

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wpływ śródoperacyjnej podaży tlenu azotu na przebieg
odpowiedzi zapalnej
w trakcie leczenia wad wrodzonych serca u dzieci.

Wojciech Stycuła

Promotor: Dr hab. n. med. Jacek Kołcz

Pracę wykonano w Klinice Kardiologii Dziecięcej Instytut Pediatrii UJ CM

Kierownik: prof. dr hab. Janusz Skalski

Badanie finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki– K/POB/000073 oraz z grantu statutowego -K/ZDS/003727 i objęte jest zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego –KBET/176/B/2010.

Kraków, 2017

Serdecznie dziękuję promotorowi Dr hab. Jackowi Kołczowi.

*Bardzo dziękuję panu Profesorowi Januszowi Skalskiemu za
umożliwienie realizacji projektu w Klinice Kardiologii
Dziecięcej.*

1. SKRÓTY	5
2. WSTĘP	6
2.1. Zaburzenia patofizjologiczne wywoływane przez wady wrodzone serca	9
2.2. Aspekty kliniczne odpowiedzi stresowej	11
2.3. Leczenie chirurgiczne wad wrodzonych serca	13
2.3.1. <i>Elementy układu krążenia pozaustrojowego</i>	14
2.3.2. <i>Prowadzenie krążenia pozaustrojowego</i>	17
2.4. Efekty krążenia pozaustrojowego stosowanego podczas korekcji wad wrodzonych serca	18
2.4.1. <i>Uogólniona odpowiedź zapalna (SIRS)</i>	18
2.4.2. <i>Zmiany układowe i narządowe</i>	23
2.5. Strategie ograniczające odpowiedź zapalną stosowane w trakcie krążenia pozaustrojowego	26
2.6. Tlenek azotu i jego rola w leczeniu wad wrodzonych serca	29
3. ZAŁOŻENIA	32
4. CEL PRACY	33
5. MATERIAŁY I METODY	34
5.1. Charakterystyka badanej grupy	34
5.2. Metody operacyjne. Protokół znieczulenia	35
5.3. Metody laboratoryjne	39
5.3.1. <i>Półilościowe wyznaczenie profilu czynników związanych z odpowiedzią zapalną</i>	39
5.3.2. <i>Ilościowe oznaczenia czynników osoczowych</i>	42
5.4. Metody analizy statystycznej	43
6. WYNIKI	44
6.1. Półilościowa analiza zmian	44
6.2. Ilościowa analiza wysokiej czułości	45
6.3. Wpływ tlenu azotu na przebieg leczenia pooperacyjnego	59
7. DYSKUSJA	60
8. WNIOSKI	83
9. STRESZCZENIE	84
10. SPIS RYCIN	888
11. BIBLIOGRAFIA	89

1. SKRÓTY

ARDS – acute respiratory distress syndrome - zespół ostrej niewydolności oddechowej

BPD – broncho-pulmonary dysplasia - dysplazja oskrzelowo-płucna

CPB – cardio-pulmonary bypass – krążenie pozaustrojowe

cGMP – cykliczny monofosforan guanozyny

ECMO – extracorporeal membrane oxygenation – pozaustrojowe natlenowanie krwi

FASC - fluorescence-activated cell sorting

GTP – trójfosforan guanozyny

ICAM-1 – intracellular adhesion molecule 1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna

iNO – tlenek azotu stosowany wziewnie

KDR/VEGFR2 (kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2)

klf-4 – kruppel like factor

KKCz – Koncentrat krwinek czerwonych

MDA - malondialdehyd

metHb – methemoglobina

MOF – multiple organ failure - zespół niewydolności wielonarządowej

NO – tlenek azotu

NOS – syntetaza tlenku azotu

PAF – platelet-activating factor – czynnik aktywacji płytek

PMP - platelet microparticles

PPHN – persistent pulmonary hypertension of the newborn - przetrwałe nadciśnienie płucne noworodków

PVR - pulmonary vascular resistance – opór naczyniowy łożyska płucnego

SDF-1 stromal cell derived factor 1

TEM – transmission electron microscope

TNF – tumor necrosis factor – czynnik martwicy guza

VEGF – vascular endothelial growth factor

2. WSTĘP

Wady wrodzone serca występują u 8 na 1000 żywo urodzonych noworodków i stanowią najczęstszy typ wad wrodzonych u człowieka (Chowdhury, 2007). W znacznym odsetku przypadków współistnieją one z wadami pozasercowymi i od wczesnych etapów życia prenatalnego wywierają wpływ na fizjologię rozwoju płodu (Allan L. , 2000). Główne zaburzenia patofizjologiczne po urodzeniu związane są z obecnością sinicy, przeciążenia objętościowego lub przeciążenia ciśnieniowego serca i stanowią czynnik uruchamiający odpowiedź stresową. Jednym z podstawowych elementów tej odpowiedzi jest inicjowana przez mechanizmy lokalne i ogólnoustrojowe reakcja zapalna, wpływająca na funkcję serca, naczyń oraz innych narządów. W złożonych wadach, główne zaburzenia patofizjologiczne nakładają się, nasilając odpowiedź stresową i wpływając na rozwój wtórnych powikłań (Sommer, Hijazi i Rhodes, 2008).

Chirurgiczne leczenie wad wrodzonych serca wiąże się z koniecznością zastosowania krążenia pozaustrojowego (sztuczne płuco – serce), hipotermii oraz zatrzymania serca roztworem kardioplegicznym. Od czasów pierwszego zastosowania sztucznego płuco-serca przez Johna Gibbona w 1953 r. znacznie lepiej zrozumiano proces uogólnionej odpowiedzi zapalnej i opracowano strategie ograniczenia jej szkodliwego wpływu na układ krążenia i inne narządy. Pomimo upływu kilku dekad badań i praktyki klinicznej szkodliwy wpływ stosowania krążenia pozaustrojowego nadal stanowi ogromne wyzwanie dla leczenia wad wrodzonych serca.

Układ krążenia pozaustrojowego zawierający pompę rolkową, oksygenator, system drenów, kaniul, filtrów i zastawek, tworzy ogromną powierzchnię materiałów sztucznych, nie pokrytych śródbłonkiem, aktywującą szereg układów biologicznych. Czynniki te, wraz z procesami niedokrwienia i reperfuzji, wprowadzają patologiczne warunki kontrolowanego wstrząsu, ze szczególnym narażeniem na uszkodzenie takich narządów jak serce, mózg, płuca czy nerki (Hövels-Gürich i inni, 2002), (Hall, Smith i Rucker, 1997). Pomimo wdrożenia nowoczesnych metod operacyjnych, rozwoju technologii krążenia pozaustrojowego, protekcji serca i innych narządów przed skutkami niedokrwienia i reperfuzji, indukowana odpowiedź zapalna w istotny sposób wpływa na wczesne i odległe

wyniki leczenia operacyjnego złożonych wad wrodzonych serca. Wciąż poszukuje się sposobów na zniwelowanie odpowiedzi zapalnej oraz lepszą protekcję serca i innych narządów (Pasquali i inni, 2010), (Mastropietro i inni, 2013), (Keski-Nisula i inni, 2013), (Jacobs i inni, 2011).

Stresory działające w trakcie operacji prowadzą do aktywacji układu dopełniacza, produkcji mediatorów zapalnych oraz cytokin, aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy, kalikreiny, bradykininy i tkankowego aktywatora plazminogenu. Stężenia takich czynników jak IL-6, IL-10, IL-8, C3a, C5b-9 znacząco wzrasta u dzieci po operacji w krążeniu pozaustrojowym i wiąże się ze stopniem ciężkości przebiegu pooperacyjnego (Allan i inni, 2010), (Madhok i inni, 2006), (Jensen, Bengtsson, Berggren, Ekroth i Andréasson, 2001). Indukowana jest synteza białek ostrej fazy (CRP, Pentraxin). Niehamowane efekty działania mediatorów zapalnych, cytokin, limfokin i układu dopełniacza prowadzi do ciężkiego zespołu uogólnionej odpowiedzi zapalnej z uwolnieniem histaminy, wzrostem przepuszczalności naczyń i obkurczeniem łożyska naczyniowego. Hipoperfuzja tkankowa z jednoczesnym przedostawaniem się do krwi toksyn i antygenów potęguje opisane mechanizmy. Obok ryzyka zespołu uogólnionej odpowiedzi zapalnej (SIRS), prowadzącego w prostej linii do zespołu niewydolności wielonarządowej (MODS), odpowiedź zapalna towarzysząca korekcji wad wrodzonych serca manifestuje się wieloma zaburzeniami klinicznymi, których zwalczanie jest istotną częścią leczenia pooperacyjnego. Objawy kliniczne odpowiedzi zapalnej zależą od stopnia jej nasilenia i najczęściej wiążą się z dysfunkcją płuc prowadzącą do spadku podatności, gorszego utlenowania i koniecznością dłuższego wspomaganie oddechu. Niewydolność serca (powodowana niedokrwieniem, uszkodzeniem mechanicznym i immunologicznym) i dysfunkcja śródbłonna naczyniowego prowadzące do niewydolności sercowo – naczyniowej wymagającej wspomaganie inotropowego lub mechanicznego pojawia się u ponad 50% leczonych dzieci, u 30% pacjentów występują różnego rodzaju zaburzenia neurologiczne, neuroendokrynne i/lub endokrynologiczne. U wysokiego odsetka pacjentów obserwuje się zaburzenia równowagi wodno – elektrolitowej, zaburzenia metaboliczne i kwasowo zasadowe, retencję płynów i różnego stopnia obrzęki.

W 3 – 15% obserwuje się dysfunkcje nerek oraz wątroby (Brix-Christensen, 2001), (Hövels-Gürich i inni, 2002), (Hall, Smith i Rocker, 1997), (Wan, LeClerc i

Vincent, 1997). Objawy kliniczne przyczyniają się do przedłużenia pobytu w oddziale intensywnej terapii oraz czasu hospitalizacji. Monitorowanie odpowiedzi stresowej oraz SIRS oparte jest na rejestracji wielu parametrów klinicznych oraz laboratoryjnych. Obok oznaczania profilu neurohormonalnego oraz poziomu czynników pro- i antyzapalnych w praktyce klinicznej monitoruje się poziom glukozy, białka C-reaktywnego lub pentraksyny, poziom mleczanów oraz insuliny (Arkader, Malbouisson, Del Negro, Yamamoto i Okay, 2013). Podczas gdy u ludzi dorosłych ostra odpowiedź zapalna przebiega z hiperglikemią i hiperinsulinizmem, u dzieci z pooperacyjnym SIRS, hiperglikemii towarzyszy niski poziom insuliny. Utrzymywanie się hiperglikemii we wczesnym okresie po operacji serca u dzieci nasila uogólnioną reakcję zapalną i wiąże się ze złym rokowaniem (Vlasselaers i inni, 2010).

Ogniwem łączącym opisane zjawiska na poziomie molekularnym, jest tlenek azotu (NO). Jako przekaźnik, NO odgrywają istotną rolę w patogenezie skutków niedokrwienia i reperfuzji, odpowiedzi zapalanej, aktywacji układu krzepnięcia oraz regulacji kluczowych funkcji śródbłonna naczyniowego (Schechter i Gladwin, 2003). Wykazano, że farmakologiczna podaż NO może działać ochronnie na układ sercowo naczyniowy, łagodząc skutki uszkodzenia reperfuzyjnego (Hataishi i inni, 2006). Zaburzenia produkcji NO związane są zwykle z dysfunkcją śródbłonna i przyczyniają się do nasilenia odpowiedzi zapalnej (Chello, Mastroberto, Perticone, Celi i Colonna, 1998). Wiadomo, że w okresie okołoperacyjnym związanym z korekcją wady wrodzonej serca, z użyciem krążenia pozaustrojowego, dochodzi do ogromnej dysfunkcji śródbłonna. Produkcja i efekt działania tlenu azotu są zaburzone zarówno przez konsekwencje patofizjologiczne wady jak i odpowiedź stresową związaną ze stosowanym leczeniem chirurgicznym. Wolna hemoglobina obecna w surowicy krwi wskutek hemolizy wiąże produkowany w fizjologicznych ilościach tlenek azotu, co powoduje drastyczny spadek jego biodostępności (Schechter i Gladwin, 2003).

Od czasów pionierskiego zastosowania sztucznego płuco – serca u człowieka przez Johna Gibbona, rozwój techniki krążenia pozaustrojowego skupia się na zmniejszeniu inwazyjności i ograniczeniu odpowiedzi stresowej związanej z jej stosowaniem. W ostatnim okresie dokonał się na tym polu ogromny postęp, między innymi poprzez miniaturyzację układu do krążenia pozaustrojowego, zastosowanie

nowej generacji materiałów (drenów i filtrów) i oksygenatorów, strategię znieczulenia ogólnego, zapobiegania hemolizy, leczenia przeciwzakrzepowego i przeciwzapalnego oraz protekcji narządów. Niestety postęp ten oraz szeroko zakrojone badania podstawowe i kliniczne nie doprowadziły do rozwiązania problemu odpowiedzi zapalnej i jej szkodliwych skutków.

W pracy podjęto próbę zbadania wpływu śródoperacyjnej podaży tlenu azotu do oksygenatora, w trakcie krążenia pozaustrojowego, na zjawiska związane z uogólnioną odpowiedzią zapalną w grupie dzieci ze złożonymi, sinicznymi wadami wrodzonymi serca, których leczenie obarczone jest najwyższym ryzykiem okołoperacyjnym. Dodatkowo analizie poddano wpływ inhalacji NO na wybrane parametry metaboliczne, wskaźniki niedokrwienia serca oraz dane kliniczne, na które bezpośredni wpływ ma indukowana przez operację odpowiedź zapalna.

2.1. Zaburzenia patofizjologiczne wywoływane przez wady wrodzone serca.

Główne zaburzenia hemodynamiczne będące konsekwencją wady wrodzonej serca to przeciążenie objętościowe serca, sinica (niedotlenienie), przeciążenie ciśnieniowe serca oraz rozwój nadciśnienia płucnego.

Wspólną cechą wad, w których obserwuje się przeciążenie objętościowe serca, jest przeciek lewo – prawy. Krew, w wyniku nieprawidłowych połączeń, przepływa z lewej części serca do prawej, zgodnie z gradientem ciśnień. Wielkość przecieku zależy od rozmiarów połączenia oraz różnicy ciśnień po obu jego stronach. U noworodków, w związku z fizjologicznie wysokim oporem płucnym i podwyższonym ciśnieniem w prawym sercu, pomimo istnienia dużego połączenia, przeciek krwi może być niewielki. W miarę wzrostu i dojrzewania dziecka obniża się opór naczyniowy płuc i nasila się przeciek lewo-prawy. Prowadzi to do wzrostu przepływu krwi przez krążenie płucne, zwiększenia powrotu krwi z żył płucnych do lewego przedsionka, przeciążenia objętościowego lewej komory i rozwoju zastoinowej niewydolności krążenia. Przewlekłe utrzymywanie się zwiększonego przepływu płucnego zwiększa ryzyko nawrotowych infekcji płuc. U dzieci ze znacznym przeciekiem lewo-prawym często obserwuje się opóźnienie wzrostu i rozwoju fizycznego. W krążeniu płucnym prowadzi to do wytworzenia się patologicznych, zazwyczaj nieodwracalnych zmian w ścianach tętnic płucnych i

wzrostu oporu naczyniowego płuc. W takich warunkach ciśnienie w prawym sercu może przewyższyć ciśnienie w lewym sercu i spowodować odwrócenie kierunku przecieku. W związku z pojawieniem się przecieku prawo-lewego, pojawia się sinica (reakcja Eisenmenger).

Wady siniczne związane są z utrudnieniem napływu krwi do płuc, przeciekiem krwi o niskiej zawartości tlenu z prawego do lewego serca i zmniejszeniem utlenowania krwi w krążeniu systemowym. Nasilenie sinicy jest proporcjonalne do stopnia ograniczenia przepływu przez krążenie płucne. W odpowiedzi na przewlekłe niedotlenienie, dochodzi do pobudzenia szpiku kostnego i wzrostu produkcji czerwonych krwinek oraz zawartości hemoglobiny we krwi, co w połączeniu z prozakrzepowymi zmianami w układzie krzepnięcia, stwarza wysokie ryzyko zakrzepów i zatorów narządowych, w tym uszkodzenia mózgu. Przewlekłe niedotlenienie powoduje uruchomienie kaskady narządowych i ogólnoustrojowych zmian prowadzących do niewydolności krążenia i znacznego ograniczenia wydolności wysiłkowej.

Wady powodujące zaburzenia przepływu krwi przez zastawki serca lub duże naczynia prowadzą do przeciążenia ciśnieniowego i przerostu proksymalnie umiejscowionych jam serca. Postępujący przerost lewej komory może doprowadzić do nagłego zgonu z powodu zaburzeń rytmu serca.

Na obecnym etapie rozwoju diagnostyki i leczenia, rzadko obserwuje się niezaburzoną historię naturalną wad wrodzonych serca. Wczesne korekcje zapobiegają rozwojowi zaawansowanych zmian patofizjologicznych, obserwowanych klinicznie. Największe obciążenie dla układu krążenia stanowią wady złożone, w których współlistnieją opisane zaburzenia, (np.: tetralogia Fallota, całkowity kanał przedsionkowo – komorowy, zwężenia zastawek połączone z ich niedomykalnością i ubytkami w przegrodach serca, wady o typie serca jednokomorowego). Leczenie korekcyjne tej grupy wad, obarczone jest najwyższym ryzykiem okołoperacyjnym. Sinica połączona z przeciążeniem ciśnieniowo-objętościowym, wiąże się z aktywacją wielu osi neurohumoralnych (w tym układu renina – angiotensyna – aldosteron, RAAS), pobudzeniem czynników neuroendokrynnych, hormonalnych oraz biorących udział w regulacji odpowiedzi zapalnej, angiogenezy i apoptozy. Zmiany te prowadzą do niepożądanych objawów biochemicznych i klinicznych jak: zaburzenia regulacji gospodarki wodno-

elektrolitowej, niekorzystna przebudowa mięśnia sercowego i płuc, wytwarzanie naczyń krążenia obocznego i połączeń tętniczo żylnych w płucach, rozwój nadciśnienia płucnego, retencja płynów i obrzęki, ograniczenie wydolności wysiłkowej, arytmia serca, dysfunkcja nerek, przewodu pokarmowego i innych narządów. Aktywacja tych mechanizmów wpływa niekorzystnie na przebieg leczenia, zwłaszcza w ostrej fazie, nasilając uogólnioną odpowiedź zapalną, zaburzając odpowiedź metaboliczną i utrudniając śródoperacyjną protekcję narządów przed niedokrwieniem i reperfuzją. Operacja kardiochirurgiczna z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego powoduje, że mechanizmy związane z ostrą odpowiedzią stresową nakładają się na zmiany przewlekłe, powodowane przez obecność wady serca.

2.2 Aspekty kliniczne odpowiedzi stresowej

Odpowiedź stresowa jest ewolucyjnie nabytą zdolnością do reagowania na bodźce wewnętrzne lub zewnętrzne, które naruszają równowagę (homeostazę) w sposób mogący zagrozić przeżyciu lub spowodować naruszenie stanu zdrowia. Od początku powstania, koncepcja odpowiedzi stresowej wiązana jest z działaniem centralnych mechanizmów nerwowych i neurohormonalnych związanych z układem nerwowym autonomicznym (ANS) i systemem nadnerczowo-rdzeniowym (SAM) oraz podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowym (HPA), a także z reakcją immunologiczną na działające stresory. Autonomiczny układ nerwowy (ANS) zapewnia szybką (gwałtowną) odpowiedź na pojawiające się zagrożenie i obejmuje swoim działaniem wiele narządów. Aktywacja ANS prowadzi do szybkiego uwalniania adrenaliny z nadnerczy oraz noradrenaliny z zakończeń nerwowych sympatycznych. Przyspiesza on czynność serca oraz oddychanie, hamuje trawienie i zwiększa produkcję oraz uwalnianie glukozy (Kvetnansky, Sabban i Palkovits, 2009). Aktywacja HPA związana jest z działaniem zlokalizowanego w podwzgórzu jądra okołokomorowego (PVN), w którym uwalniane są neuropeptydy takie jak hormon uwalniający kortykotropinę (CRH) oraz wazopresyna, a także prolaktyna oraz hormon wzrostu. W obrębie krążenia wrotnego przysadki mózgowej neuropeptydy te działają na przysadkę stymulując uwalnianie ACTH do krwi obwodowej. ACTH przedostając się do nadnerczy drogą krwi, stymuluje syntezę

hormonów kortykosteroidowych, mineralokortykosteroidów i glikokortykosteroidów.

Układ immunologiczny reaguje na zagrożenia mikroskopowe, działające na śródbłonek oraz różnego typu komórki nabłonkowe. Początkowy bodziec (sygnał) wzmacniany zostaje przez kaskady limfokin oraz aktywowanych komórek i stymuluje centralną odpowiedź stresową, która ma działanie hamujące i zapobiega nadmiernej stymulacji systemu. Odpowiedź immunologiczna oraz uszkodzenie tkanek mogą jednak doprowadzić do rozwoju zespołu uogólnionej odpowiedzi zapalnej (SIRS). Sygnały zapalne przekazywane są do ośrodkowego układu nerwowego drogą nerwu błędnego i aktywują oś podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczową (HPA) (Chesnokova i Melmed, 2002), (Johnston i Webster, 2009).

Stymulacja układu współczulnego jest częścią centralnej odpowiedzi stresowej i wywiera wiele efektów na układ krążenia poprzez adrenalinę i noradrenalinę. Stymulacja baroreceptorów drogą wstępującą sygnalizuje ośrodkowy układ nerwowy o zmniejszonym rzucie serca, co uruchamia współczulne mechanizmy efektorowe prowadzące do obkurczenia naczyń (zwiększenie obciążenia następczego dla serca i zmniejszenie przepływu nerkowego), przyspieszenia czynności serca, zwiększenia kurczliwości (zwiększenie rzutu serca) oraz aktywację układu RAA. Wszystkie te efekty mają na celu utrzymanie rzutu serca, kosztem jednak zwiększonego zapotrzebowania mięśnia sercowego na tlen, zaburzeń metabolizmu wapnia i niekorzystnej przebudowy serca. Nadmierna stymulacja współczulna prowadzi do szeregu niepożądanych efektów jak: ekspresja genów płodowych, apoptoza, martwica, przebudowa mięśnia sercowego oraz podwyższonego poziomu noradrenaliny w osoczu.

Oś podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowa jest centralnym układem wiążącym kontrolę układu nerwowego z regulacją neurohormonalną i humoralną. W odpowiedzi na sygnały korowe (lęk, ból, głębokie emocje) lub bodźce związane z układem immunologicznym jak np. TNF α czy IL-6, uwalniane są CRH, wazopresyna, prolaktyna i hormon wzrostu. CRH stymuluje układ współczulny i wydzielanie ACTH. Stymuluje on produkcję kortyzolu, który współdziała z aktywacją układu współczulnego w przygotowaniu organizmu do odpowiedzi stresowej. Mechanizm ten zahamowuje wszystkie funkcje wzrostowe i rozwojowe, przygotowuje substraty metabolizmu (glukoza, kwasy tłuszczowe, aminokwasy),

zwiększa ciśnienie tętnicze i objętość wewnątrznaczyniową. Po operacjach kardiochirurgicznych z użyciem krążenia pozaustrojowego w populacji dziecięcej dochodzi do niewydolności tej centralnej osi opisaną jako *critical illness-related corticosteroid insufficiency* (CIRCI). W połączeniu z niewydolnością innych osi mózgowo – trzewnych oraz uszkodzeniem mięśnia sercowego, mechanizm ten odpowiedzialny jest za rozwój niewydolności krążenia (zespołu małego rzutu) w okresie pooperacyjnym. Opisano wiele czynników odpowiedzialnych za w/w mechanizm, m.in.: hipoperfuzja mózgu, niewydolność podwzgórza oraz przysadki mózgowej, oporność tkanek na ACTH, dysfunkcja nadnerczy, sinica i niedojrzałość tkanek.

Wraz ze stymulacją układu współczulnego, uruchamiana jest odpowiedź ze strony układu przywspółczulnego, która ma działanie przeciwzapalne. Stymulacja nerwu błędnego prowadzi do interakcji z receptorami monocytów i makrofagów, co prowadzi do zmniejszonej produkcji cytokin. Przeciwzapalna droga cholinergiczna wywiera toniczny, hamujący wpływ na odpowiedź immunologiczną na infekcje oraz uszkodzenia tkanek, a zablokowanie tej drogi prowadzi do zaostrzonej odpowiedzi przeciwbakteryjnej.

