

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. KÖVESI TAMÁS



Pécsi Tudományegyetem ÁOK
Gyermekegyógyászati Klinika

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit
Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet

2005.

BEVEZETÉS

2003-ban ünnepeltük a kardiovaszkuláris sebészet egyik legjelentősebb vívmányának, az extracorporális keringés (cardio-pulmonalis bypass; CPB) vagy ismertebb nevén a szív-tüdő motor kifejlesztésének 50 éves évfordulóját. Az eljárás új fejezetet nyitott a cardio-pulmonális sebészetben, emellett megteremtette a szív- és tüdő-transzplantáció technikai feltételeit is.

A cardio-pulmonális bypass alkalmazásával végzett „rutin” szívműtétek a szervezet gyulladáshoz vezető folyamatainak aktiválódása révén azonban különböző súlyosságú posztoperatív szövődmények kiváltó okai lehetnek. A citokinek más gyulladáskeltő mediátorokkal együtt meghatározó szereppel bírnak a lokális és szisztémás gyulladáshoz vezető válasz beindításában és lezajlásának dinamikájában. A korai szakban aktiválódó citokinek két jelentős képviselője, a TNF α és az IL-1 β egyrészt direkt mediátorként, másrészt pedig indirekt módon, további gyulladáskeltő citokinek stimulálása révén fejtik ki hatásukat.

Irodalmi adatok szerint a motoros szívműtétek specifikus és nem specifikus citokin-antagonisták képződését is fokozzák, melyek a szervezet védelmét szolgálják a pro-inflammatorikus citokinek hatásának ellensúlyozásával. A szérumban szabad formában megtalálható szolubilis TNF receptorok (sTNF RI és sTNF RII) a TNF-hez kötődve kompetitív módon gátolják annak transzmembrán receptorokhoz történő kapcsolódását. Az IL-1 RI receptor természetes antagonistája (IL-1 ra) az IR-1 RI receptorhoz kötődik, de szignál- transzdukciós biológiai hatással nem rendelkezik.

A vaszkuláris endothelium mint a nyílt szívműtéteket kísérő ártalmak egyik fő támadáspontja meghatározó szereppel bír a posztoperatív ischaemia-reperfúziós sérülések, coagulopathiák vagy a szisztémás gyulladáshoz vezető válasz klinikai-laboratóriumi képeinek alakításában. Emellett az endothelium a szerv-specifikus gyulladáshoz vezető válaszok egyik mediátorként a benne található indukálható gének és enzimek aktivitásán keresztül a posztoperatív szak kimenetelét is befolyásolhatja.

A nitrogén-monoxid szintáz – nitrogén monoxid (NOS – NO) rendszer

A nitrogén monoxid (NO) jelentős élettani szerepet játszik az erek relaxációjának biztosításában, így a pulmonális keringés szabályozásában is. A tüdőerek endothel sejteiben és a légúti epithel sejtekben található NO-synthase (NOS) enzimek folyamatosan szintetizálják a NO-t az L-arginin terminális guanidin csoportjából. 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.

A tüdő különböző eredetű, az ereket és/vagy a légutakat érintő kórfolyamataiban a NO termelése, valamint a képződött NO hatékonysága is jelentősen változhat. A gyulladásos folyamatokban a pro-inflammatorikus citokin rendszer aktivációja képes az indukálható enzimek, így a NOS aktivitásának növelésére is, de a mRNS destabilizálásával gátolhatják is az endothelialis NOS aktivitását.

A hemoxigenáz – szénmonoxid (HO – CO) rendszer

A hemoxigenáz enzim három ismert izoformja közül a HO-1 számos stimulus által (hypoxia, hyperoxia, cytokinek, endotoxin, UV-sugárzás, nehézfémek, stb.) indukálható, és cytoprotektív molekulaként fontos szerepet játszik a sejtek oxidatív károsodásának kivédésében. Az enzim által termelt szénmonoxid alacsony (0.01% alatti) koncentrációban a NO-hoz hasonlóan a guanil-cikláz - cGMP út aktiválásával a vazomotor tónus szabályozásában játszik szerepet, valamint a trombocytaktiválódás- és aggregáció gátlása révén anti-inflammatorikus hatással rendelkezik. In vitro és in vivo kísérletek egyaránt igazolták az alacsony koncentrációban adott CO protektív hatását hyperoxia vagy bakteriális lipopolyszaccharid (LPS) -indukált endotoxémia által kiváltott gyulladás esetén.

A légúti nitrogén-monoxid és szénmonoxid koncentráció meghatározására kifejlesztett műszerek fejlődésével a kilégzett NO és CO szintjeinek változása a tüdőt érintő akut és krónikus gyulladásos folyamatok nyomkövetésének egyik új eszközévé válhatott.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Motoros szívműtéteket követően a korai posztoperatív szakban megjelenő pro-inflammatorikus cytokinek, valamint azok ellenregulátoraiként szereplő specifikus anti-inflammatorikus mediátorok abszolút szintjeinek mérése, a kapott adatok összehasonlítása a műtét előtti alapértékekkel. A gyulladásos válasz két ellentétes oldalának arányával kifejezhető nettó gyulladásos egyensúly változásának összevetése a posztoperatív szak alakulásával és esetleges műtét utáni szövődmények megjelenésével.

