulátoraiként

szereplő specifikus anti-inflammatorikus mediátorok abszolút szintjeinek mérése, a kapott adatok összehasonlítása a műtét előtti alapértékekkel. A gyulladáshoz vezető válasz két ellentétes oldalának arányával kifejezhető nettó gyulladáshoz vezető egyensúly változásának összevetése a posztoperatív szak alakulásával és esetleges műtét utáni szövődmények megjelenésével.

2.2.2

Humán vaszkuláris (aorta és artéria pulmonalis) endothelsejt alapú in vitro bioassay segítségével a gyulladáshoz vezető citokinek és mediátorok endothelsejtekre kifejtett aktiváló hatásának és a következményes sejtkárosodás (apoptózis) mérése. A kapott adatok összevetése a coronariaműtéten átesett betegek aktiválódott plazmájának ugyanezen bioassay-re gyakorolt hatásával.

2.2.3

Irodalmi adatok szerint az akut gyulladáshoz vezető állapotok az indukálható nitrogén oxid szintáz (iNOS) és a hemoxigenáz (HO) enzimek aktivitásának növelésével fokozott nitrogén monoxid és szénmonoxid szintézist váltanak ki. E tanulmányok eredményeit alapul véve az in vitro kísérletek kiegészítése céljából a citokin egyensúly által okozott pulmonális gyulladáshoz vezető válasz in vivo megközelítése a perioperatív időszak több pontján mért bazális (epitheliális) és exogén NO donor adásával indukált (endotheliális) légúti nitrogén monoxid mérésével.

3. CYTOKIN EGYENSÚLY SZÍV-TÜDŐ MOTORRAL VÉGZETT „RUTIN” SZÍVSEBÉSZETI MŰTÉTEK KAPCSÁN

3.1 Bevezetés

A coronariabetegségek sebészi megoldása napjainkban általában jó posztoperatív eredménnyel és a műtéten átesett betegek életminőségének jelentős javulásával kecsegtető beavatkozás. Azonban -mint azt már a bevezetőben is részletesen taglaltuk-, a cardio-pulmonális bypass alkalmazásával végzett „rutin” szívűtétek a szervezet gyulladásos folyamatainak aktiválódása révén különböző súlyosságú posztoperatív szövődmények kiváltó okai lehetnek. A cytokinek más gyulladásokeltő mediátorokkal együtt meghatározó szereppel bírnak a lokális és szisztémás gyulladásos válasz beindításában és lezajlásának dinamikájában. A korai szakban aktiválódó cytokinek két jelentős képviselője, a TNF α és az IL-1 β egyrészt direkt mediátorként, másrészt pedig indirekt módon, további pro-inflammatorikus cytokinek stimulálása révén fejt ki hatását.

A cytokineknek a gyulladásos folyamatokban betöltött szerepét tovább színesítette a pro-inflamatorikus cytokinek biológiai hatásait ellensúlyozni képes specifikus és nem specifikus cytokin-antagonisták felfedezése. Míg több tanulmány igazolta szív-tűdő motorral végzett szívűtétek kapcsán a betegek vérében a gyulladásokeltő cytokinek (TNF α és IL-1 β) koncentrációjának emelkedését⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾, más közlemények ezzel párhuzamosan a specifikus cytokin-antagonisták (sTNF-RI, sTNF-RII, illetve IL-1ra) növekedését is kimutatták^(75,114). Eszerint a motoros szívűtétek nemcsak a gyulladásos válasz kialakulásáért felelős pro-inflamatorikus cytokinek fokozott szintézisét indítják be, hanem egyidejűleg a szervezet védekezését szolgáló anti-inflamatorikus oldal aktiválását is, melynek feladata a

gyulladásos válaszreakció kifejlődésének megakadályozása, illetve a bekövetkezett folyamat terminálása. A gyulladásos válaszreakció nagysága valószínűleg a két oldal aktiválódásának egymáshoz viszonyított mértékétől függ⁽¹¹⁵⁾.

Vizsgálataink célja az volt, hogy alacsony rizikócsoporthú betegek CPB segítségével végzett coronaria helyreállító műtétei kapcsán mérjük egyes gyulladásokeltő cytokinek és specifikus antagonistáik plazmaszintjét a pre- és posztoperatív szakban. Összevetettük a gyulladásos válasz két ellentétes oldalának arányával jellemezhető nettó gyulladásos egyensúly eltolódását az esetleges posztoperatív szövődmények kialakulásával.

Tanulmányunk további célja volt, hogy összehasonlítsuk az in vivo kapott cytokin választ és a számított nettó gyulladásos egyensúlyt a betegek vérének in vitro bakteriális LPS-aktiválását kísérő cytokin változásokkal.

3.2 Betegcsoport, aneszteziológiai és műtéti technika

Méréseinkbe összesen 18 (11 férfi és 7 nő), 44 és 75 év közötti beteget vontunk be, akiknél az elektív myocardialis revaszkularizáció műtétre CPB alkalmazásával került sor. A betegek a műtét előtt jó balkamra funkcióval (45% feletti ejekciós frakció), normál légzésfunkciós értékekkel és negatív mellkas-röntgennel rendelkeztek, valamint sem szisztémás, sem pulmonális gyulladásos folyamatuk (pl. asztma) nem volt ismeretes. A vizsgálatokra a kórházi etikai bizottság engedélyével került sor, a betegektől részletes tájékoztatást követően írásos beleegyezést kaptunk.

Gyógyszeres műtéti előkészítést követően (temazepam, ranitidine) a narcosis bevezetése fentanyl és propofol, majd pancuronium iv. adásával történt. Az anesztézia fenntartását a műtét során inhalációs szerekkel (isoflurane és nitrogén oxidul) illetve propofol-remifentanyl infúzióval végeztük. Antikoagulálás céljából a betegek 300 IU/kg heparint kaptak, ami az ACT időt 480 sec. fölé emelte. A műtét végén a maradék heparin hatás felfüggesztése 1 mg protamin/100 IU heparin adásával történt.

A cardio-pulmonális bypass membrán-oxigenátorral és centrifugális pumpával felszerelt motorral történt. A perfúzió fenntartását 2.4 l/min/m² nem

pulzatis áramlással végeztük az artériás középnyomás folyamatosan 50 Hgmm felett tartásával.

3.3 Vérminták levétele és kezelése

A betegektől 40 ml vért vettünk le a műtét kezdete előtt, illetve 6 órával a cardio-pulmonális bypass befejezése után a behelyezett centrális vénás kanülön keresztül. Az elsőként levett vérminta képezte azt a kiindulási értéket, amelyekhez a nyílt szívműtét/CPB által kiváltott hatásokat viszonyítottuk. A második mintavételi időpontot több szempont figyelembevételével határoztuk meg. A CPB és a cytokin mérések között elegendő időt kívántunk biztosítani a génindukációs folyamatok kifejlődéséhez, amely például LPS által indukált gének esetén 3-6 órát igényel. Azt viszont el szeretnénk volna kerülni, hogy egy túl távoli mintavételi időpont miatt a szívműtét és a CPB hatásai mellett esetleg más gyulladáskeltő tényezők (posztoperatív sebgyógyulási zavar, fertőzés, láz vagy más események) is befolyásolják a mért pro-és anti-inflammatorikus mediátorok koncentrációját. A második vérminta levételi időpontjánál klinikai szempontokat is figyelembe vettünk: a műtét szövődményeként esetleg kialakuló szisztémás vagy pulmonális gyulladással válasz 6 óra elteltével már jól detektálható klinikai tüneteket okoz, ugyanakkor komplikációmentes esetben a betegek már nem igényelnek gyógyszeres keringéstámogatást, illetve lélegeztetést.

A levett vérminták feléből centrifugálással (3000/min; 10 perc) nyert plazmát a felhasználásig pár ml-es egységekre szétosztva $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltuk (natív plazma).

Annak megfigyelésére, hogy a vér érintkezése műanyag felszínnel önmagában is kivált-e cytokin-expressziót, minden levett vérből egy 5 ml-es mintát steril műanyag csőben tartottunk 6 órán keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten a centrifugálás és lefagyasztás előtt. Emellett mind a műtét előtti, mind pedig a CPB utáni vérminták esetén elkészítettük a gyulladással válasz pozitív kontrolljait is (LPS plazma). Minden vérvétel alkalmával 4 db. 5 ml-es vérmintát növekvő koncentrációjú (1, 10, 100, 1000 ng/ml) LPS-sel

inkubáltunk 6 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten, majd centrifugálás után a plazmákat az előzőekkel megegyező módon tároltuk.

3.4 Cytokin mérések

A TNF α és IL-1 β cytokineket és modulátoraikat (sTNF RI, sTNF RII és IL-1ra) a plazmából specifikus kvantitativ enzim immunoassay módszerrel (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; Quantikine, R&D) határoztuk meg. A mért cytokinek, illetve specifikus cytokin-antagonisták koncentrációját tükröző színeltérést microplate reader-rel 540 nm hullámhosszon értékeltük.

3.5 Eredmények

3.5.1 Pro-inflammatorikus cytokinek

3.5.1.1 TNF α

A műtét előtti vérmintákból származó natív plazmák értékelésekor a betegek több mint kétharmadában (13 betegnél) a TNF α koncentrációja a meghatározáshoz használt immunoassay érzékenységének szintje alatt maradt és így nem volt detektálható, míg 5 betegben a műtét előtti TNF α koncentrációk jelentős szórással a mérhető tartományba estek (2.9–27 pg/ml; átlag: 3.3 pg/ml). Számolási és ábrázolási szempontokat figyelembe véve az érzékenységi küszöb alatti TNF értékeket egységesen 1 pg/ml-nek vettük.

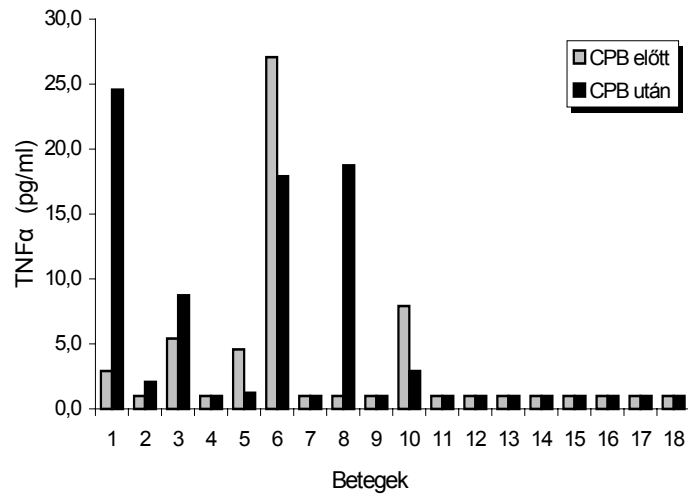
A CPB után 6 órával is mindössze 6 betegben kaptunk mérhető TNF α koncentrációt (1.8-24.6 pg/ml; átlag: 4.6 pg/ml), a betegek nagyobb részénél az értékek változatlanul az érzékenységi küszöb alatt maradtak. (3. ábra). A CPB előtti és utáni csoportok adatait összehasonlítva a TNF α szintekben nem találtunk szignifikáns különbséget.

A CPB előtt levett vérminták 37 °C-on történő 6 órás inkubálása a TNF α koncentrációját nem várt módon tág határok között ugyan, de mindegyik mintában a mérhető tartományba emelte (3.7-569 pg/ml; átlag:

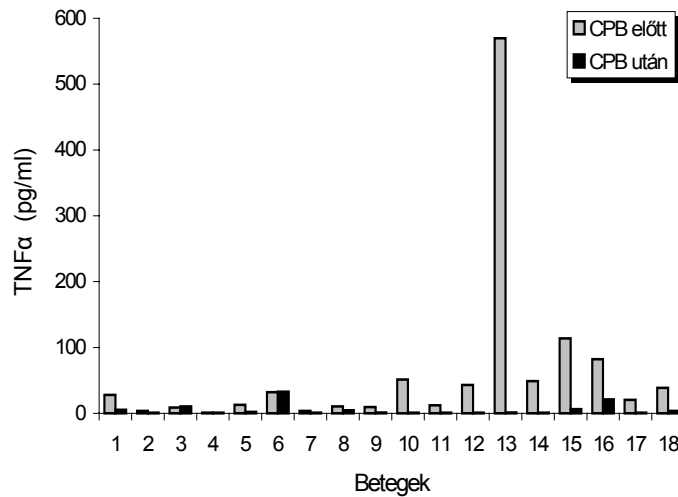
57.9 pg/ml; 4. ábra). E spontán emelkedésen túl a vérminták LPS-sel történő inkubálása a TNF α plazmakoncentrációjának további hatalmas növekedését váltotta ki, amely 10 ng/ml LPS stimulálás esetén több százszorosnak (7035-11303 pg/ml; átlag: 9007 pg/ml) bizonyult (5. ábra).

A műtét előtti vérekkkel ellentétben a CPB után 6 órával levett mintákban a natív (LPS-mentes) módon történő inkubálás hatására nem tapasztaltunk jelentős TNF α emelkedést (1-32 pg/ml; átlag: 5.1 pg/ml). 10 ng/ml LPS stimulálás ugyan e csoportban is a TNF α plazmakoncentráció növekedését okozta (152-4331 pg/ml; átlag: 1595 pg/ml), de ez – a natív mintákhoz hasonlóan - a preoperatív eredményekkel összehasonlítva szignifikánsan kisebb mértékű maradt ($p < 0.05$).

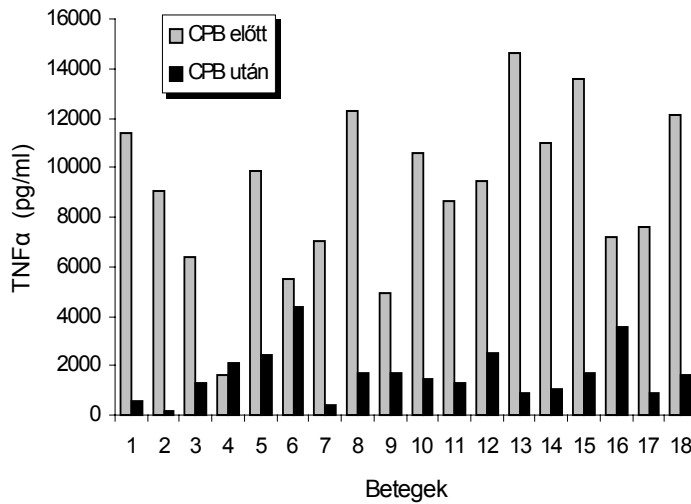
A TNF α szérumkoncentrációit a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban a minták LPS nélküli, illetve 10 ng/ml LPS-sel történő inkubálásának hatására a 6. ábra összegzi.



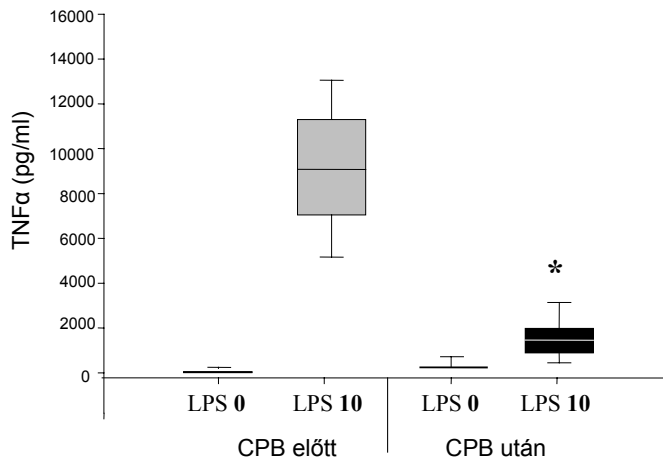
3. ábra TNFα szérumkoncentrációk a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban.



4. ábra TNFα szérumkoncentrációk a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS nélküli) inkubálás után (37 °C; 6 óra).



5. ábra TNFα szérumkoncentrációk a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban LPS-sel történő inkubálás után (37 °C; 6 óra).

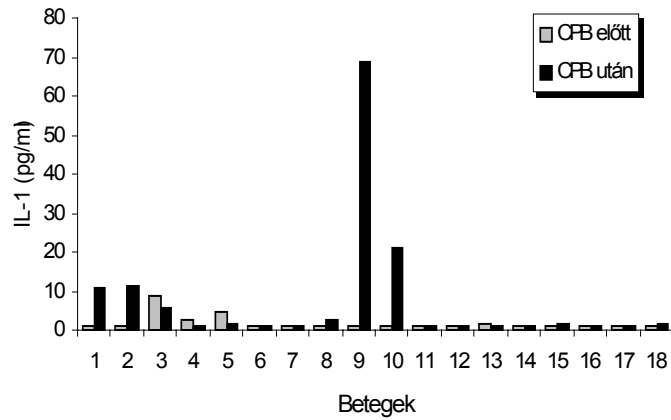


6. ábra TNFα szérumkoncentrációk összegzése a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra; *p< 0.05).

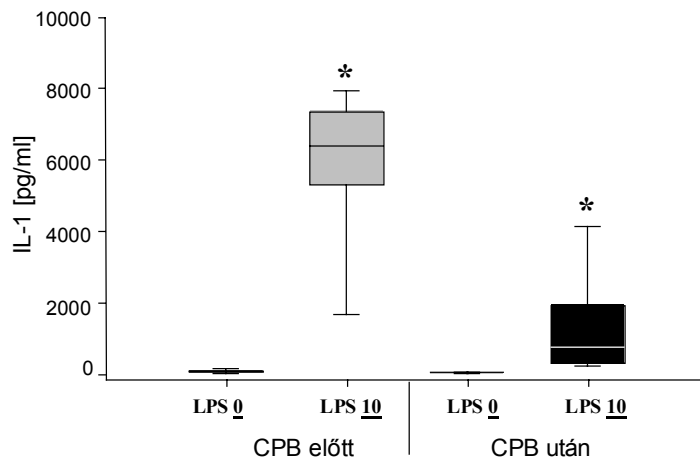
3.5.1.2 IL-1 β

A TNF α plazmakoncentrációihoz hasonlóan a betegektől a műtét előtt levett vérminták nagy részében nem tudunk IL-1 β szinteket detektálni a méréshez használt immunoassay kit tehetetlensége miatt. Az érzékenységi küszöbértéket meghaladó 3 esetben az IL-1 β értékek 1.1-8.4 pg/ml között változtak. A CPB után 6 órával két kiugróan magas érték mellett (68.5, ill. 21 pg/ml) az IL-1 β plazmaszintje 4 további betegben érte el a detektálhatóság szintjét, míg 10 esetben továbbra sem volt mérhető (7. ábra).

A preoperatív natív vérminták 6 órás inkubálása önmagában is az IL-1 β szint kimutatható növekedését okozta (48-109 pg/ml; átlag: 73 pg/ml), míg bakteriális LPS-sel az IL-1 β koncentráció TNF α -hoz hasonló további mintegy százszoros emelkedését észleltük (5125-7321 pg/ml; átlag: 6396 pg/ml). A posztoperatív minták LPS stimulálása a natív vérekhez képest ez esetben is jelentős IL-1 β koncentrációnövekedést váltott ki, ám ennek mértéke – a TNF α mérések eredményeihez hasonlóan – jelentősen kisebb volt a CPB előtti vérmintáknál mért hasonló értékeknél (302-1912 pg/ml; átlag: 766 pg/ml; 8. ábra).



7. ábra IL-1β szérumkoncentrációk a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban.



8. ábra IL-1β szérumkoncentrációk összegzése a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra; *p < 0.05).

3.5.2 Solubilis cytokin receptorok

3.5.2.1 Solubilis TNF RI

A natív vérplazma sTNF RI koncentrációjának pontos meghatározása kezdetben nehézséget okozott, mivel a plazmaszintek meghaladták a meghatározáshoz használt immunoassay rendszer méréstartományának felső határát (500 pg/ml). Ezért a mérésekhez a minták tízszeres hígításait használtuk, és az így kapott eredményeket 10-zel megszorozva jutottunk a valós sTNF RI értékekhez.