Odpowiedź stresowa na krążenie pozaustrojowe charakteryzuje się uwolnieniem szeregu substancji neurohumoralnych, włączając katecholaminy, wazopresynę, prostaglandyny, kortyzol i hormon wzrostu. Odpowiedź ta jest znacznie bardziej nasiloną u noworodka, w porównaniu z dorosłymi poddawanyymi operacji z użyciem krążenia pozaustrojowego. Bodźcami wyzwalającymi są: kontakt z powierzchnią ciała obcego, hipotermia, niskie ciśnienie perfuzji, brak przepływu pulsacyjnego. Wskutek nasilonej odpowiedzi stresowej dochodzi do zmniejszenia perfuzji narządowej, uszkodzenia tkanek, rozwoju nadciśnienia płucnego, uszkodzenia śródbłonna oraz wzmożonej reaktywności naczyń płucnych (Anand, Hansen i Hickey, 1990).

2.3 Leczenie chirurgiczne wad wrodzonych serca.

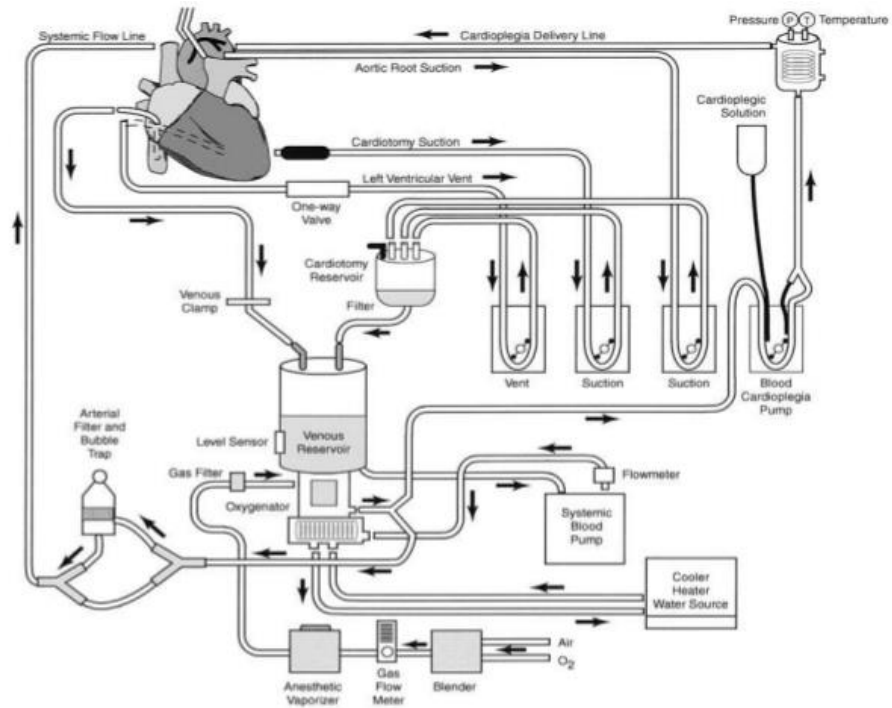
Operacja z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego stanowi jedyną możliwość korekcji złożonych wad wrodzonych serca. Każda tego typu operacja składa się z precyzyjnie zaplanowanych i następujących po sobie etapów. Operację taką podzielić można na część przygotowawczą, korekcję z użyciem krążenia

pozaustrojowego i fazę końcową. Etap początkowy ma charakter przygotowawczy i obejmuje otwarcie klatki piersiowej z preparowaniem i ekspozycją struktur serca koniecznych do przeprowadzenia korekcji wady oraz podłączenie krążenia pozaustrojowego. Kolejny etap obejmuje rozpoczęcie krążenia pozaustrojowego, ochładzanie dziecka. Po osiągnięciu docelowej hipotermii, zaklemowania zostaje aorta wstępująca i do naczyń wieńcowych podany zostaje roztwór kardioplegiczny. Przy pomocy kardioplegii o ściśle określonym składzie uzyskuje się czasowe, odwracalne zatrzymanie czynności serca w celu protekcji tego narządu przed niedokrwieniem oraz zapobiegania pooperacyjnej niewydolności serca. Roztwór kardioplegiczny podawany jest zwykle do opuszki aorty lub bezpośrednio do ujść naczyń wieńcowych. Najczęściej stosowana jest kardioplegia depolaryzująca, krystaliczna, o wysokim stężeniu potasu, prowadząca do zatrzymania serca w rozkurczu. Inne stosowane składniki roztworu to: wymiatacze wolnych rodników, czynniki buforujące i substraty energetyczne (Amark i inni, 2005).

Po wykonaniu zasadniczej części operacji korekcyjnej i uruchomieniu serca ma miejsce reperfuzyja serca (usunięcie klemu z aorty powoduje przywrócenie krążenia wieńcowego) i rozpoczyna się proces ogrzewania pacjenta do normotermii. Po uzyskaniu stabilnej czynności serca i wydolnego krążenia następuje odłączenie układu krążenia pozaustrojowego.

2.3.1. Elementy układu krążenia pozaustrojowego.

Krażenie pozaustrojowe, niezbędne do korekcji wady serca, wiąże się z przepływem krwi przez sztuczne płuco serce oraz naczynia poza ciałem pacjenta. Krew styka się z ogromnymi powierzchniami niepokrytymi śródbłonkiem i poddawana jest nefizjologicznym siłom (*shear stress*). Schemat obrazujący podstawowe elementy krążenia pozaustrojowego przedstawiono na Ryc. 2.3.1. Obecnie stosowany w praktyce klinicznej układ krążenia pozaustrojowego przedstawiono na ryc. 2.3.2.



Ryc.2.3.1. Schemat krążenia pozaustrojowego (Perfusion for congenital heart surgery Notes on cardiopulmonary bypass for a complex patient population Gregory S. Matte, Boston, 2015)



Ryc.2.3.2. Sztuczne płuco – serce. Obecnie stosowany zestaw do prowadzenia krążenia pozaustrojowego. (Perfusion for congenital heart surgery Notes on cardiopulmonary bypass for a complex patient population Gregory S. Matte, Boston, 2015).

Zasadniczym elementem układu krążenia pozaustrojowego jest sztuczne płuco – serce (Ryc.2.3.2.), a więc oksygenator, w którym zachodzi wymiana gazowa oraz pompa wprawiająca w ruch krew. Elementy układu krążenia pozaustrojowego połączone są drenami, zastępującymi naczynia tętnicze i żyłne. Cały system zespolony jest z układem krążenia pacjenta przy pomocy kaniul. Kaniula tętnicza wprowadzana jest do aorty wstępującej i powoduje zwykle nieznaczego stopnia zwężenie w układzie wywołujące turbulencje, wzrost szybkości przepływu oraz uszkodzanie elementów morfotycznych (m.in. hemoliza i uwalnianie hemoglobiny). Kaniula tętnicza, podobnie jak wszystkie inne elementy, dobierana jest tak, aby zapewnić adekwatny przepływ i minimalny *shear stress*. Kaniule żyłne wprowadzane są zwykle do prawego przedsionka lub żył głównych i zapewniają odpowiedni powrót krwi żyłnej do oksygenatora. W systemie znajduje się zbiornik krwi żyłnej pozwalający na dostosowanie przepływu pompy w warunkach zmieniającego się spływu żylnego oraz regulację wypełnienia łożyska naczyniowego.

Pompy stosowane do krążenia pozaustrojowego to tzw. Pompy rolkowe Debakey'a. Mogą one generować zarówno dodatnie jak i ujemne ciśnienie, a przepływ krwi w systemie jest funkcją średnicy drenu i szybkości obrotów. System filtrów, stosowanych w kilku miejscach układu, pozwala na zabezpieczenie przed zatorami powietrznymi i tkankowymi.

Oksygenator stanowi element układu, w którym ma miejsce wymiana gazowa, ogrzewanie i ochładzanie krwi oraz podaż gazów anestetycznych. Zawiera on największą objętość układu i w największym stopniu odpowiedzialny jest za generowanie odpowiedzi zapalnej. W trakcie operacji na otwartym sercu najczęściej stosowane są obecnie oksygenatory zawierające mikro-włókna (*hollow fiber*) zbudowane z silikonowej błony półprzepuszczalnej. Przez włókna otoczone krwią przechodzi mieszanina gazów oddechowych (*blood outside fiber oxygenator*) lub krew przepływa przez włókna otoczone gazem (*blood inside fiber oxygenator*).

Typowo, w układzie krążenia pozaustrojowego znajdują się napędzane oddzielnymi pompami system do podawania roztworu kardioplegicznego oraz układ ssaków wspomagających odsysanie krwi wyczyniającej się w obręb pola operacyjnego. Dodatkowo układ zawiera wymiennik ciepła oraz system czujników, monitorów i blokad bezpieczeństwa sprzężonych z komputerem centralnym,

umożliwiających precyzyjną regulację i bezpieczne prowadzenie krążenia pozaustrojowego.

Materiały stosowane do produkcji elementów układu są biokompatybilne i pokryte od wewnątrz heparyną, w celu zmniejszenia uogólnionej odpowiedzi zapalnej.

2.3.2. Prowadzenie krążenia pozaustrojowego.

Krążenie pozaustrojowe w kardiochirurgii stosowane jest w celu zastąpienia pracy serca i płuc, w trakcie operacji na otwartym sercu. Pozwala ono także na ochładzanie lub ogrzewanie pacjenta, precyzyjne dostosowywanie przepływu oraz objętości krwi krążącej, oraz dokładne monitorowanie parametrów związanych z krążeniem i oddychaniem. Wprowadza jednak нефizjologiczne środowisko, z którym styka się krew. Ogromna powierzchnia drenów, filtrów, oksygenatora i kaniul nie pokryta śródbłonkiem uruchamia kaskadę niepożądanych efektów. Okres prowadzenia krążenia pozaustrojowego porównywany jest do sytuacji kontrolowanego wstrząsu, w którym narządy perfundowane są pod niższym ciśnieniem, przepływ ma charakter niepulsacyjny i stosuje się hemodilucję oraz hipotermię.

Układ krążenia pozaustrojowego wypełniany jest przed operacją tzw. roztworem początkowym (*priming*). Objętość tego roztworu dostosowywana jest do wskaźników masy i wzrostu pacjenta. Najczęściej jest to wieloelektrolitowy roztwór krystaloidów z dodatkiem masy erytrocytarnej oraz leków, w tym m.in. antybiotyków, heparyny, sterydów oraz mannitolu. Dodatkowa objętość, oprócz początkowego wypełnienia układu powoduje zaplanowaną hemodilucję, która przyczynia się do zmniejszenia lepkości krwi w trakcie hipotermii i poprawia jej właściwości reologiczne. Zmniejsza również tendencję do osadzania białkowych elementów krwi na nie pokrytych śródbłonkiem powierzchniach.

Stosowanie hipotermii pozwala na zmniejszenie tempa metabolizmu kluczowych narządów (mózg, serce, nerki) i tkanek oraz zapotrzebowania organizmu na tlen. Pozwala to na lepszą protekcję przed skutkami niedotlenienia, zmniejszenie przepływu krwi w trakcie operacji (lepsza ekspozycja odpowiednich struktur w polu operacyjnym), zmniejsza także nasilenie odpowiedzi zapalnej,

stresu oksydacyjnego oraz zahamowanie apoptozy. Wraz z obniżaniem temperatury zwiększa się rozpuszczalność CO₂, co powoduje zmniejszenie jego stężenia we krwi, choć całkowita jego zawartość pozostaje niezmienną. W związku z tym prowadzenie krążenia pozaustrojowego wymaga dostosowania strategii regulacji gospodarki kwasowo – zasadowej. W tym zakresie stosowane są dwie podstawowe metody.

Strategia *pH stat* oparta jest na utrzymaniu stałego pH ok. 7.4 i pCO₂ ok. 40 mmHg niezależnie od temperatury. Parametry te mierzone są dla temperatury 37 C, a wartości gazometryczne korygowane matematycznie przy pomocy odpowiednich normogramów. W miarę chłodzenia, krew staje się coraz bardziej alkaliczna (uwzględniając matematycznie efekt temperatury). W celu korygowania alkalicznego pH do układu dostarcza się CO₂, tak aby pH skorygowane do temperatury utrzymać na poziomie 7.4. Jest to stan kwasicy oddechowej i *hypercarbii*.

Strategia *alpha stat* oparta jest na zasadzie utrzymania stałego stosunku jonów wodorowych do wodorowęglanowych. pH krwi zmienia się w miarę zmian temperatury, a pacjent pozostaje w stanie zasadowicy oddechowej i hipokapnii. W praktyce, wentylacja oksygenatora utrzymywana jest na poziomie odpowiadającym normotermii (utrzymanie stałego poziomu pCO₂ odpowiadającemu pH ok. 7.4 w temp 37C) bez względu na głębokość hipotermii. Ta hiperwentylacja w hipotermii prowadzi do spadku pCO₂ i wzrostu pH, gdy jednak wartości te zostaną matematycznie skorygowane do temperatury pacjenta, pozostają one w przyjętym zakresie normy.

2.4. Efekty krążenia pozaustrojowego stosowanego podczas korekcji wad wrodzonych serca.

2.4.1. Uogólniona odpowiedź zapalna (SIRS)

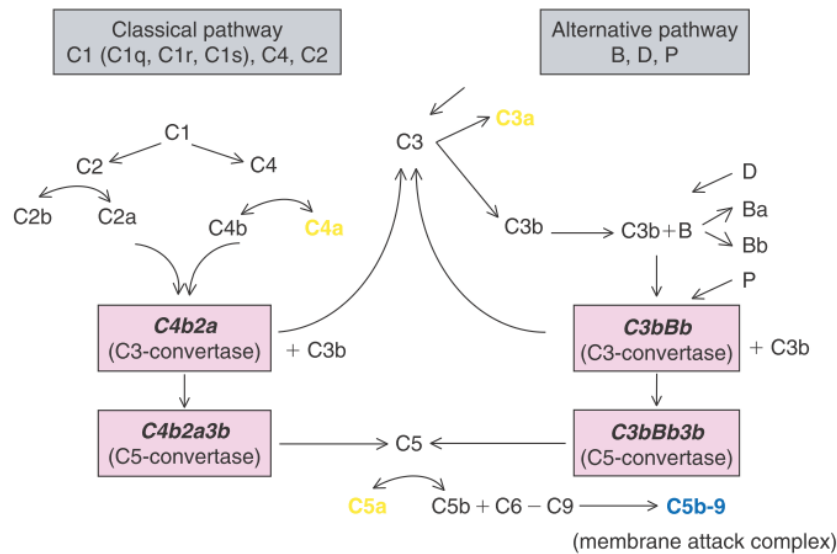
Głównym elementem odpowiedzi stresowej wpływającym na przebieg pooperacyjny oraz profil hemodynamiczny po operacji korekcji wady wrodzonej serca jest aktywacja uogólnionej (SIRS) i lokalnej odpowiedzi zapalanej (Wernovsky i inni, 1995), (Hirsch i inni, 1998). Kryteria SIRS w populacji dziecięcej opracowane zostały i opublikowane w 2005 roku przez międzynarodową konferencję (International Pediatric Sepsis Consensus Conference). Według tego konsensusu

SIRS został zdefiniowany jako niespecyficzny uogólniony proces zapalny, przebiegający bez zakażenia i stanowiący reakcję na uraz (np. oparzenie, zabieg operacyjny, zapalenie trzustki itp.). Przy tym spełnione muszą być przynajmniej dwa z czterech kryteriów: nieprawidłowa temperatura ciała, nieprawidłowa liczba leukocytów, tachykardia, tachypnoe (Goldstein, Giroir i Randolph, 2005). Najistotniejszym czynnikiem wywołującym odpowiedź zapalną (Larmann i Theilmeier, 2004), (Serrano i inni, 2010) w trakcie korekcji wady wrodzonej serca, jest użycie krążenia pozaustrojowego. Czynniki wyzwalającymi reakcję są: aktywacja komórek w wyniku kontaktu krwi ze sztucznymi materiałami elementów układu krążenia pozaustrojowego, mechaniczne siły zcinania, laminarny, nie-pulsacyjny przepływ krwi, niskie ciśnienie tętnicze, uraz chirurgiczny, niedokrwienie i reperfuzyja tkankowa, zmiany temperatury, hemodilucja z względną anemią, przetaczanie obcych produktów krwi, hypotermia, podaż heparyny i protaminy, uwolnienie endotoksyny.

W przebiegu uogólnionej reakcji zapalnej pobudzanej w trakcie operacji serca u dzieci dochodzi do aktywacji biologicznych kaskad humoralnych oraz związanych z komórkami. Aktywacji ulega układ dopełniacza, układ krzepnięcia i fibrynolizy. Dochodzi do uwolnienia cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6), czynnika martwicy guza (TNF α), aktywacji leukocytów wraz z ekspresją molekuł adhezyjnych, uwolnienia chemokin (IL-8, MCP – *monocyte chemoattractant protein*), produkcji wolnych rodników tlenowych, metabolitów kwasu arachidonowego, czynnika aktywacji płytek (PAF), endoteliny, białek ostrej fazy (pentraksyna) i enzymów proteolitycznych. Dochodzi do dysfunkcji śródbłónka i inicjacji układu krzepnięcia. Ta złożona kaskada zmian przekłada się na rozwój powikłań pooperacyjnych takich jak niewydolność serca, niewydolność oddechowa, zaburzenia funkcji nerek, zaburzenia krzepnięcia, dysfunkcja wątroby i jelit, rozwija się *capillary leak syndrome* i zespół niewydolności wielonarządowej (MOF) (Warren i inni, 2009), (Durandy, 2014).

Aktywacja układu dopełniacza następuje poprzez uruchomienie drogi alternatywnej (stymulacja przez powierzchnię ciała obcego, kontakt z endotoksyną, kalikreina, plazmina, trombina) i / lub klasycznej (protamina) (Steinberg, Kapelanski, Olson i Weiler, 1993). W efekcie powstają fragmenty C3a i C5a. Podanie protaminy w celu odwrócenia działania heparyny aktywuje układ

dopełniacza drogą klasyczną, z wytworzeniem fragmentów C4a i następnie C3a. Aktywne fragmenty układu dopełniacza powodują uwalnianie histaminy przez mastocyty i bazoofile, zwiększają przepuszczalność naczyń, stymulują leukocyty do uwalniania wolnych rodników tlenowych i enzymów lizosomalnych. C3a jest silnym stymulatorem agregacji płytek natomiast C5a stymuluje agregację neutrofilii i ich adhezję do komórek śródbłonna. Produkcja fragmentów C3a i C5a przyczynia się do powstawania C5b-9 - kompleksu atakującego błony komórkowe (po połączeniu z C6, C7, C8 i C9). Kompleks ten tworzy kanał przezbłonowy umożliwiający napływ jonów i wody do wnętrza komórek, co zakłóca równowagę osmotyczną i doprowadza w rezultacie do lizy i śmierci komórek (Ryc.3.4.1). Dodatkowo kompleks C5b-9 stymuluje ekspresję molekuł adhezyjnych w obrębie leukocytów oraz sekrecję limfokin i chemokin. Aktywacja układu dopełniacza prowadzi do skurczu mięśniówki gładkiej naczyń, wzrostu ich przepuszczalności, aktywacji neutrofilii oraz produkcji wolnych rodników tlenowych. W wielu doniesieniach korelowano stopień aktywacji składników komplementu z częstością powikłań pooperacyjnych, koniecznością przedłużonego wspomagania oddechu, czasem pobytu na intensywnej terapii, krwawieniem pooperacyjnym, niestabilnością hemodynamiczną czy ostrym uszkodzeniem płuc (ALI, *acute lung injury*) (Seghaye M. i inni, Complement activation during cardiopulmonary bypass in infants and children. Relation to postoperative multiple system organ failure, 1993), (Tennenberg, Clardy, Bailey i Solomkin, 1990).



Ryc. 2.4.1. Schemat aktywacji układu dopełniacza. M.Ch. Seghaye. The clinical implications of the systemic inflammatory reaction related to cardiac operations in children. *Cardiol Young* 2003; 13: 228–239

Podobne mechanizmy mogą doprowadzić do aktywacji neutrofilii. Kontakt z powierzchnią ciała obcego, działanie endotoksyny, wpływ cytokin, składników dopełniacza oraz niedokrwienia i reperfuzji prowadzą do wzrostu adhezji neutrofilii oraz ich migracji z następowym wydzielaniem proteaz oraz wolnych rodników tlenowych. Dochodzi do uszkodzenia bariery śródbłonkowej i rozwoju tzw. *Capillary leak syndrome* (Boyle, Pohlman, Johnson i Verrier, 1997).

Aktywowane neutrofile stanowią główne źródło produktów rozpadu kwasu arachidonowego tj. prostanoidów (prostaglandyny, tromboksany) i leukotrienów. Aktywacja kaskady kwasu arachidonowego następuje pod wpływem różnego rodzaju bodźców zapalnych i związana jest z pobudzeniem cyklooksygenazy i fosfolipazy A2 (Downing i Edmunds, 1992). Źródłem kwasu arachidonowego są przede wszystkim neutrofile, ale produkowany jest on także w dużej ilości w płucach. Tromboksan A2 znany jest jako substancja obkurczająca naczynia i promująca agregację płytek. Produkowany jest głównie przez płytki krwi, ale także w dużych ilościach w płucach. Prostaglandyna E1, E2 i prostacyklina mają działanie rozszerzające naczynia i antyagregacyjne na płytki. W ten sposób równoważą one działanie tromboksanu A2. Leukotrien B4 jest silnym chemoatraktantem, który wpływa na przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz adhezję leukocytów. Jak wykazano, produkcja substancji pochodnych kwasu

arachidonowego jest zależna od wieku i bardziej nasiloną jest u dzieci młodszych (Greeley, Bushman, Kong, Oldham i Peterson, 1988).

Monocyty, makrofagi, limfocyty i komórki śródbłonna produkują cytokiny. Bodźcem stymulującym są procesy zachodzące podczas niedokrwienia i reperfuzji, aktywacja układu dopełniacza, uwalnianie endotoksyny. Najistotniejszymi cytokinami produkowanymi podczas krążenia pozaustrojowego są cytokiny działające prozapalnie: TNF, Interleukina 1, interleukina 6, interleukina 8. Cytokiny o działaniu przeciwzapalnym to IL 10 oraz antagonistą receptora IL-1 (IL-1ra). TNF, IL-1, IL-6 i IL-8 biorą udział w ostrej odpowiedzi zapalnej. TNF oraz IL-1 inicjują odpowiedź zapalną i działają pirogennie. TNF bierze udział w interakcji pomiędzy leukocytami i endotelium, a jego podwyższony poziom u dzieci po operacjach serca z użyciem krążenia pozaustrojowego związany jest z pooperacyjnym *capillary leak syndrom* (Chew i inni, 2001). Wykazano również jego efekt inotropowo ujemny w działaniu na serce (Hansen i inni, 1994). Interleukina 6 działa na limfocyty B oraz hepatocyty, stymulując je do produkcji białek ostrej fazy (pentraksyna - CRP). Produkcja interleukiny 10 oraz IL1-ra stymulowana jest przez IL-6 i ich rola polega na hamowaniu produkcji cytokin prozapalnych.

Białka ostrej fazy, których produkcja stymulowana jest przez cytokiny prozapalne w wątrobie. Białko C-reaktywne pełni funkcje opsoniny, która pobudza układ dopełniacza. Przyczepia się ono do ligandów pojawiających się wskutek śmierci komórek i ułatwiają ich opsonizację i usuwanie. Stężenie pentraksyny w surowicy krwi skorelowane jest również z niedokrwieniem i reperfuzją mięśnia sercowego. Poziom pentraksyny wzrasta w ciągu kilku godzin od niedokrwienia i znana jest jako wczesny marker uszkodzenia niedokrwiennego serca.

Silnym aktywatorem kaskady zapalnej jest endotoksyna. Podczas trwania krążenia pozaustrojowego jej poziom rośnie. Najbardziej prawdopodobnym źródłem endotoksyny jest przewód pokarmowy. Niedokrwienie śluzówki jelit oraz zmiana przepływu z pulsacyjnego na laminarny powodują zwiększenie przepuszczalności błony śluzowej jelit i przedostawanie się endotoksyny do krwiobiegu (Wan, LeClerc i Vincent, 1997). Endotoksyna powoduje aktywację układu dopełniacza na drodze alternatywnej i uwalnianie szeregu cytokin prozapalnych takich jak czynnik martwicy guza (TNF-alfa).