2. Humán vaszkuláris (aorta és artéria pulmonalis) endothelsejt alapú in vitro bioassay segítségével a gyulladáskeltő cytokinek 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.

3. Irodalmi adatok szerint az akut gyulladásos 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 cytokin egyensúly által okozott pulmonális gyulladásos válasz in vivo megközelítése a perioperatív időszak több pontján mért szénmonoxid, valamint bazális (epitheliális) és exogén NO donor adásával indukált (endotheliális) légúti nitrogén monoxid koncentrációk mérésével.

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

Vizsgálataink célja coronaria helyreállító műtétek kapcsán gyulladáskeltő cytokinek és specifikus antagonistáik plazmaszintjeinek, illetve a gyulladással járó választ két ellentétes oldalának arányával jellemezhető nettó gyulladással járó egyensúly alakulásának mérése volt a pre- és posztoperatív szakban. Az in vivo kapott cytokin választ összehasonlítottuk a betegek vérének natív és bakteriális LPS-indukált in vitro cytokin változásokkal.

Módszerek

A kórház etikai bizottságának engedélyével, részletes beteg tájékoztatás és írásos beleegyezés után 18 betegtől vettünk 40 ml vért a centrális vénás kanülon keresztül a szív-műtét kezdete előtt, illetve 6 órával a cardio-pulmonális bypass befejezése után egyes cytokinek és antagonistáik abszolút és relatív plazmaszintjeinek meghatározására. Az első időpontban levett vérminta képezte azt a kiindulási értéket, amelyekhez a nyílt szív-műtét/CPB által kiváltott hatásokat viszonyítottuk. Méréseinkhez a vérekből centrifugálással szeparált plazmát használtuk.

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 °C -n a centrifugálás és cytokin meghatározások előtt.

A gyulladással járó választ pozitív kontrolljaként minden vérvétel alkalmával egy-egy 5 ml-es vérmintát növekvő koncentrációjú (1, 10, 100, 1000 ng/ml) LPS-sel inkubáltunk 6 órán keresztül 37 °C -n a plazma szeparálása és a cytokinek koncentrációjának mérését megelőzően.

A TNF α és IL-1 β cytokinokat és modulátoraikat (sTNF RI, sTNF RII és IL-1ra) a plazmából specifikus kvantitatív enzim immunoassay módszerrel (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; Quantikine, R&D) határoztuk meg.

Eredmények

TNF α

TNF α a műtét előtt a betegek nagy részénél (n=13) nem volt detektálható, de CPB után 6 órával is mindössze 6 betegben kaptunk mérhető TNF α koncentrációt (ns). A CPB előtt levett vérminták natív inkubálása a TNF α koncentrációját mindegyik mintában a mérhető tartományba emelte, az LPS-sel történő inkubálás további, akár többszázszoros TNF α növekedését váltott ki. A műtét előtti vérekkkel ellentétben a CPB után levett mintákban a natív módon történő inkubálás hatására nem tapasztaltunk jelentős TNF α emelkedést. LPS stimulálás e csoportban is a TNF α plazmakoncentráció növekedését okozta, ám ez – a natív mintákhoz hasonlóan - a preoperatív eredményekkel összehasonlítva szignifikánsan kisebb mértékű maradt (p<0.05).

IL-1 β

IL-1 β sem a műtét előtti, sem a posztoperatív mintákban levett vérminták nagy részében nem volt kimutatható. A preoperatív vérminták 6 órás natív inkubálása az IL-1 β szintek növekedését okozta, míg LPS-indukció az IL-1 β koncentráció további mintegy százszoros emelkedését eredményezte. A posztoperatív minták LPS stimulálása által kiváltott IL-1 β koncentrációnövekedés mértéke – a TNF α mérések eredményeihez hasonlóan – elmaradt a CPB előtti vérmintáknál mért hasonló értékeknél.

Solubilis TNF receptorok

A solubilis TNF RI és RII plazmaszintek a TNF α -val ellentétben a preoperatív mintákban is mérhetőek voltak, CPB után 6 órával pedig további szignifikáns emelkedést mutattak. Az in vitro inkubálás natívan, illetve LPS hozzáadása után nem okozott szignifikáns változást sem a műtét előtti, sem a műtét utáni mintákban.

Receptor antagonisták

Az IL-1ra a CPB utáni mintákban a preoperatív állapothoz képest jelentősen emelkedett. A műtét előtti vérminták 6 órás natív in vitro inkubálása az IL-1ra szintet kis mértékben, LPS jelenlétében viszont közel tízszeresére emelte. A posztoperatív

natív és indukált mintákban nagy egyéni variabilitás mellett ugyancsak az IL-1ra koncentrációk növekedését figyelhettük meg.