A TNF α -val ellentétben a sTNF RI magas műtét előtti plazmakoncentrációja a natív mintákban a CPB után 6 órával szignifikáns emelkedést mutatott: az átlagértékek 2469 (1420-2560) pg/ml-ről 4693 (2611-5361) pg/ml-re növekedtek ($p < 0.05$; 9. ábra).

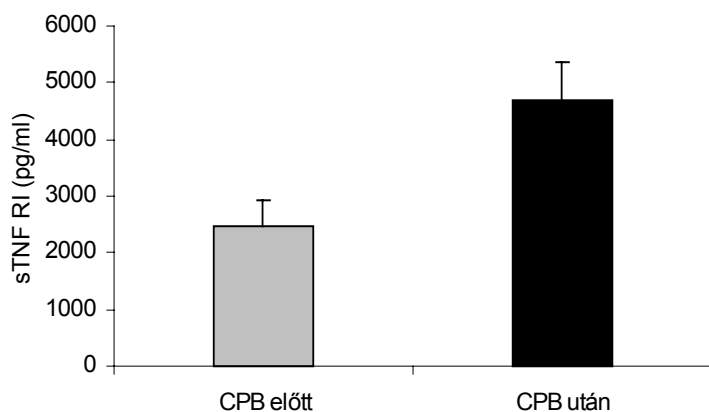
A műtét előtti vérekben az in vitro inkubálás önmagában nem (1904-2813 pg/ml; átlag: 2200 pg/ml), de LPS hozzáadása is csak kismértékben emelte a sTNF RI plazmaszintjét (2115-2922 pg/ml; átlag: 2487 pg/ml).

A CPB utáni mintákban ugyancsak nem okozott szignifikáns sTNF RI emelkedést a 6 órás inkubálás sem LPS nélkül (3742-5663 pg/ml; átlag: 4367 pg/ml), sem LPS jelenlétében (3635-5805 pg/ml; átlag: 4627 pg/ml; 10. ábra).

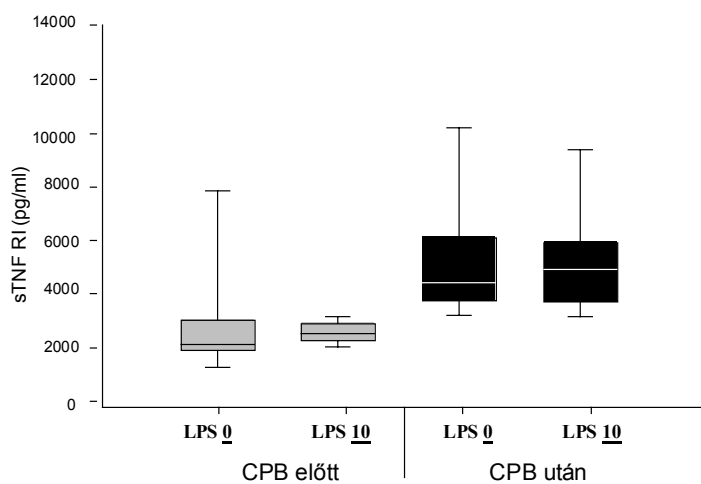
3.5.2.2 Solubilis TNF RII

A sTNF RII koncentrációjának alakulása a mérések alkalmával a sTNF RI fent részletezett profiljával jelentős egyezést mutatott. A natív mintákban azonban a sTNF RII szint emelkedése a műtét előtti értékekhez viszonyítva a CPB utáni vérekben noha egyértelmű volt (3019 vs. 3807 pg/ml), nem érte el a szignifikanciaszintet (11. ábra).

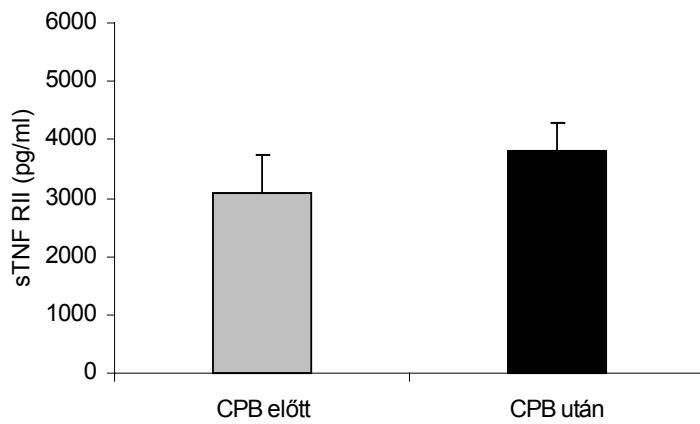
A két időpontban levett natív vérminták in vitro 6 órás inkubálása után a sTNF RII plazmaszintek között a sTNF RI hasonló adataival ellentétben jól érzékelhető eltérést találtunk (2943 vs. 4105 pg/ml).



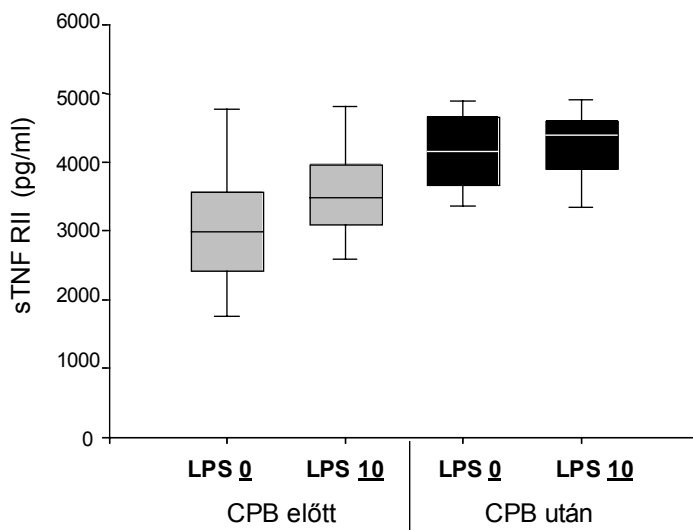
9. ábra sTNF RI szérumszintek a betegek CPB előtt (1. oszlop) és 6 órával CPB után (2. oszlop) levett vérmintáiban.



10. ábra sTNF RI szérumszintek összességében a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra).



11. ábra sTNF RII szérumszintek a betegek CPB előtt (1. oszlop) és 6 órával CPB után (2. oszlop) levett vérmintáiban.



12. ábra sTNF RII szérumszintek összegzése a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra).

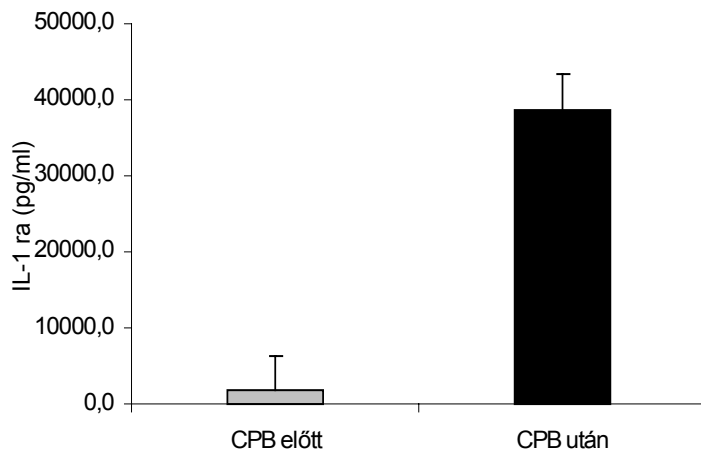
A vérminták 10 pg/ml LPS stimulálása sem a CPB előtti mintákban, sem pedig a műtét utáni vérekben nem okozott számottevő változást a sTNF RII koncentrációkban (3557 vs. 4217 pg/ml; 12. ábra).

3.5.3 Receptor antagonisták

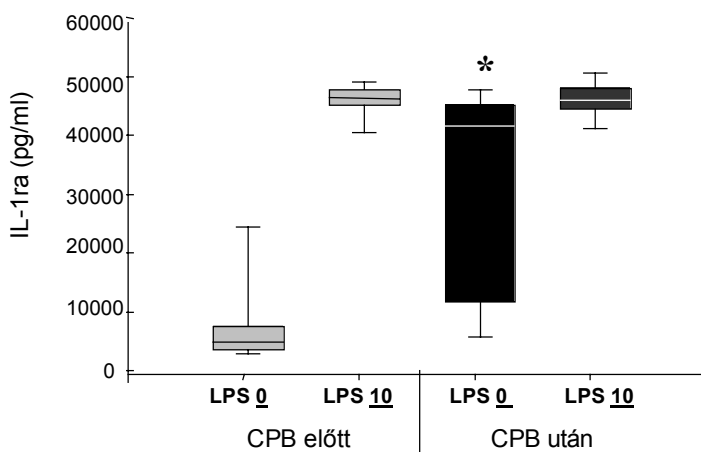
3.5.3.1 IL-1ra

Műtét előtt a betegek vérében az IL-1ra koncentrációja jelentős egyéni ingadozást mutatott (343-5643 pg/ml; átlag: 729 pg/ml). A CPB utáni minták elemzésekor egyetlen beteg kivételével minden esetben az IL-1ra szintek kifejezett emelkedését észleltük. Ez a koncentrációnövekedés igen tág határok között változva a preoperatív értékek 6-84-szeres értékét érte el (13. ábra).

A műtét előtti vérminták natív 6 órás in vitro inkubálása a kezdeti IL-1ra szintet 4814 pg/ml-re (3007-7661 pg/ml) emelte. A posztoperatív vérek esetében a CPB után mért in vivo adatokhoz hasonlóan nagy egyéni variabilitás volt látható az IL-1ra koncentrációk jelentős további növekedése nélkül. A hat órás inkubálás LPS jelenlétében az IL-1ra plazmaszintjét a műtét előtti és a CPB utáni mintákban közel egyforma értékre emelte (46071, ill. 41514 pg/ml). Ez a növekedés az első csoportban az alacsonyabb kezdeti szintek miatt közel tízszeres volt, szemben a műtét utáni mintákban az eleve magasabb értékek miatt alig megfigyelhető változással (14. ábra).



13. ábra IL-1ra szérumszintek a betegek CPB előtt (1. oszlop) és 6 órával CPB után (2. oszlop) levett vérmintáiban.



14. ábra IL-1ra szérumszintek összehasonlítása a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra; *p< 0.05).

3.5.4 Cytokin egyensúly

3.5.4.1 sTNF RI : TNF α és sTNF RII : TNF α moláris arányok

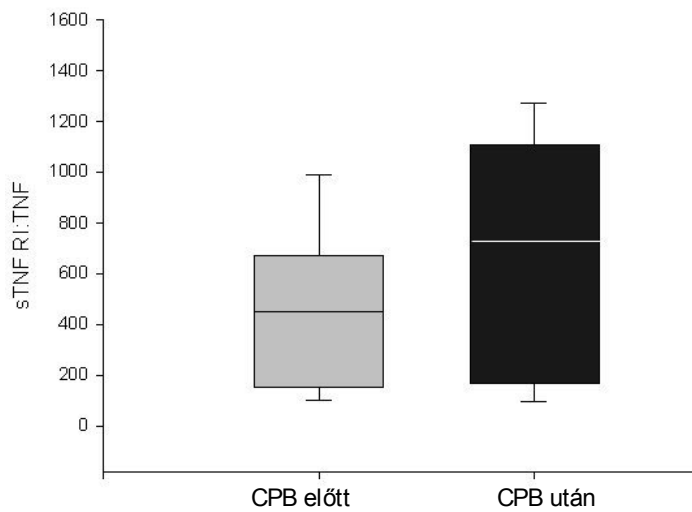
A sTNF RI és sTNF RII receptorok az 1. fejezetben említett módon a szabad TNF molekulához kötődve semlegesíteni képesek annak biológiai hatását. Miután ez a kapcsolódás 1:1 arányban következik be, a sTNF RI : TNF α és sTNF RII : TNF α moláris aránya a TNF α és solubilis receptorai viszonylatában a plazmában aktuálisan jelenlevő pro- vagy anti-inflammatorikus túlsúly mutatója lehet.

A mérések alkalmával a használt immunoassay rendszer érzékenységi küszöbértéke alatt maradt, tehát nem mérhető TNF α plazmakoncentrációkat a számolás érdekében egységesen 1 pg/ml-nek tekintettük. Irodalmi adatok alapján a TNF α molekulásúlyát 17 kD-nak, a sTNF RI és sTNF RII receptorok molekulásúlyát 55, illetve 75 kD-nak vettük.

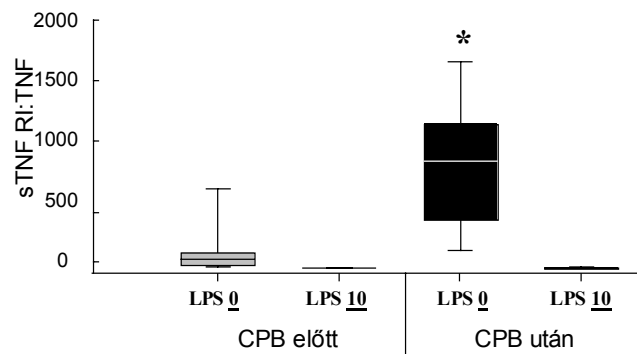
Számításaink alapján a két solubilis TNF receptor és a TNF α relatív mennyisége hasonló módon változott. A betegek vérében a műtétet megelőzően az anti-inflammatorikus sTNF RI és sTNF RII receptorok plazmakoncentrációinak aránya több mint két nagyságrenddel (átlagban 473-szorosan) meghaladta a TNF α koncentrációját. CPB után 6 órával ez az arány tovább növekedett a sTNF RI és sTNF RII receptorszintek emelkedése miatt (15, 17. ábra).

A műtét előtti natív vérminták 6 órás inkubálása a fenti arány csökkenéséhez vezetett, miután a TNF α szintjének emelkedése meghaladta az anti-inflammatorikus oldal hasonló irányú változásait. A CPB után viszont a sTNF RI és sTNF RII receptorok koncentrációnövekedése lépést tudott tartani a TNF α enyhe emelkedésével, így a két oldal aránya jelentősen nem változott.

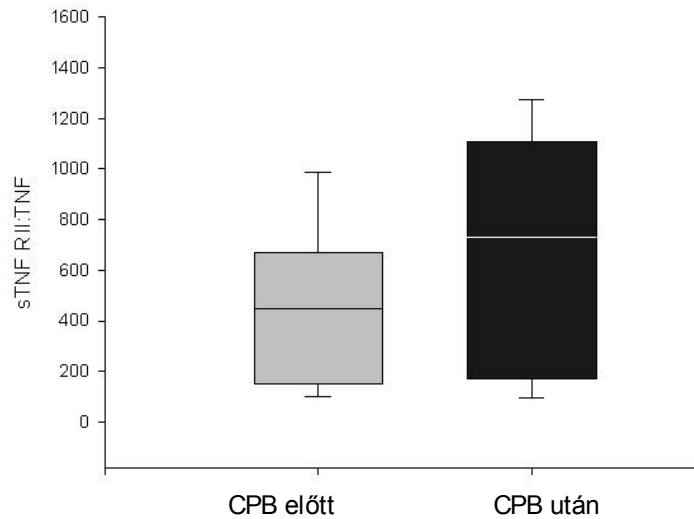
A minták in vitro aktiválása 10 pg/ml LPS-sel jelentős változást eredményezett: az indukció hatására a TNF α több százszoros emelkedése a a pro-inflammatorikus oldal kialakult túlsúlya az arány megfordulásához vezetett. Ez a jelenség a CPB előtti és a CPB utáni vérmintákban egyaránt megfigyelhető volt (16, 18. ábra).



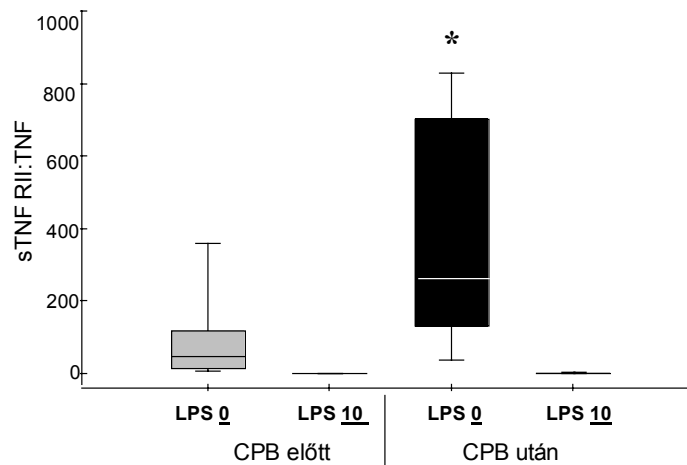
15. ábra sTNF RI : TNF α szérumkoncentrációk aránya a betegek CPB előtt (1. oszlop) és 6 órával CPB után (2. oszlop) levett vérmintáiban.



16. ábra sTNF RI : TNF α szérumkoncentrációk összegzése a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37°C; 6 óra; *p< 0.05).



17. ábra sTNF RII : TNF α szérumkoncentrációk aránya a betegek CPB előtt (1. oszlop) és 6 órával CPB után (2. oszlop) levett vérmintáiban.



18. ábra sTNF RII : TNF α szérumkoncentrációk aránya a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra; *p< 0.05).

3.5.4.2 IL-1ra : IL-1 β moláris arányok

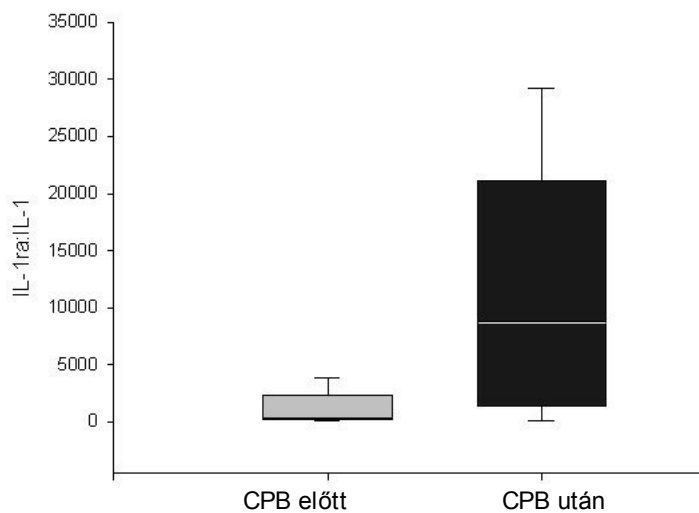
Az IL-1ra : IL-1 β moláris aránya a műtét előtt levett vérekben az előzőekhez hasonló módon jelentős, átlagban 352-szeres anti-inflammatorikus túlsúlyt mutatott, ez az arány a CPB után 6 órával további egy nagyságrenddel növekedett (átlag: 8753; 19. ábra).

Az első vérminták in vitro inkubálása LPS hozzáadása nélkül az IL-1ra túlsúlyt átlagban 67-szeres értékre, az LPS-sel történő indukció az IL-1 β szintézis jelentős növekedése folytán még tovább (átlag: 4.7-szeres) csökkentette.