Młodszy wiek dziecka oraz niższa masa ciała powodują, że opisane procesy są bardziej nasilone i inaczej przebiegają w porównaniu z pacjentami dorosłymi. Związane jest to z ogromną dysproporcją pomiędzy powierzchnią i objętością układu do krążenia pozaustrojowego a powierzchnią i objętością układu naczyniowego pacjenta, większymi potrzebami metabolicznymi, a co za tym idzie koniecznością generowania większego rzutu oraz zwiększoną reaktywnością i niedojrzałością łożyska płucnego. Podobnie niedojrzałość innych narządów (takich jak nerki, mózg, serce) powoduje, że ryzyko krążenia pozaustrojowego jest większe w populacji dziecięcej. Szczególny nacisk kładzie się na niedojrzały mózg. Obszary mózgu o szczególnie wysokiej aktywności metabolicznej narażone są na niedotlenienie, uszkodzenie poreperfuzyjne czy obrzęk (Chugani, 1998). Niedojrzałość płuc predysponuje do większego nasilenia obrzęku śródmiąższowego, obrzęku płuc i nadciśnienia płucnego (Vidal Melo, 2004). Niedojrzałość nerek wiąże się z upośledzoną autoregulacją, zmniejszoną zdolnością do koncentracji, reabsorpcji i wydalania sodu oraz regulacji równowagi kwasowo – zasadowej (Bestic i Reed, 2005).

2.4.2. Zmiany układowe i narządowe

W trakcie krążenia pozaustrojowego upośledzone zostaje w znacznym stopniu zarówno krążenie płucne jak i systemowe. Związane z tym objawy niewydolności krążeniowo oddechowej (zespół małego rzutu serca) po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w populacji dziecięcej obserwowany jest w codziennej praktyce.

Efekty uboczne działania krążenia są następstwem działania skrajnie nefizjologicznych warunków prowadzących do aktywacji komórek w kontakcie z powierzchnią drenów, mechanicznym stresem (siła ścinająca, *shear stress*), niedokrwieniem tkanek, niskim ciśnieniem perfuzji oraz brakiem perfuzji pulsacyjnej, hemodilucją i hipotermią.

Kontakt z powierzchnią ciała obcego indukuje produkcję kinin osoczowych prowadząc do rozszerzenia łożyska naczyniowego, wzrostu przepuszczalności naczyń oraz chemotaksji neutrofilii. Uruchomione zostają procesy fibrynolizy i krzepnięcia. Podczas krążenia pozaustrojowego, aktywacja czynnika XII do czynnika XIIIa katalizuje konwersję prekalikreiny do kalikreiny. Kalikreina aktywuje czynnik XII (sprężenie zwrotne dodatnie) oraz bierze udział w produkcji

bradykininy (Mojcik i Levy, 2001). Kininy osoczowe działają poprzez zlokalizowane w wielu komórkach receptory B1 i B2. Ich aktywacja prowadzi do uwolnienia wapnia, produkcji tlenu azotu, eikozanoidów, wolnych rodników oraz cytokin. W mózgu może wpływać na wzrost przepuszczalności bariery krew – mózg po niedokrwieniu i reperfuzji prowadząc do obrzęku oraz zaburzeń przepływu mózgowego (Abbott, 2000).

Aktywowany czynnik XII (XIIa) prowadzi do aktywacji bradykininy i aktywuje wewnątrzpochodną drogę aktywacji układu krzepnięcia, natomiast uszkodzenie naczyń prowadzi do wzrostu ekspozycji na czynnik tkankowy i aktywację zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia, dodatkowo stymulując kaskadę krzepnięcia. Produkty kaskady krzepnięcia oraz fibrynolizy, czynnik XIIa oraz formowanie kompleksów heparynowo – protaminowych aktywuje klasyczną drogę układu dopełniacza.

Krażenie pozaustrojowe stanowi dla ustroju ogromny bodziec prozakrzepowy. Stosowanie heparyny hamuje formowanie skrzepów, nie zabezpiecza jednak przed działaniem tkankowych aktywatorów krzepnięcia, które znajdują się na aktywowanych komórkach śródbłonka i monocytach. Powoduje to aktywację zewnętrznej drogi krzepnięcia przez kontakt z czynnikiem VII i konwersję protrombiny w trombinę. Trombina posiada również właściwości prozapalne. Poprzez pobudzenie ekspresji P-selektyny w komórkach śródbłonka i aktywację neutrofilii oraz uwalnianie prozapalnych i chemotaktycznych cytokin (Levy i Tanaka, 2003).

Poszczególne elementy odpowiedzi zapalnej powiązane sprzężeniami zwrotnymi prowadzić mogą do obrazu klinicznego, który często obserwowany jest u dzieci po korekcji wady wrodzonej serca. Końcowym rezultatem reakcji organizmu na krążenie pozaustrojowe może być uszkodzenie śródbłonka, wzrost przepuszczalności naczyń oraz dysfunkcja wielonarządowa.

Różnego stopnia zaburzenia krążeniowo – oddechowe obecne są u wszystkich dzieci po operacjach z użyciem krążenia pozaustrojowego. Bodźcami powodującymi dysfunkcję serca są zaklepowanie aorty, niedokrwienie i reperfuzja oraz mechaniczne uszkodzenie serca w trakcie wykonywania operacji. Po wykonaniu zabiegu korekcyjnego i usunięciu klemu z aorty, serce jest reperfundowane przez szereg aktywowanych w trakcie krążenia pozaustrojowego elementów krwi

(leukocyty, płytki krwi, cytokiny i czynniki prozapalne wydzielane do krążenia), które wchodzi w interakcję z niedokrwionym śródbłonkiem. Uszkodzenie niedokrwienne serca oraz skutki krążenia pozaustrojowego nakładają się na siebie i stanowią główny element powodujący dysfunkcję mięśnia sercowego po operacjach kardiochirurgicznych (Hövels-Gürich i inni, 2002). Stopień dysfunkcji i uszkodzenia serca skorelowany jest z aktywnością markerów niedokrwienia (troponiny, CKMB) oraz koniecznością wspomagania farmakologicznego we wczesnym okresie pooperacyjnym (indeks katecholamin). Troponiny (TnT, TnI) są bardzo czułymi wskaźnikami niedokrwienia mięśnia sercowego. Troponina I w obrębie miofilamentów wiąże się z aktywną biorąc udział w formowaniu kompleksów aktynowo – tropomiozynowych. Niedokrwienie powoduje uwolnienie TnI do krwi obwodowej, co wykorzystywane jest jako marker uszkodzenia serca. Mniej specyficznym wskaźnikiem uszkodzenia mięśnia sercowego jest kinaza kreatyninowa (CKMB). Stężenie frakcji MB wzrasta znacznie po niedokrwieniu serca. CKMB jest enzymem cytoplazmatycznym biorącym udział w katalizowaniu reakcji przekazywania bogatych energetycznie grup fosfatowych pomiędzy ATP, ADP i fosfokreatyną (Zhang i inni, 2012).

Krażenie pozaustrojowe wpływa również na funkcje płuc. W trakcie operacji płuca zaopatrywane są tylko przez naczynia oskrzelowe. W efekcie działania krążenia pozaustrojowego, dochodzi do wzrostu oporu w naczyniach płucnych, spadku podatności płuc, zmniejszenia czynnościowej pojemności płuc, zaburzeń wentylacji i przepływu, wzrostu przecieku nieutlenowanej krwi przez płuca oraz spadku aktywności surfaktantu (Vidal Melo, 2004). Hemodilucja, stosowana w trakcie krążenia pozaustrojowego, zwiększa ucieczkę płynów do przestrzeni zewnątrznaczyniowej poprzez zmniejszenie ciśnienia onkotycznego. Niedokrwienie i reperfuzja powodują zaburzenia śródbłonkowej regulacji oporu naczyniowego płuc (Serraf i inni, 1997), a sekwestracja neutrofilów w krążeniu płucnym, razem z aktywacją dopełniacza, uwalnianiem cytokin i leukotrienów mogą prowadzić do uszkodzenia błony pęcherzykowo – naczyniowej i dalszego nasilenia obrzęku płuc.

Funkcje nerek u dzieci z wadami wrodzonymi serca, często zaburzone są już przed operacją korekcji wady. Filtracja kłębkowa oraz zdolność nerki do zagęszczania moczu nie są całkowicie wydajne w niedojrzałych nerkach

noworodków i młodych niemowląt. Niedokrwienie nerek, brak przepływu pulsacyjnego oraz mediatory procesu zapalnego dodatkowo upośledzają funkcje tego narządu. Uwalnianie substancji naczynioskurczowych (wazopresyna, tromboksan), oraz stosowanie katecholamin o takim działaniu prowadzą do zaburzenia perfuzji nerek oraz pobudzenia układu renina – angiotensyna – aldosteron, co dodatkowo obkurcza naczynia nerkowe. Dysfunkcja nerek prowadzi do retencji płynów, zaburzeń wodno – elektrolitowych, retencji metabolitów (w tym substancji związanych z odpowiedzią zapalną), obrzęku płuc i konieczności przedłużonego wspomagania oddechu.

Rozwijający się i dojrzewający mózg jest szczególnie podatny na uraz powodowany przez niedokrwienie – reperfuzję oraz mediatory procesu zapalnego (Wernovsky, Shillingford i Gaynor, Central nervous system outcomes in children with complex congenital heart disease, 2005). Mechanizm uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w trakcie krążenia pozaustrojowego związany może być z zaburzeniami autoregulacji krążenia mózgowego i perfuzji mózgu, uszkodzeniem związanym reperfuzją, odpowiedzią zapalną oraz krwawieniem i zatorami. Zaburzenia te mogą nakładać się na istniejące przed operacją wady wrodzone lub nabyte uszkodzenia OUN. Objawy uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, obok typowych objawów ogniskowych lub drgawek mogą także obejmować hipotonię objawy piramidowe, zaburzenia napięcia mięśniowego oraz zaburzenia w odżywianiu (Mahle, 2001).

2.5. Strategie ograniczające odpowiedź zapalną stosowane w trakcie krążenia pozaustrojowego

Strategie zmierzające do ograniczenia odpowiedzi zapalnej u dzieci poddawanych operacji z użyciem krążenia pozaustrojowego, zogniskowane są na zmniejszeniu ilości powikłań i śmiertelności pooperacyjnej. W szczególności ich celem jest poprawa wydolności serca i układu krążenia, poprawa funkcji płuc i wymiany gazowej, eliminacja *capillary leak syndrome* i dysfunkcji narządów włączając ośrodkowy układ nerwowy.

Najczęściej stosowanym w klinice elementem strategii ograniczającej odpowiedź zapalną jest podaż sterydu do układu krążenia pozaustrojowego. Wykazano, że hamuje on produkcję czynników prozapalnych i zwiększa produkcję

czynników przeciwzapalnych. Hamuje aktywację dopełniacza oraz produkcję IL-1, IL-6, IL-8, leukotrienów, endotoksyny i TNF α jednocześnie nasilając produkcję IL-4 i IL-10. Badania prowadzone zarówno na modelu zwierzęcym jak i u dzieci z wadami wrodzonymi serca, którym podawano 30 mg/kg Solu-Medrolu, wykazały mniejszą retencję płynów oraz lepszą funkcję płuc (Lodge, Chai i Dagget, 1999), (Bronicki, Backer i Baden, 2000). Podaż dexamethasonu (1mg/kg) sprzężona była także ze zmniejszeniem poziomu troponiny I, sugerując dodatkowy mechanizm kardioprotekcyjny (Checchia i inni, 2003).

Innym czynnikiem stosowanym w celu ograniczenia odpowiedzi zapalnej na krążenie pozaustrojowe, zarówno w populacji dzieci, jak i u dorosłych, jest aprotynina – niespecyficzny inhibitor proteaz serynowych. Wiąże się ona w sposób odwracalny z aktywnymi częściami plazminy, kalikreiny i trypsyny prowadząc do zahamowania aktywności tych proteaz, a także trombiny i elastazy. Ogranicza ona również aktywację płytek i leukocytów w trakcie krążenia pozaustrojowego (Edmunds, Ellison i Colman, 1982). Poza ograniczeniem krwawień pooperacyjnych i poprawą funkcji płytek krwi, wykazano, że wpływa ona również na zmniejszenie krążących produktów rozpadu fibrynogenu, które działają prozapalnie (Mojcik i Levy, 2001).

Pomimo wysiłków zmierzających do zmniejszenia objętości układów stosowanych do krążenia pozaustrojowego, noworodki i małe niemowlęta narażone są najbardziej na zaburzenia wodno – elektrolitowe oraz zaburzenia objętości krążących płynów ustrojowych. Użycie zmodyfikowanej hemofiltracji (hemofiltracja po zakończeniu krążenia pozaustrojowego) pozwoliło na zmniejszenie wahań objętości płynów ustrojowych, hemodilucji, poprawę funkcji serca i płuc oraz skrócenie czasu wspomaganego oddechu. Wykazano, że zmodyfikowana ultrafiltracja usuwa w efektywny sposób cytokiny prozapalne takie jak IL-6, IL-8 oraz TNF (Gaynor, 1998).

Używane są również strategie prowadzące do modyfikowania powierzchni układu krążenia pozaustrojowego, na którą ekspozycja jest krew pacjenta. Układy pokryte heparyną zmniejszyły stopień aktywacji układu dopełniacza, syntezę hemokin oraz degranulację neutrofilii i płytek. Wykazano również zmniejszenie syntezy leukotrienu B₄, prostaglandyny E₂ oraz tromboksanu B₂ (Lappegård i inni, 2005). Użycie poli-2-methoxyethylakrylatu do pokrycia

powierzchni układu pozwoliło na efektywniejsze zahamowanie aktywacji układu dopełniacza, zmniejszenie produkcji IL-6 i IL-8 oraz poprawę funkcji płuc (Gunaydin i inni, 2002).

Inne badane strategie ograniczenia odpowiedzi zapalnej w trakcie krążenia pozaustrojowego obejmują użycie przeciwciał przeciwko składnikom układu dopełniacza oraz rekombinowanego receptora dopełniacza CR-1 (TP-10). Stosowanie przeciwciał przeciwko składnikowi C5 u pacjentów poddawanych krążeniu pozaustrojowemu powodowało zahamowanie aktywacji układu dopełniacza, lepszą funkcję mięśnia sercowego, zmniejszenie objętości krwawienia pooperacyjnego oraz występowania deficytów poznawczych (Fitch i inni, 1999). Podawanie rekombinowanego CR-1 przyczyniało się do lepszej protekcji mięśnia sercowego i płuc (Chai i inni, 2000).

Głównym czynnikiem kontrolującym ekspresję genów odpowiedzialnych za regulację odpowiedzi zapalnej jest tzw. czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B; NF- κ B). Jest to heterodimer składający się z dwóch podjednostek p50 i p65, który w normalnych warunkach związany jest z jednostką inhibitorową (IkB), zapobiegającą przechodzeniu czynnika do jądra komórkowego. Po stymulacji, jednostka IkB ulega fosforylacji i degradacji, a białko kappa B przechodzi do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcją czynników zapalnych takich jak TNF α , IL-1 β , IL-6, chemokina IL-8, enzymy (syntaza tlenu azotu, cyklooksygenaza, lipooksygenaza, fosfolipaza A2, oraz czynniki adhezyjne (ICAM-1, VCAM-1, selektyna-E) (Barnes i Karin, 1997). Białko kappa B może być stymulowane przez wiele różnych czynników, stąd działa ono wzmacniająco na mechanizmy zapalne. Wyniki licznych badań sugerują, że sterydy mogą hamować NF- κ B i zmniejszać produkcję molekuł adhezyjnych i aktywację leukocytów (Barnes i Karin, 1997).

Odpowiedź na zastosowanie krążenia pozaustrojowego obejmuje pobudzenie szeregu pętli sprzężenia zwrotnego dodatniego i powielających się kaskad. Natura opisanych procesów powoduje, że nie opracowano dotąd dobrej strategii modulowania odpowiedzi zapalnej i zapobiegania jej efektom. Odpowiedź zapalna ma ogromny wpływ na wyniki leczenia w grupie najbardziej podatnych pacjentów tj. dzieci ze złożonymi wadami serca. Poddawane są one kompleksowym, długotrwałym procedurom z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego, hipotermii i zatrzymania serca przy pomocy kardioplegii. Wobec powyższych faktów wydaje

się, że stosowanie strategii oddziaływania na różne mechanizmy lub punkty uchwytu, może przynieść pożądany efekt, bez wywoływania niekorzystnych skutków ubocznych.

2.6. Tlenek azotu i jego rola w leczeniu wad wrodzonych serca.

Tlenek azotu (NO) jest bezbarwnym, bezwonny i słabo rozpuszczalnym w wodzie gazem. W organizmie człowieka powstaje dzięki złożonemu układowi enzymatycznemu - syntetazie tlenku azotu (NOS). NOS wiąże dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), mononukleotyd flawinowy (FMN), hem, tetrahydrobiopterynę (BH₄) i kalmodulinę. W efekcie z L-argininy i tlenu powstaje tlenek azotu i L-cytrulina. Znane są trzy różne izoformy NOS kodowane przez różne geny. Neuronalna NOS (NOS I) obecna w komórkach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Indukowana NOS (NOS II) jest wytwarzana w odpowiedzi na bodźce zapalne. Działa w komórkach układu immunologicznego, takich jak neutrofile i makrofagi. Występuje także w innych liniach komórkowych np. w hepatocytach. Śródbłonkowa NOS (NOS III) jest stale wytwarzana w komórkach śródbłonka i pełni rolę w procesie rozszerzania naczyń. (Bhatraju, Crawford, Hall i Lang, 2015).

Endogenne NO powoduje rozluźnienie mięśni gładkich. Odbywa się to na drodze aktywacji cyklicznej guanylanowej, co podnosi poziom wewnątrzkomórkowego cGMP i hamuje wchodzenie wapnia do komórki, wywołując rozkurcz mięśni gładkich. Również poprzez aktywację kanałów potasowych dochodzi do hiperpolaryzacji komórkowej, stymulacja zależnej od cGMP kinazy białkowej i defosforylacji łańcucha lekkiego miozyny, co powoduje rozkurcz mięśni gładkich.

Egzogenne NO w postaci wziewnej ma podobny mechanizm działania w łożysku naczyniowym płuc. Po zainicjowaniu rozkurczu mięśni gładkich naczyń, cząsteczka NO dyfunduje do krwiobiegu, gdzie łączy się z żelazem w hemoglobinie, tworząc methemoglobinę i ulega inaktywacji. Dlatego cząsteczka NO nie wywiera praktycznie żadnego wpływu rozszerzającego na naczynia systemowe. (Steudel, Hurford i Zapol, 1999)

Wpływ tlenku azotu na systemy biologiczne rozciąga się daleko poza funkcję naczynioruchową. W rzeczywistości, NO odgrywa podwójną rolę zarówno jako mediator pro- i przeciwzapalny. Ponadto, NO hamuje reakcje leukocytów, obniża

agregację płytek, bierze udział w neurotransmisji, rozszerza oskrzela i łagodzi reakcje zapalne w takich zaburzeniach jak niedokrwienie czy reperfuzja. W leczeniu tlenu azotu stosuje się wziewnie w dawce 1-80 ppm. Ze względu na to, że jest on stosowany w połączeniu z tlenem w różnych stężeniach, dochodzi do powstawania dwutlenku azotu (NO₂), który może działać uszkadzająco na tkanki płuc. Szybkość powstawania NO₂ zależy od stężenia tlenu azotu oraz od stężenia tlenu, dlatego NO powinien być stosowany w najmniejszym możliwym stężeniu tlenu a stężenia NO i NO₂ powinny być stale monitorowane podczas terapii.

W organizmie cząsteczka NO wchodzi w reakcję z oksyhemoglobina w efekcie czego powstaje methemoglobina. Obecność methemoglobiny przesuwają krzywą dysocjacji oksyhemoglobiny w lewo, zmniejszając jej zdolność do oddawania tlenu. Stężenie metHb w zakresie 0-15% jest najczęściej bezobjawowe. Przy stężeniach na poziomie 15-20% rozwija się sinica. Stężenia powyżej 70% są śmiertelne. Ryzyko toksyczności tlenu azotu związanej z methemoglobinemią jest szczególnie duże u noworodków - hemoglobina płodowa łatwiej i szybciej przechodzi w methemoglobinę pod wpływem NO, eryocyty noworodków i wcześniaków zawierają mniejszą ilość reduktazy methemoglobiny. Dlatego należy regularnie monitorować stężenie methemoglobiny podczas terapii tlenkiem azotu.

W klinice tlenek azotu stosowany jest w leczeniu przetrwałego nadciśnienia płucnego noworodków (PPHN), dysplazji oskrzelowo - płucnej oraz zespołu ostrej niewydolności oddechowej (acute respiratory distress syndrome). Selektywne rozszerzenie naczyń łożyska płucnego przez podawany wziewnie NO, poprawia stosunek wentylacji do perfuzji zwiększa utlenowanie krwi i zmniejsza obciążenie prawej komory serca. Dodatkową korzyścią jest przeciwzapalne i przeciwapagacyjne działanie podawanego wziewnie tlenu azotu (Granger i Kubes, 1996), (Gries i inni, 1998).

W leczeniu nadciśnienia płucnego związanego z wadami wrodzonymi serca NO stosowany jest od kilku dekad zarówno w celach diagnostycznych (próba z tlenkiem azotu w trakcie badania hemodynamicznego) jak i terapeutycznych (Miller i inni, 2000). Szczególną korzyść z leczenia tlenkiem azotu podawanym wziewnie do układu oddechowego odnoszą dzieci z wadami serca o typie serca jednokomorowego w trakcie leczenia paliatywnego metodą Fontana.

Korzystne działanie tlenku azotu wykazano również w anemii sierpowatokrwinkowej, u pacjentów po przeszczepie serca i płuc oraz u pacjentów leczonych przy użyciu ECMO.

W badaniach nad mechanizmami niedokrwienia i reperfuzji, badaniach w grupie pacjentów po przeszczepie wątroby, po przebytych zatrzymaniu krążenia i w kardiochirurgii wykazano działanie cytoprotekcyjne, przeciwzapalne, antyagregacyjne i antyoksydacyjne. (Bacha i inni, 1997), (Siriussawakul, Zaky i Lang, 2010). Działa on zatem wielokierunkowo i ma różne punkty uchwytu. W pracy przedstawiono wyniki badania wpływu podaży tlenku azotu w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego, wraz z mieszaniną gazów oddechowych, bezpośrednio do oksygenatora.

3. ZAŁOŻENIA

1. Zaburzenia patofizjologiczne powodowane przez wady wrodzone serca oraz ich chirurgiczne leczenie, z użyciem krążenia pozaustrojowego, pobudzają uogólnioną reakcję zapalną. Odpowiedź zapalna ma bezpośredni i pośredni wpływ na przebieg i wyniki leczenia pooperacyjnego.
2. Podaż tlenu azotu w dawkach farmakologicznych do oksygenatora, w trakcie krążenia pozaustrojowego, pozwala na uzyskanie jego wysokiej biodostępności w trakcie procesów niedokrwienia, niedotlenienia i reperfuzji. Tlenek azotu może wywierać bezpośrednie i pośrednie działania farmakologiczne.
3. Tlenek azotu stosowany wziewnie może wywoływać efekt przeciwzapalny, zmniejszać uszkodzenie niedokrwienno – reperfuzyjne, przyczyniać się do lepszej protekcji serca i wpływać na przebieg oraz wyniki leczenia pooperacyjnego.

4. CEL PRACY

Celem pracy jest ustalenie wpływu podaży tlenu azotu, wraz z mieszaniną gazów oddechowych, do oksygenatora, w trakcie krążenia pozaustrojowego, na wywoływane przez operację korekcji wady serca reakcję zapalną, uszkodzenie reperfuzyjne serca oraz przebieg leczenia w oddziale intensywnej terapii.

W szczególności planowane jest:

1. Charakterystyka jakościowa i ilościowa reakcji zapalnej wywołanej podczas korekcji złożonej wrodzonej wady serca u dzieci z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego.
2. Określenie wpływu stosowanego śródoperacyjnie tlenu azotu na profil wybranych czynników związanych z ostrą odpowiedzią zapalną oraz jej pośrednich skutków związanych z perfuzją narządową i protekcją mięśnia sercowego.
3. Określenie wpływu inhalacji tlenu azotu na przebieg kliniczny leczenia w oddziale intensywnej terapii (powikłania metaboliczne, czas wspomagania oddechu, czas intensywnej terapii, indeks katecholamin).

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Charakterystyka badanej grupy.

Badaniem objęto grupę 30 kolejnych pacjentów ze złożonymi, sinicznymi wadami serca, którzy operowani byli w Klinice Kardiochirurgii Dziecięcej, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Wśród nich znalazło się 6 dzieci z tetralogią Fallota, 12 z zespołem niedorozwoju lewego serca na różnych etapach leczenia paliatywnego, 5 z atrezią zastawki trójdzielnej, 2 z dwuujściową komorą prawą, 3 z przełożeniem wielkich pni tętniczych oraz 2 z całkowitym kanałem przedsionkowo – komorowym (po wcześniejszym paliatywnym zabiegu zwężenia opaską tętnicy płucnej). Z badania wykluczono wszystkich pacjentów z prostymi, bezsincznymi wadami serca oraz pacjentów operowanych bez użycia krążenia pozaustrojowego. Badaniem nie objęto również pacjentów, których opiekunowie prawni (rodzice) nie wyrazili zgody na wzięcie udziału w projekcie. Wszystkich pacjentów poddano planowym operacjom korekcyjnym, z użyciem krążenia pozaustrojowego.