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

A műtétet megelőzően az anti-inflammatorikus sTNF RI és sTNF RII plazmakoncentrációinak aránya több mint két nagyságrenddel meghaladta a TNF α koncentrációját. CPB után 6 órával ez az arány tovább növekedett a sTNF RI és sTNF RII receptorszintek emelkedése miatt. Míg a műtét előtti vérminták 6 órás inkubálása a TNF α szintjének emelkedése miatt az arány csökkenéséhez vezetett, CPB után a két oldal egymáshoz viszonyított nagysága jelentősen nem változott. A minták LPS-sel történő aktiválása a CPB előtti és a CPB utáni vérmintákban egyaránt jelentős változást eredményezett: az indukció hatására a TNF α többszázszoros emelkedése az arány megfordulásához vezetett.

IL-1ra : IL-1 β moláris arányok

Az IL-1ra : IL-1 β moláris aránya a műtét előtt levett vérekben jelentős anti-inflammatorikus túlsúlyt mutatott, ez a CPB után 6 órával további nagyságrendekkel növekedett. A preoperatív 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 (átlagban ötszörösére) csökkentette. A CPB utáni minták natív inkubálása mintegy tizedére csökkentette ugyan a gyulladással válasz két oldalának arányát, amely azonban még így is komoly, több mint 500-szoros IL-1ra túlsúlyt mutatott. LPS hozzáadása a pro-inflammatorikus cytokin oldal emelésével ugyan az arány csökkenéséhez vezetett (átlagban 36-szoros), de az IL-1ra relatív túlsúlya fennmaradt és nem következett be a TNF α kapcsán megfigyelt fordított viszony.

Új megfigyelések

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 gyulladós folyamatok kivédésére és a szervkárosodások megelőzésére. Bár mind a pro-, mind pedig az anti-inflammációs cytokinek szérum szintjeinél jelentős egyéni eltérések voltak mérhetőek, ez a variabilitás posztoperatív gyulladós válasz kialakulását és a posztoperatív szak kimenetelét beteganyagunkban nem befolyásolta.

2. Igazoltuk, mások eredményeitől eltérően, hogy CPB-vel végzett nyílt szívműtétek nem jártak a posztoperatív szisztémás gyulladós válaszáért felelős pro-inflammatorikus cytokinek szérum szintjének szignifikáns emelkedésével. Az anti-inflammatorikus oldal esetenként jelentősebb emelkedése az ellentétes hatású folyamat, a gyulladás elleni védelem további erősödését mutatta.

3. A CPB után in vivo elmaradt gyulladós válasszal 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).

PRO-INFLAMMATORIKUS CYTOKINEK ÉS SZÍVMŰTÉTEN ÁTESETT BETEGEK SZÉRUMÁNAK HATÁSA HUMÁN VASZKULÁRIS ENDOTHELSEJTEKRE

Kísérleteink során a TNF α és IL-1 β cytokinek valamint az LPS humán endothel-sejt tenyésztetre kifejtett hatását figyeltük meg. A kapott adatokat párhuzamba állítottuk a betegek műtét előtti és utáni natív, illetve LPS-indukált vérplazmájának hatásával.

Módszerek

A vizsgálatok során használt humán aorta és artéria pulmonális endothel-sejteket szívtranszplantációk során beültetésre került donor szerv kis darabjának eltávolításával nyertük. Az endothel-sejtek izolálás és tisztítás után zselatinnal bevont tégelybe kerültek, ahol a sejtek növekedését elősegítő tápoldatban 5-7 napon belül konfluenssé váltak. A sejtenyészetek életképességének megtartására a sejteket 8-10 naponta az edény faláról trypsin/EDTA oldattal történő leválasztottuk, majd mosás, centrifugálás és reszuszpendálás után 3 új tégelybe szélesztettük.

A kísérletekhez 3 különböző donorból izolált, legfeljebb 10 alkalommal újraszélesztett endothel-sejteket használtunk. A sejtenyészetek endothel karakterét a kísérletek előtt részben mikroszkópos képük alapján, részben immuncytokémiai próbával azonosítottuk.

Apoptózis bioassay

A pro-inflammatorikus cytokinek illetve az LPS endothel-sejt morfológiára és életképességére gyakorolt hatásának lemérésére a humán aortából tenyésztett endothel-sejteket cycloheximidet (CHX) tartalmazó tápoldatban vagy a nélkül 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-assay segítségével határoztuk meg.

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

Eredmények

Cytokinek cytotoxikus hatása

Cycloheximid (CHX) 10 μ M hozzáadása nélkül a TNF α az endothel-sejtekben sem látható morfológiai, sem MTT-vel kimutatható funkcionális károsodást nem okozott.

Cycloheximid jelenlétében a gyulladáskeltő faktorok sejtkárosító 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 felületének megváltozott, az összefüggő endothel monolayer feltöredezett és egyes sejtek elváltak az alapjuktól. A sejtek 6 órás inkubálása növekvő koncentrációjú TNF α -val vagy IL-1 β -val a sejtek életképességének koncentrációfüggő csökkenéséhez Endotoxin (LPS) expozíció hatására a koncentráció-dependens válasz csak magasabb (10 ng/ml) koncentrációkban jelentkezett.