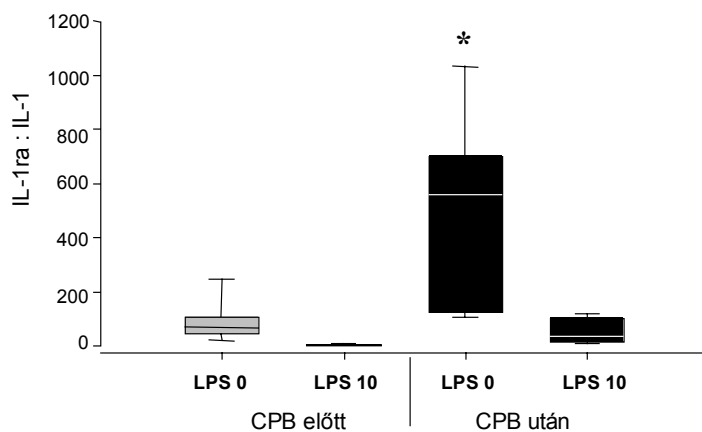
A CPB utáni minták natív inkubálása mintegy tizedére csökkentette ugyan a gyulladáshoz vezető két oldalának arányát, amely azonban még így is komoly (átlagban 559-szeres) IL-1ra túlsúlyt mutatott. LPS hozzáadása a pro-inflammatorikus cytokin oldal emelésével ugyan az arány csökkenéséhez vezetett (átlag: 36-szoros), de az IL-1ra relatív túlsúlya fennmaradt és nem következett be a TNF α kapcsán megfigyelt fordított viszony (20. ábra).

3.5.5 Perioperatív klinikai adatok

A CPB használatával végzett coronaria bypass műtét a tanulmányba bevont minden betegnél komplikációmentesen zajlott. A cardio-pulmonális bypass ideje átlagosan 100 perc (60-154 perc) volt, 44 perces (27-87 perc) aorta-lefogási idővel. A műtétet követően két betegnél elhúzódó posztoperatív vérzés miatt vér-, illetve vérkészítmények adása vált szükségessé, reoperációra egy esetben sem kényszerültünk. A betegek 13 (7-19) órán belül extubálhatóak voltak. Általános vagy szervspecifikus gyulladáshoz vezető klinikai vagy laboratóriumi jeleit nem tapasztaltuk. Egy betegnél a műtét szövődeményeként jelentkező átmeneti nervus phrenicus bénulás négy napos intenzív osztályos megfigyelést tett szükségessé, a többi beteg a műtétet követő napon szívsebészeti osztályra visszahelyezhető volt. Posztoperatív



19. ábra IL-1ra : IL-1 szérumkoncentrációk aránya a betegek CPB előtt (1. oszlop) és 6 órával CPB után (2. oszlop) levett vérmintáiban.



20. ábra IL-1ra : IL-1 szérumkoncentrációk aránya a betegek CPB előtt és 6 órával CPB után levett vérmintáiban natív (LPS 0) illetve 10 ng/ml LPS-sel (LPS 10) történő inkubálás után (37 °C; 6 óra; *p< 0.05).

kórházi tartózkodásuk 6 (5-8) napja alatt egyéb szövődmény a vizsgált betegcsoportban nem jelentkezett.

3.6 Megbeszélés

A hosszú évtizedek óta intenzíven folyó, kiterjedt kutatások ellenére a nyitott szívműtéteknél fél évszázada alkalmazott cardio-pulmonális bypass technika mellékhatásaként fellépő szisztémás gyulladós válasz szindróma (SIRS) celluláris és molekuláris alapjai napjainkban sem kellően tisztázottak.

A cytokinek felfedezése és a gyulladós folyamatokban betöltött kulcsfontosságú szerepének megismerése eredményezte, hogy e molekulák gyorsan a szívműtéteket kísérő szisztémás gyulladós válasz kutatásának középpontjába kerültek. Számos közlemény támasztotta alá a cytokineknek a lokális és szisztémás gyulladásokban, ezen belül is a szepszisben és az akut tüdőkárosodásban betöltött jelentőségét, más tanulmányok szívműtétek során mutatták ki pro-inflammatorikus cytokinek plazmaszintjének növekedését a kísérő szisztémás gyulladós válasz megjelenésekor. A kutatók célja olyan gyulladós marker (cytokin?) azonosítása volt, amely a preoperatív szakban alkalmas a SIRS szempontjából fokozott rizikó csoportba tartozó betegek kiszűrésére. Később azonban nyilvánvalóvá vált, hogy egyetlen cytokin sem hozható közvetlen ok-okozati kapcsolatba a SIRS vagy PIRS kialakulásával illetve lefolyásával. A kutatások iránya ezért az individuális cytokinek helyett a plazmában jelenlevő pro- és anti-inflammatorikus cytokinek összessége felé terelődött. Egyre meggyőzőbbek voltak azok az érvelések, melyek szerint nem valamely egyes cytokin, hanem a gyulladós folyamatban résztvevő összes pro- és anti-inflammatorikus cytokin egyensúlya határozza meg a gyulladás dinamikáját ⁽¹¹⁵⁾.

Tanulmányunkban a CPB használatával végzett artéria coronaria bypass műtétek során vizsgáltuk a pro- és anti-inflammatorikus oldalak arányával jellemezhető gyulladós egyensúly in vivo és in vitro körülmények között bekövetkező változásait. Az enzim immunoassay (ELISA) módszer alkalmas biológiai folyadékokban a cytokinek koncentrációjának pontos meghatározására ^(116,117). Kérdéses azonban, hogy a plazmában mért értékek

és azok változásai mennyire tükrözik más szövetek és szervek (pl. vese és tüdő) cytokin státuszát.

Fő célkitűzésünk a nyílt szívműtéten átesett betegek plazmájában a gyulladáskeltő cytokinek és antagonistáik arányával kifejezhető immunológiai egyensúly perioperatív vizsgálata volt. A kapott adatokat próbáltuk kapcsolatba hozni a betegekben esetlegesen fellépő akut gyulladós folyamatokkal, vizsgálva azt, hogy a cytokin egyensúly megváltozásának a vannak-e perioperatív morbiditást-mortalitást befolyásoló következményei.

Az in vivo eredményeket összehasonlítottuk az idegen felszín, valamint a bakteriális LPS által indukált in vitro reakciókkal. Munkánk során a pro-inflammatorikus cytokinek két meghatározó képviselőjét (TNF α és az IL-1 β) illetve azok anti-inflammatorikus párját (TNF RI és RII, IL-1ra) néztük. Az individuális plazmaszinteken túl az aktuális gyulladós egyensúly jellemzésére a két ellentétes oldal moláris koncentrációinak arányát használtuk, miután a TNF α és az IL-1 β specifikus antagonistáikkal és agonistáikkal 1:1 arányú stochiometrikus alapon lépnek reakcióba.

3.6.1 Műtét/CPB előtti cytokin egyensúly

Bár irodalmi adatok alapján a betegektől a műtét előtt levett vérmintákban valószínűsíthető volt a cytokin antagonisták túlsúlya, a kapott eredmények felülmúlták a várakozásunkat. A moláris koncentrációkon alapuló számítások szerint TNF α esetében közel ötszázszoros, IL-1-nél pedig szintén több mint 300-szoros anti-inflammatorikus fölényt tapasztaltunk. És miután a detektálhatóság szintje alatt maradt gyulladáskeltő cytokinek értékeit kalkulációs megfontolásból felfelé kerekítettük, a gyulladás ellen ható oldal túlsúlya valószínűleg még kifejezettebb. Ezek az eredmények mutatják, hogy normál körülmények között a humán vérplazma óriási anti-inflammatorikus kapacitással rendelkezik, amelynek szerepe lehet a szívműtétet kísérő gyulladós válasz mérséklésében és a kiterjedt szervkárosodások megelőzésében. Az alap TNF α és IL-1 β szintekben mért jelentős egyéni eltérések elvileg magyarázhatják egyes betegeknél a szívműtétet követő kifejezettebb gyulladós válasz kialakulását, bár ez kisszámú

beteganyagunkban nem igazolódott. A sTNF RI, sTNF RII és IL-1ra esetében ugyancsak szembetűnő egyéni variabilitás ezzel szemben azt a hipotézist támogathatja, miszerint a gyulladással válasz kifejlődéséért nem a fokozott citokintermelés, hanem a plazmában kialakuló csökkent anti-inflammatorikus kapacitás tehető felelőssé. A gyulladás ellen ható aktivitás alacsonyabb szintje a szívűtétek szövődményein túl más betegségek lefolyásában is meghatározó tényezőként szerepelhet, közlemények szerint például ARDS-es betegekben a broncho-alveoláris mosófolyadékban mért alacsony IL – 1ra értékekhez magasabb mortalitás társult ⁽¹¹⁸⁾.

3.6.2 Műtét/CPB utáni citokin egyensúly

Eredményeink nem támogatták azon irodalmi adatokat, melyek szerint a szívűtét és a CPB rövid időn belül gyulladáskeltő citokinek szintézisének indukálásával az immunológiai egyensúly felborulásához vezet. Ugyan a mérések során jelentős egyéni ingadozásokat találtunk, a csoport egészét nézve nem tudtunk szignifikáns eltérést kimutatni a preoperatív adatokhoz képest. Individuálisan elemezve a kapott adatokat azt találtuk, hogy noha a betegek kis részénél a TNF α és IL-1 β emelkedés szignifikánsnak bizonyult, posztoperatív gyógyulásuk nem különbözött a többi betegétől. Ez is mutatja, hogy a pro-inflammatorikus citokinek önmagukban nem tehető felelőssé a posztoperatív gyulladással komplikációkért, mivel a plazma nagyságrendekkel nagyobb és CPB hatására gyakran még tovább emelkedő anti-inflammatorikus kapacitása „pufferelni” képes a gyulladáskeltő ágensek hatását.

A második mintavételi időpontban az anti-inflammatorikus sTNF receptorok és az IL-1 receptor antagonisták szintje a citokinekkel ellentétben érzékelhető változásokat mutatott. A sTNF RI plazmakoncentrációja a szívűtétet követően pár órán belül mintegy kétszeresére emelkedett. A sTNF RII hasonló növekedése szintén megfigyelhető volt, de itt az értékek a statisztikai szignifikanciahatár alatt maradtak. A solubilis TNF receptorok viszonylag kismértékű pozitív válasza mellett a másik vizsgált gyulladáscsökkentő molekula, az IL-1ra plazmakoncentrációja a CPB után a

kiinduló értékek 6-84-szeresére emelkedett. Az IL-1ra fokozott termeléséért felelős sejtek azonosítása további vizsgálatokat igényel, és bár a máj szerepe az IL-1ra akut fázis fehérjeként való szintézisben nem zárható ki, in vitro a teljes vér LPS stimulálását követő jelentős IL-1ra emelkedés a vérben lévő leukocyták ezirányú szerepét veti fel.

3.6.3 In vitro cytokin egyensúly

Kísérleteink ezen részében arra kerestünk választ, hogy a műtét előtti és utáni vérminták in vitro 6 órás inkubálása képes-e cytokin választ kiváltani pusztán a műanyag kémcső falával mint idegen felszínnel történő hosszabb ideig tartó érintkezése miatt. Méréseinket az in vitro gyulladással egyensúly meghatározása céljából a specifikus anti-inflammatorikus cytokin receptorokra és receptor antagonistákra is kiterjesztettük. Pozitív kontrollként a vérmintákhoz ismerten erős gyulladáskeltő bakteriális endotoxint (LPS 10 pg/ml) adtunk.

Kiderült, hogy az in vivo elmaradt cytokinválasszal szemben a 6 órás inkubálási folyamat önmagában mindkét vizsgált pro-inflammatorikus cytokin jelentős koncentrációnövekedését eredményezte. A jelenség egyik lehetséges magyarázata a kísérlethez használt steril műanyag csövek belső felszínének aktiváló hatása lehet. Az in vivo körülmények között, az extracorporalis keringés után elmaradt hasonló válasz feltételezéseink szerint a jóval rövidebb érintkezési idővel, illetve a modern CPB-rendszerek vérrel érintkező műanyag csőrendszerének szövetbarát felszínével magyarázható.

A CPB-vel végzett szívűtét és az in vitro LPS által kiváltott cytokin stimulációk karakterisztikájában érdekes eltérések figyelhetők meg. Az in vivo látott minimális TNF α és IL-1 β hatással szemben az LPS erőteljes stimuláló hatásának mutatkozott. Az anti-inflammatorikus oldalon azonban ennek ellenkezője látható: a műtét/CPB stimuláló hatása kifejezettebb volt az in vitro válaszoknál. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a korábbi véleményekkel ellentétben az LPS nem vagy csak részben tehető felelőssé a nyitott szívűtétek során fellépő cytokinválassz kiváltásában. Közlemények szerint a

CPB után a betegek vérében mérhető emelkedett LPS szintek elsődleges termelődési helye a bélrendszer; a splachnikus hypoperfúzió által kiváltott bélfali permeabilitás-növekedés elősegítheti a bélbaktériumok véráramlatba jutását ⁽¹¹⁹⁾. A kialakult szisztémás endotoxinaemia a leukocyták aktiválásán keresztül vezet a posztoperatív gyulladásos szövődményekért felelős cytokinek expressziójához. Vizsgált beteganyagunkban a fenti mechanizmussal létrejövő endotoxaemia nem érte el a cytokinválasz kiváltásához szükséges szintet, noha IL-1ra esetében az in vivo és in vitro LPS hozzáadásakor egyaránt látható emelkedés az alacsony endotoxinszint stimuláló hatását tételezheti fel.

Egy másik említést érdemlő megfigyelésünk CPB után levett vérmintákban az LPS stimuláló hatásának szignifikánsan csökkent volta a műtét előtti mintákban kiváltott reakciókkal összehasonlítva. A jelenség magyarázata az endotoxin adaptációval, deszenzitizációval, csökkent válaszképességgel jellemezhető endotoxin tolerancia lehet. In vivo és in vitro kísérletek tanúsága szerint egy ligand pimer stimulusára adott specifikus válasz mértéke az adott ligand ismételt stimulusa hatására csökkent mértékben jelentkezik vagy egyáltalán nem váltható ki ⁽¹²⁰⁾. Az LPS tolerancia kialakulásával kapcsolatban az irodalomban kétféle hipotézis olvasható. Az egyik az első LPS stimulus által aktivált anti-inflammatorikus cytokinek (ilyen például az Interleukin-10) hatásával magyarázza a későbbi gyulladásos cascade csökkent intenzitását ^(121,122). A másik hipotézis szerint az LPS tolerancia oka a leukocytákban, elsősorban a monocytákban az első stimulus következtében megváltozott jelátviteli rendszerrel hozható összefüggésbe.

Az endotoxin tolerancia primer stimulusának eredete a nyitott szívű műtétek esetén nem tisztázott. Egyesek a CPB rendszer jelentőségét helyezik előtérbe olyan irodalmi adatokkal, melyek szerint a vér huzamosabb ideig tartó keringetése a CPB csőrendszerében képes kiváltani az LPS csökkent válaszkésztségét ⁽¹²³⁾. Más tanulmányok viszont a jelenséget nem szívsebészeti nagy műtétek során is kimutatták, ami CPB rendszerrel szemben a primer okként a műteti stimulus hatását veti fel ⁽¹²⁴⁾.

Eredményeinket összegezve megállapíthattuk, hogy a CPB-vel végzett rutin szívműtétek elsősorban az anti-inflammatorikus oldal aktiválódását okozzák, a modern extracorporalis rendszerek és a rövid CPB idő nem képes komoly gyulladásos reakciók beindítására. A posztoperatív vérmintákban megfigyelt LPS tolerancia kiváltásában mind magának a CPB rendszernek, mind pedig egyéb műtéti (sebészeti és/vagy aneszteziológiai) faktoroknak lehet szerepe.

4. PRO-INFLAMMATORIKUS CYTOKINEK ÉS SZÍVMŰTÉTEK ÁTESETT BETEGEK SZÉRUMÁNAK HATÁSA HUMÁN VASZKULÁRIS ENDOTHELSEJTEKRE

4.1 Bevezetés

Az utóbbi években a vaszkuláris endothelium került a szívműtéteket követő akut és krónikus szövődmények kutatásának középpontjába. A vaszkuláris endothelium mint a nyílt szívműtéteket kísérő ártalmak egyik fő támadáspontja meghatározó szereppel bír a posztoperatív ischaemia-reperfúziós sérülések, a coagulopathiák vagy a szisztémás gyulladással válasz klinikai-laboratóriumi képének alakításában ⁽¹²⁵⁻¹²⁸⁾. Emellett a szervspecifikus gyulladással válaszok egyik mediátoraként (pl.: PIRS – kilégzett NO) a műtéti szövődmények kimenetelében is komoly jelentősége van.

Az endothel-sejtek sérülése a CPB-vel végzett szívműtéteket követően különböző mértékű lehet, és az endothel-mediált vazomotor-tónus átmeneti zavarától a sejtek életképességének teljes megszűnéséig terjedhet. Tanulmányok igazolták az endothel-sejtek apoptotikus válaszát a nyílt szívműtétek által okozott behatásokra ⁽¹²⁹⁾, míg mások a betegek szérumában pro-apoptotikus anyagok felszaporodását mutatták ki ⁽¹³⁰⁾. Ilyen in vivo programozott sejthalál kiváltására képes molekulák az LPS és a pro-inflammatorikus TNF α citokin is ⁽¹³¹⁾.

A különféle sejtenyészetekre alapozott in vitro bioassay-k nagy segítséget jelentenek a gyulladással folyamatok kutatásában. A vizsgálatok során azonban többnyire néhány elkülönített, ismert pro- vagy anti-inflammatorikus tulajdonságú anyag sejtkultúrákra gyakorolt hatását elemezték és próbálták kivetíteni a szervezetben lezajló gyulladással folyamat

egészére. Tudva azonban a gyulladásos válaszban szerepet játszó anyagok óriási számát (csak cytokinekből például napjainkban már több mint 140 ismert), kézenfekvő az a megállapítás, hogy egyes komponensek izolált tanulmányozása nem helyettesítheti a folyamat egészének átfogó értékelését.

A fent említettek alapján feltételeztük, hogy egy endothel-sejt alapú bioassayben kiváltott apoptotikus válasz vizsgálatával közelebbi képet kaphatunk a CPB-vel végzett szívműtétet követően megváltozott komplex gyulladásos állapot biológiai hatásairól. Az egyes pro- vagy anti-inflammatorikus komponensek izolált elemzésénél a szérum egészének endothel-sejtekre gyakorolt hatása hűebben tükrözheti az in vivo végbemenő folyamatokat, mivel így a vérben jelenlevő számos egyéb faktor (a száznál is több cytokin bonyolult kölcsönhatásai, illetve sok más nem fehérje természetű anyag –mint például a glukokortikoidok -, stb.) szerepe is érvényesül.

Kísérleteink során a TNF α és IL-1 β cytokinek valamint az LPS humán endothel-sejt tenyésztésre kifejtett hatását figyeltük meg, meghatározva a bekövetkezett válasz jellegét. A kapott adatokat párhuzamba állítottuk a betegek műtét előtti és utáni natív, illetve LPS-indukált vérplazmájának hatásával. Megvizsgáltuk, hogy a betegek posztoperatív állapota és az in vivo kapott adatok között kimutatható-e valamilyen összefüggés.

4.2 Betegcsoport, módszerek

4.2.1 Betegcsoport, vérminták levétele és kezelése

A 18 főből álló betegcsoport azonos volt a 3.2 fejezetben leírttal, így az aneszteziológiai és műtéti technika is megegyezett. A vérminták levételének időpontját, módját, kezelését és tárolását a 3.3 fejezet taglalja.