Tab. 6.1.1 Charakterystyka grupy pacjentów poddanych badaniu. Dane przedstawiono jako licznosci lub średnia +/- SD. NO – tlenek azotu;

Zmienna	NO (1)	NO (0)	P
N (%)	14 (46.7)	16 (53.3)	n.s.
Płeć męska; N (%)	8	6	n.s.
Płeć żeńska; N (%)	6	10	n.s.
Wiek (dni)	679.4 ± 342.4	534 ± 228.7	n.s.
Masa ciała (kg)	11.4+/-6.4	10.6+/-4.8	n.s.
Zgon	0	0	n.s.

W przedoperacyjnych badaniach diagnostycznych, u wszystkich pacjentów, zakwalifikowanych do badania, stwierdzono złożone, współistniejące zaburzenia patofizjologiczne tj. przeciążenie ciśnieniowo – objętościowe serca, z towarzyszącą

sinicą. U 14 spośród nich, w sposób randomizowany przez zespół perfuzjonistów, w trakcie operacji korekcji stosowano tlenek azotu. Gaz podawany był w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego, bezpośrednio do oksygenatora w dawce 20 ppm. Protokół stosowania tlenu azotu, zgodnie ze wskazaniami klinicznymi oraz zaleceniami producenta był identyczny u wszystkich dzieci. U wszystkich 30 pacjentów, standardowo podłączano zestaw do inhalacji i monitorowania NO do oksygenatora. W sposób randomizowany włączano inhalację NO do mieszaniny gazów oddechowych (grupa NO.1.) lub jej nie stosowano i podawano tylko gazy oddechowe (grupa NO.0. - placebo) (ryc.6.2.1). W Tab. 6.1.1. przedstawiono charakterystykę badanych grup.

U wszystkich pacjentów, w ramach rutynowych oznaczeń hematologicznych i / lub biochemicznych, wykonywanych w trakcie leczenia operacyjnego lub intensywnej terapii, pobierano próbki krwi (2-3 ml): 1 – przed zabiegiem operacyjnym - próbka referencyjna (w trakcie indukcji znieczulenia, po założeniu inwazyjnego pomiaru ciśnienia tętniczego), 2a – po podłączeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b – po zaklemowaniu aorty i podaniu kardioplegii – w trakcie krążenia pozaustrojowego po osiągnięciu docelowej hipotermii, 2c – po usunięciu klemu aortalnego, w trakcie reperfuzji i ogrzewania pacjenta, 2d – po reperfuzji serca i odłączeniu krążenia pozaustrojowego w normotermii, 3 – w 4. godzinie po operacji, 4 – w 8. godzinie po operacji, 5 - w 12h po operacji, 6 – w 24h po operacji. Badanie objęte było zgodą Komisji Bioetycznej CMUJ.

5.2. Metody operacyjne. Protokół znieczulenia.

Wszystkie operacje w badanej grupie pacjentów przeprowadzono w standaryzowany, identyczny sposób używając tej samej metodologii i technologii. Korekcji wady dokonywano w znieczuleniu ogólnym, przy użyciu krążenia pozaustrojowego i hipotermii ogólnej.

Znieczulenie ogólne prowadzono przy pomocy diazepamu, fentanylu i bromku pankuronium. Po indukcji znieczulenia wykonywano intubację dotchawiczą oraz centralny dostęp żylny i inwazyjny pomiar ciśnienia tętniczego (tętnica obwodowa). Okołooperacyjna profilaktyka antybiotykowa prowadzona była przy zastosowaniu ceftazydymu.

Krażenie pozaustrojowe prowadzone było zgodnie ze stosowanym w Klinice Kardiochirurgii Dziecięcej CMUJ protokołem, który nie był zmieniany w trakcie trwania badania.

Układ do krążenia pozaustrojowego składał się z pomp rolkowych DeBekeya, oksygenatora oraz systemu drenów łączących, zestawu filtrów, rezerwuarów, drenów i kaniul. Ochładzanie oraz ogrzewanie pacjenta prowadzone było przy użyciu wymiennika ciepła. Bezpośrednio przed operacją układ do krążenia pozaustrojowego wypełniano roztworem początkowym (*priming*). Do wypełnienia stosowano płyn wieloelektrolitowy (w ilości zależnej od masy ciała pacjenta i rodzaju oksygenatora, Solu-Medrol: 30mg/kg masy ciała, natrium bicarbonicum: 10 ml/1000 ml roztworu wypełniającego i 20ml/1j(220ml) koncentratu krwinek czerwonych (KKCz), heparyna 10mg/1000ml roztworu oraz 30mg na każdą stosowaną jednostkę (220ml) KKCz, furosemid 1mg/kg m.c. (maksymalnie 40 mg). Dodatkowo na etapie ogrzewania pacjenta, do układu krążenia pozaustrojowego dodawano mannitol 0,5g/kg m.c. oraz glukonian wapnia w dawce 1g/1j(220ml) KKCz lub 1g/1000ml *primingu*. Perfuzja prowadzona była przy zastosowaniu strategii *alpha-stat* i hipotermii. Do zatrzymania serca, po zaklemowaniu aorty, stosowano jednorazową dawkę roztworu kardioplegii krystalicznej, wysokopotasowej. Po wykonaniu korekcji wady i uruchamiano serca (reperfuzja) i ogrzewano pacjenta do normotermii. Czas reperfuzji wynosił minimalnie 1/3 czasu zaklemowania aorty. Podczas chłodzenia i ogrzewania pacjenta przepływ utrzymywany był na poziomie pomiędzy 2.4 i 3.0 l/min/m². W przypadku dysfunkcji mięśnia sercowego, do wspomaganie układu krążenia rozpoczynano wlew ciągły dopaminy, milrinonu oraz adrenaliny. Po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, do odwrócenia heparyny używano protaminy, a do uzupełniania traconej objętości używano preparatów krwi i osocza.

Podaż NO prowadzona była w sposób standardowy według instrukcji producenta. Dren do podaży NO połączony został z drenem doprowadzającym gazy oddechowe do oksygenatora przy pomocy konektora, w odległości ok 40 cm od wlotu gazów oddechowych. Monitor tlenu azotu podłączono w podobny sposób w odległości ok 4 cm od wlotu gazów oddechowych do oksygenatora (Ryc. 6.2.1, 6.2.2). Podaż NO utrzymywana była na poziomie 20 ppm od momentu rozpoczęcia krążenia pozaustrojowego do jego zakończenia. Wraz z zakończeniem krążenia pozaustrojowego przerywano również podaż tlenu azotu.

Wszyscy pacjenci leczeni byli według identycznego, standardowego protokołu znieczulenia, przy pomocy identycznej aparatury i strategii prowadzenia krążenia pozaustrojowego oraz podaży roztworu kardioplegicznego.



Ryc.6.2.1. Zestaw do podawania i monitorowania tlenu azotu bezpośrednio do oksygatora, wraz z mieszaniną gazów oddechowych.



Ryc.6.2.2. Sposób podłączenia do oksygatora i monitorowania podaży tlenu azotu w trakcie operacji korekcji wady w krążeniu pozaustrojowym.

Monitorowanie okołoperacyjne obejmowało EKG, inwazyjny pomiar ciśnienia tętniczego, ośrodkowego ciśnienia żylnego, pulsoksymetrii, temperatury ciała, diurezy oraz drenażu z klatki piersiowej. Dodatkowo monitorowano podstawowe parametry oddechowe, biochemiczne (gazometria, równowaga kwasowo – zasadowa, stężenie podstawowych elektrolitów, stężenie mleczanów oraz glukozy). Substytucji objętości dokonywano przy pomocy krystaloidów z elektrolitami, roztworu albuminy, osocza świeżo mrożonego oraz koncentratu krwinek czerwonych, w zależności od wskazań.

W oddziale intensywnej terapii pooperacyjnej, konieczność stosowania leków wspomagających układ krążenia zależna była od stopnia dysfunkcji serca oraz monitorowania parametrów hemodynamicznych i biochemicznych. Na podstawie ilości i jakości stosowanych leków obliczano, znany w pooperacyjnej intensywnej terapii, indeks katecholamin (CAI), w celu porównania dawek (wyrażonych w $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) stosowanych u poszczególnych pacjentów ($\text{CAI} = \text{dawka Dopaminy} + \text{dawka Dobutaminy} + 100 \times (\text{dawka Adrenaliny} + \text{dawka Noradrenaliny})$).

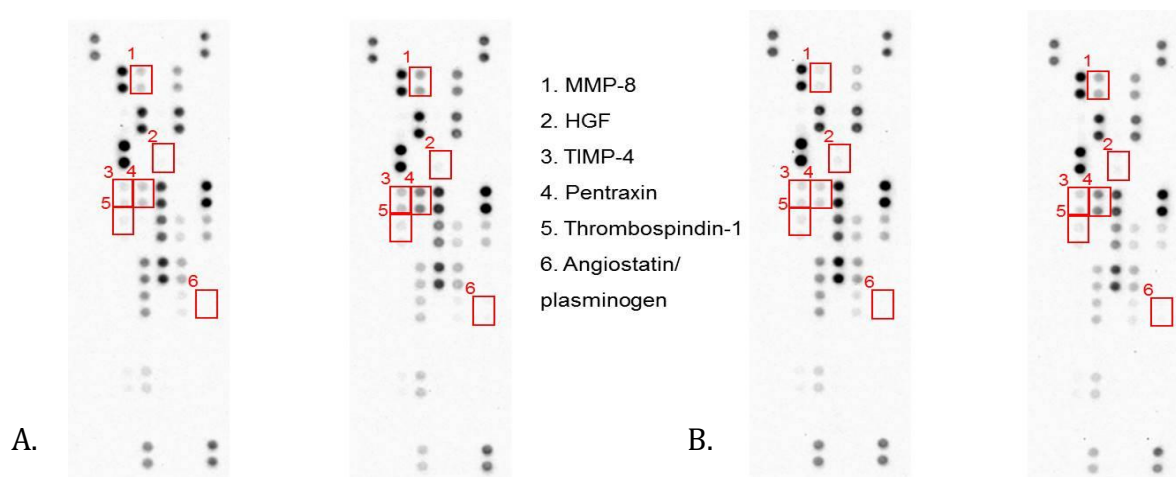
W ramach rutynowych oznaczeń biochemicznych i hematologicznych pobierano próbki krwi w celu oznaczenia profilu badanych czynników. U wszystkich badanych pacjentów w okresie pooperacyjnym stwierdzono jeden lub kilka kryteriów klinicznych związanych z uogólnioną odpowiedzią zapalną: gorączka (wyższa lub równa 38 C), dysfunkcja hemodynamiczna (wyrażona indeksem katecholamin), dysfunkcja płuc (wyrażona indeksem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$), dysfunkcja nerek (wzrost kreatyniny o więcej niż 20%), obecność uogólnionego obrzęku (ocena kliniczna i radiologiczna – pomiar grubości), dysfunkcja jelit (niedrożność czynnościowa, brak lub zbyt wolna perystaltyka).

5.3. Metody laboratoryjne

5.3.1. Półilościowe wyznaczenie profilu czynników związanych z odpowiedzią zapalną.

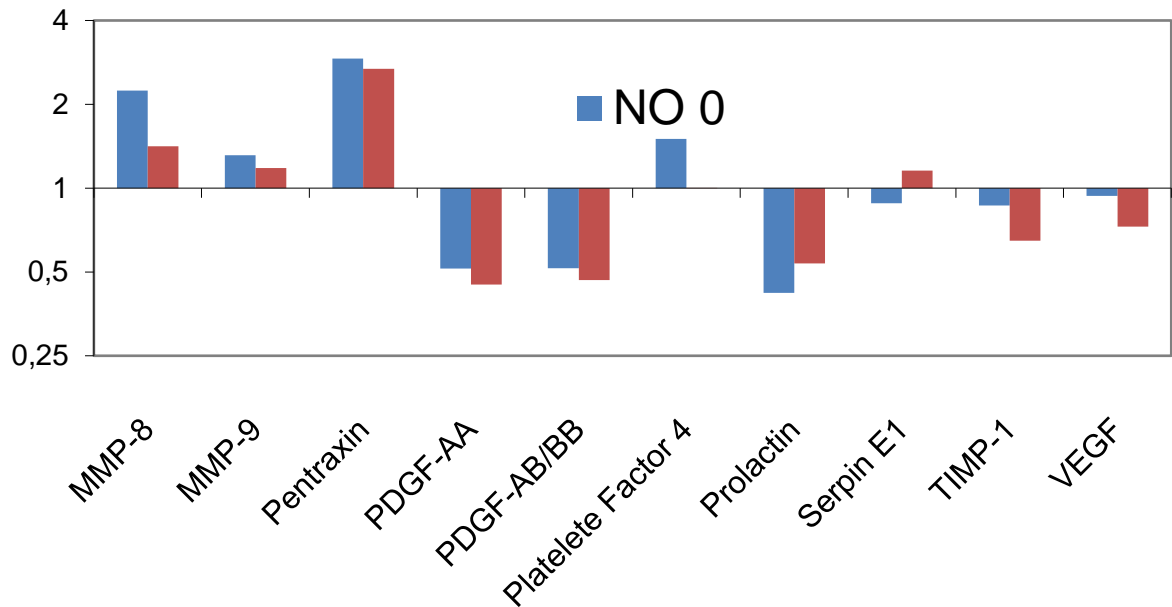
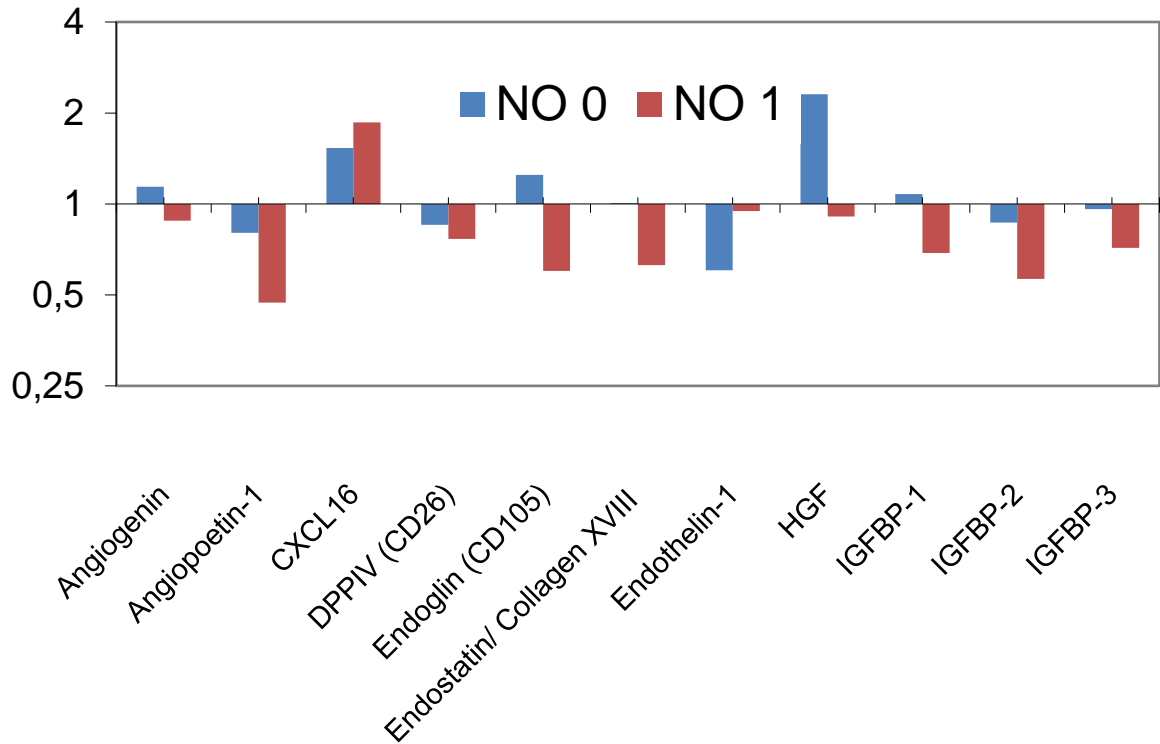
W celu wyznaczenia odpowiedniego profilu białek do analizy wysokiej czułości, wykonano badanie przesiewowe pobranych próbek krwi, przy pomocy komercyjnie dostępnych macierzy Human Proteome Profiler Arrays (R&D) obejmujących 96 typowych czynników związanych z odpowiedzią zapalną, metaboliczną, angiogenną oraz podstawowe wskaźniki niedokrwienia i niewydolności serca.

Badanie przeprowadzono ściśle według instrukcji producenta. Odwirowane próbki krwi, pobrane w wybranych punktach czasowych (przed operacją 1. – próbka referencyjna oraz po operacji: próbka 3. – 4 godziny po operacji; próbka 5. – 12 godzin po operacji) wymieszane zostały z odpowiednio znakowanymi (*biotynylated detection antibodies*) przeciwciałami i inkubowane przez 12 godzin w macierzach screeningowych zawierających przeciwciała specyficzne dla detekcji profilu oznaczanych białek. Po wypłukaniu, macierze poddawano inkubacji z przeciwciałami sprzężonymi streptawidyną z peroksydazą chrzanową (HRP). Przed analizą dodawano substrat chemiluminescencyjny, a sygnał rejestrowano przy pomocy analizatora *MicroChemi (DNR Bio-Imaging System)*. Wykorzystując analizę densytometryczną przy pomocy *Quantity One Software (Bio-Rad)* wyznaczono względną zmianę stężenia poszczególnych czynników poprzez porównanie punktu czasowego referencyjnego (próbka 1.) w stosunku do pozostałych punktów czasowych. W trakcie analizy, dzięki zastosowaniu oprogramowania *Quantity one* uśredniony sygnał podłoża odejmowano od sygnału każdego dołka. Do każdej macierzy dołączona była również kontrola pozytywna, w celu zapewnienia powtarzalności i odpowiedniej jakości metody pomiarowej. Na Ryc. 6.6.1 przedstawiono przykładowy wynik badania screeningowego metodą macierzy dołkowej dotyczący niektórych analitów. Przedstawiono wpływ stosowanego tlenu azotu na ekspresję: angiostatyny, MMP8 (matrix metalloproteinase-8), TIMP4 (tissue inhibitor of metalloproteinase 4) i thrombospondyny.



Ryc.6.6.1. Przykładowy wynik badania screeningowego przy pomocy macierzy obrazujący wpływ podaży tlenku azotu (NO) na panel badanych czynników osoczowych. Porównanie próbki referencyjnej 1 (lewa strona ryciny A i B) z próbką pobraną 4 godziny po operacji (próbka 3.) A. Obraz macierzy dołkowej u pacjentów, którzy otrzymali NO do oksygenatora (grupa NO.1.). Zaznaczono lokalizację przeciwciał dla wybranych czynników osoczowych oraz pozytywną i negatywną kontrolę. B. Obraz macierzy dołkowej u pacjentów, którzy nie otrzymali inhalacji NO do oksygenatora (grupa NO.0.).

Na Ryc. 6.6.2. przedstawiono przykładowe zestawienie względnych poziomów ekspresji wybranych czynników, w odniesieniu do poziomu wyjściowego (który oznacza linia na poziomie 1) wyrażone w skali logarytmicznej. Dzięki badaniu porównawczemu wyselekcjonowano profil białek wykrytych zastosowaną metodą, których stężenie zmieniło się istotnie pomiędzy poddanymi *screeningowi* punktami czasowymi.



Ryc.6.6.2. Przykładowy wynik screeningowego badania wpływ tlenu azotu na ekspresję wybranych czynników – oznaczenia ilościowe porównujące średnią oznaczeń w próbce referencyjnej (1.) z ze średnią oznaczeń w próbce pobranej 4 godziny po operacji (3.).

Na rycinie przedstawiono względne poziomy ekspresji badanych czynników odniesieniu do poziomu wyjściowego (który oznacza linia na poziomie 1) wyrażone w skali logarytmicznej. Porównanie pacjentów, którzy otrzymywali w trakcie krążenia pozaustrojowego tlenek azotu (kolor czerwony) z pacjentami, którzy nie otrzymali inhalacji NO (kolor niebieski). MMP8, matrix metalloproteinase-8; TIMP4, Metalloproteinase inhibitor 4; HGF – hepatocyte growth factor; IGFBP-1,-2, Insulin-like growth factor-binding protein 1,2; PDGF, platelet-derived growth factor; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; VEGF, vascular endothelial growth factor.

5.3.2. Ilościowe oznaczenia czynników osoczowych

Do ilościowego oznaczenia stężenia badanych czynników osoczowych użyto macierzy Miliplex Map Kit Assays (Merck Millipore), która oparta jest o magnetyczną detekcję i połączona z platformą Luminex xMAP. Analizie poddano panel czynników wyselekcjonowanych na podstawie przeprowadzonego *screeningu*. Szczegółową listę użytych przeciwciał przedstawiono w Tabeli 6.6.2.

Analizę przeprowadzono we wszystkich punktach czasowych randomizowanych do dwóch grup w zależności od śródoperacyjnej podaży tlenu azotu. Próbkę osocza przygotowano zgodnie z protokołem producenta. Macierze dołkowe zawierające odpowiednie podłoża fluorescencyjne sprzężone z przeciwciałami wychwytyjącymi badane anality inkubowano z surowicą krwi poszczególnych pacjentów. Następnie dodawano przeciwciała wiążące fluoresceinę. Poziom fluorescencji w każdym dołku odczytywano przy użyciu systemu Bio-Plex 200 (Bio-Rad) i analizowano oprogramowaniem Bio-Plex Manager (BioRad). Stężenie analitów obliczano w oparciu o krzywe standardowe uzyskane dla odpowiednich białek.

Tab. 6.6.2. Przeciwciała użyte do ilościowych pomiarów wysokiej czułości wybranych analitów w próbkach krwi we wszystkich punktach czasowych.

Analizowany czynnik	Użyte przeciwciała	Numer katalogowy
Insulina	Human Bone Magnetic Bead Panel	HBNMAG-51K
CKMB, Troponina I, NTpro-BNP	Human Cardiovascular Disease Panel 1 Magnetic Bead Kit	HCVD1MAG-67K
IL-1ra	Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel	HCYTOMAG-60K
Pentaksyna	Human Cardiovascular Disease (CVD) Magnetic Bead Panel 4	HCVD4MAG-67K
TNF α , GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10	High Sensitivity Human Cytokine Magnetic Bead	HSTCMAG-28SK

Dane kliniczne objęte analizą zawierały: wiek, czas krążenia pozaustrojowego, czas zaklemowania aorty, objętość krwawienia pooperacyjnego, czas wspomaganego oddechu, czas pobytu na intensywnej terapii, indeks katecholamin, poziom mleczanów, poziom glukozy.

Próbki krwi pobrane zostały w ramach rutynowych badań laboratoryjnych, a udział w badaniu nie wiązał się dla pacjenta z przedłużeniem pobytu w szpitalu oraz dodatkowymi procedurami. Wszystkie oznaczenia wykonano w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Badanie finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki – K/POB/000073 oraz z grantu statutowego –K/ZDS/003727 i objęte było zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego –KBET/176/B/2010.

5.4. Metody analizy statystycznej

Do analizy statystycznej wykorzystano standardowe metody statystyki opisowej. Dane zaprezentowano jako średnie +/- odchylenie standardowe lub częstości i procenty. Normalność rozkładów badano testem Shapiro-Wilka. Różnice pomiędzy średnimi wartościami zmiennych o rozkładzie normalnym badano testem *t-Studenta*. W przypadku zmiennych o rozkładzie nienormalnym różnice pomiędzy grupami badano testem Mann-Whitney. Analizę zmiennych objętych powtarzanymi pomiarami wykonano przy pomocy nieparametrycznej analizy wariancji powtarzanych pomiarów Friedmana. Testy *post hoc* przeprowadzono przy użyciu metody Dunna, przyjmując poprawkę dla wielokrotnych porównań. Analizę międzygrupową przeprowadzono testem ANOVA Kruskala-Wallisa, stosując procedurę Holmsa-Bonferoniego dla wielokrotnych porównań. Za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0.05$, a wszystkie obliczenia wykonano programem *Statistica 12* (Stat Soft. Inc. 1984-2017).

6. WYNIKI

Podstawową charakterystykę badanych pacjentów podano w tabelach 6.1.1. i 7.3.1.