Az a megfigyelésünk, hogy a sejtek életképességének csökkenése caspase-inhibitorral kivédhető volt, a folyamat apoptotikus jellegét bizonyította.

Natív humán szérum cytotoxikus hatása

Eredményeink a műtét utáni mintáknál egyéneként 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%-ra csökkentette. Az egyes betegek adatait individuálisan értékelve a kiváltott apoptózis mértéke 0 – 32% között változott.

LPS-stimulált vér szérumának cytotoxikus hatása

A bakteriális endotoxin in vitro közvetlen sejtkárosító hatása csak magas (10 ng/ml feletti) koncentrációnál jelentkezett, az ennél in vivo kisebb vérszinteknél az

LPS erős gyulladáskeltő hatása a vérben indirekt úton, a leukocyta/monocyta sejtek aktiválásával és gyulladáskeltő cytokinek szintézisének indukcióján keresztül érvényesült. Modellünkben azt vizsgáltuk, hogy a vér CPB előtti és utáni eltérő pro- és anti-inflammatorikus komponensei mennyiben befolyásolják az LPS indirekt hatását.

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.

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 tartományban is, ahol direkt LPS hatást már nem láttunk. A sejtek életképességének csökkenése a 6 órás inkubálás során a 3. és az 5. óra között következett be.

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. 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). Megfigyeltük, hogy a posztoperatív szérumok által indukált endothel-sejt apoptózis mindegyik LPS koncentráció esetén kisebb mértékű volt ($p < 0.05$).

Új megfigyelések

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

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

A pulmonális endothel és a légúti epithel sejtekben termelődő nitrogén monoxid (NO) a pulmonális vazodilatatív hatása révén fontos élettani szerepet játszik a kisvérköri keringés szabályozásában. Tanulmányozásánál a vérből történő direkt meghatározást nehezítette a NO folyadékfázisban jellemző instabilitása, rövid felezési ideje. Annak felismerése, hogy a szervezetben termelődött NO egy része a tüdő légterében, stabil gáz formájában megjelenik, lehetővé tette a NO keletkezés és felhasználódás dinamikájának tanulmányozását. A légutakban mérhető NO folyamatos termeléséért elsősorban a bronchioláris epithel sejtek II. típusú NOS enzime felelős, a vaszkuláris endothelben működő eNOS által termelt NO koncentrációja nagyságrendekkel alacsonyabb. Így a kilégzett NO döntően az epitheliális NO képződés-felhasználás dinamikáját tükrözi, elfedve a vaszkuláris NO szintézis és metabolizmus történéseit.

Az endotheliumban végbemenő NO termelés felerősíthető a vaszkuláris endotheliumban metabolizálódó exogén NO donor (glicerin trinitrát; GTN) alkalmazásával. 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.

Munkánkban a szív-tüdő motorral végzett szívsebészeti műtétek következtében kialakuló funkcionális tüdőkárosodás mértékét vizsgáltuk a légúti NO szinteknek a pre- és a posztoperatív időszak több pontján történő regisztrálásával. Az alapméréseken túl GTN alkalmazásával módunk nyílt a légúti epithel és a pulmonális vaszkuláris endothel történéseinek egymástól elkülönített elemzésére.

Módszerek

A klinikai gyakorlatban is használható NO analizátorok működése a gáz fázisban lévő NO mérésére a kemilumineszcia elvén alapul, melynek előnye, hogy a mérési adatokat a szöveti homeosztázis (pH, hőmérséklet) változása nem befolyásolja. A gyors reakcióidejű, érzékeny analizátorok kifejlesztésével lehetővé vált a kilégzett NO szintjének légvételről-légvételre történő folyamatos regisztrálása. A legújabb, nagy érzékenységgű és rövid reakcióidejű mérőműszerek áramlás- és nyomásmérővel rendelkeznek, és a NO mellett CO és CO₂ regisztrálására is képesek.

Kórházi etikai bizottsági engedély és a betegektől kapott írásos beleegyezés birtokában a kilégzett nitrogén monoxid koncentrációjának légzésciklusonkénti online mérését a szívűtethez elaltatott, intubált, lélegeztetett betegeken Logan LR2500 Multi-gas Analyser (Logan Research Ltd, Rochester, U.K.) műszerrel végeztük, a NO mellett CO és CO₂ egyidejű regisztrálásával. Az endotracheális tubus belsejébe vezetett és annak disztális végéig érő vékony Teflon mintavevő cső biztosította, hogy a vett gázminta elsősorban az alsó légutakból származzon. Mivel a detektált gázok koncentrációja a termelés-elimináció dinamikáján kívül a beállított lélegeztetési paraméterek függvénye, 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 kilégzésvégi nyomás (PEEP).