4.2.2 Humán vaszkuláris endothelsejt tenyésztés

A vizsgálatok során használt humán aorta és artéria pulmonális endothel-sejteket a kórház etikai bizottságának engedélyével a

szívtranszplantációk során beültetésre került donor szerv felszálló aortaszakasz, illetve az artéria pulmonális kis darabjának eltávolításával nyertük. Az endothel-sejtek izolálása 20 perces collagenase (1 mg/ml) és elastase (1 mg/ml) előkezelést követően centrifugálással (1200 rpm; 5 perc) történt. Az üledéket az endothel-sejtek növekedést elősegítő tápoldatban (M199 medium, 25% hő-inaktivált fetalis bovin serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamin, 25 mM HEPES és endothel-sejt növekedési faktor) reszuszpendáltuk, majd az endothel-sejteket tartalmazó oldatot a sejtek könnyebb megtapadásának érdekében 1%-os zselatinnal bevont steril műanyag tégelybe osztottuk szét. A 37°C-on tartott edényekben a sejtek 5-7 napon belül konfluenssé váltak. A konfluens sejtenyészetek életképességének megtartására a sejteket 6-10 naponta az edény faláról 3 ml 0.25%-os trypsin/EDTA oldattal történő leválasztás, majd ismételt mosás, centrifugálás és reszuszpendálás után 3 újabb tégelybe szélesztettük.

A kísérletek céljára azonnal fel nem használt sejteket reszuszpendálás és megfelelő előkezelés után lassú fagyasztó kamrában folyékony nitrogénnel fokozatosan -135°C-ra lefagyasztottuk, majd a felhasználásig folyékony nitrogénben -196°C-on tároltuk.

A kísérletekhez 3 különböző donorból izolált, legfeljebb 10 alkalommal újraszélesztett endothel-sejteket használtunk. A sejtek karakterét részben mikroszkópos megjelenésük alapján (egységes, kockakő mintázatra emlékeztető monolayer), részben immuncytokémiai próbával (CD31 endothel-sejt markerrel adott pozitív, illetve fibroblast felületi markerrel adott negatív reakció) ellenőriztük.

4.2.3 Apoptózis bioassay

A humán endothel-sejtek az ún. túlélő gének („survival genes”) aktiválódása miatt a cytokin-indukálta apoptózis, vagyis a programozott sejthalál iránt rezisztensek⁽¹¹¹⁾. A sejtek életben maradását segítő gének szintézisének transzkripció, vagy transláció szintjén történő gátlásával azonban a sejtek védelmi rendszere blokkolható, lehetővé téve a cytokinek és bakteriális endotoxinok hatására bekövetkező apoptotikus változások

tanulmányozását. A pro-inflammatorikus cytokinek illetve az LPS endothel-sejt morfológiára és életképességére gyakorolt hatásának lemerésére a humán aortából tenyésztett endothel-sejteket cycloheximidet (10 μ M) tartalmazó tápoldatban inkubáltuk 6 órán keresztül növekvő koncentrációjú TNF α , IL-1 β és LPS hozzáadásával, valamint a betegek műtét előtti és utáni, natív vagy LPS-stimulált plazmájával. Az inkubációs idő letelte után az endothel-sejtek apoptózisra utaló morfológiai elváltozásait fáziskontraszt-mikroszkóppal elemeztük, a sejtek életképességét MTT- ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)) assay segítségével határoztuk meg. Az MTT teszt a sejtek mitochondriumának funkcióját méri spektrofotometria segítségével, alapja az élő sejtekben mitochondriális dehydrogenase enzim által katalizált MTT - formazán konverzió kimutatása ⁽¹¹²⁾. A sejtekhez óvatos mosást követően 0.5 mg/ml MTT-t tartalmazó tápoldatot (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM) adtunk. Két órás inkubálást követően az oldatban lévő MTT koncentrációját spektrofotométerrel 540 nm hullámhosszon olvastuk le.

Az apoptózis szerepét az endothel-sejt cytokin- és vérplazma-okozta cytotoxicitásban az endogén caspase-ok esetleges mediátor-funkciójának kimutatásával vizsgáltuk: a sejt kultúrákat specifikus caspase-inhibitor jelenlétében (zVAD-fmk), vagy anélkül inkubálva hasonlítottuk össze a kiváltott cytotoxicitások mértékét.

A sejtek 96-kamrás lemezekbe szélesztve 2-3 nap alatt összefüggő monolayer réteget alkottak. Ekkor a sejtekről a tápoldatot 250 μ l foszfát pufferelt fiziológiás sóoldattal (Phosphate Buffered Saline; PBS) lemostuk és a betegek műtét előtti vagy 6 órás CPB utáni szérumával helyettesítettük, míg a kontroll-méréseknél a sejtekhez steril borjúszérumot (Fetal Bovine Serum; FBS) adtunk.

A sebészet/CPB által indukált változások pozitív kontrolljaként a betegek két időpontban levett vérmintáit a centrifugálás előtt 6 órán keresztül inkubáltuk növekvő koncentrációjú (1, 10, 100, 1000 ng/ml) LPS hozzáadásával.

Az endothel-sejtek apoptózisának stimulálására a pre- és posztoperatív natív és LPS-sel kezelt vérminták savójának hígítási sorát használtuk. Az egész kísérletsorozat pozitív kontrolljául a vizsgált

gyulladás-keltő cytokinek és LPS emelkedő koncentrációinak 6 órás inkubálást követően az endothel-sejt apoptózisra kifejtett direkt hatását állítottuk szembe. Az endothel-sejtek életképességében bekövetkezett változásokat MTT assay segítségével határoztuk meg, míg az apoptózis igazolását caspase-inhibitor zVAD-fmk hozzáadásával végeztük (3.4. fejezet).

4.3 Eredmények

4.3.1 Cytokinek cytotoxikus hatása

Mint azt az általános módszertani fejezetben is kifejtettük, a humán aorta endothel-sejtek védekező rendszere („survival genes”) hatásos védelmet nyújt a programozott sejthalállal szemben ⁽¹¹¹⁾. A cytokinek és bakteriális endotoxinok következtében létrejövő apoptotikus változások tanulmányozása csak e gének szintézisének blokkolása után válik lehetővé. Cycloheximid (CHX) 10 µM hozzáadása nélkül a TNFα az endothel-sejtekben sem látható morfológiai, sem MTT-vel kimutatható funkcionális károsodást nem okozott.

CHX hatására a mikroszkopikus kép némileg megváltozott, a sejtek kisebbek és kerek formájúak lettek, életképességük az eredeti érték mintegy kétharmadára csökkent (5.1 ábra TNF 0 ng/ml). Cycloheximid jelenlétében a gyulladást keltő faktorok sejt-károsító hatása láthatóvá és mérhetővé vált. Az endothel-sejtek morfológiája a károsító ágens mennyiségének növelésével arányos átalakuláson ment keresztül és az apoptózis jeleit mutatta: a sejtek alakjának és területének megváltozott, az összefüggő endothel monolayer feltöredezett és egyes sejtek elváltak az alapjuktól. A sejtek 6 órás inkubálása 1, 5, 10, 50 és 100 ng/ml TNFα-val a sejtek életképességének koncentrációfüggő csökkenéséhez (88.1%, 79.4%, 70.4%, 54.3% és 52.9%) vezetett (21. ábra). IL-1β 1, 5, 10, 50, 100 U/ml emelkedő koncentrációival való inkubálás után hasonló választ kaptunk: a sejtek viabilitása a kiinduló érték 92.6, 94.1, 83.1, 65.7 és 31.5 százalékára csökkent (22. ábra). Endotoxin (LPS) expozíció hatására a koncentráció-dependens válasz csak

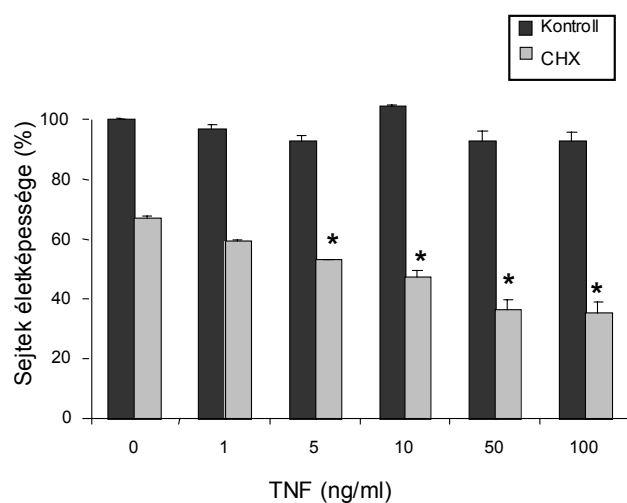
10 ng/ml felett jelentkezett (64.1, 50.6, 35.2 és 32.7% 50, 100, 500 és 1000 ng/ml LPS hozzáadása után; 23. ábra)

Annak igazolására, hogy a megfigyelt endothel-sejt károsodás valójában apoptotikus folyamat eredménye, a sejteket caspase-inhibitorral (zVAD-fmk 100 μ M) előkezeltük 2 órán keresztül a CHX és a cytokin vagy endotoxin hozzáadása előtt. Mint látható, a sejtek életképességének csökkenése zVAD jelenlétében teljesen kivédhető volt (24. ábra).

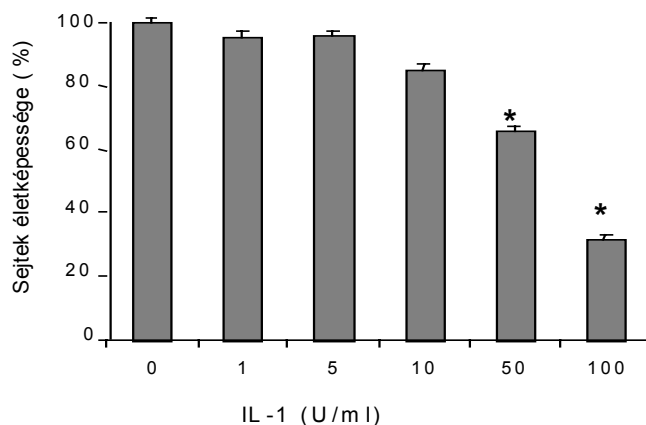
4.3.2 Natív humán szérum cytotoxikus hatása

A CPB alkalmazásával végzett szívműtétek során a betegek vérében az egyes pro- és anti-inflammatorikus cytokinek koncentrációjában változások következnek be, ami összességében a nettó gyulladáshoz vezető egyensúly eltolódását okozza. Méréseinkkel e megváltozott állapot cycloheximiddel előkezelt endothel-sejtekre gyakorolt hatását vizsgáltuk, a műtét előtti plazmával összehasonlítva.

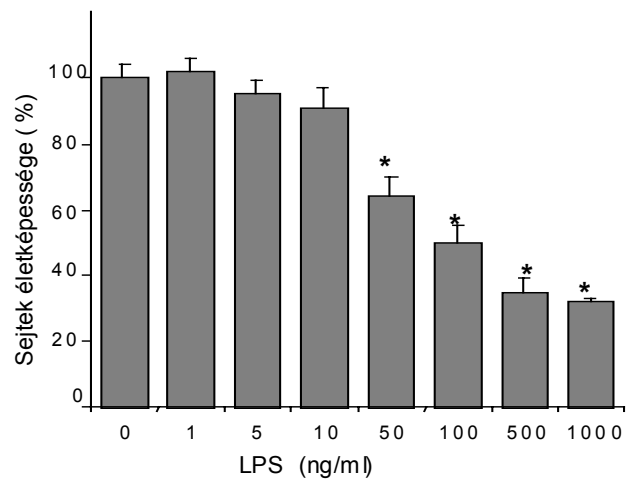
Eredményeink a műtét utáni mintáknál egyénekenként változó mértékű, összességében kismértékű sejtkárosodást igazoltak. A preoperatív szérummal való inkubálás utáni adatokat 100%-nak véve, a CPB után 6 órával vett vérminták savója az endothel-sejtek életképességét átlagban $86\% \pm 3\%$ -ra csökkentette. Az egyes betegek adatait individuálisan értékelve a kiváltott apoptózis mértéke 0 – 32% között változott (25. ábra).



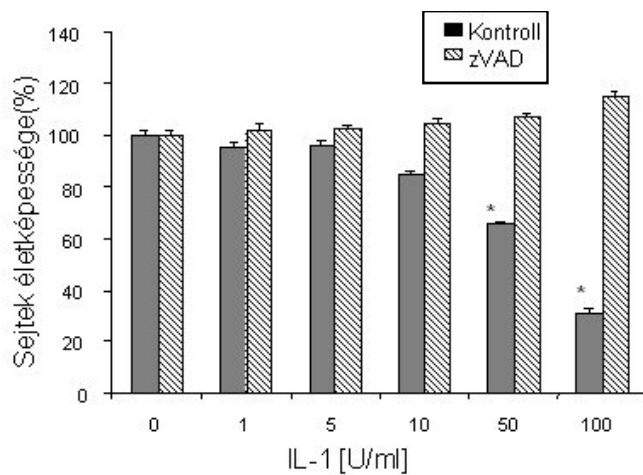
21. ábra TNF α emelkedő koncentrációinak hatása a kezeletlen (kontroll) ill. cycloheximiddel (CHX) érzékenyített humán aorta endothel-sejtek életképességére 6 óra inkubálás után (* $p < 0.05$).



22. ábra IL-1 β emelkedő koncentrációinak hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtek életképességére 6 óra inkubálás után (* $p < 0.05$).



23. ábra LPS emelkedő koncentrációinak hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtek életképességére 6 óra inkubálás után (* $p < 0.05$).



24. ábra Az IL-1 β koncentrációfüggő sejtkárosító hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtekben (kontroll) apoptózis inhibitor zVAD-fmk (100 μ M) hozzáadásával kivédhető (* $p < 0.05$). Inkubálási idő 6 óra.

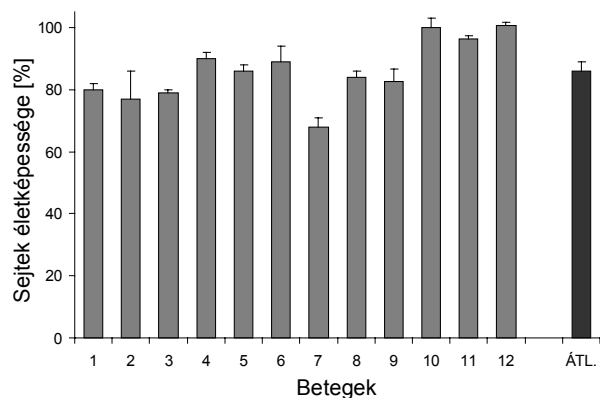
4.3.3 LPS-stimulált vér szérumának cytotoxikus hatása

Mint az 5.3.1 fejezet eredményeiből is látható, a bakteriális endotoxin in vitro közvetlen sejtkárosító hatása csak magas (10 ng/ml feletti) koncentrációnál jelentkezik. Az ennél in vivo kisebb vérszinteknél az LPS erős gyulladáskeltő hatása a vérben indirekt úton, a leukocyta/monocyta sejtek aktiválásával és gyulladáskeltő citokinek szintézisének indukcióján keresztül érvényesül. Kísérleti modellünkben azt vizsgáltuk, hogy a vér CPB előtti és utáni eltérő pro- és anti-inflammatorikus komponensei mennyiben befolyásolják az LPS indirekt hatását. Miután irodalmi adatok alapján a motoros szívműtétek hasonló mechanizmussal aktiválják a gyulladáskeltő faktorokat, modellünk a CPB pozitív kontrolljaként is szolgálhatott.

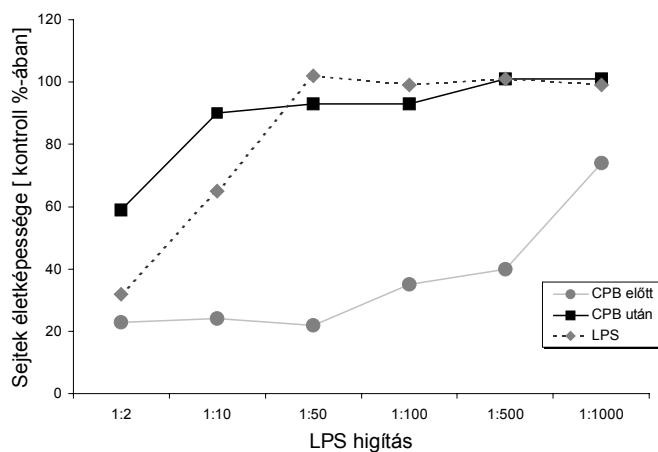
Kísérleteink során a műtét előtti és utáni vérmintákhoz in vitro 1 µg/ml LPS alapoldat 1:2, 1: 10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 arányú hígításait adtuk. A 6 óra elteltével a centrifugálással elválasztott szérumot cycloheximiddel előkezelt humán aorta endothel-sejt tenyészetéhez adtuk, majd újabb 6 óra inkubációs idő után a sejtek életképességének változását MTT-assay-vel határoztuk meg. Az LPS fenti hígításait önmagában (a sejt kultúra tápoldatában) a sejtekhez adva arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az indirekt aktiválás mellett az endotoxin direkt sejtkárosító hatással is rendelkezik-e.

Méréseink eredményét az 26. ábrán összegeztük. Mint látható, az LPS direkt sejtkárosító hatása jelentkezett az 1:2 és 1:10 hígításoknál. 1:50 hígítás felett azonban ez a cytotoxicitás eltűnt, így az e feletti mintákban a sejtkárosításért az endotoxin direkt hatása nem tehető felelőssé.

Az LPS-sel kezelt műtét előtti vérmintáknál erőteljes cytotoxikus aktivitás volt megfigyelhető az egész hígítási sorozatban, még abban a



25. ábra Az egyes betegek CPB utáni vérszérumának hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtek életképességére a kontroll %-ában (1-12) ill. a kapott értékek átlaga (ÁTL).



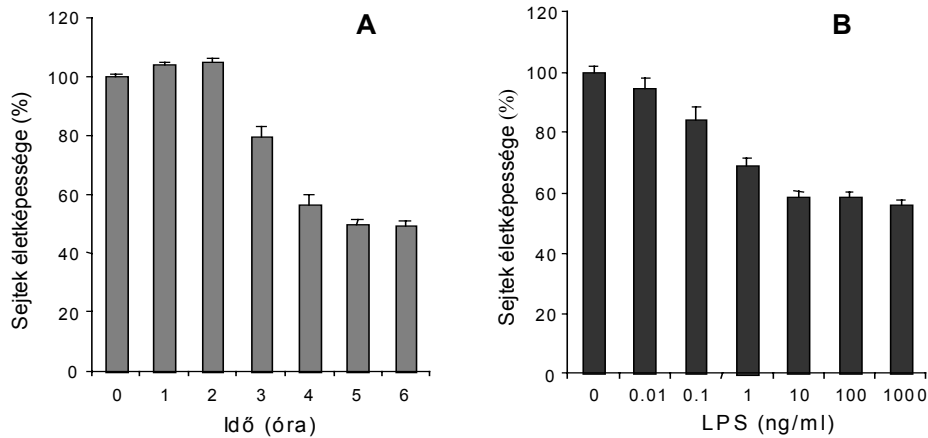
26. ábra Különböző koncentrációjú LPS, ill. LPS-sel inkubált CPB előtti és utáni vérminták hatása a cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtekre. Az endotoxin direkt cytotoxikus hatása 1:10 feletti hígításokban már nem észlelhető, jól látható azonban az LPS-sel kezelt preoperatív minták sejtkárosító hatása a teljes hígítási sorozatban.

tartományban is, ahol direkt LPS hatást már nem láttunk. Annak megfigyelésére, hogy az észlelt sejtkárosító hatás a 6 órás inkubálási periódus folyamán időben mikor jelentkezik és válik teljessé, az 1:100 hígítású LPS-sel aktivált preoperatív plazmáját az endothel-sejtekhez adva óránként mértük a kiváltott apoptózis mértékét. Mint az idő-grafikonon látható, a sejtek életképességének csökkenése a 3. és az 5. óra között következett be (27. ábra A).