Średni czas trwania krążenia pozaustrojowego w badanych grupach wynosił ok. 100 minut (NO.1. 116.7 ± 23.3 vs. NO.0. 94.5 ± 23.1), a średni czas zaklemowania aorty ok. 45 minut (NO.1. 45.4 ± 20.3 vs. NO.0. 42.7 ± 16.7). Oznacza to, że odstępów czasowe pomiędzy badanymi próbkami nie są równe, a czas pomiędzy próbką 2b a 2c, stanowił połowę czasu trwania operacji. Podobnie odstępów pomiędzy pozostałymi śródoperacyjnymi punktami czasowymi nie były jednakowe. Wynika to ze schematu i zasad prowadzenia operacji w krążeniu pozaustrojowym oraz schematu pobierania rutynowych badań, w ramach których analizowano próbki (w ramach zgody Komisji Bioetycznej UJ). Czas chłodzenia (punkty czasowe od 2a do 2b) powinien wynosić 15 – 20 minut, a czas reperfuzji serca w trakcie ogrzewania powinien wynosić $1/3 - 1/2$ czasu zaklemowania aorty. Na podstawie analizy porównawczej nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy pacjentami, którzy otrzymali NO i pacjentami, u których nie stosowano tlenu azotu w odniesieniu do wieku, masy ciała, rozkładu płci, a także czasu trwania krążenia pozaustrojowego, czasu trwania zaklemowania aorty, czasu pobytu w oddziale IT oraz poziomu glukozy w próbce pobranej po zakończeniu krążenia pozaustrojowego. Istotne różnice dotyczyły poziomu mleczanów bezpośrednio po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, czasu wspomagania oddechu, indeksu katecholamin oraz objętości krwawienia pooperacyjnego (Tab.7.3.1.). Grupa pacjentów, która otrzymała NO charakteryzowała się istotnie krótszym czasem wspomagania oddechu (17.4 ± 1.2 h vs. 38.6 ± 1.9 h) oraz mniejszą wartością indeksu katecholamin (1.9 ± 1.3 vs. 3.7 ± 0.76) (Tab.7.3.1.).

6.1. Półilościowa analiza zmian

W celu wyznaczenia wpływu stosowanego tlenu azotu w warunkach klinicznych, analizie poddano czynniki osoczowe bezpośrednio związane z inicjowaniem i regulacją odpowiedzi zapalnej lub uwalniane jako rezultat uszkodzenia zapalnego, wpływające na funkcję serca i naczyń.

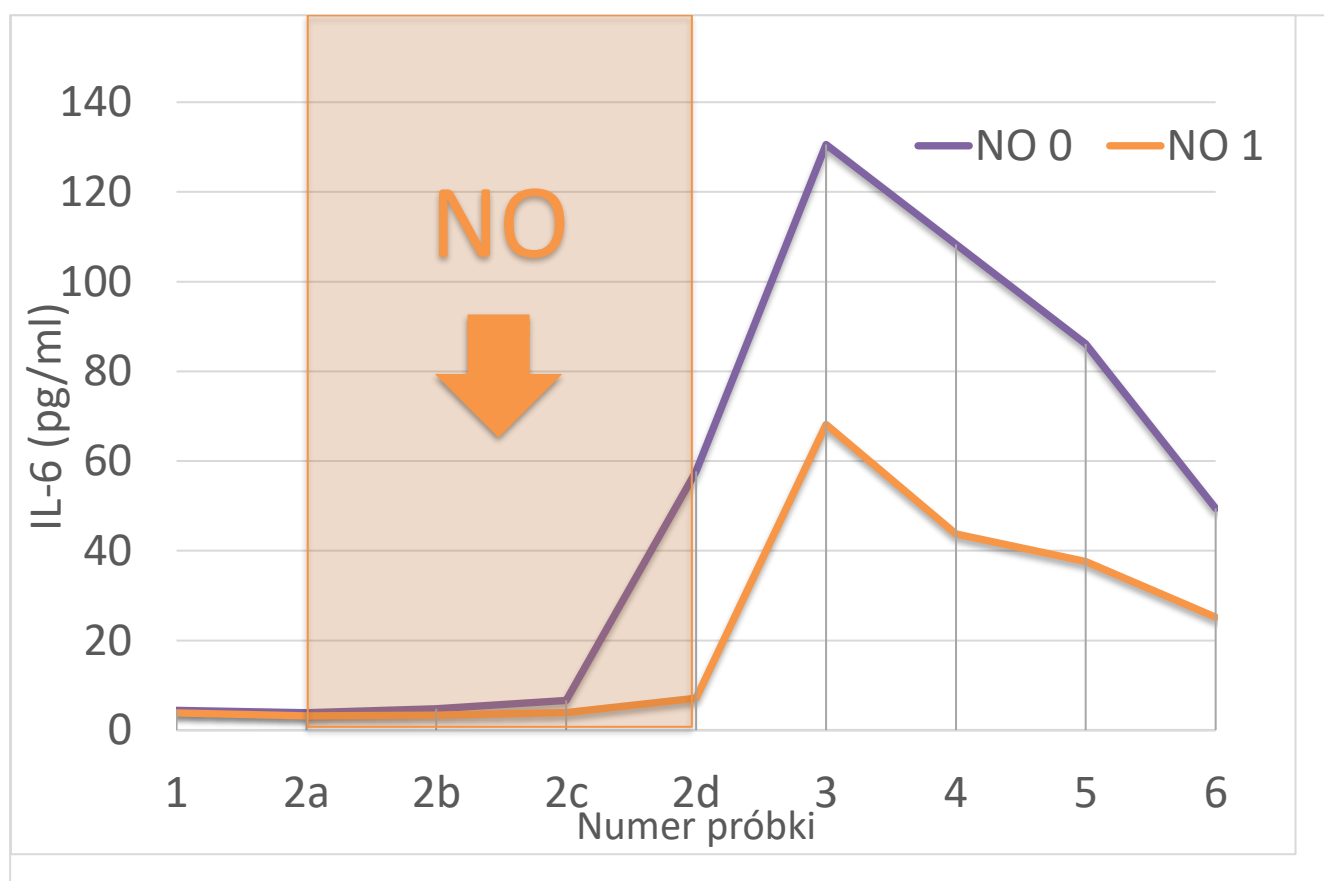
Porównanie metodą półilościową z zastosowaniem macierzy dołkowych 96 czynników osoczowych pozwoliło na znalezienie istotnych różnic pomiędzy

wyselekcjonowanymi punktami czasowymi w odniesieniu do: interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 8 (IL-8), interleukiny 10 (IL-10), interleukiny 1 β (IL-1 β), czynnika martwicy guza (tumor necrosis factor, TNF- α), CKMB, Troponiny I; Insuliny, IL1-ra (interleukin-1 receptor antagonist), pentraksyny, czynnika stymulującego kolonie makrofagów, (GM-CSF macrophage colony-stimulating factor). Czynniki te włączono do dalszej analizy ilościowej wysokiej czułości. W przypadku pozostałych analitów sygnał chemiluminescencyjny z odpowiadających im dołków, zawierających odpowiednie przeciwciała nie różnił się od sygnału tła oraz negatywnej kontroli.

6.2. Ilościowa analiza wysokiej czułości

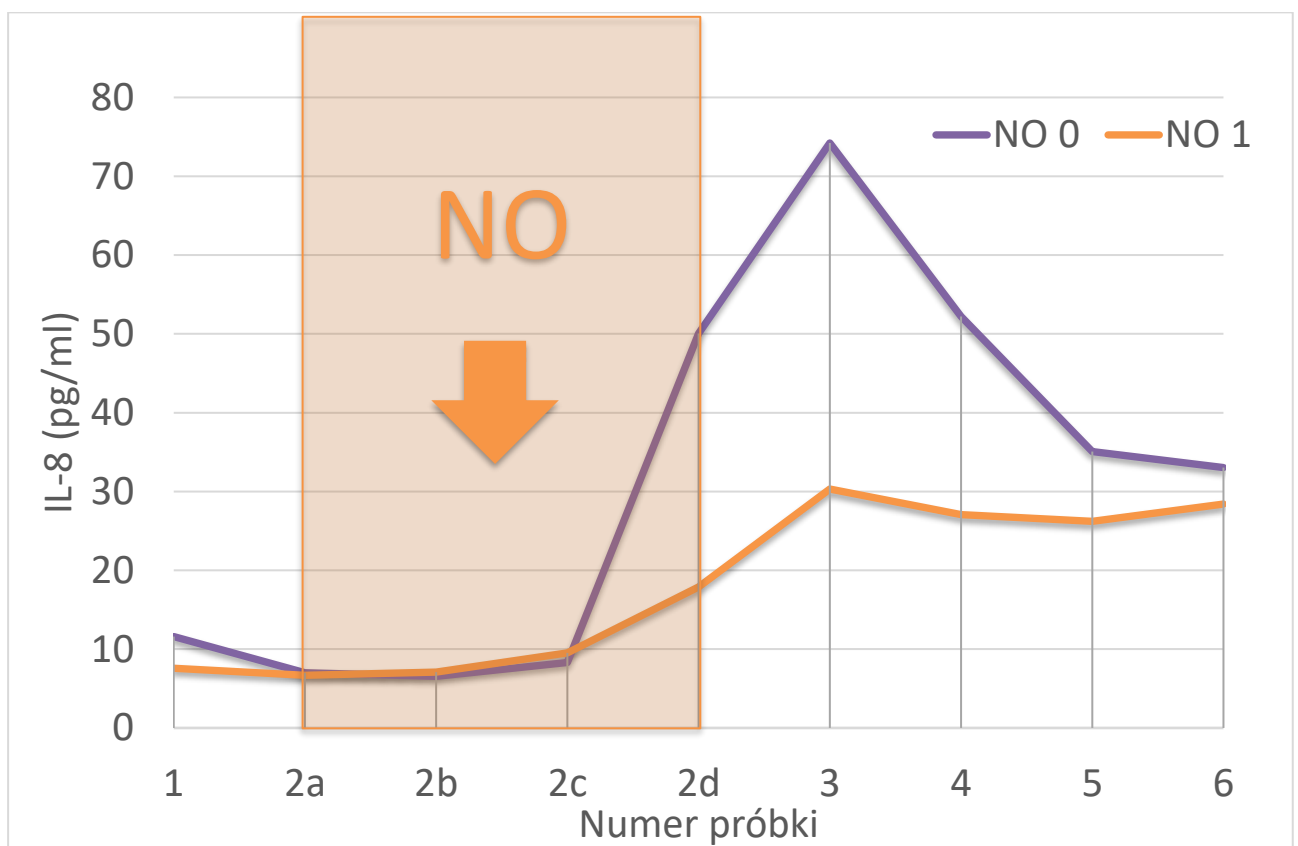
Wśród czynników wyselekcjonowanych do dalszej analizy ilościowej wysokiej czułości, znalazły się czynniki w sposób bezpośredni lub pośredni związane z regulacją odpowiedzi zapalnej, biorące jednocześnie udział w regulacji procesów takich jak angiogeneza i regeneracja, chemoatrakcji oraz protekcja serca przed uszkodzeniem niedokrwienno - reperfuzyjnym. Stosując analizę wariancji powtarzanych pomiarów obserwowano zróżnicowaną dynamikę zmian stężenia badanych czynników.

Stężenie IL-6 zmieniało się istotnie zarówno w grupie NO1 (Chi Sqr. = 20.8, p = 0.0007), jak i NO0 (Chi Sqr. = 33.3, p = 0.00005) (Ryc.7.2.1.). Analiza wewnątrzgrupowa wykazała statystycznie istotny wzrost stężenia IL-6 w punkcie czasowym 2d, 3, 4 i 5 u dzieci, które nie otrzymały śródoperacyjnej inhalacji NO, w odniesieniu do próbki przedoperacyjnej. W grupie dzieci z inhalacją NO, istotny wzrost obserwowano jedynie w punkcie 3., w porównaniu z próbką przedoperacyjną (Ryc. 7.2.1.). Analiza międzygrupowa wykazała istotne różnice pomiędzy grupami w punktach: 2d, 3, 4, 5. Taka dynamika zmian wskazuje na istotny efekt przeciwzapalny stosowanego tlenu azotu.



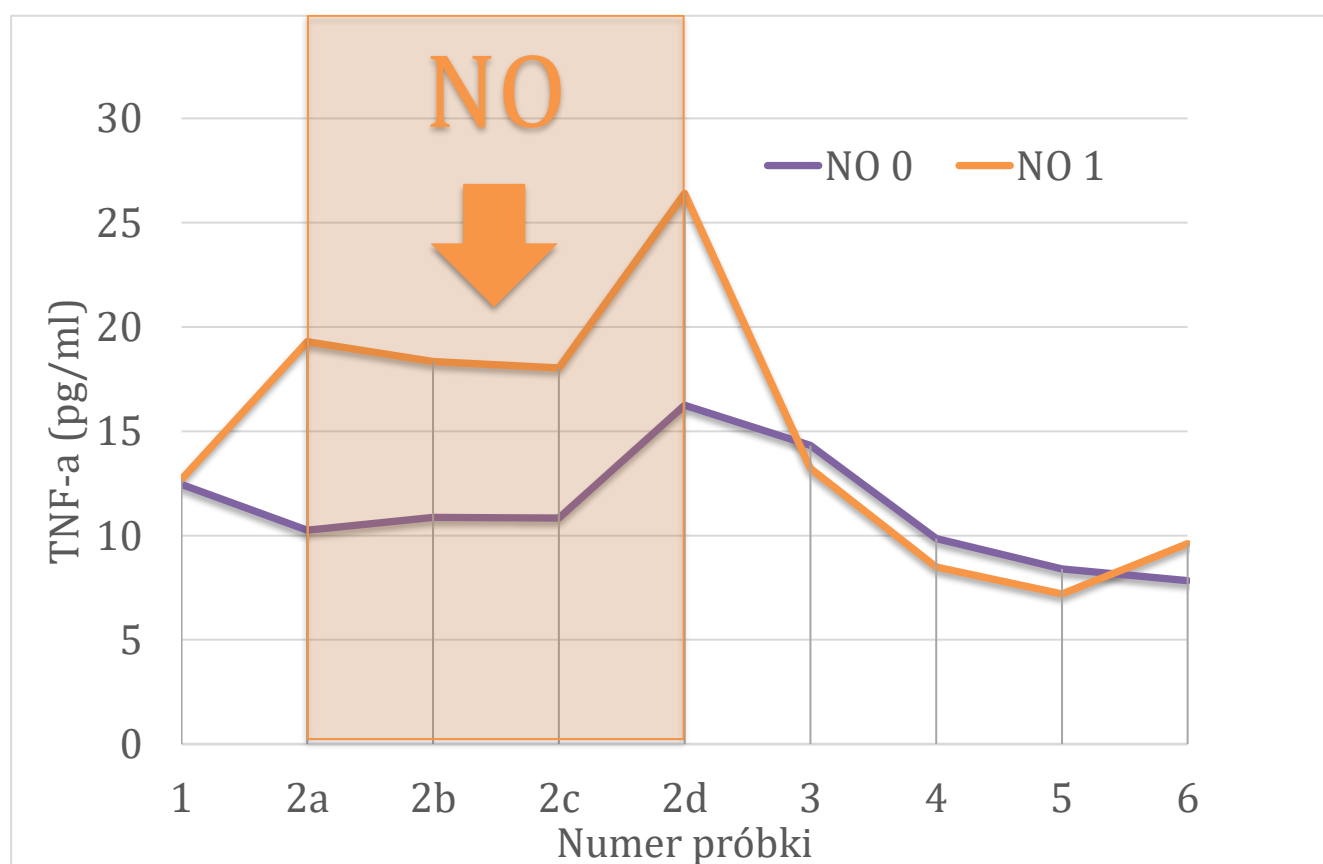
Ryc.7.2.1. Wpływ śródoperacyjnej podaży tlenu azotu na średnie stężenie IL6 u pacjentów ze złożonymi wadami serca. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii w hipotermii, 2c. – reperfuzja serca, w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie IL-8 zmieniło się istotnie zarówno w grupie NO.0. ($\chi^2=19.6$, $p=0.011$), jak i w grupie NO1($\chi^2=28.58$, $p=0.00037$). Najistotniejszy wzrost w obydwu grupach stwierdzono w punkcie 3., przy czym w grupie bez tlenu azotu wzrost ten był istotnie większy niż w grupie z tlenkiem azotu. Analiza wewnątrzgrupowa wykazała istotne różnice w stężeniu IL-8 pomiędzy próbką referencyjną a próbkami 2d, 3, 4 w grupie NO.0. oraz pomiędzy próbką przedoperacyjną a próbką 3. w grupie NO.1. Dodatkowo, analiza międzygrupowa wykazała istotne różnice w punktach 2d. oraz 3. ($p<0.05$, Ryc.7.1.3.).



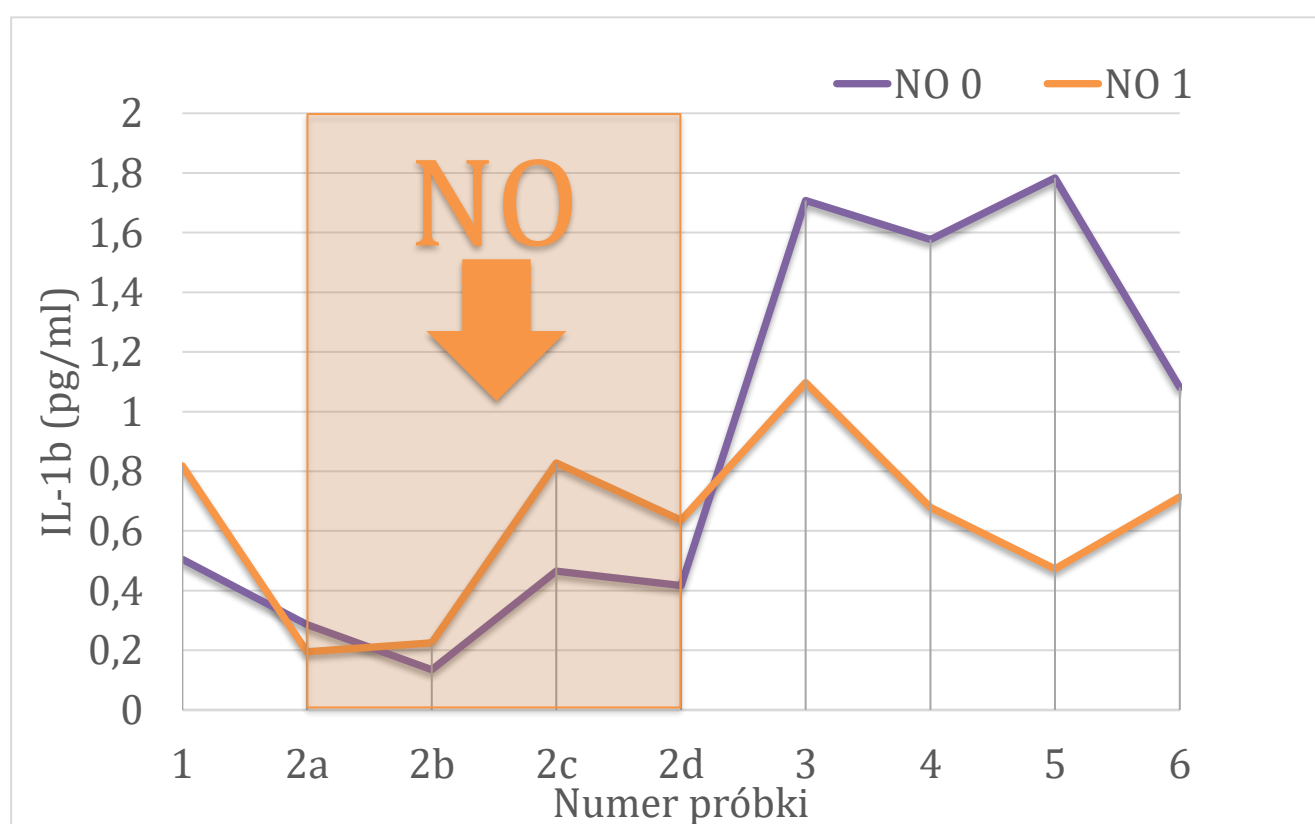
Ryc.7.2.2. Wpływ śródoperacyjnej podaży NO na średnie stężenie IL-8 u pacjentów ze złożonymi wadami serca. Próbki krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – zaklepowanie aorty i podanie kardioplegii w hipotermii, 2c. – reperfuzja serca w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie TNF α wzrosło w grupie, w której stosowano tlenek azotu, ale zmiana ta nie była istotna statystycznie, ($\chi^2=18.8$, $p=0.112$). Porównania *post hoc* stężenia TNF α w próbce referencyjnej z próbkami pobranymi w pozostałych punktach czasowych, wykazało nieistotny wzrost jego stężenia w grupie NO1 w punkcie czasowym 2d (po reperfuzji). Jednocześnie, porównanie pomiędzy badanymi grupami, wykazało brak statystycznie istotnej różnicy stężenia TNF α w badanych punktach pomiarowych (Ryc.7.2.2.). Po zakończeniu inhalacji NO, stężenie TNF α spadło do poziomu poniżej wyjściowego.



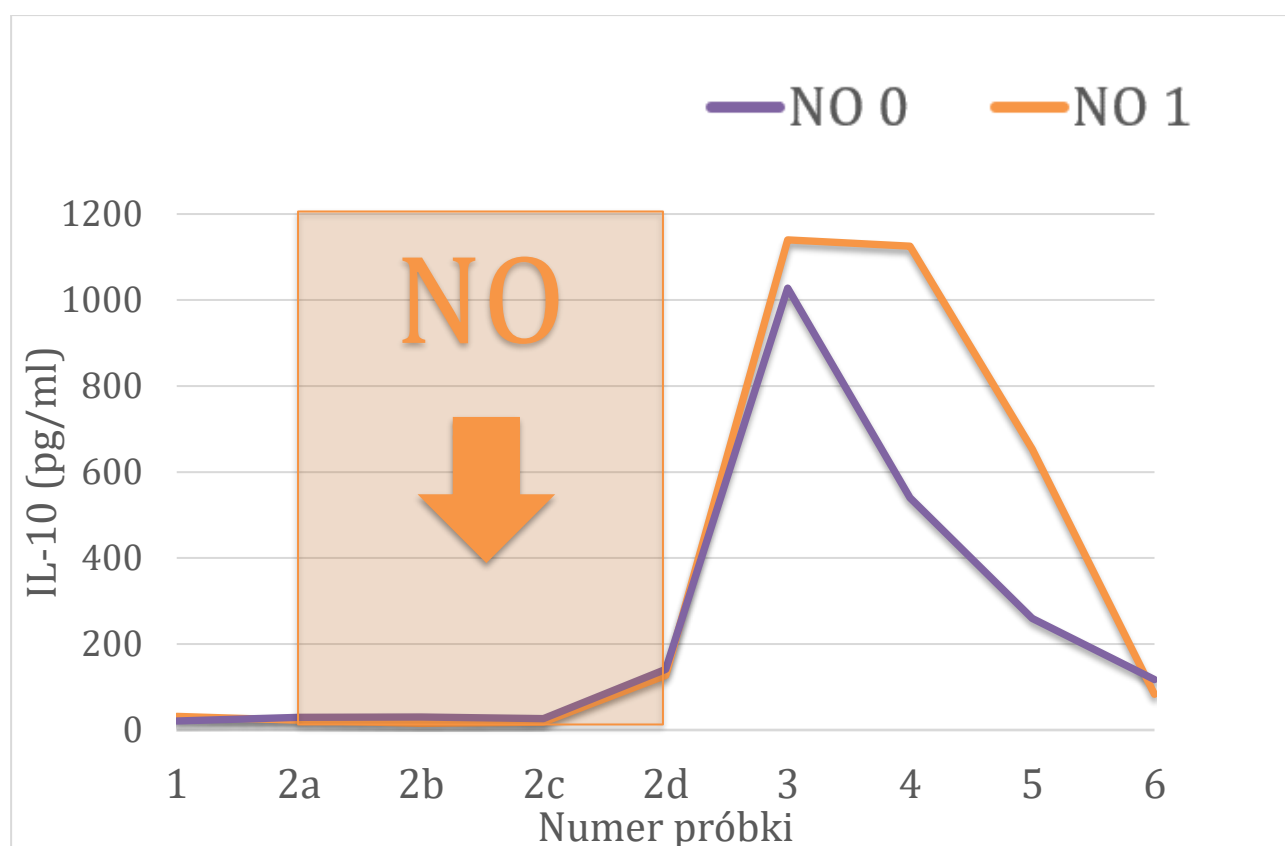
Ryc. 7.2.3. Średnie stężenie TNF alfa u pacjentów ze złożonymi wadami serca w zależności od stosowania tlenu azotu. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii, 2c. – reperfuzja w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie IL1 β zmieniało się istotnie w grupie bez inhalacji tlenu azotu ($X^2=27.25$, $p=0.0006$). Analiza wewnątrzgrupowa wykazała istotne różnice w stężeniu pomiędzy próbką 1. a próbką 3., 4., i 5. w grupie NO.0. W obrębie grupy, która otrzymała inhalację NO, zmiany stężenia IL1 β były nieistotne, w odniesieniu do próbki referencyjnej. Analiza międzygrupowa wykazała istotne różnice pomiędzy grupami w punktach czasowych 3., 4., i 5 (Ryc.7.2.4.).