A méréseket minden betegnél a perioperatív időszak ugyanazon három pontján, a műtétek kezdete előtt, valamint a CPB után 1 és 3 órával végeztük el. Az alapmérések után a betegeknél emelkedő koncentrációban 1, 2 és 3 µg/testsúly kg glycerin trinitrate bolus injekciót adtunk a centrális vénás kanülön keresztül. A légúti NO értékek regisztrálása után a következő bolus GTN adás előtt megvártuk azt az időt, amíg a kilégzett gázok és a hemodinamikai paraméterek egyaránt visszatértek az alapértékekhez.

A CPB befejezése után 1 és 3 órával elvégzett bazális, illetve GTN-indukált légúti NO méréseink a preoperatív protokollal megegyező módon történtek.

Eredmények

A műtétet megelőző mérések során CO és NO a kilégzett levegőben mindegyik betegnél detektálható volt a CO₂ görbével megegyező irányú, tehát a kilégzési fázisban emelkedő jellegzetes hullámforma képében.

A műtét előtt mért légúti CO koncentráció a ppm (pars per million) tartományban volt, 10.4 ± 1.2 ppm középpértékkel. A kilégzett CO értékekben a preoperatív alapértékekhez viszonyítva a CPB után 1 és 3 órával végzett méréseink során nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

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, CPB után 1 órával 12.5 ± 2.4 ppb, 3 órával a bypass után pedig 12.2 ± 2.3 ppb volt. A NO számított középpértékeinek átlaga a műtét előtti értékekhez viszonyítva ugyancsak nem változott számottevően a CPB utáni mérések alkalmával.

Exogén NO donor GTN intravénás bólus injekciók hatására a légúti NO értékek gyors, átmeneti és a beadott GTN dózistól függő emelkedését tapasztaltuk. 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 légzésciklus (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 változtak, ami a bazális NO szinthez viszonyítva 31, 56, illetve 64% -os növekedésnek felelt meg.

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. Az egyidejűleg regisztrált CO₂ koncentrációk nem különböztek a műtét előtt regisztrált értékektől, ami a lélegeztetési paraméterek változatlan voltára utalt. Így valószínűsíthettük, hogy a csökkent NO-válasz a vaszkuláris endotheliumnak a szív-műtét és/vagy a CPB következtében jelentkező átmeneti funkciózavarát tükrözte.

Új megfigyelések

1. Szívműtétek során, a perioperatív időszak több pontján végzett légúti méréseinkkel beteganyagunkban sem az indukálható HO – CO rendszerben, sem az irodalmi adatok alapján döntően epitheliális eredetűnek iNOS - NO rendszerben nem tudtunk enzimindukciót kimutatni; a műtét/CPB után mért kilégzett CO és bazális NO értékek a CPB előtti mérési adatokkal összehasonlítva nem mutattak szignifikáns változást.

2. Külső NO-donor parenterális adásának hatására a kilégzett levegőben az endotheliális indukált NO koncentrációk CPB után tapasztalható szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető, ami a vaszkuláris endothel feltehetően ischaemia-reperfúziós eredetű átmeneti károsodását mutatta.

**SYSTEMIC AND PULMONARY INFLAMMATORY RESPONSE ASSOCIATED WITH
OPEN HEART SURGERY INVOLVING CARDIO-PULMONARY BYPASS;
CHANGES IN CYTOKINE BALANCE AND PULMONARY FUNCTION**

INTRODUCTION

Year 2003 celebrated the 50th anniversary of the development of cardiopulmonary bypass (CPB) technology that has been one of the greatest advancements in cardiovascular surgery, and also established the technical background of heart and lung transplantation.

However, routine cardiac operations involving cardio-pulmonary bypass are often associated with postoperative complications related to blood contact with foreign surface and resultant activation of blood leukocytes and pro-inflammatory cytokines collectively termed systemic inflammatory response (SIRS). Cytokines play a critical role as signalling molecules that set off, intensify, and terminate local and systemic inflammatory responses. Among these proteins, tumour necrosis factor (TNF α) and interleukin-1 (IL-1 β) are particularly important since they can be stimulated by a broad spectrum of stimuli, and are able to act on a large number of effectors.

According to numerous studies, specific and non-specific cytokine antagonists have also been described in the plasma of patients undergoing coronary surgery providing potential mechanisms for limiting the biologic effects of pro-inflammatory cytokines. Soluble TNF receptors bind TNF in the plasma and thus preclude it from binding to its transmembranous receptors, while IL-1 receptor antagonists occupies IL-1 receptors without any signal-transduction effect.

The vascular endothelium is known to be one of the main targets of postoperative ischaemia-reperfusion injuries, coagulopathies or systemic inflammatory responses. On the other hand, acting as a mediator organ it alters the postoperative outcome of cardiac patients through inducible genes and enzymes located in the endothelium.