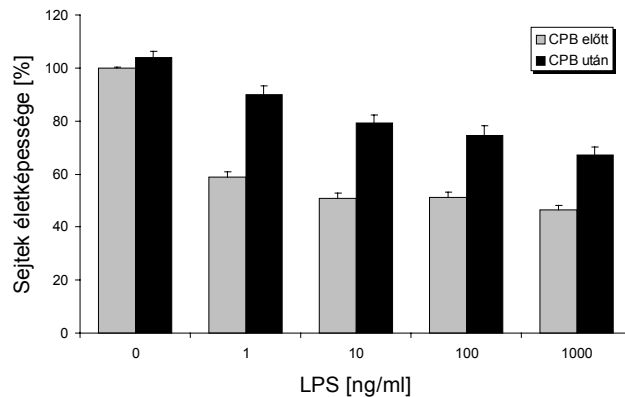
A CPB utáni vérmintákban endotoxin aktiválás hatására 1:50 hígítás felett a kontroll LPS sorhoz hasonlóan nem láttunk cytotoxicitást. Úgy tűnt azonban, hogy a kisebb LPS-hígításoknál a bypass utáni plazma egyfajta védelmet nyújt az endothel-sejteknek az endotoxin direkt ártalmával szemben.

E jelenség további vizsgálatához a műtét előtti és utáni vérmintákat LPS emelkedő koncentrációival (1, 10, 100, 1000 ng/ml) hoztunk össze, majd a 6 órás inkubálást követően mértük az aktiválódott szérum endothel-sejtekre kifejtett hatását (27. ábra B). Az LPS fent bemutatott direkt cytotoxicitásának elkerülésére a vérmintákból nyert szérumot 1:100 hígításban adtuk a cycloheximiddel érzékenyített endothel-sejtek tápoldatához.

LPS hozzáadása nélkül a preoperatív mintát véve alapul (100%), a posztoperatív szérum cytotoxicitásában nem volt kimutatható eltérés (104%). Az emelkedő endotoxin-koncentrációk hatására mindkét csoportban koncentrációfüggő sejtkárosodást mértünk (59%, 51%, 50% és 46% a CPB előtti, 90%, 79%, 75%, és 67% a CPB utáni mintákban). A grafikonon jól látható, hogy posztoperatív szérumok által indukált endothel-sejt apoptózis mindegyik LPS koncentráció esetén kisebb mértékű volt ($p < 0.05$; 28. ábra).



27. ábra LPS-stimulált preoperatív vérminták 1:100 hígításának hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtek életképességére az inkubálási idő függvényében (A). A preoperatív minták inkubálásánál adott LPS koncentrációjának hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothelsejtek életképességére 6 óra inkubálási idő után (B).



28. ábra LPS-stimulált pre és posztoperatív vérminták 1:100 hígításának hatása cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejtek életképességére. A cytotoxikus aktivitás az alkalmazott LPS-koncentráció függvényében változik, a CPB utáni minták esetén a sejtkárosító hatás kisebb fokban jelentkezik ($p < 0.05$).

4.4 Megbeszélés

Bár a pro- és anti-inflammatorikus cytokinek plazmakoncentrációjának mérése és az arányaikkal kifejezett gyulladós egyensúly jól tükrözi a beteg vérében uralkodó gyulladós állapotot, a módszereknek vannak korlátjai. Egyrészt az egyes szövetek cytokin-koncentrációja eltérhet a cytokinek plazmában mérhető szintjétől, másrészt a cytokinek biológiai aktivitását a plazmában számos más jelenlévő anyag befolyásolhatja, mint például a nem fehérjetermészetű glukokortikoidok, vagy más mediátorok. Emellett pedig könnyen belátható, hogy a pro-, illetve az anti-inflammatorikus cytokinek nagyszámú táborából néhány önkényesen kiválasztott tagjának mérése nem adhat valós képet a szervezetben zajló komplex gyulladós válaszról.

A probléma áthidalásának egyik módja az *in vitro* bioassay-k alkalmazása, mely során a pro- és anti-inflammatorikus egyensúly változásait globálisan, sejt kultúrában tenyésztett sejtekre gyakorolt hatása alapján vizsgálja. Noha a módszer *in vitro*, az élő sejtek használata biomarkerként az *in vivo* végbemenő élettani-kórélettani változásokat hitelesebben tükrözi, mint a kémiai-immunológiai reakciókon alapuló tesztek. Bár a TNF α , az IL-1 β és az LPS a humán endothel-sejt tenyészet egyes sejtjeiben bizonyíthatóan beindítja a pro-apoptotikus jelátviteli rendszert, a sejt kultúra egésze a szimultán aktiválódó anti-apoptotikus gének szintézise következtében nagyfokú rezisztenciával bír. A sejt károsító hatás a protektív gének termelésének cycloheximiddel történő gátlása után válik kutathatóvá.

Kísérletsorozatunkban arra kerestünk választ, hogy a nyílt szívsebészeti műtétek és cardio-pulmonális bypass alkalmazása a betegek vérében milyen globális változásokat indít. A pre- és poszt-CPB vérmintákból nyert szérum hatását *in vitro* cycloheximiddel érzékenyített humán aorta endothel-sejteken vizsgáltuk, összehasonlítva egyes pro-inflammatorikus cytokinek és bakteriális endotoxin hasonló körülmények között kiváltott sejt károsító hatásával.

A vizsgálataink során kapott eredményekből két fő felismerés szűrhető le. A szív-műtét/CPB utáni vér szérumában mérhető cytotoxikus aktivitás a

vártnál kisebb fokban jelentkezett és jóval alatta maradt a teljes vér endotoxinnal aktiválható sejtkárosító hatásának. A másik megfigyelésünk a 6 órával a CPB befejezése után levett második vérmintákban kialakult LPS tolerancia volt; az endotoxin gyulladást egyensúlyt megváltoztató és ezáltal cytotoxicitást kiváltó képessége szignifikáns mértékben csökkent.

A pro- és anti-inflammatorikus komponensek izolált meghatározásainál (3. fejezet) kimutattuk, hogy a műtét elején levett vérmintákban endotoxin hozzáadásakor masszív cytokintermelődés indul meg. Ezért nem meglepő az endothel-sejtekre gyakorolt koncentrációdependens cytotoxicitás, a stimuláló LPS mennyiségének függvényében. Az endotoxin aktiváló hatásának beindulásához az expozíció után 3 órára van szükség, maximális mértékét további 2 óra alatt érte el. Ez a megfigyelés újabb adalékul szolgál annak igazolására, hogy a kiváltott cytotoxicitás nem az LPS direkt hatásának, hanem a leukocytá-cytokin vonal aktiválásának következménye.

Az endotoxin-vezérelt sejtkárosodás vizsgálata után a CPB utáni vérminták elemzésével arra kerestünk választ, hogy a motoros szívműtétek is okoznak-e in vivo LPS aktiválást vagy más, hasonló cytotoxicitást kiváltó folyamatok indukcióját. Eredményeink az mutatták, hogy míg az endotoxin-aktivált teljes vér erős apoptotikus hatása még a szérumok 1:100 hígításánál is megmutatkozott, CPB után mindössze néhány esetben és csak az 1:2 arányú hígításnál tapasztaltunk fokozott cytotoxikus aktivitást. A rövid szívműtét/CPB tehát nem okozott a humán endothelsejt-alapú bioassay-vel kimutatható változást a gyulladást egyensúlyban. Ez a megfigyelés összhangban van az egyedi pro- és anti-inflammatorikus cytokinek meghatározásakor nyert adatainkkal (3. fejezet). CPB után a TNF α és az IL-1 β szintekben észlelt minimális emelkedés mellett a mérleg másik serpenyőjében lévő specifikus receptorok és receptor antagonisták koncentrációja jelentősen emelkedett, tovább növelve a már kezdetben is meglévő anti-inflammatorikus túlsúlyt. A bioassay azt mutatta, hogy az anti-inflammatorikus válasznak mérhető élettani – endothelsejt apoptózis indukcióját gátló – kihatása is van.

Az a megfigyelésünk, hogy a cardio-pulmonális bypass utáni szérum in vitro még a cycloheximiddel védekezésképtelenné tett humán endothel-

sejtekben is csak minimális apoptózis kiváltására volt képes, éles ellentmondásban van azokkal az elméletekkel, melyek in vivo a posztoperatív szövődmények fő okaként a CPB-indukált endothelkárosodást tartják^(126, 132-134). Néhány megjelent in vivo kísérlet konklúziója azonban a mi megfigyeléseinket támogatja. Glavind-Kristensen állatkísérletben kimutatta, hogy CPB után az endothelfüggő NO-mediált vazodilatáció a szervezet nagy részében megtartott marad⁽¹³⁵⁾. Egy másik tanulmány nem tudta igazolni a CPB-indukált endothelsérüléssel járó kapilláris permeabilitás-fokozódást, így a korai posztoperatív szakban megfigyelhető oedema előidézőjeként a plazma onkotikus nyomás csökkenését és a műtét alatti folyadékterápia hibáit tartja⁽¹³⁶⁾. Eredményeink az utóbbi időben megjelent tanulmányokkal összhangban feltételezik, hogy a CPB fő szövődményének tartott endothelkárosodás jelentősége kisebb a korábban egybehangzóan állítottnál.

A CPB előtti és utáni vérminták LPS-sel történő aktiválásakor azt vizsgáltuk, hogy a nyílt szívű műtét hatására a teljes vér alkotóelemeinek érzékenysége endotoxinnal szemben módosul-e endothel-sejt bioassay-vel kimutatható módon. Méréseinkkel az LPS hatására ugyan a pre- és posztoperatív mintáknál egyaránt koncentrációfüggő cytotoxicitást tapasztaltunk, de ennek mértéke a műtét utáni csoportban szignifikánsan kisebb volt. Az eredmény azt sugallta, a CPB hatására a gyulladással egyensúly eltolódása következtében a teljes vér endotoxin indukált stimulációval szemben fokozottan ellenállóvá vált. Így viszont a CPB nem a gyulladáskelő citokinek aktiválásában játszik szerepet, hanem valójában éppen ellenkezőleg, védelmet nyújt a cytotoxikus folyamatokkal szemben. Ezt a következtetést támasztják alá az előző fejezet izolált citokinmérései és a belőlük számított moláris arányok adatai. A műtét előtti vérmintákban LPS hozzáadásakor az addigi anti-inflammatorikus túlsúly a TNF α és az IL-1 β plazmaszintjének hatalmas arányú növekedésével megfordult. A gyulladáskeltő oldal dominanciáját a bioassay-ben masszív endothel-sejt apoptózis mutatta. A CPB után az endotoxin stimulálás hatására a kezdeti anti-inflammatorikus túlsúly mérséklődött ugyan, de ez a változás kisebb mértékű volt, mint a másik csoportban. A különbség a szérumok humán endothel-sejteket károsító hatásának csökkenésében is megmutatkozott.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy a szív-tüdő motorral végzett rutin szívműtétek hatására a betegek vérében nem tudtunk in vitro endothelsejt cytotoxicitás assay-vel detektálható gyulladáshoz vezetett választ kimutatni. A vérminták gyulladáshoz vezető stimulálásánál a CPB után a kialakult LPS tolerancia miatt csökkent inflammatorikus hatást tapasztaltunk. Eredményeink megkérdőjelezzik a CPB oly gyakran hangoztatott szerepét a szívműtétek szövődeményeként jelentkező gyulladáshoz vezető folyamat kiváltásában.

5. BAZÁLIS ÉS NITROGLICERYN-INDUKÁLT KILÉGZETT NITROGÉN MONOXID MÉRÉSE SZÍV-TÜDŐ MOTORRAL VÉGZETT „RUTIN” SZÍVMŰTÉTEK SORÁN

5.1 Bevezetés

A nitrogén monoxid (NO) a pulmonális vazodilatatív hatása révén fontos élettani szerepet játszik a kisvérköri keringés szabályozásában ⁽⁸⁸⁾. Szintézisének helye a tüdőben a pulmonális endothel és a légúti epithel sejtek, ahol az NO-synthase enzimek folyamatosan állítják elő a NO-t a az L-arginin aminosav terminális guanidin csoportjából^(89,90). A tüdőben a NO vaszkuláris és légúti funkciókat szabályzó tevékenysége részben direkt hatással, részben pedig a vaszkuláris és légúti simaizom sejtekben lévő szolubilis guanilát-cikláz (sGC) által szintetizált ciklikus guanilát monofoszfáton (cGMP) keresztül érvényesül ⁽⁹¹⁾.

A NO folyadékfázisban jellemző rövid felezési ideje miatt a vérből történő direkt meghatározása rendkívül nehéz. A szérumból kaphatunk képet a szervezetben termelődő NO mennyiségéről, illetve az NO szintézis változásáról ^(137,138). A nitrit-meghatározás azonban időigényes, jelentős vérmennyiséget igényel, és a kapott eredmények értékelése is megkérdőjelezhető a NO komplex lebomlása miatt. A NO-ból lebomlása során nitrit és nitrát egyaránt képződik, emellett speciális körülmények között az esetlegesen jelenlevő oxigén szabad gyökökkel (O_2^-) reakcióba lépve peroxynitrit ($ONOO^-$) is keletkezhet. A nitritből újabb reakció során nitrát, vagy esetleg ismét NO is képződhet. E sokrétű kémiai folyamatok és így a keletkezett végtermékek arányát számos tényező befolyásolhatja ⁽¹³⁹⁾.

A NO kutatásban jelentős áttörést hozott annak felismerése, hogy a szervezetben termelődött NO egy része a tüdő légterében, stabil gáz

formájában megjelenik, lehetővé téve a NO keletkezés és felhasználódás dinamikájának tanulmányozását ^(140,141). A kilégzett levegőben detektálható NO a szintézis és lebomlás pillanatnyi arányát tükrözi, így valójában hiteles képet nyújt a tüdőben a sejtekhez is eljutó, tehát aktív NO mennyiségéről. A légutakban mérhető NO folyamatos termeléséért elsősorban a bronchioláris epithel sejtek II. típusú NOS enzime felelős ^(95,96,142). A vaszkuláris endothelben működő eNOS által termelt jóval alacsonyabb, mindössze picomoláris nagyságrendű NO-t a vérben lévő oxyhemoglobin megköti és elszállítja. A fenti adatokból következik, hogy a kilégzett NO döntően az epitheliális NO képződés-felhasználás dinamikáját tükrözi, elfedve a vaszkuláris NO szintézis és metabolizmus történéseit.

Az endothelben végbemenő NO termelés felerősíthető a vaszkuláris endotheliumban metabolizálódó exogén NO donor (pl. nitroglicerín) alkalmazásával. A nitroglicerín (glicerín trinitrát; GTN) és más hasonló, organikus nitrátvegyületek klinikai alkalmazásának indikációs területe a cardiális ischaemia kezelése. Hatásuk a NO felszabadításán keresztül érvényesül, amely a sGC stimulálásával vezet az érfali izomzat relaxációjához. A NO-mediált szisztémás vazodilatáció csökkenti a vénás visszaáramlást, a nagy artériák és a szív koszorúereinek ellazulása javítja a szervek, szövetek vérellátását. A GTN parenteralis adását követően az endothelben indukált enzimfolyamat során keletkező NO egy része a kapillárisokból a tüdő alveolusokba diffundál és a kilégzett levegőben megjelenik. Miután az indukált NO szintézis mértéke függ a beadott nitrát mennyiségén kívül a vaszkuláris endothel működésétől és az alveolo-kapilláris egység integritásától, segítségével képet kaphatunk a vaszkuláris endothel átmeneti vagy végleges károsodásáról ^(97,98).

Akut tüdőkárosodás során a légutakban mérhető NO szintje pozitív és negatív irányban egyaránt változhat. A gyulladáshoz vezető folyamatokban a pro-inflammatorikus cytokin rendszer aktivációja képes más indukálható gének és enzimek, így a II. típusú NOS aktivitásának növelésére is. Ilyen enzimindukáció okozza a légúti NO emelkedését például asthma bronchialeban, vagy a tüdő-transzplantáció szövődeményeként kialakuló obliteratív bronchitisben ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. A pro-inflammatorikus cytokinek ugyanakkor a mRNS destabilizálásával gátolják a III. típusú (endothelialis) NOS aktivitását és ezzel a NO szintézisét ^(103,143). A

légúti NO szintjének csökkenését okozhatják ezeken felül a képződött NO hemoglobin által történő fokozott felvétele, valamint a keletkezett NO alveolusokba jutásának nehezítettsége. Látható tehát, hogy a szisztémás vagy pulmonális gyulladásos betegségekben a légúti NO aktuális koncentrációját számos folyamat bonyolult kölcsönhatása határozza meg.

Munkánkban a szív-tüdő motorral végzett szívsebészeti műtétek következtében kialakuló funkcionális tüdőkárosodás mértékét vizsgáltuk a légúti NO szinteknek a perioperatív időszak több pontján történő regisztrálásával. Az alap méréseken túl exogén NO donor (glicerin trinitrát) alkalmazásával módunk nyílt a légúti epithel és a pulmonális vaszkuláris endothel történéseinek egymástól elkülönített elemzésére.

5.2 Betegcsoport

A tudományos munkánkba bevont 18 betegből (3.2 fejezet) a vizsgálatunk tárgyát képező légúti gázok mérését technikai és egyéb okok miatt 12 betegben (9 férfi, 3 nő) tudtuk elvégezni. A szív-tüdő motorral végzett elektív coronaria pótló műtétek általános perioperatív jellemzőit (anesztézia, műtét, cardio-pulmonális bypass) a 3.2 fejezetben ismertetjük.

5.3 Kilégzett gázok mérése

A klinikai gyakorlatban is használható NO analizátorok működése a gáz fázisban lévő NO mérésére a kemilumineszcia elvén alapul ⁽¹⁴⁴⁾. Ennek lényege, hogy a NO ózonnal reagálva NO₂-t hoz létre, ami a jelenlévő NO mennyiségével arányos, mérhető infravörös sugárzást generál. A kemilumineszcenciával történő NO meghatározás előnye, hogy a mérési adatokat a szöveti homeosztázis (pH, hőmérséklet, stb.) változása nem befolyásolja. A gyors reakcióidejű, érzékeny analizátorok kifejlesztésével a kilégzett NO szintjének légvételről-légvételre történő folyamatos regisztrálása vált lehetővé. A legújabb mérőműszerek érzékenysége 1 ppb alatt van,

reakcióidejük 50 - 100 ms. A kilégzett NO mérésére kifejlesztett és sorozatban gyártott műszerek áramlás- és nyomásmérővel rendelkeznek, a NO mellett CO₂ regisztrálására is képesek.

A kilélegzett nitrogén monoxid koncentrációjának légzészícusonkénti online mérését a szív-műtét-hez elaltatott, intubált, lélegeztetett betegeken Logan LR2500 és Logan LR4000 Multi-gas Analyser (Logan Research Ltd, Rochester, U.K.) műszerekkel végeztük, amelyek a NO mellett CO és CO₂ egyidejű mérésére is alkalmasak (29. ábra). Az endotracheális tubus belsejébe vezetett és annak disztális végéig érő vékony Teflon mintavevő cső biztosította, hogy a vett gázminta elsősorban az alsó légutakból származzon. A mintavevő csövön keresztül a gázkeverék 150 ml/perc sebességgel áramlott a műszer mérőegységébe. Mivel a detektált gázok koncentrációja a termelés-elimináció dinamikáján kívül a beállított lélegeztetési paraméterek függvénye ^(94,98), a kapott adatok összevethetősége érdekében a mérések ideje alatt a betegeket az alábbi standardizált értékekkel lélegeztettük: 100% oxigén-koncentráció, 5 ml/kg tidál volumen, 10/perc légzésszám, 1:3 ki- és belégzési arány és 0 pozitív kilégzészívnyomás (PEEP).

A méréseket minden betegnél a perioperatív időszak ugyanazon négy pontján, a CPB előtt, valamint a CPB után 1, 3 és 6 órával végeztük el. Az alpmérések után a betegeknél emelkedő koncentrációban 1, 2 és 3 µg/testsúly kg nitroglicerinnel (glycerin trinitrate; GTN) bolus injekciókat kaptak a centrális vénás katéteren keresztül. A légúti NO értékek regisztrálása után a következő bolus GTN adás előtt megvártuk amíg a kilégzett gázok és a hemodinamikai paraméterek egyaránt visszatértek az alapértékekhez. A CPB után 1, 3 és 6 órával elvégzett mérések hasonló protokoll szerint történtek.