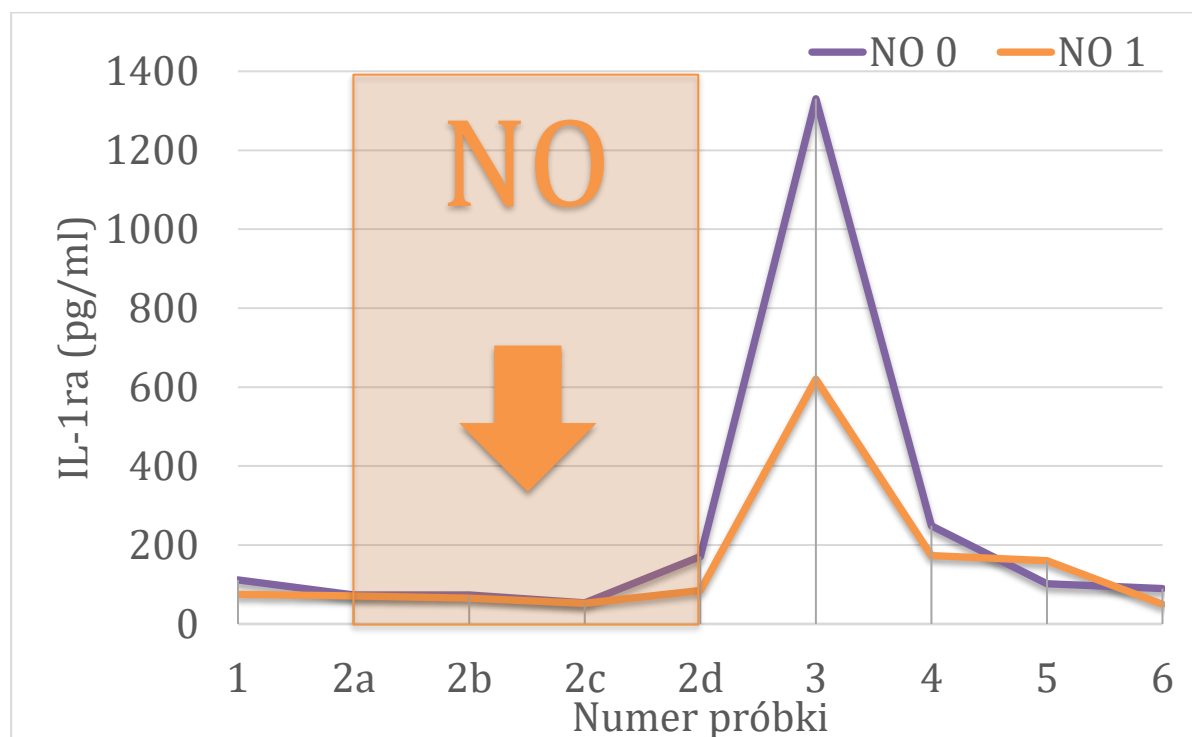
Ryc. 7.2.4. Średnie stężenie IL1beta u pacjentów ze złożonymi wadami serca w zależności od podaży tlenu azotu. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii w hipotermii, 2c. –reperfuzja w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie IL-10 zmieniało się istotnie zarówno w grupie z NO (Friedman ANOVA Chi Sqr. = 28.7, p = 0.00036) jak i bez jego inhalacji (Friedman ANOVA Chi Sqr. = 26.7, p = 0.00079). Wewnątrzgrupowa analiza *post hoc*, wykazała istotny wzrost stężenia IL10 w punkcie czasowym 3., 4. i 5. w obydwu badanych grupach w odniesieniu do próbki referencyjnej (1.). Analiza międzygrupowa, uwzględniająca poprawkę Holmsa-Bonferroniego wykazała istotnie wyższe stężenie IL 10 u pacjentów z grupy NO.1. w porównaniu z grupą NO.0. w punktach czasowych 4. (p=0.0012) i 5. (0.004). (Ryc.7.2.5). Przedstawiony profil aktywności Il-10 świadczy o znacznym pobudzeniu reakcji przeciwzapalnej, która potęgowana jest przez podaż tlenu azotu, szczególnie w okresie pooperacyjnym.



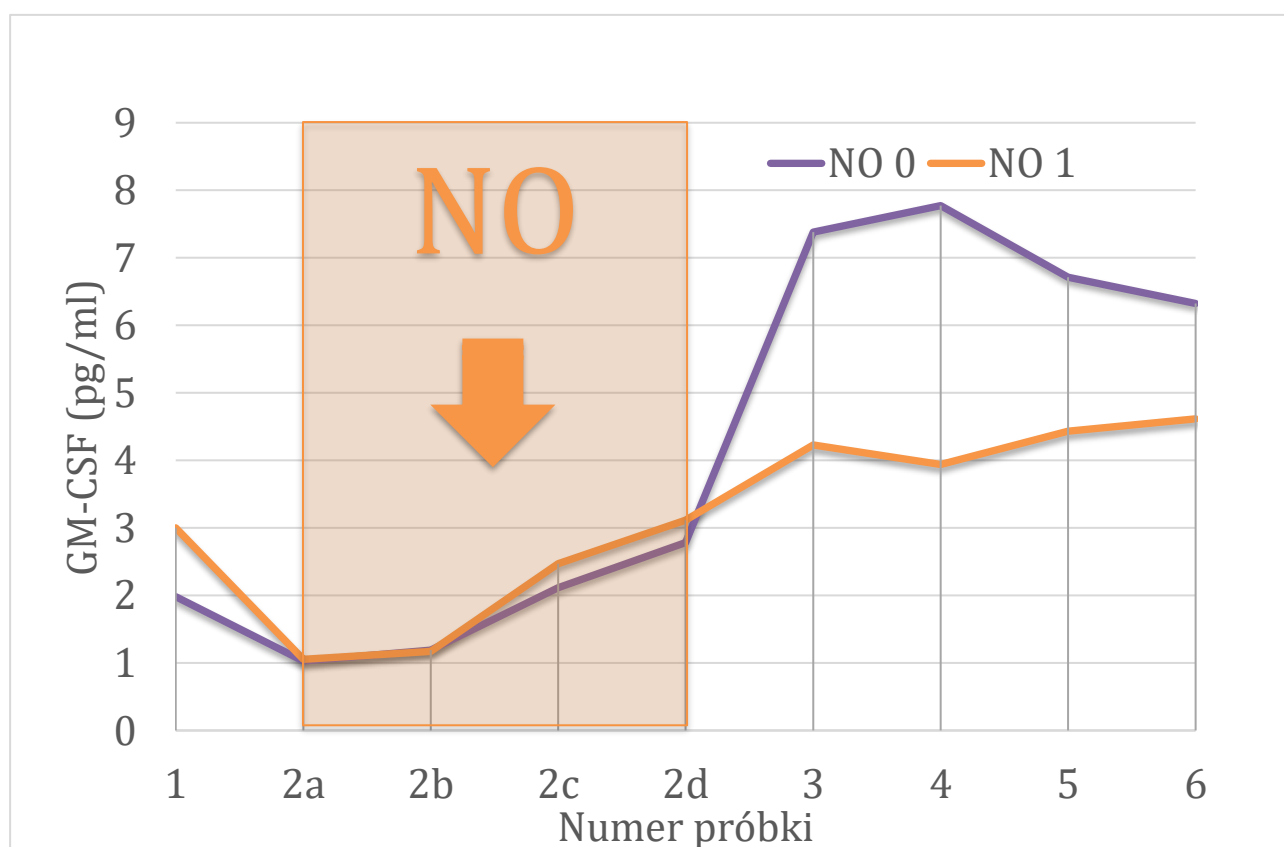
Ryc.7.2.5. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenie IL10 u pacjentów z wadami wrodzonymi serca. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. reperfuzja – w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie IL1ra wzrosło istotnie w obydwu badanych grupach. Najwyższą wartość jego stężenia zarejestrowano w okresie pooperacyjnym w punkcie czasowym 3. (4 godziny po operacji). W próbce tej stężenie IL1ra było istotnie wyższe w porównaniu ze stężeniem w próbce referencyjnej w obydwu badanych grupach. Analiza międzygrupowa wykazała także istotną różnicę w stężeniu IL1ra pomiędzy badanymi grupami w punkcie czasowym 3 i istotnie wyższe stężenie w grupie NO.0. (Ryc.7.2.6.).



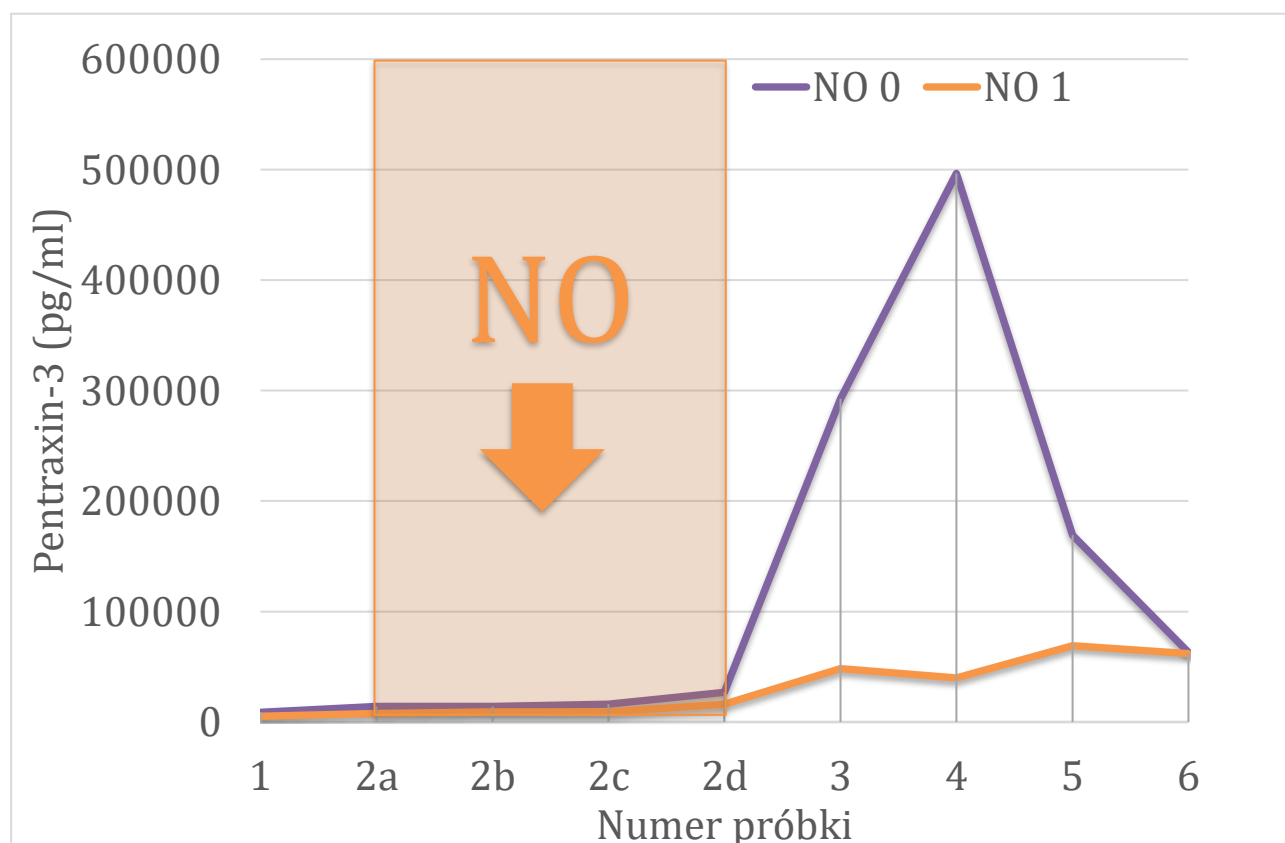
Ryc. 7.2.6. Wpływ podaży NO na stężenie IL1-ra. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii po zaklemowaniu aorty i podaniu kardioplegii, 2c. – reperfuzja, w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Podobnie wykazano istotne zmiany stężenia GM-CSF w grupie NO.0. ($X^2=27.25$, $p=0.0006$). W grupie tej stwierdzono statystycznie znamiennej wzrost stężenia GM-CSF w odniesieniu do próbki wyjściowej (przedoperacyjnej) w punkcie czasowym 3 ($p=0.005$), 4 ($p=0.002$), 5 ($p=0.008$) i 6 ($p=0.02$). Podobnie, analiza międzygrupowa wykazała istotne różnice pomiędzy pacjentami, którzy otrzymali tlenek azotu i grupą bez tlenu azotu w punktach czasowych 3 ($p=0.016$), 4 ($p=0.021$) oraz 5 ($p=0.025$) (Ryc.7.1.7.).



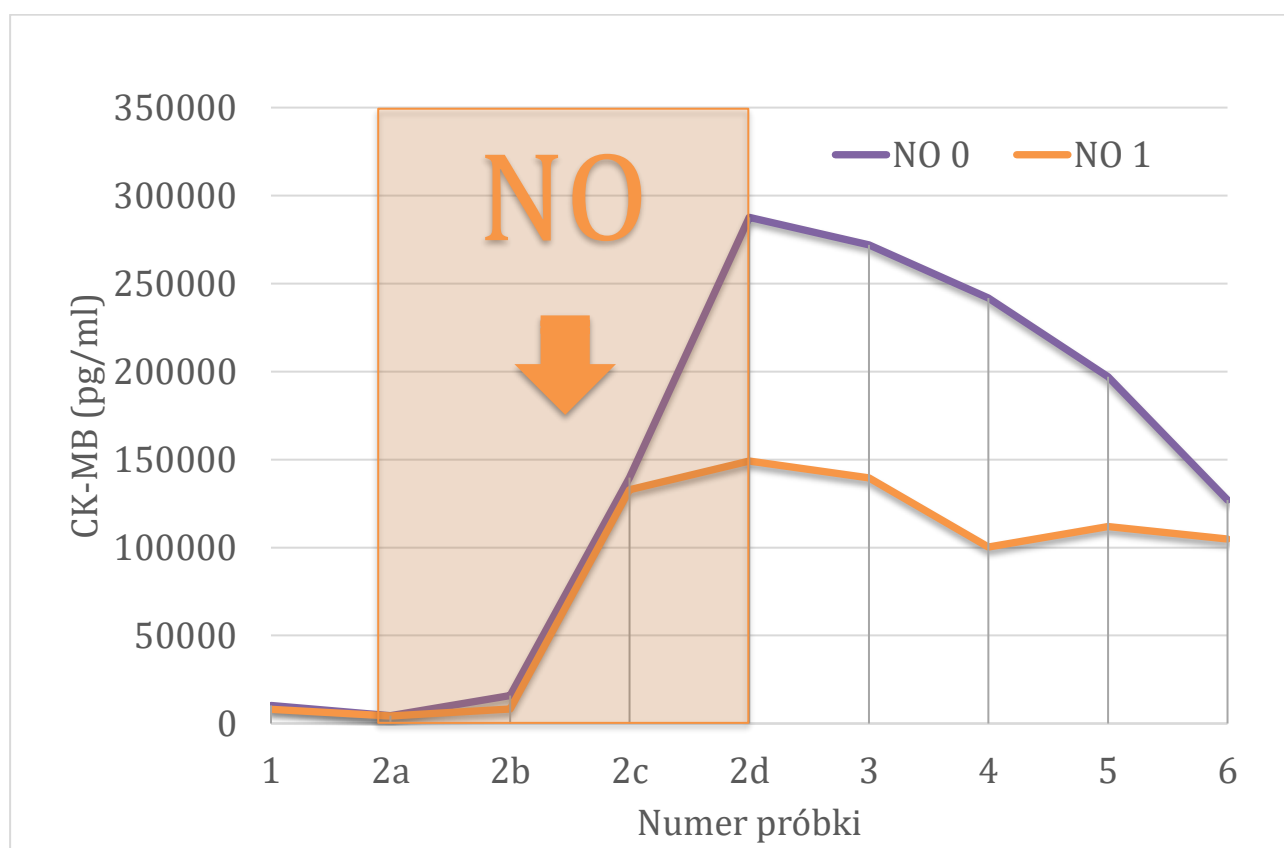
Ryc. 7.2.7. Średnie stężenie GMCSF w badanych próbkach krwi, w zależności od zastosowania tlenu azotu w odniesieniu do grupy kontrolnej. Próbki krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklemowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. – reperfuzyja w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenia pentraksyny zmieniało się statystycznie istotnie w grupie NO.0. ($X^2=23.5$, $p=0.0027$). Istotny wzrost jej stężenia wykazano w grupie NO.0. w próbce 3. i 4. Analiza międzygrupowa również wykazała znamienne różnice pomiędzy badanymi grupami w próbce w tych punktach czasowych (3.; $p=0.006$ i 4.; $p=0.04$).



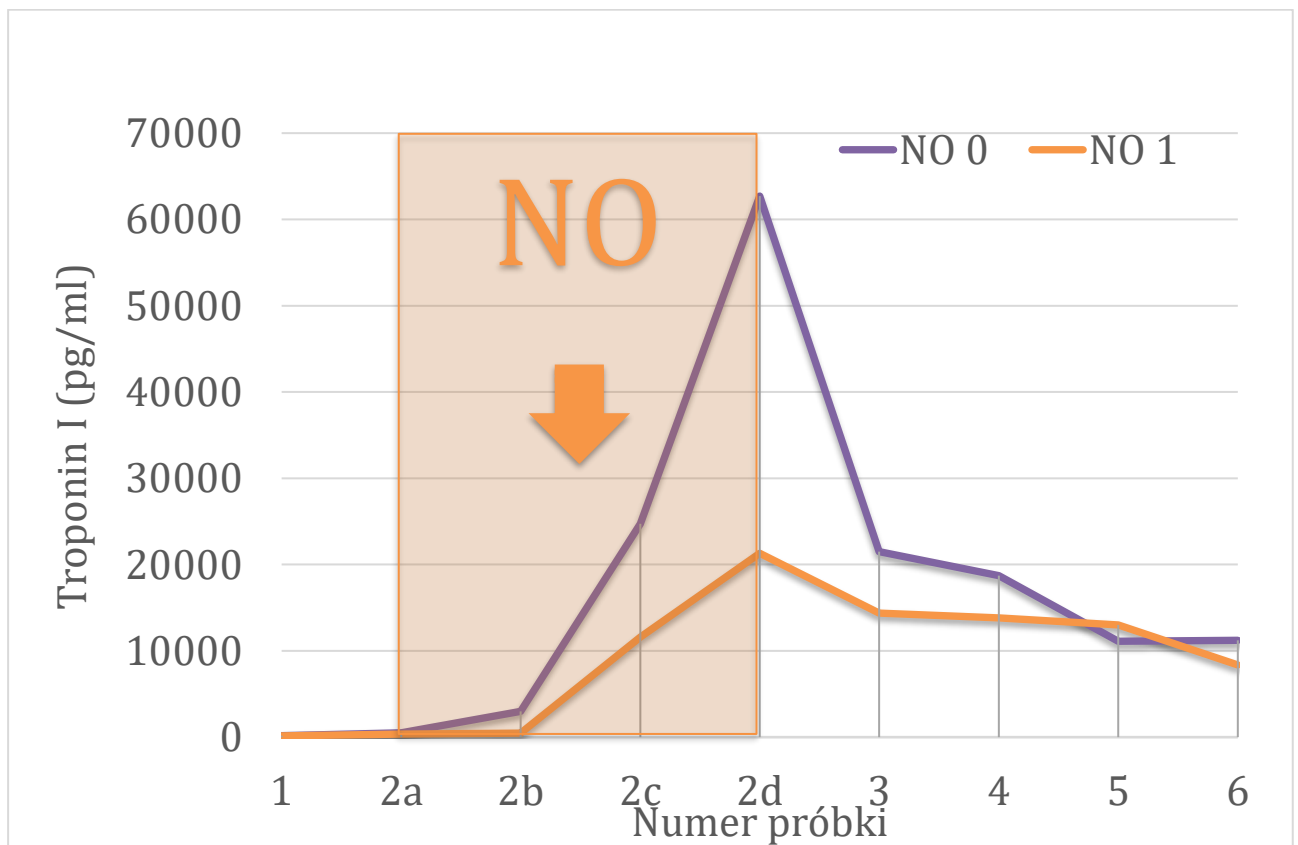
Ryc.7.2.8. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenie pentraksyny. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. – reperfuzja, w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Podobną dynamikę wykazywało CKMB. Istotne zmiany aktywności CKMB stwierdzono w grupie bez tlenu azotu ($\chi^2=42.62$, $p=0.0008$) oraz w grupie z NO ($\chi^2=57.06$, $p=0.00021$). Istotny wzrost aktywności CKMB zanotowano w próbkach 2c, 2d, 3., 4., 5. i 6. ($p<0.05$) w obrębie obydwu badanych grup w porównaniu do próbki referencyjnej (Ryc.7.2.9.). Analiza międzygrupowa wykazała istotne różnice pomiędzy próbkami 2d ($p=0.036$), 3 ($p=0.003$), 4 ($p=0.007$) i 5 ($p=0.04$).



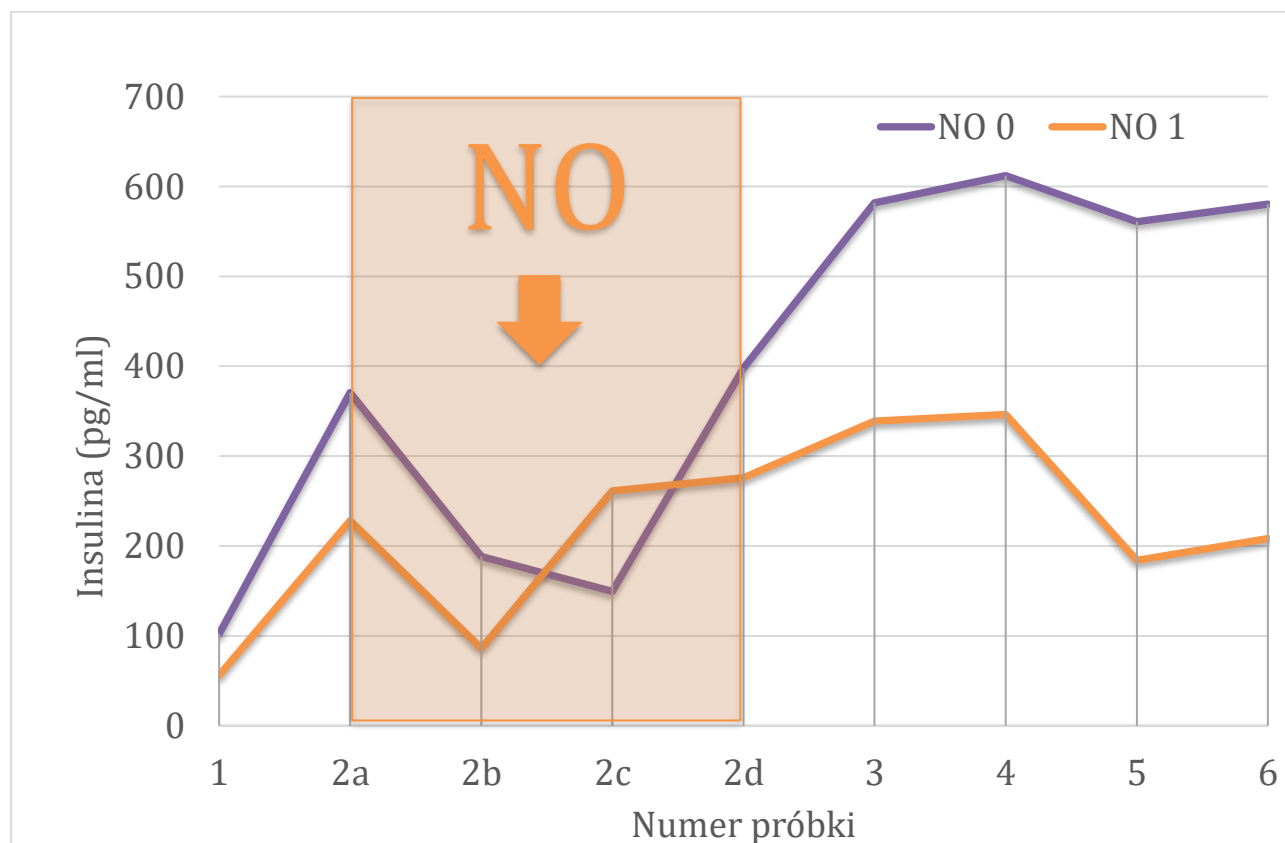
Ryc.7.2.9. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenia CKMB. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. – reperfuzja, w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie troponiny I wzrosło po reperfuzji serca (usunięcie klemu z aorty - punkt czasowy 2d ryc.7.2.11.) w obydwu badanych grupach. Zmiana ta była istotna w grupie, która NO.0. ($X^2=40$, $p=0.0001$). Analiza post hoc wykazała, że wzrost stężenia TnI był istotny w grupie pacjentów, którzy nie otrzymali inhalacji NO w porównaniu z próbką referencyjną (1 vs. 2d). Porównanie badanych grup wykazało, że w punkcie czasowym 2d różnica pomiędzy badanymi grupami była istotna statystycznie. W okresie pooperacyjnym obserwowano szybki spadek stężenia TnI w obydwu badanych grupach, a różnice międzygrupowe w odniesieniu do TnI w próbkach pooperacyjnych były nieistotne (Ryc.7.2.10.).