Nitric Oxide (NO) plays an important role in both the physiological control of lung function and in the pathophysiology of several lung diseases. Pulmonary vascular endothelial cells and airway epithelial cells continuously generate NO from the terminal guanidino group of the amino acid L-arginine, the physiological precursor of NO by the action of NO synthases. In the lung NO acts both directly and through the soluble guanyl cyclase – cyclic GMP pathway. As endogenous production of NO can be detected and monitored in the exhaled air, it has become a valuable diagnostic and monitoring tool in chronic lung pathologies.

It is widely accepted that two prominent cytokine- responsible pathways are the inducible NO and HO-CO system. These pathways are up regulated with increased generation of the products of these inducible enzymes in both systemic and local pulmonary inflammation. Thus, exhaled NO is increased in models of septic shock and in critically ill patients with ventilator associated pulmonary infections.

Out of three known isoforms of heme oxygenase enzymes HO-1 is inducible by a broad spectrum of stimuli like hypoxia, hyperoxia, cytokines, endotoxins or UV-radiation. Similarly to NO, CO in low concentrations (below 0.01%) acts through the soluble guanyl cyclase – cyclic GMP pathway regulating the vasomotor tone, and has anti-inflammatory properties. Exhaled CO has also been suggested as marker of pulmonary inflammation in critically ill patients.

AIMS

1. *Measuring the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients' plasma before and after routine cardiac surgery involving cardiopulmonary bypass. Establishing the net inflammatory balance represented by the relationships between ratios of pro- and anti-inflammatory mediators and their physiological significance in contributing to systemic vasodilatation and pulmonary dysfunction routinely associated with cardiac surgery.*
2. *Our aim was to clarify the influence and final physiological consequences of the exact cytokine balance or imbalance associated with cardiac surgery in human vascular endothelial by utilising endothelial cell-based in vitro bioassays where endothelial cell activation and apoptosis could be monitored in response to plasma from patients undergoing coronary operations.*
3. *Vast amounts of data indicate that pro-inflammatory conditions effectively up regulate the inducible NO and heme oxygenase (HO) systems leading to increased production of NO and carbon monoxide (CO), respectively. On the basis of recent recognition of measurement techniques and diagnostic acceptance of these molecules in the exhaled breath as measure of pulmonary inflammation, we reasoned that monitoring exhaled NO and CO in patients undergoing open heart surgery would be another way to evaluate in vivo consequences of net cytokine imbalance.*

CYTOKINE BALANCE IN PATIENTS UNDERGOING ROUTINE CARDIAC SURGERY UTILISING CARDIO-PULMONARY BYPASS

Methods

40 ml venous blood was collected from each patient pre CPB following placement of central venous catheter (control) and 6 hr after initiation of CPB.

To study whether plastic “foreign” surface can result in increased cytokine activity on it’s own one aliquot of blood from each blood sample was incubated for 6 hrs at 37⁰C in a sterile plastic tube. As a positive control for surgery/CPB-induced inflammatory response, aliquots of blood were spiked with increasing concentrations of LPS (1, 10, 100, 1000 ng/ml) and were incubated for 6 hrs at 37⁰C, prior to obtaining LPS-stimulated plasmas.

Individual cytokines and their respective modulators were assayed in patient plasma using the specific quantitative enzyme immunoassay ELISA for IL-1 β , IL-1ra, TNF α or sTNF RI and RII.

Results

TNF α

TNF α levels at baseline were below the sensitivity of the immunoassay in the majority of the patients. TNF α levels did not increase in all but two patients 6 hours after CPB to the detectable range. When pre and post CPB blood samples were incubated for an additional 6 hours in vitro, interestingly, this further incubation increased TNF α levels about 10 times. Inclusion of LPS (1ng/ml) produced a tremendous further increase in immunogenic TNF α in pre CPB whole blood. This stimulatory effect of LPS was less when post CPB (obtained 6 hours after CPB) whole blood was incubated with LPS in vitro ($p < 0.05$).

IL-1 β

Similarly to TNF α , IL-1 β levels were detectable only in a minority of patients prior to surgery and CPB, and as a group did not show any significant increase after

CPB. Similarly to $TNF\alpha$, the 6-hour *in vitro* incubation significantly elevated IL-1 β levels both in the pre and to a lesser degree in the post CPB blood even in the absence of LPS. LPS stimulation produced more than hundred fold increase in IL-1 β . Treatment of post CPB blood with LPS under identical conditions increased IL-1 β levels to a lesser degree ($p < 0.05$).

Soluble TNF receptors

Levels of the sTNF RI and sTNF RII were detectable in the nanogram range in all patient, which increased significantly 6 hours after CPB ($p < 0.05$). Further incubation of any of the patient's whole blood either in the presence or absence of LPS did not appear to change sTNF RI and sTNF RII receptor levels.