A kapott adatok elemzését Microsoft Excel 4.0 szoftverrel végeztük, a kilégzett NO, CO és CO₂ dinamikusan változó számadataiból csúcs-(peak) és középérték (mean) meghatározásával. A csúcs-érték a kilégzés végén elért maximális koncentrációt, a közép-érték a 30 másodperces mérési ciklusok során kapott átlagkoncentrációt jelöli. A statisztikai analízist ANOVA és Student –Nueman-kuels post hoc teszt, valamint Student t-próba segítségével végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a p<0.05 eredményeket tekintettük.

5.4 Eredmények

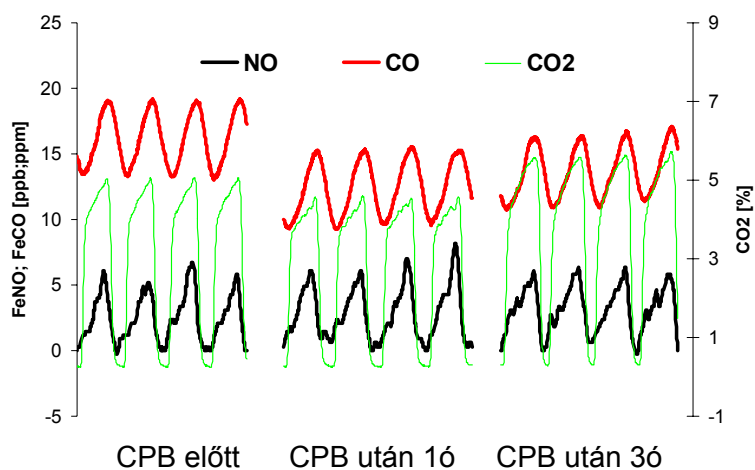
A műtétet megelőző mérések során NO a kilégzett levegőben mind a 12 betegnél detektálható volt a CO₂ görbével megegyező irányú, tehát a kilégzési fázisban emelkedő jellegzetes hullámforma képében. A 30. ábra egy beteg mérésekor rögzített jellemző, a légzési fázissal szinkron változó kilégzett NO, CO és CO₂ értékeket ábrázolja a CPB előtt, valamint 1 és 3 órával a CPB után, 4-4 légzésziklus feltüntetésével. A NO és a CO mérésével a nyílt szívű műtétek következtében kialakuló gyulladáshoz való pulmonális kihatását próbáltuk új oldalról megközelíteni, míg a CO₂ szintek a mintavételek alatti lélegeztetési paraméterekről nyújtottak információt. Bár a protokoll szerint a kilégzett gázok mérését 6 órával a műtét után is terveztük, a betegek egy része ekkor már spontán légzett vagy extubálva volt, ezért a standardizált lélegeztetési paraméterek beállítását nem tudtuk biztosítani. Ugyan az intubált betegeknél a mérést ebben az időpontban is elvégeztük és a kapott értékek nem különböztek számottevően a CPB után 1 és 3 órával történt mérések eredményeitől, a kis esetszám és az említett standardizálási hiányosságok miatt a 6 órás posztoperatív adatok nem kerültek feldolgozásra.

A műtét előtt mért légúti CO koncentráció a ppm (pars per million) tartományban volt, 10.4 ± 1.2 ppm középértékkel. A kilégzett CO értékekben a preoperatív értékekhez viszonyítva a CPB után 1 és 3 órával végzett méréseink során nem tapasztaltunk szignifikáns változást (8.8 ± 0.7 ppm illetve 11.2 ± 1.6 ppm; 31. ábra).

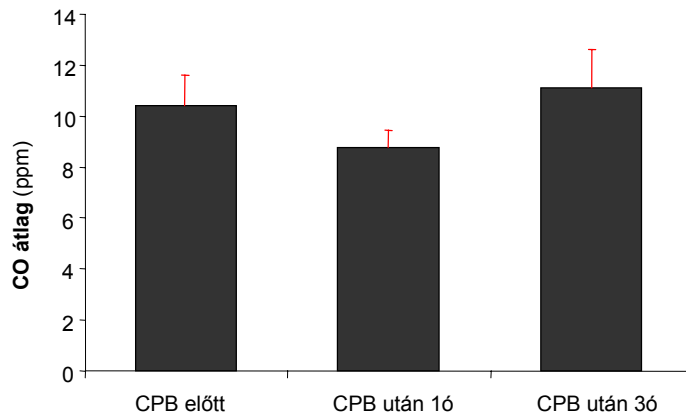
A bazális nitrogén monoxid szintje a kilégzett levegőben a CO-nál nagyságrendekkel kisebb volt és a ppb (pars per billion) tartományba esett. A légúti NO maximális értékeinek átlaga a preoperatív mérésnél 11.5 ± 2.0 ppb (pars per billion), CPB után 1 órával 12.5 ± 2.4 ppb, 3 órával a bypass után pedig 12.2 ± 2.3 ppb volt. A NO középértékek átlaga a műtét előtt 4.8 ± 1.0 ppb volt és ez az érték ugyancsak nem változott számottevően a CPB utáni mérések alkalmával (5.6 ± 1.3 ppb illetve 5.4 ± 0.9 ppb; 32. ábra).



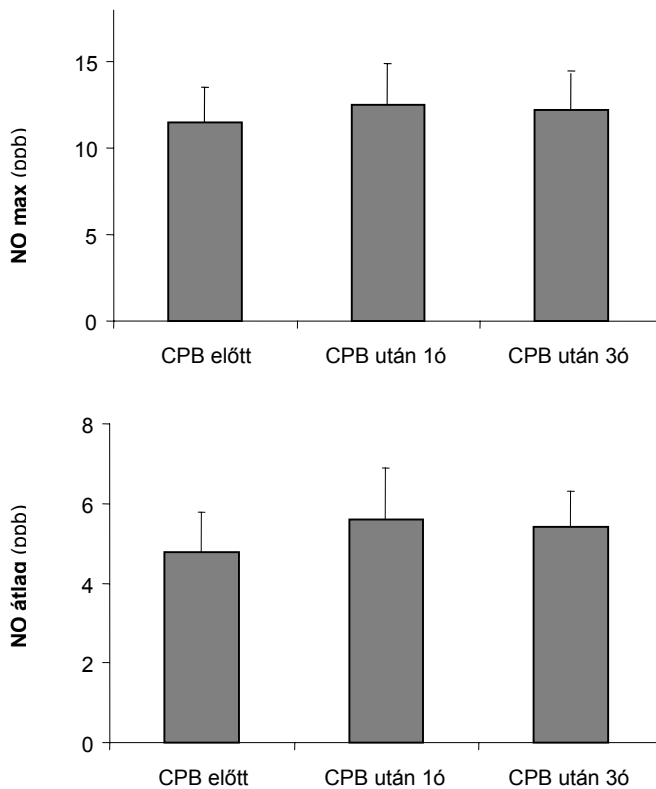
29. ábra Logan LR2500 Mobile és LR4000 Portable Multi-gas Analyser (Logan Research Ltd, Rochester, U.K.).



30. ábra Légúti nitrogén monoxid (NO), szénmonoxid (CO) és széndioxid (CO₂) értékek jellemző változása 4-4 légzésciklus során egy betegnél CPB előtt, ill. CPB után 1 és 3 órával végzett mérések során.



31. ábra Légúti szénmonoxid (CO) középértékek (30 másodperces mérési ciklusok során kapott átlagkoncentrációk) CPB előtt, ill. 1 és 3 órával a CPB után végzett mérések során.

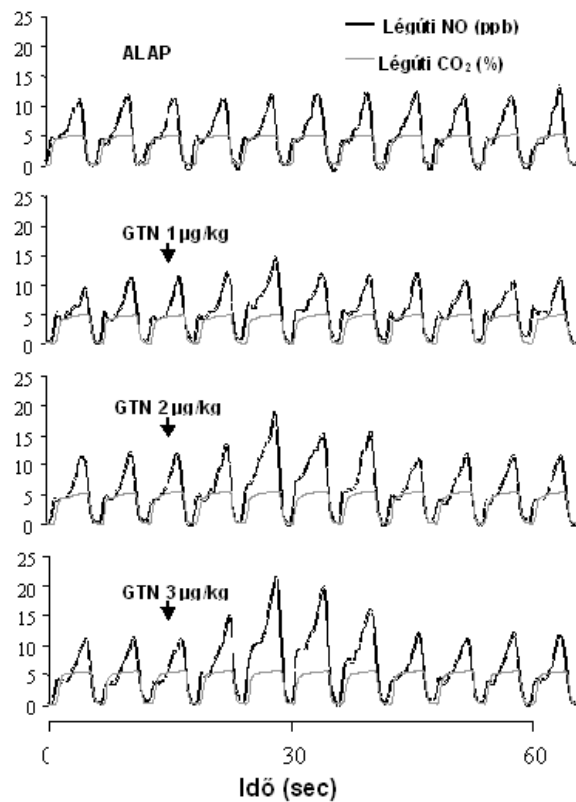


32. ábra Kilégtett nitrogén monoxid (NO) koncentrációk maximális értékei (NO max), ill. a légúti NO középértékek (30 másodperces mérési ciklusok során kapott átlagkoncentrációk; NO átlag) CPB előtt, ill. 1 és 3 órával a CPB után végzett mérések során.

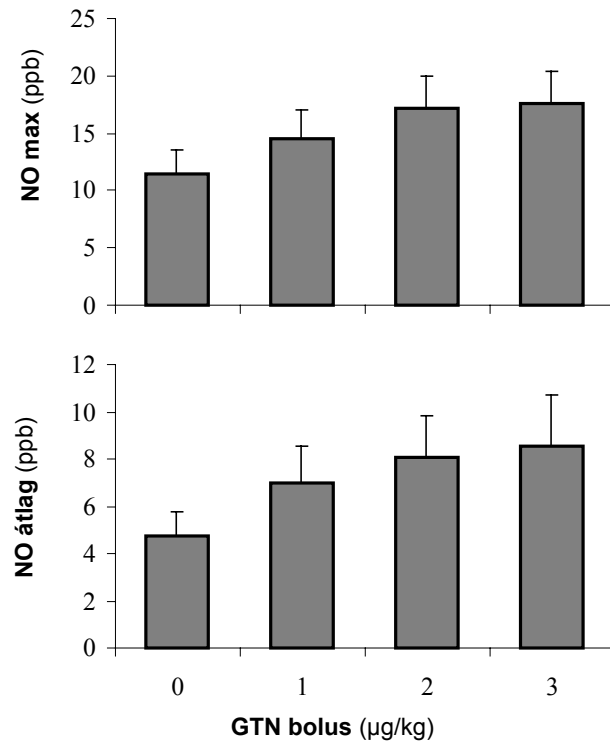
A kilégzett NO és CO mérések belső kontrolljaként alkalmazott CO₂ koncentrációk közel azonos számadatai a három időpontban ($2.8\pm 0.2\%$; $2.8\pm 0.2\%$ és $3.0\pm 0.2\%$) a lélegeztetési paraméterek azonosságát igazolták, ami alapvető fontosságú volt a mérési eredmények összevethetősége miatt.

Exogén NO donor nitroglycerin (glycerin trinitrát; GTN) intravénás bólus injekciók hatására a légúti NO értékek gyors, átmeneti és a beadott GTN dózisértékétől függő emelkedését tapasztaltuk (33. ábra). Mint az ábrán is látható, a GTN iv. adását 10-12 másodperccel követte a kilégzett NO koncentráció hirtelen növekedése majd visszatérése az alapértékhez. Az egész változás időtartama mindössze 4-5 lélegzéciklus (24 - 30 sec.) hosszára terjedt ki. Az 1, 2 és 3 µg/kg GTN bólusok a preoperatív szakban végzett méréseinknél az átlag légúti NO szintet 7.0 ± 1.5 , 8.0 ± 1.8 és 8.6 ± 2.2 ppm értékkel növelték. A kilégzett NO csúcskoncentrációi szintén dóziszfüggő módon 14.6 ± 2.4 , 17.2 ± 2.8 illetve 17.6 ± 2.8 ppm értékekre változtak, ami a bazális NO szinthez viszonyítva 31, 56, illetve 64% -os növekedésnek felel meg (34. ábra).

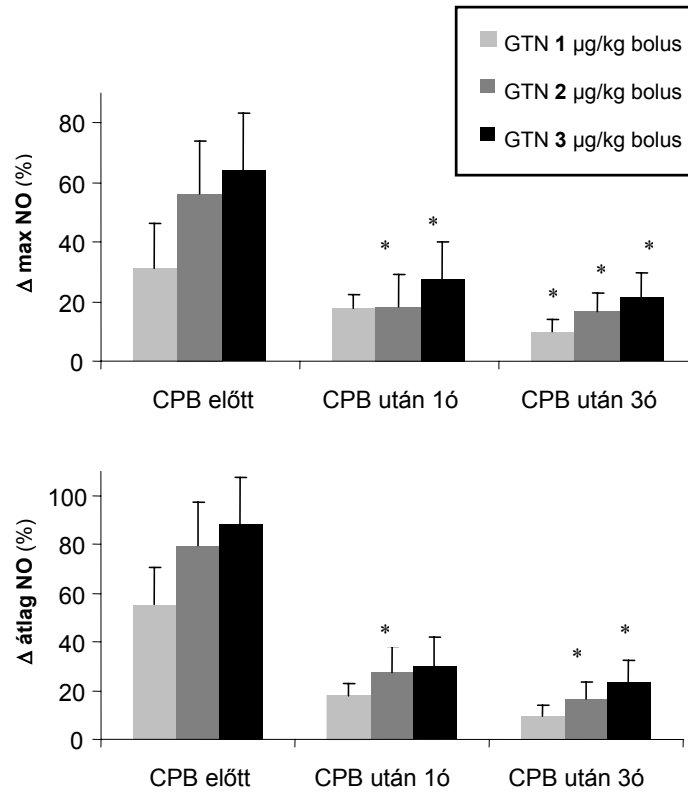
A CPB után 1 és 3 órával a beadott GTN bólusokkal hasonló dóziszfüggő, ám szignifikánsan kisebb mértékű NO-válaszokat kaptunk mind az átlag, mind pedig a csúcs NO értékek tekintetében (35. ábra). Az egyidejűleg regisztrált CO₂ koncentrációk nem különböztek a műtét előtt regisztrált értékektől, ami a lélegeztetési paraméterek változatlan voltára utalt. Így valószínűsíthettük, hogy a csökkent válasz a vaszkuláris endotheliumnak a szívműtét és a CPB következtében jelentkező átmeneti funkciózavarát tükrözte.



33. ábra Légúti nitrogén monoxid (NO) és széndioxid (CO₂) értékek jellemző görbéjének 60 sec hosszúságú részlete (egy betegben a CPB előtt elvégzett mérés). A bazális görbe regisztrálása után (alap) a nyíllal jelölt időpontban glicerín trinitrát 1 µg/kg (GTN 1 µg/kg), 2 µg/kg (GTN 2 µg/kg) és 3 µg/kg (GTN 3 µg/kg) bólus beadását végeztük a centrális vénás kanülön keresztül. A külső NO-donor hatására a légúti NO értékek néhány légzéscikluson keresztül tartó, koncentrációfüggő emelkedése figyelhető meg. A CO₂ görbe egyidejűleg történt regisztrálása a standardizált lélegeztetési paraméterek belső kontrolljaként szolgált.



34. ábra Kilégzett nitrogén monoxid (NO) koncentrációk maximális értékeinek (NO max), valamint a légúti NO középértékek (30 másodperces mérési ciklusok során kapott átlagkoncentrációk; NO átlag) változása 0 (kontroll) ill. 1, 2 és 3 µg/kg glicerin trinitrát (GTN) bólus beadását követően (CPB előtt elvégzett mérések összesítése).



35. ábra Kilégzett nitrogén monoxid (NO) koncentrációk maximális értékeinek százalékos változása ($\Delta \text{max NO}$), valamint a légúti NO középértékek százalékos változása ($\Delta \text{átlag NO}$) az alapértékekhez viszonyítva 1, 2 és 3 $\mu\text{g/kg}$ glicerin trinitrát (GTN) bólus beadását követően, a CPB előtt, ill. 1 és 3 órával a CPB után (* $p < 0.05$).

5.5 Megbeszélés

Noha az előző fejezetekben részletesen tárgyalt in vitro kísérleteink során még az érzékenyített endothel-sejtekben sem tudunk jelentősebb endothel-sejt aktivációt és apoptózist kimutatni a cardio-pulmonalis bypass következményeként, több irodalmi közlemény foglalkozik a CPB után kialakult endothel diszfunkcióval ⁽¹²⁵⁻¹²⁸⁾. A vaszkuláris endothelium funkciózavarának alátámasztásául felhozott klinikai és laboratoriumi jelek in vivo jelentősége, illetve CPB-t kísérő gyulladásos válasszal való kapcsolata továbbra sem tisztázott.

A nyílt szívű műtét során a kilégzett gázok mérésével in vivo a tüdő finom funkcióváltozásait közelítettük meg a cytokin-mediált gyulladásos válasz által befolyásolható két útvonal, az indukálható HO-CO rendszer és a NO vizsgálatával. Intubált, lélegeztetett betegekben a kilégzett gázok real-time analizálásánál az elsődleges célunk a perioperatív időszakban a légúti NO koncentrációk változásainak elemzése volt. Miután a Logan LR 2500 műszer a NO mellett CO₂ és CO egyidejű mérését is elvégezte, a CO₂ értékeket a lélegeztetési paraméterek standardizálásának igazolására használtuk fel, a CO pedig a mint a NOS mellett egy másik indukálható enzimrendszer (HO) működésének végterméke került feldolgozásra és említésre. Irodalmi adatok szerint a szisztémás és/vagy pulmonális gyulladásos válasz során az indukálható enzimrendszerek fokozott működése révén a végtermékek (jelen esetben a NO és a CO) koncentrációja emelkedik, ami adott esetben a szervezetben zajló akut vagy krónikus gyulladás súlyosságával korrelálhat. Így például ismert jelenség az intenzív osztályon lélegeztetett szepsztikus shockos betegek fokozott légúti NO értékei, vagy az asthma krónikus pulmonális gyulladásos folyamata által előidézett, a betegség dinamikájának nyomonkövetésére az FDA (U.S. Food and Drug Administration) által hivatalosan is alkalmas emelkedett kilégzett NO koncentráció ^(100,101,145-147).

Hasonlóan az in vitro cytokin-egyensúly és gyulladásos válasz eredményeinkhez, standardizált körülmények között elvégzett méréseink során nem tapasztaltuk változást az alap NO vagy CO értékekben CPB után.

Ez a megfigyelés is támogatja azon mérési eredményeinket, melyek szerint a cytokinek aránya és a cytokin egyensúly rövid CPB hatására nem tolódik el pro-inflammatórikus irányba. Természetesen ezen kísérletsorozataink eredményeiből alkotott következtetéseink csak az általunk használt körülmények között (rövid műtéti és bypass idő, jó állapotú betegek, rövid posztoperatív nyomonkövetési idő, stb.) és csak a tüdő viszonylatában helytállóak. További kutatások tárgyát kell hogy képezze annak vizsgálata, hogy hosszabb nyílt szívűműtétek során a többórás CPB idő alatt beindul-e a gyulladásos rendszer aktiválódása. Az is elképzelhető, hogy CPB hatására a tüdővel ellentétben más szervekben agresszívabb gyulladásos válasz indukálódik. Így például a vesében a különböző cytokinek és anti-inflammatorikus párjaik eltérő glomerulális filtrációja más élettani következményekkel járó gyulladásos egyensúlyt eredményezhet.