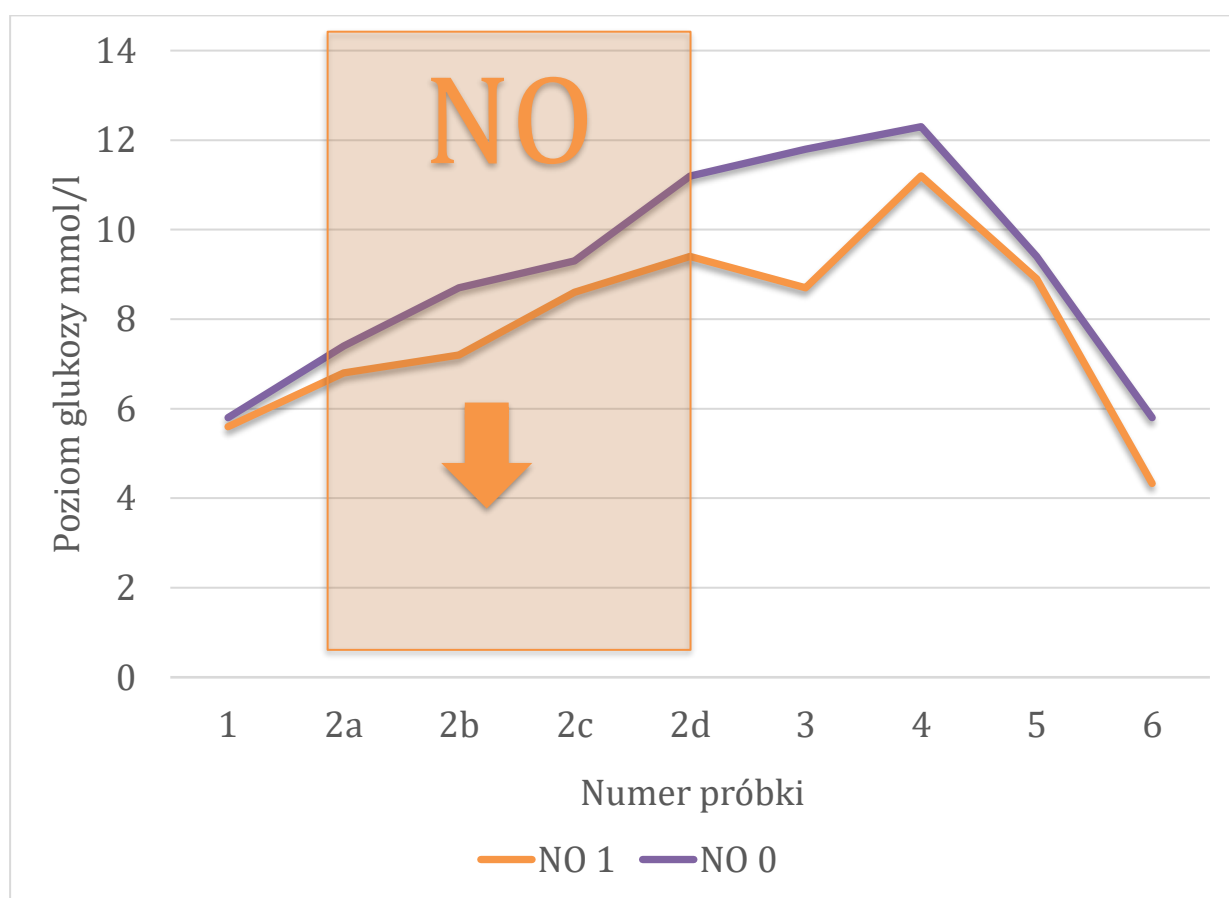
Ryc.7.2.10. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenie Troponiny I. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklemowaniu aorty i podaniu kardioplegii, 2c. – reperfuzja w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie insuliny w badanych próbkach zmieniało się istotnie w grupie NO.0. ($X^2=28.6$, $p=0.0027$). Stwierdzono istotnie wyższy poziom insuliny w próbkach 3., 4., 5., i 6. w porównaniu z próbką referencyjną. Tymczasem zmiany stężenia w grupie, która otrzymała inhalację NO, były nieistotne statystycznie w odniesieniu do poziomu referencyjnego. Analiza międzygrupowa potwierdziła istotne różnice w stężeniu insuliny pomiędzy badanymi grupami w próbkach 3., 4., 5. i 6. (Ryc.7.2.11.).



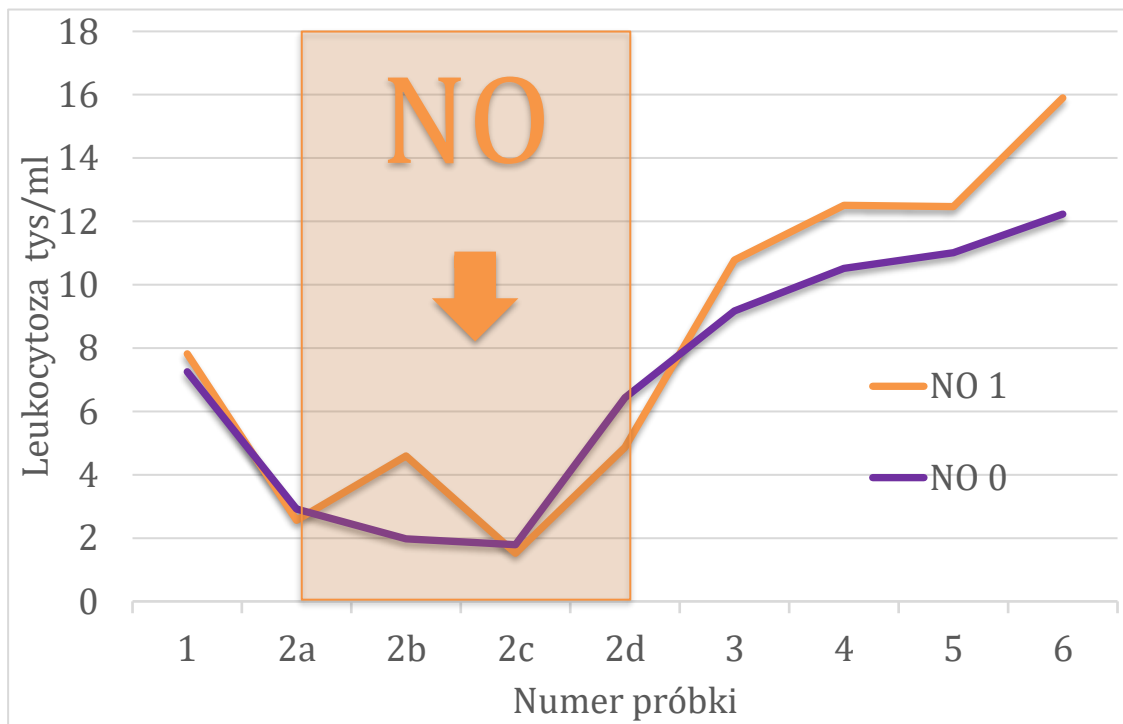
Ryc. 7.2.11. Wpływ NO na stężenie insuliny w trakcie operacji i we wczesnym okresie pooperacyjnym. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. – reperfuzja, w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Stężenie glukozy zmieniało się istotnie zarówno w grupie NO.0. (Friedman ANOVA Chi Sqr. = 27.6, $p = 0.046$) jak i w grupie NO.1. (Friedman ANOVA Chi Sqr. = 29.7, $p = 0.039$). Wewnątrzgrupowa analiza *post hoc*, wykazała istotny wzrost stężenia glukozy w punkcie czasowym 4. w obydwu badanych grupach w odniesieniu do próbki referencyjnej (1.). Analiza międzygrupowa, uwzględniająca poprawkę Holmsa-Bonferroni wykazała istotnie wyższe stężenie glukozy u pacjentów z grupy NO.0. w porównaniu z grupą NO.1. w punkcie czasowym 3. ($p=0.02$).



Ryc. 7.2.12. Wpływ NO na poziom glukozy w trakcie operacji i we wczesnym okresie pooperacyjnym. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklewowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. – reperfuzja, w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

Dodatkowo analizie poddano leukocytozę w badanych próbkach krwi. Analiza wariancji powtarzanych pomiarów nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. Wewnątrzgrupowa analiza wykazała istotny spadek leukocytozy w obydwu badanych grupach (Ryc.7.5.13.) w odniesieniu do próbki przedoperacyjnej (1. vs. 2c). W kolejnych próbkach obserwowano istotny wzrost leukocytozy, który w grupie NO.0 osiągnął istotność statystyczną (2c. vs. 6).



Ryc.7.2.13. Wpływ NO na leukocytozę w okresie okołoperacyjnym. Próbkę krwi zostały pobrane: 1. – przed zabiegiem operacyjnym, 2a. – w trakcie chłodzenia pacjenta, 2b. – w hipotermii, po zaklepowaniu aorty i podaniu kardioplegii 2c. – reperfuzja w trakcie ogrzewania pacjenta, 2d. – po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, 3. – w 4h po operacji, 4. – w 8h po operacji, 5. – w 12h po operacji, 6. – w 24h po operacji.

6.3. Wpływ tlenu azotu na przebieg leczenia pooperacyjnego

Charakterystykę kliniczną badanych grup przedstawiono w tabeli 7.6.1. Porównanie analizowanych parametrów takich jak wiek, masa ciała, czas trwania krążenia pozaustrojowego, poziom glukozy po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, czas zaklemowania aorty, śmiertelność oraz rozkład płci nie wykazały istotnych statystycznie różnic. Podaż tlenu azotu miała jednak istotny wpływ na poziom mleczanów po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, a także wielkość krwawienia pooperacyjnego, czas pobytu w oddziale IT, czas wspomaganie oddechu i wartość indeksu katecholamin (Tab 7.3.1.).

Tab.7.3.1. Charakterystyka wybranych parametrów klinicznych oraz wpływu podaży tlenu azotu na te parametry.

Zmienna	NO (1)	NO (0)	P
Czas krążenia pozaustrojowego (min)	116.7 ± 23.3	94.5 ± 23.1	n.s.
Poziom mleczanów po zakończeniu CPB (mmol/l)	2.03 ± 0.35	4.9 ± 1.64	0,039
Poziom glukozy po zakończeniu CPB (mmol/l)	4.33 ± 1.0	5.0 ± 2.8	n.s.
Czas zaklemowania aorty (min)	45.4 ± 20.3	42.7 ± 16.7	n.s.
Czas pobytu w IT (d)	6.2 ± 3,6	8.0 ± 11,8	n.s.
Czas wspomaganie oddechu (h)	17.4 ± 1.2	38.6 ± 1.9	0,012
Objętość krwawienia (ml/kg)	38.4 ± 23.6	42.36 ± 47.4	ns
Index katecholamin (μ/kg/min)	1.9 ± 1.3	3.7 ± 0.76	0,042

7. DYSKUSJA

Operacje kardiochirurgiczne z użyciem krążenia pozaustrojowego i zatrzymania serca przy pomocy roztworu kardioplegicznego, prowadzą do indukcji odpowiedzi stresowej, której głównym elementem jest znacznie nasiloną odpowiedź zapalną oraz uszkodzenia o typie niedokrwiennie – reperfuzyjnym. Reakcje te prowadzić mogą do dysfunkcji serca, płuc, nerek i mózgu. Na poziomie molekularnym obserwuje się uwolnienie kaskady cytokin, hemokin, aktywację układu dopełniacza, układu krzepnięcia, fibrynolizy i innych układów. Procesy te mogą prowadzić do zespołu uogólnionej odpowiedzi zapalnej i niewydolności wielonarządowej. Nieodłącznym elementem krążenia pozaustrojowego jest hemoliza, spowodowana przez mechaniczne uszkodzenie krwinek czerwonych, która prowadzi do pojawienia się wolnej hemoglobiny w surowicy krwi. Wolna hemoglobina jest najsilniejszym ze znanych wymiataczem tlenku azotu, który poprzez wiązanie NO prowadzi do dramatycznego spadku biodostępności tego czynnika w układzie naczyniowym. Skutkuje to skurczem naczyń krwionośnych i hipoperfuzją narządów, z ich następową dysfunkcją. Zjawiska powyższe są znacznie bardziej nasilone u dzieci ze złożonymi wadami serca wymagającymi długotrwałych, kompleksowych operacji korekcyjnych.

Łagodzenie lub eliminacja opisanych skutków krążenia pozaustrojowego może mieć podstawowe znaczenie dla poprawy wyników leczenia i uniknięcia powikłań we wczesnym okresie pooperacyjnym. Względny niedobór tlenku azotu w trakcie krążenia pozaustrojowego oraz jego kluczowe znaczenie w procesie odpowiedzi zapalnej, uszkodzenia niedokrwiennie – reperfuzyjnego i zjawisku apoptozy (Schechter i Gladwin, 2003), uzasadniły sformułowanie hipotezy badawczej weryfikowanej w pracy. Zakłada ona, że podaż NO w trakcie operacji korekcji złożonej wady wrodzonej, z użyciem krążenia pozaustrojowego i zatrzymaniem serca przy pomocy roztworu kardioplegicznego, może działać modulująco na opisane zjawiska, wpływając na wyniki leczenia pooperacyjnego. Inhalacja tlenku azotu bezpośrednio do oksygenatora pozwala na uzyskanie jego natychmiastowej biodostępności w trakcie niedokrwienia i reperfuzji. Może on wywierać bezpośrednie i pośrednie działania, hamując odpowiedź stresową, uogólnioną odpowiedź zapalną oraz zmniejszać nasilenie uszkodzenia reperfuzyjnego,

przyczyniając się do lepszej protekcji narządów, a w szczególności serca, po zakończeniu krążenia pozaustrojowego. W grupie pacjentów ze złożonymi, sinicznymi wadami serca, w której stosowano tlenek azotu wykazano zahamowanie uogólnionej odpowiedzi zapalnej (wyrażone mniejszym stężeniem cytokin prozapalnych) i metabolicznej (niższe stężenie insuliny, glukozy i pentraksyny), wzmocnienie odpowiedzi antyzapalnej, lepszą perfuzję narządową w trakcie krążenia pozaustrojowego (wyrażoną niższym stężeniem mleczanów) i lepszą protekcję mięśnia sercowego (monitorowaną stężeniem wskaźników niedokrwienia). Efekty te obserwowano również analizując dane kliniczne, gdzie w grupie pacjentów która otrzymała NO, wykazano krótszy czas wspomagania oddechu oraz mniejszy indeks katecholamin.

W dotychczasowych badaniach udowodniono, że stężenie cytokin prozapalnych, takich jak TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 koreluje z czasem trwania krążenia pozaustrojowego, czasem zaklemowania aorty oraz rozwojem zespołu niewydolności wielonarządowej. Uszkodzenia związane ze zjawiskami niedokrwienia/reperfuzji prowadzą do dysfunkcji płuc, nadmiernego gromadzenia wody w tkankach i zespołu małego rzutu serca (Hall, Cardiopulmonary bypass and the systemic inflammatory response: effects on drug action, 2002). W populacji dzieci odpowiedź zapalna jest bardziej nasiloną, w porównaniu z populacją dorosłych, ze względu na większą hemodilucję, dłuższy czas trwania operacji i krążenia pozaustrojowego, większe siły zcinające (shear stress), wyższe tempo metabolizmu oraz niedojrzałość narządów i układów. Szczególnie podatną grupę na rozwój powikłań pooperacyjnych stanowią dzieci ze złożonymi, sinicznymi wadami serca (Duval i inni, 1999).

7.1. Wybór zmiennych do analizy oraz punktów czasowych

Panel zmiennych do analizy wybrany został drogą screeningu, dzięki zastosowaniu macierzy do oznaczania kilkudziesięciu czynników związanych z odpowiedzią zapalną. Analizie poddano, powtarzalną, wystandaryzowaną sytuację kliniczną związaną z leczeniem złożonej, sinicznej wady serca, z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego i rutynowo stosowanej strategii zapobiegania odpowiedzi zapalnej (dawka sterydu podawana śródoperacyjnie, metody znieczulenia ogólnego). Przesiew przeprowadzony w tych warunkach pozwolił na wyselekcjonowanie panelu czynników, których ekspresja mieściła się w zakresie

poziomu detekcji zastosowanej metodologii. Macierze użyte do badania (Human Proteome Profiler Arrays) pozwoliły na analizę 96 czynników związanych z odpowiedzią zapalną, metaboliczną, angiogenną oraz podstawowe wskaźniki niedokrwienia i niewydolności serca. Obok poziomu detekcji, w selekcji czynników do badań ilościowych wysokiej czułości brano również pod uwagę wpływ stosowanego śródoperacyjnie tlenu azotu. W tym celu (w ramach *screeningu*) zbadano wpływ inhalacji tlenu azotu na panel objętych badaniem macierzowym 96 czynników w 4. godzinie po operacji (próbka 3.) oraz w 12. godzinie po operacji (próbka 5.). Otrzymane metodą półilościową wyniki porównano do próbki referencyjnej (próbka 1.) oraz pomiędzy badanymi grupami (NO.1. vs. NO.0.) w wyselekcjonowanych do *screeningu* punktach czasowych. Spośród tych czynników wyłoniono: interleukinę 6 (IL-6), interleukinę 8 (IL-8), interleukinę 10 (IL-10), antagonistę receptora dla interleukiny 1 (IL1-ra), interleukinę 1 β (IL-1 β), TNF α , kinazę kreatyninową – frakcję (CKMB), troponinę I (TnI), Insulinę, Pentraksynę, GM-CSF. Dodatkowo w próbkach analizowano liczbę leukocytów oraz poziom glukozy.

7.2. Wpływ czynników przedoperacyjnych na nasilenie odpowiedzi zapalnej po operacji korekcji wady wrodzonej serca.

Zjawiska badane w pracy w dużym stopniu zależne są od stanu przedoperacyjnego pacjenta. Czynniki szczególnie zwiększającymi ryzyko nasilonej odpowiedzi zapalnej są przerost mięśnia sercowego (przeciążenie ciśnieniowe), niewydolność serca (przeciążenie objętościowe), niedotlenienie oraz współistnienie tych czynników (Hövels-Gürich i inni, 2002). Przeciążenie objętościowe, związane z przeciekami lewo – prawymi, prowadzące do niewydolności zastoinowej krążenia stymuluje produkcją czynnika jądrowego kappa B i tym samym indukuje produkcję cytokin związanych z odpowiedzią zapalną (Valen, Yan i Hansson, 2001), (Wong, Fukuchi, Melnyk, Rodger i Giaid, 1998). Stwierdzono, że stężenie IL-6 jest zwiększone u dzieci z niedotlenieniem lub niewydolnością serca i koreluje z saturacją krwi tętniczej (Hövels-Gürich i inni, 2002). Po operacji korekcyjnej stężenie IL-6 pozostaje podwyższone u pacjentów z niedotlenieniem przedoperacyjnym, co sugeruje wpływ aktywny niedotlenienia na komórki układu immunologicznego. Mechanizm ten może być odpowiedzialny

za większe nasilenie odpowiedzi zapalnej w tej grupie pacjentów. W badanym materiale wykazano, że śródoperacyjna inhalacja NO może zmniejszyć stężenie IL6 (Ryc.7.2.1.). W kontekście wcześniejszych badań pojawia się również uzasadnienie dla kontynuacji podaży NO, również w okresie pooperacyjnym.

Objawy kliniczne, związane z uogólnioną odpowiedzią zapalną obecne były u wszystkich badanych pacjentów. Pamiętać należy jednak, że badaniem objęto grupę pacjentów, u których współistniały zaburzenia patofizjologiczne, związane ze złożonymi wadami serca. Według różnych doniesień objawy kliniczne związane z odpowiedzią zapalną występują u 20 – 30 % wszystkich pacjentów poddawanych operacji serca. Szczegółowa analiza wykazała, że uszkodzenie narządów takich jak serce, nerki płuca oraz aktywacja układu krzepnięcia związane były z podwyższonym poziomem C3a, a wymienione komplikacje prowadziły do przedłużenia czasu trwania intensywnej terapii (Kirklin i inni, 1983). Niewydolność oddechowa, związana ze stosowaniem krążenia pozaustrojowego, związana jest ze zjawiskiem aktywacji i wędrówki neutrofilów w obręb nabłonka płucnego, co powoduje tzw. sekwestrację leukocytów. Ostre uszkodzenie płuc i zmniejszenie stosunku PaO₂/FiO₂ odpowiedzialne jest za przedłużony okres wspomagania oddechu.

Dysfunkcja śródbłónka (capillary leak syndrome) i powodowane tym obrzęki uogólnione są wynikiem aktywacji molekuł adhezyjnych prowadzącej do pobudzenia leukocytów i wzrostu przepuszczalności ściany naczyń. Uszkodzenie bariery powoduje wydostawanie się płynu z przestrzeni wewnątrznaczyniowej do zewnątrznaczyniowej (Boyle, Pohlman, Johnson i Verrier, 1997), (Wan, LeClerc i Vincent, 1997). Pacjenci, u których rozwija się obraz kliniczny uogólnionej reakcji zapalnej, narażeni są na dłuższy czas trwania mechanicznego wspomagania oddechu (Kirklin i inni, 1983), większą częstość zakażeń dróg oddechowych oraz bezpośredniego uszkodzenia płuc (barotrauma, volutrauma, uszkodzenie tlenem).

7.3. Wpływ czynników śródoperacyjnych na indukcję odpowiedzi zapalnej.

Użycie krążenia pozaustrojowego jest konieczne do przeprowadzenia korekcji wady wrodzonej serca. Wraz z urazem chirurgicznym spowodowanym nacinaniem i preparowaniem tkanek przyczynia się to do uruchomienia odpowiedzi zapalnej, której nasilenie zależne jest od czasu trwania krążenia pozaustrojowego. Na

podstawie dotychczasowych badań wyróżniono dwie fazy odpowiedzi zapalnej w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego (Güvener, Korun i Demirtürk, 2015), (Soares, Ribas, Spring, Silva i Miyague, 2010), (Warren i inni, 2009). W fazie początkowej kontakt krwi z ogromną powierzchnią ciała obcego uruchamia mechanizmy humoralne (układ dopełniacza, cytokiny prozapalne, układ krzepnięcia) i komórkowe (leukocyty, komórki śródbłonka naczyniowego, płytki krwi). Pobudzone mechanizmy są złożone i w różnym stopniu zależne od siebie. Faza późniejsza charakteryzuje się konsekwencjami uszkodzenia niedokrwiennie – reperfuzyjnego, której towarzyszy endotoksemia. Prowadzi to do uszkodzenia śródbłonka, upośledzenia mikrokrażenia. W przeprowadzonym badaniu stwierdzono istotny wzrost stężenia Il-6 w obydwu badanych grupach (Ryc.7.2.1.). Jest ona centralną cytokiną biorącą udział w stymulacji limfocytów B i T. Działa pirogenie i stymuluje produkcję białek ostrej fazy. Podobną dynamikę wykazuje Il-8 (Ryc.7.2.2.), stymulująca migrację neutrofilów, monocytów i limfocytów, pobudzająca adhezję neutrofilów i uwalnianie histaminy z bazofilów. Stężenie Il-1 β spada w początkowej fazie operacji, a następnie wzrasta istotnie w grupie NO.0. (Ryc.7.2.4.). Podobnie TNF α zwiększa swoją aktywność w trakcie krążenia pozaustrojowego w obu grupach. Po zakończeniu krążenia pozaustrojowego jego stężenie szybko spada, osiągając poziom porównywalny z próbką referencyjną (Ryc.7.2.3.). Dane te potwierdzają znaczne pobudzenie mechanizmów związanych z odpowiedzią zapalną, pomimo stosowania śródoperacyjnej podaży dużych dawek sterydów. Kaskada odpowiedzi zapalnej w kolejnych etapach ulega amplifikacji i prowadzi do pojawienia się objawów klinicznych takich jak podwyższona temperatura ciała (lub gorączka), dysfunkcja mięśnia sercowego (z powodu niedokrwienia i reperfuzji oraz wtórnych mechanizmów immunologicznych), porażenie naczyń obwodowych ze skłonnością do hipotensji, zespół małego rzutu serca z niedotlenieniem tkanek, niewydolność nerek, dysfunkcja płuc (płuco poperfuzyjne), a także objawy neurologiczne i uogólnione obrzęki (capillary leak syndrome) (Bove i inni, 2004), (Meldrum i Donnahoo, 1999), (Ng, Wan, Yim i Arifi, 2002), (Trittenwein i inni, 2003).