Receptor antagonists

IL-1ra levels after CPB were 10-90 fold higher than their respective pre CPB value in nearly all individual patients. Treatment of pre CPB whole blood with LPS significantly increased IL-1ra levels about ten fold. LPS also had a small incremental effect in increasing IL-1ra levels in the post CPB which already contained high levels of this protein.

sTNF RI : $TNF\alpha$ és sTNF RII : $TNF\alpha$ molar ratios

Molar plasma concentrations of both sTNF RI and II were at least two orders of magnitude higher than corresponding concentrations of TNF providing a median ratio of 449 for sTNF RI/TNF and 465 for sTNF RII/TNF. These molar ratios increased further 6 hours after CPB due to increase in sTNF RI and RII over TNF. These ratios decreased following *in vitro* incubation of pre CPB whole blood even in the absence of LPS because the increase in TNF was more prominent than the increase in sTNF RI and RII. LPS activation dramatically reduced these ratios producing a situation where concentrations of TNF now exceeded the concentration of sTNF RI and RII by an order of magnitude. Similar changes were seen in the post CPB blood, although the effects of *in vitro* incubations were less pronounced.

IL-1ra : IL-1 β molar ratios

Analyses of the molar ratios reveals a 350 fold pre-dominance of IL-1ra over IL-1 β before CPB. This ratio increased tremendously following CPB although individual patients exhibited more than an order of magnitude variability. In sharp contrast to the *in vivo* data, the whole blood *in vitro* assay produced decreases in these ratios due to predominant stimulated release of IL-1 β over IL-1ra. In the presence of LPS, this ratio decreased to 5 and 36 in the pre and post CPB samples, respectively ($p < 0.05$)

New observations

1. We demonstrated that the patients present for cardiac surgery with huge molar excess of anti-inflammatory cytokines. On the basis of these calculations there were more than 800 circulating sTNF RI and sTNF RII molecules for every molecule of TNF. Similarly to the TNF pathway, there was a 400 fold molar excess of IL-1ra over IL-1 β . These observations suggest that the plasma of patients presented for open-heart surgery is equipped with a formidable repertoire to attenuate pro-inflammatory cytokine action, representing a tremendous physiologic reserve that might have the capacity to prevent widespread organ damage after heart operations.
2. Our data do not support the hypothesis that surgery/CPB up regulates the early response pro-inflammatory cytokines creating a pro-inflammatory imbalance in the plasma. Instead, our results substantiate previous observations regarding anti-inflammatory response to coronary surgery and/or CPB, involving soluble inhibitors of TNF and the soluble receptor antagonist of IL-1. In contrast to anti-inflammatory events, there was no evidence for statistically significant increases in either TNF or IL-1 concentrations at any time points following CPB when compared to pre-surgery levels.
3. In contrast to our *in vivo* results under our experimental conditions (6 hours incubation at 37° C in sterile plastic tube) we have found consistent increases in both IL-1 and TNF concentrations causing reduced anti/pro-inflammatory ratios when compared to levels prior to these incubations in the native plasma. Thus, prolonged exposure of the stagnant whole blood to foreign plastic surface readily activated blood

cells to release these cytokines under the conditions of the experiment. In response to LPS the observed increase of IL-1 and TNF release was significantly less in the postoperative samples (endotoxin tolerance).

INFLUENCE OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AND PATIENT'S PLASMA ON HUMAN VASCULAR ENDOTHELIAL CELL DEATH

In this section we compared the influence of TNF α and IL-1 β cytokines and bacterial LPS to patient's native and LPS-induced plasma before and after CPB on human endothelial cells in culture. Our major aim was to elucidate whether routine cardiac surgery involving CPB causes any imbalance of pro/anti-inflammatory and pro-apoptotic/cytoprotective bioactivities in the blood of patients that alters the viability of human vascular endothelial cells.

Methods

Human aortic (HAEC) or pulmonary artery endothelial cells (PAEC) were isolated from the aortic or pulmonary artery trimmings from heart and heart/lung donors. For experiments cells were seeded into 24 well plates and allowed to grow to 80% confluence. Endothelial cells were identified by their characteristic monolayer appearance and by immunocytochemical staining.

Apoptosis bioassay

In order to assess the direct influence of cytokines and LPS on endothelial cell morphology and viability, human aortic endothelial cells were treated in the absence or presence of cycloheximide (10 μ M) with increasing concentrations of TNF, IL-1 β and LPS for 6 hours. The effects of single cytokines were compared to native patient plasma obtained before and after CPB or to serial dilutions of plasma of LPS stimulated whole blood obtained before and after CPB. At the end of the incubation period cells were assessed for morphological criteria of apoptosis using phase contrast microscopy and for viability using the MTT assay. The role of apoptosis in endothelial cell injury was tested by investigating the role of endogenous caspases in mediating decreased viability. This was achieved by incubating the cells in the absence or presence of the cell-permeable peptide, z-VAD, a highly specific caspase inhibitor and by assessment of its influence on cytokine- and plasma-induced cell death.

Results

Cytokine-induced endothelial apoptosis in sensitised cells

In the absence of cycloheximide, there was no obvious morphological change observed in human aortic endothelial cells treated with TNF, IL-1 and LPS and there was no change in cell viability as assessed by the MTT assay. In the presence of CHX, the TNF induced cell activation and induction of cell death was unmasked, showing a concentration-dependent inhibition in cell viability over 6 hours. Similar concentration-dependent decreases in cell viability and morphological changes were observed with IL-1. LPS only caused cytotoxicity at concentrations higher than 10 ng/ml. The decrease in viability and apoptotic morphology exhibited by the endothelial cells was inhibited by ZVAD.