Ellentétben a bazális NO termeléssel, az indukált NO szintézisben a CPB hatására jól definiálható változások mérhetők. Az 1, 2 és 3 µg/kg emelkedő bólus dózisokban intravénásan a keringésbe juttatott exogén NO donor nitroglycerin hatására bekövetkezett NO-válasz a CPB után 1 és 3 órával szignifikánsan kisebb volt, mint a műtétet megelőzően. Megfigyelésünk, miszerint a GTN-indukált légúti NO válasz azokban a betegekben is csökkent, akiknél a bazális (endogén) NO szintézisében nem volt eltérés, a két folyamat különböző lokalizációját veti fel.

A NO termeléséért felelős sejtek anatómiai helye és típusa egyértelműen nem tisztázott ⁽¹⁴⁸⁾. A légúti NO tüdőn belüli szintézisét több megfigyelés támasztja alá. Állatkísérletekkel mutatták ki, hogy a NO nem szisztémás eredetű ⁽⁹³⁾, munkacsoportunknak pedig humán beteganyagon sikerült igazolnia, hogy a pulmonális keringés részleges vagy teljes hiánya esetén (CPB, illetve tüdő-transzplantáció során) is mérhető NO a kilégzett levegőben ⁽⁹⁴⁾.

A légúti CO₂ görbével azonos fázisban váltakozó légúti NO görbe alapján valószínűsíthető, hogy a kilégzett nitrogén monoxid elsődlegesen az alsó légutakból, a bronchioláris epithel-sejtekből származik ⁽¹⁴⁹⁾. A NOS enzimek eloszlása is ezt igazolja. Míg a bronchioláris epithelben található II. típusú NOS jelentős mennyiségű NO szintézisére képes ⁽⁹⁵⁾, a III. típusú

(endotheliális) NOS által nagyságrendekkel kisebb mennyiségben termelt NO a hemoglobinhoz kötődve inaktiválódik. A légúti NO mérések során az epitheliális és endotheliális eredetű NO összemosódik, és a termelődés nagyságrendbeli különbségeiből adódóan az epithelben zajló, a rutin nyílt szívsebészeti műtét során nem károsodó folyamatokat tükrözi. Sartori és mtsai humán beteganyagon kimutatták, hogy az endotheliális NO szintézis szelektív gátlása nem okozta a légúti NO koncentrációjának csökkenését (150).

Az ischaemia-reperfúzió során fellépő oxidatív stressz a NO szintézisét és kibocsátását számos módon befolyásolhatja (152-154). Ismert továbbá, hogy a termelődött NO mennyiségét a folyadékfázisban kémiai reakciók is módosíthatják. Ezek közül az egyik legfontosabb az a folyamat, melynek során a NO az oxigén szabad gyökökkel reakcióba lépve peroxynitritet képez (104). A jelenséget állatkísérletben is igazolták: ischaemia-reperfúzió során csökkent a tüdőben termelődő NO mennyisége (151). A folyamat superoxid-dismutase adásával részlegesen blokkolható volt, ami ugyancsak a NO superoxid-mediált felhasználódását bizonyítja.

A légúti NO mérésekkel a tüdő légterébe jutó, gáz fázisban lévő nitrogén monoxid koncentrációja határozható meg. Miután intubált, lélegeztetett betegekben a kilégzett NO szintjét a lélegeztetési paraméterek (tidal volumen, légzésszám, be- és kilégzési idők aránya, PEEP, stb.) jelentősen befolyásolhatják (94,98,154,155), általánosan elfogadott standardok hiányában a különböző tanulmányok adatai egymással csak korlátozottan vethetők össze. Kérdéses továbbá, hogy a légúti NO mérésekkel kapott eredményekből milyen mértékben vonhatunk le következtetéseket az in vivo NO keletkezés-metabolizmust illetően (148,156). A folyadék fázisban a NO mennyiségét és biológiai hatásait a fent említett kémiai reakciókon túl számos élettani-kórélettani történés módosíthatja, mint például lokális cytokintermelődés, gyulladáshoz vezető folyamatok, neutrophil aktiváció, illetve a szintézist végző epithel- és endothel-sejtek állapota.

A korai posztoperatív szakban megfigyelt károsodott GTN-NO metabolizmusnak többféle magyarázata lehetséges. Bár a konverziót végző enzimet és a metabolizmus lépéseit pontosan még nem ismerjük, feltételezések szerint a reakció során oxido-redukációs folyamatok is

lejátszódnak ⁽¹⁵⁷⁾, és az ischaemia-reperfúzió során fellépő oxidatív stressz ezen enzimszisztéma működését károsíthatja rövidebb-hosszabb időre. Az is elképzelhető, hogy a GTN-konvertáló enzim által termelődött NO a folyadék fázisban fokozottabb mértékben használódik fel, így csak kisebb hányada jut a tüdő légterébe és kerül detektálásra. Az oxidatív stressz következményeként kapott csökkent GTN-válasz a korábban állatkísérletek során is igazolt primér és szekunder nitrát-toleranciával is magyarázható ⁽¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾. A GTN-NO konverzió csökkenése a pulmonális keringés perioperatív szakban bekövetkező változásával is összefüggésben állhat. Nyulakban a pulmonális véráramlás növelése vagy csökkentése ugyan nem okozott számottevő változást a légúti NO koncentrációkban ⁽¹⁵⁵⁾, a kérdés humán vonatkozásában azonban további vizsgálatok szükségesek. A mellkasműtétek során gyakran tapasztalható posztoperatív atelektáziák és a ventiláció-perfúzió zavara ugyancsak magyarázhatják a légúti NO koncentráció változását, bár ennek ellene szól a bazális NO és a CO₂ koncentrációk állandósága a perioperatív szak folyamán.

Eredményeinket összefoglalva a légúti NO mérésekkel a rutin nyílt szívű műtét, az azt követő gyulladási válasz és az ischaemia-reperfúziós sérülés hatására nem tudtunk olyan változásokat kimutatni, amely a döntően epitheliális eredetű endogén NO-termelés átmeneti vagy tartós károsodására utal. Külső NO-donor adásakor a posztoperatív szakban a az indukált NO-termelés károsodását mutattuk ki, ami a vaszkuláris endothelben végbemenő GTN-NO metabolizmus zavarát tükrözheti. A kutatás iránya újabb adalékokat szolgáltat a szívsebészeti műtéteket kísérő ischaemia-reperfúziós és gyulladási károsodások megértésében és a szükséges kezelési stratégia megválasztásában, a kapott eredmények értékelése azonban mindenképpen további klinikai és laboratóriumi vizsgálatokat igényel.

6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

6.1

A gyulladáskeltő cytokinek, illetve specifikus antagonistáik moláris arányát vizsgálva kimutattuk, hogy fiziológias körülmények között az emberi vérplazma igen jelentős anti-inflammatorikus kapacitással rendelkezik. Az anti-inflammatorikus oldal túlsúlya akár több százszoros védelmet jelent a szervezet számára a gyulladással járó folyamatok kivédésére és a szervkárosodások megelőzésére. Bár mind a pro-, mind pedig az anti-inflammációs cytokinek szérumszintjeinél jelentős egyéni eltérések voltak mérhetőek, az esetleges posztoperatív gyulladással járó válasz kialakulását beteganyagunkban nem befolyásolták.

6.2

Igazoltuk, mások eredményeitől eltérően, hogy CPB-vel végzett nyílt szívműtétek nem jártak a posztoperatív szisztémás gyulladással járó válaszáért felelős pro-inflammatorikus cytokinek szérumszintjének szignifikáns emelkedésével. Az anti-inflammatorikus oldal esetenként jelentősebb emelkedése az ellentétes hatású folyamat, a gyulladással szembeni védelem további erősödését mutatta.

6.3

A CPB után in vivo elmaradt gyulladáshoz való válaszal ellentétben a műtét előtt és után levett vérminták 6 órán keresztül történő in vitro inkubálása jelentős TNF és IL-1 emelkedést okozott, igazolva az idegen felszín gyulladáskeltő hatását. Bakteriális endotoxin (LPS) további cytokin emelkedést váltott ki, ám ez a stimuláló hatás a posztoperatív mintákban szignifikánsan kisebbnek bizonyult (endotoxin tolerancia).

6.4

In vitro bioassay alkalmazásával aktivált pre- és posztoperatív vérminták humán endothel-sejtekre gyakorolt hatását elemezve kimutattuk, hogy betegeknél a szív-műtét/CPB utáni vér szérumban mérhető cytotoxikus aktivitás a vártnál kisebb fokban jelentkezett és kiváltott apoptosist jóval alatta maradt a teljes vér endotoxinnal aktiválható sejt-károsító hatásánál. CPB után az endotoxin cytotoxicitást kiváltó képessége humán endothel-sejt tenyészetekben szignifikáns mértékben csökkent.

6.5

A perioperatív időszakban végzett légúti NO mérésekkel beteganyagunkban az irodalmi adatok alapján döntően epitheliális eredetűnek tekinthető bazális NO koncentrációkban nem találtunk kimutatható eltéréseket a CPB előtti és CPB utáni értékekben. Külső NO-donor hatására az endothelben termelődő indukált NO koncentrációk CPB után tapasztalható szignifikáns csökkenése azonban a vaszkuláris endothel feltehetően ischaemia-reperfúziós eredetű károsodását igazolta.

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉBE TARTOZÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK ÉS ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Könyvfejezet

Marczin N, Kövesi T, Royston D, Yacoub M. Exhaled Nitric Oxide (NO) in Acute Lung Injury: Measurements and Physiological Implications *Etiology and treatment of acute lung injury*. Edited by S. Matalon and J. I. Sznajder Plenum Press, New York, 2001; p186-197

Kövesi T, Royston D, Yacoub M, Marczin N. Exhaled Nitric Oxide in Human Lung Ischaemia-Reperfusion. *Disease Markers in Exhaled Breath: Lung Biology in Health and Disease*. Edited by N. Marczin, S. Kharitonov, M. Yacoub and P. Barnes. Marcel Decker, 2002; p259-279

Kövesi T, Bundy R, Hoare G, Royston D, Yacoub M. Oxidative Stress During Cardiac Surgery in Diabetic Patients *Disease Markers in Exhaled Breath: Basic Mechanisms and Clinical Applications* Edited by N. Marczin, M.H. Yacoub. IOS Press NATO Science Series, 2002; p375-379

Publikáció

Kovesi T, Royston D Is there a bleeding problem with platelet-active drugs? (Editorial) *British Journal of Anaesthesia* 2002 Feb;88(2) 159-63
(IF₂₀₀₂: 2.098)

Kövesi T, Royston D, Yacoub M, Róth E, Marczin N A kilégzett nitrogén monoxid fiziológiája, mérése és változása a tüdő akut ischaemia-reperfúziós károsodásaiban. *Orvosi Hetilap* 2002 Oct;143(42) 2393-2398.

Marczin N, Kovesi T, Royston D, Cuthbertson BH, Stott SA, Webster NR Exhaled nitric oxide as a marker of lung injury in coronary artery bypass surgery. *British Journal of Anaesthesia* 2003 Jan;90(1) 101-5
(IF₂₀₀₃: 2.365)

Kovesi T, Royston D, Marczin N The unwanted response to cardiac surgery; Time for reappraisal? (Editorial) *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003 Jan;125(1) 32-5

(IF₂₀₀₃: 3.319)

Kovesi T, Royston D Pharmacological approaches to reducing allogenic blood exposure. *Vox Sanguinis* 2003 Jan;84(1) 2-10

(IF₂₀₀₃: 1.161)

Kovesi T, Royston D, Yacoub M, Marczin N Basal and nitroglycerin-induced exhaled nitric oxide in cardiac surgery. *British Journal of Anaesthesia* 2003 May;90(5) 608-16

(IF₂₀₀₃: 2.365)

Előadás

Hoare G, Kövesi T, Bundy R, Royston D, Yacoub M, Marczin N
Cardiopulmonary bypass (CPB) and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory activity in the plasma of patients undergoing coronary bypass surgery (CABG) (poster)
ATS 97th International Conference, San Francisco 2001

Bundy R, Kövesi T, Royston D, Yacoub M, Marczin N
Cardiopulmonary bypass (CPB) and endotoxin (LPS)-induced cytotoxic activity in the plasma of patients undergoing coronary bypass surgery (CABG) (poster)
ATS 97th International Conference, San Francisco 2001

Hoare G, Kövesi T, Bundy R, Royston D, Yacoub M, Marczin N
Cardiopulmonary bypass (CPB) and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory activity in the plasma of patients undergoing coronary bypass surgery (CABG) (poster)
NATO ASI Scientific Meeting, Crete 2001

Bundy R, Kövesi T, Royston D, Yacoub M, Marczin N
Cardiopulmonary bypass (CPB) and endotoxin (LPS)-induced cytotoxic activity in the plasma of patients undergoing coronary bypass surgery (CABG) (poster)
NATO ASI Scientific Meeting, Crete 2001

Kövesi T, Marczin N
Diabetes and oxidative stress in cardiac surgery
NATO ASI Scientific Meeting, Crete 2001

Kövesi T

Changes in exhaled nitric oxide levels in cardiac surgery involving cardiopulmonary bypass

Research Topics in Anaesthesia, Harefield 2001

Marczin N, Kövesi T, Imre M, Bundy R, Hoare G, Royston D, Yacoub M

Cardiopulmonary bypass and systemic inflammatory response

MAITT 31. Kongresszusa, Siófok 2002

Kövesi T, Royston D, Yacoub M, Marczin N

Cardiopulmonalis bypass hatása a bazális és nitroglicerin-indukált kilégzett nitrogén monoxid értékekre

MAITT 31. Kongresszusa, Siófok 2002

Bundy R, Kövesi T, Imre M, El-Habashi N, Royston D, Yacoub M, Marczin N

Mechanisms of bypass-induced de-sensitisation of whole blood activation by endotoxin (LPS)

EACTA 17th Annual Meeting, Dublin 2002

Kövesi T, Bundy R, Hoare G, Imre M, Royston D, Yacoub M, Marczin N

Bypass (CPB)- and LPS-induced pro-inflammatory activity in the plasma of patients undergoing CABG surgery

EACTA 17th Annual Meeting, Dublin 2002

Marczin N, Bundy R, Hoare G, Kövesi T, Royston D, Yacoub M

Cardiopulmonary bypass (CPB) and LPS-induced pro-inflammatory activity in the plasma of patients undergoing cardiac surgery suggest anti-inflammatory potential for CPB

Anesthesia& Analgesia, Vol 94: 4S, 2002. SCA65CPB.

Kövesi T, Szabó A., Royston D, Marczin N.

Relationship between basal and nitroglycerin (GTN)-induced exhaled nitric oxide (NO) and oxygenation parameters in ventilated patients undergoing cardiopulmonary bypass (CPB)

ERS 14th Annual Congress, Glasgow 2004

IRODALOMJEGYZÉK

1. Blatchford JW. Ludwig Rehn: the first successful cardiorrhaphy. *Ann Thorac Surg.* 1985 May;39(5):492-5.
2. Shumacker HB Jr. When did cardiac surgery begin? *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1989 Mar-Apr;30(2):246-9.
3. Symbas PN, Justicz AG. Quantum leap forward in the management of cardiac trauma: the pioneering work of Dwight E. Harken. *Ann Thorac Surg.* 1993 Mar;55(3):789-91.
4. Terasaki H, Morioka T. Extracorporeal life support: present status and the future. *Ann Acad Med Singapore.* 1994 Nov;23(6 Suppl):33-9.
5. Naef AP. Forgotten pioneers in thoracic surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Feb;40(1):1-4.
6. Boettcher W, Merkle F, Weitkemper HH. History of extracorporeal circulation: the invention and modification of blood pumps. *J Extra Corpor Technol.* 2003 Sep;35(3):184-91.
7. Pastuszko P, Edie RN. John H. Gibbon, Jr., the inventor of the first successful heart-lung machine. *J Card Surg.* 2004 Jan-Feb;19(1):65-73.
8. Moore FD, Burch GE, Harken DE, Swan HJ, Murray JE, Lillihei CW. Cardiac and other organ transplantation. In the setting of transplant science as a national effort. *JAMA.* 1968 Dec 9;206(11):2489-500.
9. Khan SS, Denton T, Matloff JM. Long-term survival after coronary artery bypass grafting. *Curr Opin Cardiol.* 1994 Nov;9(6):692-703.
10. Dargie HJ. Late results following coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J.* 1992 Dec;13 Suppl H:89-95.
11. Opie LH. Myocardial energy metabolism. *Adv Cardiol.* 1974;12(0):70-83.
12. Menasche P. Strategies to improve myocardial protection during extracorporeal circulation. *Shock.* 2001;16 Suppl 1:20-3.
13. Gal J, Smith A, Riedel B, Royston D. Preservation and protection of myocardial function. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2000 Jun;14(3 Suppl 1):22-36
14. Amrani M, Yacoub MH, Royston D. Myocardial protection for cardiac surgery: classical views and new trends. *Int Anesthesiol Clin.* 1999 Spring;37(2):39-53.
15. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983 Dec;86(6):845-57.

16. Maslow A, Schwartz C. Cardiopulmonary bypass-associated coagulopathies and prophylactic therapy. *Int Anesthesiol Clin.* 2004 Summer;42(3):103-33.
17. Linden MD. The hemostatic defect of cardiopulmonary bypass. *J Thromb Thrombolysis.* 2003 Dec;16(3):129-47.
18. Royston D. Blood-sparing drugs: aprotinin, tranexamic acid, and epsilon-aminocaproic acid. *Int Anesthesiol Clin.* 1995 Winter;33(1):155-79.
19. Kovesi T, Royston D. Pharmacological approaches to reducing allogeneic blood exposure. *Vox Sang.* 2003 Jan;84(1):2-10.
20. Royston D. Aprotinin versus lysine analogues: the debate continues. *Ann Thorac Surg.* 1998 Apr;65(4 Suppl):S9-19; discussion S27-8.
21. Kovesi T, Royston D. Is there a bleeding problem with platelet-active drugs? *Br J Anaesth.* 2002 Feb;88(2):159-63.
22. Hirai S. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Dec;9(6):365-70.
23. Asimakopoulos G. Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion.* 1999 Jul;14(4):269-77.
24. Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1997 May;11(3):341-54.
25. Royston D. Systemic inflammatory responses to surgery with cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 1996 May;11(3):177-89.
26. Royston D, Kovesi T, Marczin N. The unwanted response to cardiac surgery: time for a reappraisal? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Jan;125(1):32-5.
27. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation.* 1983 Aug;68(2 Pt 2):125-36.
28. Hearse DJ. Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990 Aug;4 Suppl 4:767-76.
29. Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Sep;112(3):806-11.
30. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest.* 1995 Jan;95(1):89-103.
31. Oddis CV, Finkel MS. Cytokines and nitric oxide synthase inhibitor as mediators of adrenergic refractoriness in cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol.* 1997 Feb 12;320(2-3):167-74.
32. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, Leung JM, Mangano DT, Greenfield LJ, Rankin JS. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Oct;108(4):626-35.
33. Wan S, Izzat MB, Lee TW, Wan IY, Tang NL, Yim AP. Avoiding cardiopulmonary bypass in multivessel CABG reduces cytokine response and myocardial injury. *Ann Thorac Surg.* 1999 Jul;68(1):52-6

34. Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, Tarkka M. Cytokine Responses in Low-Risk Coronary Artery Bypass Surgery. *Int. J. Angiol.* 2001 Jan;10(1):27-30.
35. Wilson IC, Gardner TJ, DiNatale JM, Gillinov AM, Curtis WE, Cameron DE. Temporary leukocyte depletion reduces ventricular dysfunction during prolonged postischemic reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Nov;106(5):805-10.
36. Mangano CM, Diamondstone LS, Ramsay JG, Aggarwal A, Herskowitz A, Mangano DT. Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *Ann Intern Med.* 1998 Feb 1;128(3):194-203.
37. Zanardo G, Michielon P, Paccagnella A, Rosi P, Calo M, Salandin V, Da Ros A, Michieletto F, Simini G. Acute renal failure in the patient undergoing cardiac operation. Prevalence, mortality rate, and main risk factors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Jun;107(6):1489-95.
38. Gormley SM, McBride WT, Armstrong MA, Young IS, McClean E, MacGowan SW, Campalani G, McMurray TJ. Plasma and urinary cytokine homeostasis and renal dysfunction during cardiac surgery. *Anesthesiology.* 2000 Nov;93(5):1210-6
39. Tang AT, Alexiou C, Hsu J, Sheppard SV, Haw MP, Ohri SK. Leukodepletion reduces renal injury in coronary revascularization: a prospective randomized study. *Ann Thorac Surg.* 2002 Aug;74(2):372-7
40. Van Den Noortgate N, Mouton V, Lamot C, Van Nooten G, Dhondt A, Vanholder R, Afschrift M, Lameire N. Outcome in a post-cardiac surgery population with acute renal failure requiring dialysis: does age make a difference? *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Apr;18(4):732-6.
41. Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med.* 1998 Apr;104(4):343-8.
42. Massoudy P, Zahler S, Becker BF, Braun SL, Barankay A, Meisner H. Evidence for inflammatory responses of the lungs during coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Chest.* 2001 Jan;119(1):31-6.
43. Asimakopoulos G, Smith PL, Ratnatunga CP, Taylor KM. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1999 Sep;68(3):1107-15.
44. Sinclair DG, Haslam PL, Quinlan GJ, Pepper JR, Evans TW. The effect of cardiopulmonary bypass on intestinal and pulmonary endothelial permeability. *Chest.* 1995 Sep;108(3):718-24.
45. Baughman RP, Gunther KL, Rashkin MC, Keeton DA, Pattishall EN. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Jul;154(1):76-81.
46. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest.* 1995 Nov;108(5):1303-14.
47. Ito H, Hamano K, Gohra H, Katoh T, Fujimura Y, Tsuboi H, Esato K. Relationship between respiratory distress and cytokine response after cardiopulmonary bypass. *Surg Today.* 1997;27(3):220-5.

48. Gu YJ, de Vries AJ, Boonstra PW, van Oeveren W. Leukocyte depletion results in improved lung function and reduced inflammatory response after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Aug;112(2):494-500.
49. 1: Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation.* 1990 Oct;50(4):537-44.
50. Smith CW. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol.* 1993 Oct;30(4 Suppl 4):45-53; discussion 54-5.
51. Tonnesen MG. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol.* 1989 Aug;93(2 Suppl):53S-58S.
52. Garcia JG, Azghani A, Callahan KS, Johnson AR. Effect of platelet activating factor on leukocyte-endothelial cell interactions. *Thromb Res.* 1988 Jul 1;51(1):83-96.
53. Luscinskas FW, Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Rosenzweig A. C-C and C-X-C chemokines trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 May;902:288-93.
54. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MH, Roos D. Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J Cell Biol.* 1992 May;117(3):565-72.
55. Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol.* 1999 Nov;66(5):698-704.
56. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Nov 20;1639(3):141-51.
57. Grimsley C, Ravichandran KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol.* 2003 Dec;13(12):648-56.
58. Lachmann PJ, Hughes-Jones NC. Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol.* 1984;7(2-3):143-62.
59. Jones HM, Matthews N, Vaughan RS, Stark JM. Cardiopulmonary bypass and complement activation. Involvement of classical and alternative pathways. *Anaesthesia.* 1982 Jun;37(6):629-33.
60. Gillinov AM, Redmond JM, Winkelstein JA, Zehr KJ, Herskowitz A, Baumgartner WA, Cameron DE. Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass: a study in the complement-deficient dog. *Ann Thorac Surg.* 1994 Feb;57(2):345-52.
61. Mantovani A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P. Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):406-14.
62. Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest.* 1991 Dec;21(6):559-73.
63. Tonnesen E, Christensen VB, Toft P. The role of cytokines in cardiac surgery. *Int J Cardiol.* 1996 Apr 26;53 Suppl:S1-10.
64. Cameron D. Initiation of white cell activation during cardiopulmonary bypass: cytokines and receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27 Suppl 1:S1-5.

65. Lahat N, Zlotnick AY, Shtiller R, Bar I, Merin G. Serum levels of IL-1, IL-6 and tumour necrosis factors in patients undergoing coronary artery bypass grafts or cholecystectomy. *Clin Exp Immunol.* 1992 Aug;89(2):255-60.
66. Meldrum DR, Partrick DA, Cleveland JC Jr, Shenkar R, Meldrum KK, Raiesdana A, Ayala A, Brown JW, Harken AH. On-pump coronary artery bypass surgery activates human myocardial NF-kappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J Surg Res.* 2003 Jun 15;112(2):175-9.
67. Rothenburger M, Soeparwata R, Deng MC, Schmid C, Berendes E, Tjan TD, Wilhelm MJ, Erren M, Bocker D, Scheld HH. Prediction of clinical outcome after cardiac surgery: the role of cytokines, endotoxin, and anti-endotoxin core antibodies. *Shock.* 2001;16 Suppl 1:44-50.
68. Sawa Y, Shimazaki Y, Kadoba K, Masai T, Fukuda H, Ohata T, Taniguchi K, Matsuda H. Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Jan;111(1):29-35.
69. Spanier T, Tector K, Schwartz G, Chen J, Oz M, Beck J, Mongero L. Endotoxin in pooled pericardial blood contributes to the systemic inflammatory response during cardiac surgery. *Perfusion.* 2000 Sep;15(5):427-31.
70. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Apr;155(4):1187-205.
71. Giannoudis PV, Smith MR, Evans RT, Bellamy MC, Guillou PJ. Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients. *Acta Orthop Scand.* 1998 Apr;69(2):184-8.
72. Norrby-Teglund A, Pauksens K, Norgren M, Holm SE. Correlation between serum TNF alpha and IL6 levels and severity of group A streptococcal infections. *Scand J Infect Dis.* 1995;27(2):125-30.
73. Offner F, Philippe J, Vogelaers D, Colardyn F, Baele G, Baudrihaye M, Vermeulen A, Leroux-Roels G. Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. *J Lab Clin Med.* 1990 Jul;116(1):100-5.
74. Kawamura T, Wakusawa R, Inada K. Interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonists increase during cardiac surgery. *Can J Anaesth.* 1997 Jan;44(1):38-42.
75. McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM. Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits. *Br J Anaesth.* 1995 Dec;75(6):724-33.
76. Gormley SM, McBride WT, Armstrong MA, McClean E, MacGowan SW, Campalani G, McMurray TJ. Plasma and urinary cytokine homeostasis and renal function during cardiac surgery without cardiopulmonary bypass. *Cytokine.* 2002 Jan 21;17(2):61-5.
77. Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg.* 1990 Dec;212(6):694-700.
78. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA.* 1993 Apr 14;269(14):1829-35.
79. Kubota T, Miyagishima M, Frye CS, Alber SM, Bounoutas GS, Kadokami T, Watkins SC, McTiernan CF, Feldman AM. Overexpression of tumor necrosis factor- alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Jul;33(7):1331-44.

80. Bellomo R. The cytokine network in the critically ill. *Anaesth Intensive Care*. 1992 Aug;20(3):288-302
81. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today*. 1992 May;13(5):151-3.
82. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 1;89(11):4845-9.
83. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. Increased interleukin-1 beta and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol*. 1993 Jun;142(6):1772-86.
84. Dinarello CA. The biology of interleukin-1. *Chem Immunol*. 1992;51:1-32.
85. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999 May 29;353(9167):1838-42.
86. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*. 1991 Nov;12(11):404-10.
87. Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J, Dinarello CA. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem*. 1991 Aug 5;266(22):14147-50.
88. Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 May;149(5):1375-80.
89. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(2):682-5.
90. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Jun 30;153(3):1251-6.
91. Weinberger B, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action. *Pharmacol Ther*. 1999 Dec;84(3):401-11.
92. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 15;43(3):580-94.
93. Cremona G, Higenbottam T, Takao M, Hall L, Bower EA. Exhaled nitric oxide in isolated pig lungs. *J Appl Physiol*. 1995 Jan;78(1):59-63.
94. Marczin N, Riedel B, Gal J, Polak J, Yacoub M. Exhaled nitric oxide during lung transplantation. *Lancet*. 1997 Dec 6;350(9092):1681-2.
95. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):7809-13.
96. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Jun;16(6):629-39.
97. Marczin N, Riedel B, Royston D, Yacoub M. Intravenous nitrate vasodilators and exhaled nitric oxide. *Lancet*. 1997 Jun 14;349(9067):1742.

98. Marczin N, Riedel B, Royston D. Exhaled nitric oxide in patients undergoing cardiothoracic surgery: a new diagnostic tool? *Acut Respiratory Distress Syndrome: Cellular and Molecular Mechanisms and Clinical Management*. Ed.: Matalon SS. Plenum Press, New York. 1998: 365-74.
99. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Dec 16;181(2):852-7.
100. Belvisi M, Barnes PJ, Larkin S, Yacoub M, Tadjkarimi S, Williams TJ, Mitchell JA. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. *Eur J Pharmacol*. 1995 Sep 5;283(1-3):255-8.
101. Kharitonov SA, Barnes PJ. Nitric oxide in exhaled air is a new marker of airway inflammation. *Arch Chest Dis*. 1996 Dec;51(6):533-7.
102. Gabbay E, Walters EH, Orsida B, Whitford H, Ward C, Kotsimbos TC, Snell GI, Williams TJ. Post-lung transplant bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is characterized by increased exhaled nitric oxide levels and epithelial inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec;162(6):2182-7.
103. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*. 1993 Jul;73(1):205-9.
104. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991 Mar 5;266(7):4244-50.
105. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Oct;61(2):748-55.
106. Keyse SM, Tyrrell RM. Induction of the heme oxygenase gene in human skin fibroblasts by hydrogen peroxide and UVA (365 nm) radiation: evidence for the involvement of the hydroxyl radical. *Carcinogenesis*. 1990 May;11(5):787-91.
107. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987 Feb 27;235(4792):1043-6.
108. Cardell LO, Lou YP, Takeyama K, Ueki IF, Lausier J, Nadel JA. Carbon monoxide, a cyclic GMP-related messenger, involved in hypoxic bronchodilation in vivo. *Pulm Pharmacol Ther*. 1998;11(4):309-15.
109. Snyder SH, Jaffrey SR, Zakhary R. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998 May;26(2-3):167-75.
110. Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 1):L688-94.
111. Bannerman DD, Tupper JC, Ricketts WA, Bennett CF, Winn RK, Harlan JM. A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):14924-32.
112. Bank U, Reinhold D, Ansorge S. [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method] *Allerg Immunol (Leipz)*. 1991;37(3-4):119-23.
113. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Furlott HG, Hoffstein E, Wakita S, Chapman KR, Szalai JP, Zamel N. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jan;155(1):260-7.

114. McBride WT, Armstrong MA, Gilliland H, McMurray TJ. The balance of pro and anti-inflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) at paediatric cardiac surgery. *Cytokine*. 1996 Sep;8(9):724-9.
115. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F 2nd, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1896-903.
116. Engelberts I, Moller A, Schoen GJ, van der Linden CJ, Buurman WA. Evaluation of measurement of human TNF in plasma by ELISA. *Lymphokine Cytokine Res*. 1991 Apr;10(1-2):69-76.
117. Ida N, Sakurai S, Hosoi K, Kunitomo T. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of interleukin-8 in biological fluids. *J Immunol Methods*. 1992 Nov 25;156(1):27-38.
118. Fisher CJ Jr, Opal SM, Lowry SF, Sadoff JC, LaBrecque JF, Donovan HC, Lookabaugh JL, Lemke J, Pribble JP, Stromatt SC, et al. Role of interleukin-1 and the therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonist in sepsis. *Circ Shock*. 1994 Sep;44(1):1-8.
119. Neuhof C, Wendling J, Dapper F, Bauer J, Zickmann B, Jochum M, Tillmanns H, Neuhof H. Endotoxemia and cytokine generation in cardiac surgery in relation to flow mode and duration of cardiopulmonary bypass. *Shock*. 2001;16 Suppl 1:39-43.
120. Yoza B, LaRue K, McCall C. Molecular mechanisms responsible for endotoxin tolerance. *Prog Clin Biol Res*. 1998;397:209-15.
121. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1995 May 1;181(5):1887-92.
122. Dehoux MS, Hernot S, Asehnoune K, Boutten A, Paquin S, Lecon-Malas V, Toueg ML, Desmonts JM, Durand G, Philip I. Cardiopulmonary bypass decreases cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated whole blood cells: roles of interleukin-10 and the extracorporeal circuit. *Crit Care Med*. 2000 Jun;28(6):1721-7.
123. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM. Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3439-46.
124. Flohe S, Borgermann J, Lim L, Schade FU. Interferon-gamma counteracts reduced endotoxin responsiveness of whole blood following trauma and cardiopulmonary bypass. *J Endotoxin Res*. 2000;6(6):431-6.
125. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg*. 1997 Jan;63(1):277-84.
126. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1996 Dec;62(6):1868-75.
127. Curzen NP, Griffiths MJ, Evans TW. Role of the endothelium in modulating the vascular response to sepsis. *Clin Sci (Lond)*. 1994 Apr;86(4):359-74.
128. Verrier ED, Morgan EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *Ann Thorac Surg*. 1998 Nov;66(5 Suppl):S17-9

129. Cooper WA, Duarte IG, Thourani VH, Nakamura M, Wang NP, Brown WM 3rd, Gott JP, Vinten-Johansen J, Guyton RA. Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2000 Mar;69(3):696-702
130. Kawahito K, Misawa Y, Fuse K. Transient rise in serum soluble Fas (APO-1/CD95) in patients undergoing cardiac surgery. *Artif Organs.* 2000 Aug;24(8):628-31.
131. Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jun;284(6):L899-914.
132. Miller BE, Levy JH. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1997 May;11(3):355-66.
133. Clermont G, Vergely C, de Girard C, Rochette L. [Cellular injury associated with extracorporeal circulation] *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 2002 Jan;51(1):38-43.
134. Serraf A, Sellak H, Herve P, Bonnet N, Robotin M, Detruit H, Baudet B, Mazmanian GM, Planche C. Vascular endothelium viability and function after total cardiopulmonary bypass in neonatal piglets. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Feb;159(2):544-51.
135. Glavind-Kristensen M, Brix-Christensen V, Toennesen E, Ravn HB, Forman A, Sorensen K, Hjortdal VE. Pulmonary endothelial dysfunction after cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002 Aug;46(7):853-9.
136. Hindman BJ, Funatsu N, Cheng DC, Bolles R, Todd MM, Tinker JH. Differential effect of oncotic pressure on cerebral and extracerebral water content during cardiopulmonary bypass in rabbits. *Anesthesiology.* 1990 Nov;73(5):951-7.
137. Akiyama K, Suzuki H, Grant P, Bing RJ. Oxidation products of nitric oxide, NO₂ and NO₃, in plasma after experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Jan;29(1):1-9.
138. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res.* 1999 Mar;41(3):765-72.
139. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999 May 5;1411(2-3):273-89.
140. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Dec 16;181(2):852-7.
141. Leone AM, Gustafsson LE, Francis PL, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Nitric oxide is present in exhaled breath in humans: direct GC-MS confirmation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jun 15;201(2):883-7.
142. Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993 Oct;9(4):371-7.
143. Marczin N, Antonov A, Papapetropoulos A, Munn DH, Virmani R, Kolodgie FD, Gerrity R, Catravas JD. Monocyte-induced downregulation of nitric oxide synthase in cultured aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Sep;16(9):1095-103.
144. Walters CL, Gillatt PN, Palmer RC, Smith PL. A rapid method for the determination of nitrate and nitrite by chemiluminescence. *Food Addit Contam.* 1987 Apr-Jun;4(2):133-40.

145. Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*. 1993 Oct;6(9):1368-70.
146. Brett SJ, Evans TW. Measurement of endogenous nitric oxide in the lungs of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):993-7.
147. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994 Jan 15;343(8890):133-5.
148. Pietropaoli AP, Perkins PT, Perillo IB, Hyde RW. Exhaled nitric oxide does not provide a marker of vascular endothelial function in healthy humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jun;161(6):2113-4.
149. Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet*. 1994 Jan 15;343(8890):146-7.
150. Sartori C, Lepori M, Busch T, Duplain H, Hildebrandt W, Bartsch P, Nicod P, Falke KJ, Scherrer U. Exhaled nitric oxide does not provide a marker of vascular endothelial function in healthy humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Sep;160(3):879-82.
151. Pinsky DJ, Naka Y, Chowdhury NC, Liao H, Oz MC, Michler RE, Kubaszewski E, Malinski T, Stern DM. The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):12086-90.
152. Pinsky DJ, Oz MC, Koga S, Taha Z, Broekman MJ, Marcus AJ, Liao H, Naka Y, Brett J, Cannon PJ, et al. Cardiac preservation is enhanced in a heterotopic rat transplant model by supplementing the nitric oxide pathway. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2291-7.
153. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*. 1994 Oct 21;269(42):26066-75.
154. Persson MG, Lonnqvist PA, Gustafsson LE. Positive end-expiratory pressure ventilation elicits increases in endogenously formed nitric oxide as detected in air exhaled by rabbits. *Anesthesiology*. 1995 Apr;82(4):969-74.
155. Carlin RE, Ferrario L, Boyd JT, Camporesi EM, McGraw DJ, Hakim TS. Determinants of nitric oxide in exhaled gas in the isolated rabbit lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar;155(3):922-7.
156. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, Erzurum SC. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):660-6.
157. Kowaluk EA, Fung HL. Vascular nitric oxide-generating activities for organic nitrites and organic nitrates are distinct. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991 Nov;259(2):519-25.
158. Husain M, Adrie C, Ichinose F, Kavosi M, Zapol WM. Exhaled nitric oxide as a marker for organic nitrate tolerance. *Circulation*. 1994 Jun;89(6):2498-502.
159. Munzel T, Kurz S, Heitzer T, Harrison DG. New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am J Cardiol*. 1996 May 30;77(13):24C-30C.
160. Munzel T, Harrison DG. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med*. 1997 Nov-Dec;75(11-12):891-900.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat szerzője köszönetet mond az alábbi személyeknek a tudományos munka elvégzéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért:

Prof. Dr. Róth Erzsébetnek (PTE ÁOK Sebészeti Oktató és Kutató Intézet, Pécs), PhD programvezetőmnek, aki konzultációk sokaságán hasznos tanácsaival és építő jellegű kritikáival segítette a dolgozat elkészülését,

Dr. Marczin Nándornak (Imperial College of Science, Technology and Medicine, Heart Science Centre, Harefield Hospital, Harefield, UK), igaz barátomnak, akinek egész angliai tanulmányutamat, PhD témaválasztásomat, a metodikák elsajátítását, a kapott eredmények értékelését és publikálását valamint felejthetetlen külföldi kongresszusok élményét köszönhetem,

Dr. David Roystonnak (Department of Anaesthetics, Royal Brompton and Harefield NHS Trust, Harefield, UK) harefieldi klinikai kutatói állásom biztosításáért, kongresszusi részvételeim támogatásáért és a publikációkban nyújtott önzetlen segítségéért,

Ruth E. Bundynak és Dr. Imre Mariannának (Imperial College of Science, Technology and Medicine, Heart Science Centre, Harefield Hospital, Harefield, UK) a laboratóriumi munkák során nyújtott segítségükért,

Családomnak –feleségemnek, **Mariann-nak** és gyermekeimnek, **Zsófinak** és **Bencének**– a dolgozat elkészülésének érdekében hozott áldozatukért.