Influence of patient plasma samples on HAEC apoptosis

There was a small and variable degree of reduction in HAEC viability in response to post CPB plasma when compared to the appropriate pre CPB plasma samples. In contrast, significant bioactivity to cause endothelial cell death was observed in the plasmas obtained from the LPS-stimulated whole bloods. This activity was present even at 1:100 fold dilutions of the LPS-stimulated plasmas. Again, ZVAD completely prevented HAEC cytotoxicity induced by all LPS-activated plasma samples.

Finally, we compared the influence of LPS on the pre and post CPB blood samples. Although LPS produced a concentration dependent cytotoxic activity in both the pre- and post-CPB whole blood, cytotoxicity induced by the post CPB plasmas was significantly less at all LPS concentrations.

New observations

1. Using human endothelial cells in vitro bioassay we failed to demonstrate severe cytotoxic activity in patients' plasma after routine cardiac surgery utilizing CPB. On the other hand, concentration-dependent cytotoxic/apoptotic activity induced by bacterial LPS was significantly less in the post CPB plasmas than in the preoperative samples.

BASAL AND NITROGLYCERIN-INDUCED EXHALED NITRIC OXIDE IN OPEN-HEART CARDIAC SURGERY

Nitric Oxide (NO) plays an important role in both the physiological control of lung function and in the pathophysiology of several lung diseases.

As endogenous production of NO can be detected and monitored in the exhaled air it has become a valuable diagnostic and monitoring tool in acute and chronic lung pathologies. Previous studies suggest that expired NO is mainly of airway epithelial rather than of vascular endothelial origin, what would mean that altered pulmonary microvascular function might not be reflected by a change in expired NO.

However, endogenous NO pathways can be augmented by administration of NO donors, such as nitroglycerin (GTN), which elicits its biological effect by NO release mediated by thiol-dependent enzymatic biotransformation in the pulmonary microvasculature. NO then diffuses into the alveolar space, giving measurable rise to exhaled NO. On the basis of these considerations, GTN-induced exhaled NO might be a useful tool to monitor metabolic function of pulmonary microvasculature.

The aim of this study was to clarify the characteristics of NO in the expired air in the setting of routine open-heart surgery utilizing CPB. In addition we contrasted airway epithelial mechanisms (reflected as basal exhaled NO) to vascular events (judged by exhaled NO responses following intravenous administration of GTN).

Methods

Breath to breath measurements of NO concentrations in the lower airways were performed using a real-time, computer-controlled and integrated system (LR2000 series, Logan Research Ltd.). Inspired and expired samples for analysis of NO, CO and CO₂ were continuously withdrawn directly from the main lower airways through a thin Teflon sampling tube. Since detected concentration of exhaled gases depends on both the production rate and ventilation parameters, ventilation was standardized for inspired gas (100% O₂), tidal volume (5 ml/kg), respiratory rate (10/min), inspiratory and expiratory ratio (1:3) and PEEP set to zero.

Baseline measurements were performed prior to CPB to evaluate endogenous levels of exhaled NO. After the baseline measurements, three increasing boluses of 1,

2 and 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ GTN were administered to the patient via the central venous catheter with exhaled NO response recorded. The similar protocol was repeated 1 and 3 hours after CPB.

Results

In all patients NO was detectable in the exhaled air before CPB as a characteristic oscillating signal, which appeared to increase with expiration as judged by the CO_2 .

Basal (endogenous) exhaled NO levels and exhaled CO levels remained unchanged 1 and 3 hours after CPB.

Intravenous bolus administration of 1, 2 and 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ GTN resulted in a rapid, transient and dose-dependent increase in exhaled levels of NO. The time between administration of GTN bolus and detectable rise in exhaled NO was about 10-12 seconds and lasted for only a couple of breathe cycles.

There were characteristic changes in GTN-induced response in exhaled NO after CPB. The dose-dependent increases in exhaled NO by GTN were significantly smaller at 1 hour and 3 hours after CPB when compared to levels measured before CPB. As an internal control, we analysed the CO_2 output data to ensure that the changes regarding GTN-induced exhaled NO post CPB was not due to changes in exhalation profiles. This analysis reveals that baseline peak exhaled CO_2 was similar before, 1 and 3 hours after CPB and similarly, end tidal CO_2 remained the same for each respective GTN boluses before and after CPB.

New observations

1. *While basal NO production mainly of epithelial origin remained unchanged in the perioperative period, our results indicate attenuation of the metabolic activity of lungs to increase exhaled NO in response to intravenous GTN following CPB, suggesting a degree of selective microvascular injury even in routine open-heart surgery.*

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 nitroglicerín-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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezés 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 az értekezés 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** – az értekezés elkészülésének érdekében hozott megértésükért.

Az értekezést szüleim emlékének ajánlom.