Znanym czynnikiem wpływającym na rozwój uogólnionej reakcji zapalnej jest sinica (niedotlenienie). Bardziej nasiloną odpowiedź zapalną przypisywana jest istotnie większej aktywności cytokin prozapalnych oraz większemu stężeniu tych

cytokin w obrębie mięśnia sercowego u dzieci z wadami sinicznymi serca (Qing i inni, 2003), w porównaniu z wadami serca bez sinicy. Badana grupa pacjentów obejmowała tylko dzieci ze złożonymi wadami serca, u których obok sinicy diagnozowano również przeciążenie ciśnieniowe i/lub przeciążenie objętościowe serca. Jest to zatem grupa najbardziej narażona na rozwój uogólnionej odpowiedzi zapalnej i powikłań z nią związanych.

Czynnikiem istotnie wpływającym na rozwój reakcji zapalnej w dotychczasowych badaniach były czas trwania krążenia pozaustrojowego oraz czas zaklemowania aorty (Soares, Ribas, Spring, Silva i Miyague, 2010). W analizowanym materiale, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami pod względem czasu zaklemowania aorty lub trwania krążenia pozaustrojowego (Tab.7.3.1.). Średni czas trwania krążenia pozaustrojowego (punkty czasowe od 2a do 2d) wynosił w obydwu grupach ok. 100 minut, natomiast czas zaklemowania aorty (punkty czasowe od 2b do 2c) ok. 40 minut. Czas ogrzewania i reperfuzji (2c – 2d) ok 40 minut, a czas chłodzenia ok. 20 min. Odstępy czasowe pomiędzy pobranymi punktami nie były zatem równe, a średni czas do momentu reperfuzji wynosił ok. 60 minut. Obserwując dynamikę zmian stężenia badanych czynników stwierdzić można, że najwyższe ich stężenie we krwi pojawia się po reperfuzji i ogrzaniu pacjenta do normotermii. Sugeruje to, że główne nasilenie czynników potęgujących kaskadę odpowiedzi zapalnej, pojawia się w trakcie reperfuzji i ogrzewania. Również wtedy maksymalne stężenie osiągają wskaźniki niedokrwienia mięśnia sercowego (CK-MB, TnI) (Ryc.7.2.9, 7.2.10). Dostępność tlenu azotu w tym właśnie momencie może mieć kluczowe znaczenie. W istocie, jego dostarczenie do układu powoduje znamienne obniżenie stężenia czynników działających prozapalnie, modulację odpowiedzi przeciwzapalnej oraz istotne zmniejszenie wskaźników uszkodzenia mięśnia sercowego.

7.4. Strategie śródoperacyjne zmierzające do ograniczenia odpowiedzi zapalnej.

Pomimo kilku dekad badań klinicznych i podstawowych, nie opracowano skutecznej metody leczenia lub zapobiegania uogólnionej odpowiedzi zapalnej. Jak wiadomo, całkowite wyłączenie procesów związanych z odpowiedzią zapalną mogłoby w rezultacie przynieść niekorzystne efekty dla pacjenta. Możliwa jest

natomiast modulacja tej odpowiedzi przez stosowanie odpowiednich strategii farmakologicznych oraz związanych z techniką prowadzenia krążenia pozaustrojowego. Strategie te skupiają się na wzmocnieniu równowagi pomiędzy odpowiedzią zapalną a czynnikami działającymi przeciwzapalnie. Wiadomo na podstawie dotychczasowych badań, że zarówno całkowite zahamowanie odpowiedzi zapalnej jak i nadmierne pobudzenie produkcji czynników przeciwzapalnych może prowadzić do spadku odporności na zakażenia oraz wpłynąć niekorzystnie na procesy gojenia i regeneracji.

Efektywne zahamowanie uogólnionej odpowiedzi zapalnej oraz zniwelowanie uszkodzeń niedokrwienno-reperfuzyjnych wywołanych przez stosowanie krążenia pozaustrojowego i niedokrwienie serca może w istotny sposób wpłynąć na ograniczenie powikłań oraz wyniki leczenia w oddziale intensywnej terapii.

Poza modyfikacjami układu do krążenia pozaustrojowego (miniaturyzacja układu w celu zmniejszenia powierzchni oddziaływania, wprowadzenie filtrów antyleukocytarnych lub wychwytyjących mediatorów zapalne, pokrycie powierzchni substancjami biokompatybilnymi) stosowane są różne interwencje farmakologiczne (sterydy lub niesterydowe leki przeciwzapalne, inhibitory układu dopełniacza, inhibitory proteaz serynowych, antyfibrynolityki, antyoksydanty i in.) oraz odpowiednio dostosowywane metody znieczulenia ogólnego (propofol, sevofluran). Metody te nie pozwoliły opanować odpowiedzi zapalnej w okresie okołoperacyjnym.

Jednym z pierwszych etapów pobudzenia odpowiedzi zapalnej podczas operacji na otwartym sercu jest aktywacja układu dopełniacza (Kalfin i inni, 1993), która uruchamia złożoną kaskadę dalszych zjawisk. Aktywowane fragmenty dopełniacza powodują wzrost przepuszczalności naczyń, uwolnienie histaminy (C3a, C4a, C5a), mobilizację, aktywację i wzrost adhezji neutrofilów (C5a), stymulują syntezę TNF α , IL-1 β i pośrednio inne cytokiny prozapalne. W celu zahamowania tej odpowiedzi już na wczesnym etapie, stosowane są specyficzne i niespecyficzne inhibitory układu dopełniacza. W wielu doniesieniach korelowano stopień aktywacji składników komplementu z częstością powikłań pooperacyjnych, koniecznością przedłużonego wspomaganego oddechu, czasem pobytu na intensywnej terapii, krwawieniem pooperacyjnym, niestabilnością hemodynamiczną czy ostrym uszkodzeniem płuc (ALI, *acute lung injury*) (Seghaye

M. i inni, Complement activation during cardiopulmonary bypass in infants and children. Relation to postoperative multiple system organ failure, 1993), (Tennenberg, Clardy, Bailey i Solomkin, 1990). Wykazano, że donory tlenku azotu (np. nitroprusydek sodu) posiadają właściwości hamowania aktywacji układu dopełniacza, przy czym za prawdopodobny mechanizm uznano hamowanie konwersji C3. W badaniach klinicznych udowodniono, że podaż nitroprusydku sodu (jako donora NO) w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego przyczyniało się do mniejszej aktywacji układu dopełniacza w porównaniu z grupą kontrolną, która nie otrzymała leku (Seghaye M. i inni, Effect of sodium nitroprusside on complement activation induced by cardiopulmonary bypass: a clinical and experimental study, 1996). W przeprowadzonym badaniu, u dzieci ze złożonymi wadami wrodzonymi serca, tlenek azotu podawano bezpośrednio do oksygenatora, w postaci inhalacji. Choć nie badano bezpośredniego wpływu NO na układ dopełniacza, to wykazano jego działanie hamujące odpowiedź zapalną, wzmacniające efekty przeciwzapalne oraz protekcyjne działanie na mięsień sercowy (Ryc.7.2.1, 7.2.2., 7.2.4., 7.2.5., 7.2.9., 7.2.10.). Efekty te uwidoczniło na poziomie molekularnym oraz klinicznym (krótszy czas wspomaganie oddechu, niższy indeks katecholamin) (Tab.7.6.1.)

Najczęściej stosowaną metodą ograniczenia odpowiedzi zapalnej jest przedoperacyjna lub śródoperacyjna podaż sterydów. Sterydy hamują syntezę wszystkich mediatorów procesu zapalnego związanych z działaniem czynnika jądrowego κ B. Mechanizm ich działania, na poziomie genomu, polega na uruchomieniu transkrypcji czynników przeciwzapalnych takich jak: IL-10, IL-1ra, lipokortyna-1 oraz czynnika hamującego czynnik jądrowy κ B (Barnes i Karin, 1997). Podaż deksametazonu u dzieci powoduje zmniejszenie produkcji TNF α , IL-6 i może wpłynąć na poprawę wyników leczenia (Bronicki, Backer i Baden, 2000). Ich stosowanie może też przynieść efekty niepożądane. Potwierdzono to w wielu doniesieniach i pracach oryginalnych oraz metaanalizach (Dieleman i inni, 2011). Niekorzystne działania stosowania wysokich dawek sterydów podczas krążenia pozaustrojowego obejmują częstsze występowanie infekcji, zwłaszcza zakażeń ran pooperacyjnych oraz częstsze występowanie niewydolności oddechowej, w tym wiążącej się z koniecznością wytworzenia tracheostomii. Śródoperacyjna podaż sterydów związana była z wyższym stężeniem glukozy w okresie pooperacyjnym i

częstszym stosowaniem insuliny (Dreher, Glatz, Kennedy, Rosenthal i Gaynor, 2015).

W badanym materiale stwierdzono pobudzenie istotnej odpowiedzi zapalnej, pomimo stosowania śródoperacyjnych strategii przeciwzapalnych. Ponadto, w obydwu grupach wykazano znacznie nasiloną odpowiedź przeciwzapalną, wyrażoną istotnym wzrostem stężenia IL1-ra oraz Il-10 (związaną w dużej mierze z zastosowanym sterydem). W grupie, która otrzymała inhalację NO stwierdzono niwelujący wpływ inhalacji na poziom insuliny, a także stężenia mleczanów w próbkach krwi pobranych po operacji. Stężenie mleczanów było normalne i istotnie niższe w grupie pacjentów, którzy otrzymali NO (Tab.7.6.1, Ryc.7.2.11.). Stężenie insuliny w próbkach pooperacyjnych było istotnie niższe w grupie NO.1., podobnie odpowiadające mu stężenie glukozy utrzymywało się na niższym poziomie (Ryc.7.2.12.). Dane te świadczą mogą o mniejszym nasileniu bloku metabolicznego i insulinooporności. Jednym z negatywnych wpływów stosowania sterydów, o którym donoszono w dotychczasowych badaniach był przedłużony czas intubacji i wspomaganie oddechu (Hövels-Gürich i inni, 2002). W badanej populacji, w grupie dzieci, które otrzymały NO, wykazano krótszy czas wspomaganie oddechu, w porównaniu z dziećmi które nie otrzymały NO. Nie stwierdzono natomiast różnic w czasie pobytu w oddziale intensywnej terapii (Tab.7.6.1.).

Inną powszechnie stosowaną praktyką podczas operacji w krążeniu pozaustrojowym jest hipotermia ogólna. Wykazano, że hipotermia ogólna zwiększa produkcję IL-10 u dzieci (Seghaye M. i inni, 1996). Obserwację tą potwierdzono na modelu zwierzęcym, gdzie chłodzenie związane było ze zwiększoną produkcją IL-10 i zmniejszoną syntezą TNF α . Przesunięcie równowagi w kierunku odpowiedzi przeciwzapalnej związane było z lepszą protekcją narządów (Qing i inni, 2001). W badanej populacji, u wszystkich pacjentów stosowano hipotermię ogólną podczas operacji korekcyjnych w celu zmniejszenia zapotrzebowania na tlen oraz uzyskania lepszej protekcji narządów. W grupie dzieci, które otrzymały tlenek azotu stwierdzono niższe stężenie mleczanów w próbce krwi pobranej po zakończeniu krążenia pozaustrojowego (Tab.7.6.1.). Może to dowodzić lepszej perfuzji narządów w trakcie krążenia pozaustrojowego.

7.5. Wpływ tlenu azotu na badane parametry związane z regulacją odpowiedzi zapalnej

Dzięki wysokiej czułości oznaczeniom ilościowym przy pomocy macierzy *Miliplex Map Kit assays* zbadano wpływ śródoperacyjnej inhalacji NO na panel badanych czynników.

Początkowe interleukiny, aktywowane we wczesnej fazie odpowiedzi zapalnej to TNF α oraz interleukina 1 β . Ich produkcja wzrasta natychmiast po zadziałaniu bodźca prozapalnego. Inicjują one odpowiedź zapalną i odpowiadają za reakcję gorączkową. W grupie, która otrzymała NO stężenie IL1 β było istotnie niższe w próbkach pooperacyjnych, a istotny wzrost tej cytokiny stwierdzono tylko w grupie bez tlenu azotu. Stężenie TNF α wzrosło w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego (Ryc.7.2.3.). Wzrost ten związany może być z ogólną odpowiedzią stresową (zapalną) oraz działaniem NO. Po odłączeniu podaży tlenu azotu i zakończeniu krążenia pozaustrojowego, stężenie TNF α spadło do poziomu przedoperacyjnego i nie różniło się od stężenia w próbkach pochodzących od pacjentów, którzy nie otrzymali NO.

Takie działania tlenu azotu mogą przyczynić się do hamowania kaskady odpowiedzi zapalnej już na bardzo wczesnym jej etapie i zapobiegać pobudzeniu i podtrzymywaniu uogólnionego procesu.

TNF α oraz IL-1 β stymulują produkcję IL-6 wpływając na różne typy komórek (monocyty, makrofagi, komórki śródbłonka, fibroblasty komórki mięśniówki gładkiej). Istotny wzrost jej stężenia został opisany w wielu stanach klinicznych min. rozległe operacje chirurgiczne, oparzenia oraz urazy wielonarządowe (Nijsten i inni, 1991). Jest ona czynnikiem wywołującym gorączkę, a jej stężenie było istotnie wyższe wśród pacjentów, u których z różnych powodów dochodziło do rozwoju zespołu niewydolności wielonarządowej. W grupie z tlenkiem azotu jej stężenie było istotnie niższe w próbkach pooperacyjnych. Ponadto interleukina 6 znana jest jako główny regulator odpowiedzi ostrej fazy (Heinrich, Castell i Andus, 1990). Stymuluje ona w wątrobie produkcję białek ostrej fazy (jak np. C – reactive protein, pentraksyna). Jest to kluczowy etap regulacji odpowiedzi zapalnej, zmierzający do jej ograniczenia. Białka ostrej fazy posiadają bowiem działanie przeciwzapalne (Heuertz i Webster, 1997). W obydwu badanych grupach pacjentów obserwowano istotny wzrost IL-6, przy czym najwyższe jej stężenie stwierdzono w

próbki pobranych 4 godziny po zakończeniu operacji (Ryc.7.5.1.). W grupie, która otrzymała NO, stwierdzono istotnie niższe stężenie IL-6, co może przyczynić się potencjalnie do ograniczenia prozapalnych efektów jej działania. Dodatkowo, dynamika zmian stężenia pentraksyny zbliżona była do dynamiki zmian aktywności interleukiny 6 (Ryc.7.2.8).

GM-CSF jest znanym czynnikiem wpływającym na stymulację produkcji makrofagów w szpiku. Dodatkowo wykazano jego stymulujące działanie na funkcje makrofagów pęcherzykowych oraz produkcję surfaktantu (Trapnell i Whitsett, 2002). W pracy wykazano istotny wzrost stężenia GM-CSF w grupie pacjentów, którzy nie otrzymali tlenu azotu w próbkach pobranych w okresie pooperacyjnym (Ryc.7.2.7.). U pacjentów, którzy otrzymali NO stężenie GM-CSF było istotnie niższe w okresie pooperacyjnym. Stężenie GM-CSF w badanych grupach ma podobną dynamikę do badanej leukocytozy (Ryc.7.2.13.). Początkowy spadek leukocytozy związany może być z hemodilucją stosowaną podczas zabiegów w krążeniu pozaustrojowym. Jest to istotny spadek w obydwu badanych grupach. W okresie pooperacyjnym obserwowano wzrost ilości leukocytów we krwi, który był istotny w grupie NO.0. (2c vs.6). Różnice jednak pomiędzy badanymi grupami w tym punkcie czasowym były nieistotne statystycznie. Podobnie, stężenie GM-CSF wzrosło istotnie w punktach czasowych 3., 4., 5. (Ryc.7.2.7.) w porównaniu z próbka referencyjną i w próbkach 3., 4., i 5. Było istotnie wyższe w porównaniu do grupy NO.1. 24 godziny po operacji odnotowano w grupie NO.0. spadek stężenia GM-CSF, tymczasem w grupie tej nadal podwyższona była leukocytoza. Opisana dynamika odpowiada wcześniej opisanym zjawiskom mobilizacji różnych frakcji leukocytów u zdrowych ochotników (vanPelt i inni, 1996). Pierwszymi komórkami, które pojawiały się we krwi obwodowej po iniekcji podskórnej GM-CSF były neutrofile (ok 60 minut po podaniu podskórnym). Osiągały one maksymalną liczebność we krwi po 8 godzinach, eozynofile i monocyty natomiast szczytową liczebność osiągały ok. 24 godziny po podaniu GM-CSF. Inhalacja tlenu azotu w badanej grupie pacjentów powodowała obniżenie stężenia GM-CSF w próbkach pooperacyjnych (3 – 6) w porównaniu z grupą NO.0. Jednocześnie w tych punktach czasowych zanotowano większą leukocytozę. Sugeruje to, że inhalacja NO może działać na uwalnianie leukocytów do krwi obwodowej przez mechanizm nie związany z działaniem GM-CSF. Leukocyty są głównym celem działania

aktywowanych składników komplementu i biorą udział w podtrzymywaniu systemowej reakcji zapalnej. Jednocześnie stanowią populację komórek odpowiedzialną za procesy regeneracyjne i odpowiedź regeneracyjną organizmu (Takabayashi i inni, 1996). Cytokiny prozapalne stymulują leukocyty inicjując produkcję kolejnych mediatorów zapalenia, uszkodzenia komórek i indukcji apoptozy (Dinarello, 2000). Badania populacji pediatrycznej wykazały wzrost liczby krążących leukocytów po rozpoczęciu krążenia pozaustrojowego, z jednoczesnym wzrostem aktywności elastazy i mieloperoksydazy. Jednocześnie wykazano wzrost stężenia krążących cząstek adhezyjnych sICAM (Chew i inni, 2001). Zjawisko uwalniania leukocytów do krwi obwodowej, niezależnie od GM-CSF może odzwierciedlać regeneracyjne właściwości stosowanego tlenu azotu (Borówka i inni, 2013).

Naturalna odpowiedź przeciwzapalna mediowana jest poprzez cytokiny działające przeciwzapalnie (IL-10, IL-1ra). IL-10 hamuje uwalnianie zarówno IL-6 jak i TNF α oraz IL-1 β . Stymuluje ona także produkcję IL-1ra oraz krążący receptor p75 dla TNF α , hamując prozapalne działanie tych cytokin (Seitz i inni, 1995). Pojawienie się cytokin przeciwzapalnych we krwi obwodowej jest zwykle opóźnione w stosunku do czynników działających prozapalnie, ponieważ ich synteza zależy częściowo od stymulacji odpowiedzi prozapalnej. Ich pojawienie się hamuje zwrotnie syntezę cytokin prozapalnych. Poprzez aktywację osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej stymulują one uwalnianie kortyzolu, hamując w ten sposób uogólnioną odpowiedź zapalną. Interleukina 10 pobudza uwalnianie IL-1ra (Rennick, Berg i Holland, 1992), (Tilg, Dinarello i Mier, 1997). W przeprowadzonym badaniu również obserwowano podobne efekty. Tlenek azotu podawany śródoperacyjnie powodował wyższe stężenie IL-10, utrzymujące się nieco dłużej w porównaniu z grupą NO.0, w której obserwowano szybki spadek jej stężenia w 8. i 12. godzinie po operacji (Ryc.7.2.5). Sugeruje to wzmacniający i utrwalający efekt działania NO na syntezę IL-10. Może to oznaczać utrwalające i nasilające działanie NO w badanym układzie. W tym zakresie tlenek azotu wydaje się wykazywać działanie synergistyczne ze stosowaną śródoperacyjnie w obydwu grupach sterydoterapią. Jednocześnie w grupie NO.1. stwierdzono niższe stężenie IL-1ra, co może potwierdzać stymulujący wpływ IL-10 na stężenie IL-1ra, sugeruje także możliwy mechanizm działania NO.

Równowaga pomiędzy produkcją czynników prozapalnych i przeciwzapalnych odgrywa centralną rolę w kontrolowaniu odpowiedzi zapalnej (Brix-Christensen i inni, 2001). Zdolność do produkcji czynników przeciwzapalnych (hamujących odpowiedź zapalną, np. IL-10), w odpowiedzi na bodźce działające prozapalnie decyduje o protekcji tych narządów przed uszkodzeniem. W warunkach zakażenia uogólnionego wyższa wartość proporcji IL-6/IL-10 była predyktorem niepomyślnego przebiegu klinicznego (Taniguchi i inni, 1999). U dzieci poddanych operacjom kardiochirurgicznym natomiast wyższa wartość wskaźnika stężenia cytokin we krwi IL-10 / IL-6 związana była z mniejszą ilością powikłań pooperacyjnych (Hövels-Gürich i inni, 2002), a zwiększona produkcja IL-10 podczas operacji kardiochirurgicznych związana była z lepszą protekcją narządów (Qing i inni, 2001), (Vazquez-Jimenez i inni, 2001). W przeprowadzonym badaniu, w obydwu badanych grupach odpowiedź przeciwzapalna jest znacznie zaznaczona (śródoperacyjna podaż sterydów, mechanizmy odpowiedzi zapalnej). Tlenek azotu podawany śródoperacyjnie do oksygenatora powoduje wzrost stężenia IL-10 (Ryc.7.2.5.) oraz obniżenie stężenia IL-6 w okresie pooperacyjnym, tym samym zwiększając wartość wskaźnika IL-10/IL-6 w grupie NO.1. Podaż sterydów oraz zbyt duże stężenia IL-10 mogą jednak powodować ograniczenie odpowiedzi immunologicznej i zwiększenie ryzyka zakażenia okołooperacyjnego.

Produkcja cytokin prozapalnych takich jak IL-6, IL-8, TNF α osiąga swoje maksimum zwykle pod koniec trwania krążenia pozaustrojowego, podczas gdy odpowiedź przeciwzapalna pojawia się nieco później, w trakcie (4 – 24 godziny po operacji) (McBride, Armstrong, Gilliland i McMurray, 1996), (Seghaye M. i inni, 1996). Dynamika uwalniania poszczególnych cytokin zależna jest od okołooperacyjnego postępowania przeciwzapalnego (m.in. podaż sterydów). W badanej populacji leczonych dzieci stwierdzono podobną dynamikę zmian. Aktywacja czynników prozapalnych (IL-6, IL-8, TNF α) i ich najwyższe stężenie ma miejsce pod koniec trwania krążenia pozaustrojowego (Ryc.7.2.1., Ryc.7.2.2., Ryc.7.2.3.). Stężenie IL-10 osiąga swoje maksimum nieco później (8 – 12 godzin po zakończeniu operacji). Inhalacja tlenu azotu powoduje istotne zmniejszenie stężenia IL-6 i IL-8 w punktach maksymalnej aktywacji, pozostając bez

statystycznie istotnego wpływu na stężenie TNF α . Uznaje się, że głównymi czynnikami wpływającymi na uwalnianie cytokin prozapalnych są układ dopełniacza oraz endotoksyna uwalniania z jelit. Istotny wpływ wywierają także mechanizmy niedokrwienia i reperfuzji (Jansen i inni, 1992).

7.6. Wpływ badanych zjawisk na protekcję mięśnia sercowego.

Uszkodzenie niedokrwienno – reperfuzyjne i odpowiedź zapalna powiązane są z sobą szeregiem złożonych zależności. Po okresie niedokrwienia, reperfuzja stymuluje wzrost stężenia cytokin prozapalnych oraz wysoce reaktywnych rodników tlenowych. Lokalna odpowiedź komórkowa w reperfundowanym narządzie ze strony komórek śródbłonna, płytek krwi oraz komórek zapalnych zwiększa stężenia cytokin. Dochodzi do obumierania komórek w mechanizmie apoptozy oraz nekrozy.

Centralnym zjawiskiem w reperfundowanym obszarze jest uszkodzenie śródbłonna prowadzące do zaburzenia produkcji NO i regulacji rozkurczu naczyń zależnej od śródbłonna (Cooper i inni, 2000). W modelu doświadczalnym upośledzenie produkcji NO następuje po kilku minutach od przywrócenia przepływu przez naczynie (Tsao, Aoki, Lefer, Johnson i Lefer, 1990). W kolejnym etapie ma miejsce marginalizacja leukocytów, przyleganie i migracja neutrofilów przez endotelium, któremu towarzyszy znaczny wzrost ekspresji p-selektyny. Zjawiska te prowadzą do obrzęku, zatykania drobnych naczyń (*no-reflow phenomenon*) i upośledzenia funkcji serca z powodu martwicy i apoptozy (Lefer i Lefer, 1996). Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że uszkodzenie reperfuzyjne może być modulowane przez tlenek azotu. Głównym zadaniem tlenu azotu w obrębie układu naczyniowego (gdzie jest produkowany przez komórki śródbłonna) jest regulacja napięcia ściany naczyń. Komórki śródbłonna produkują NO używając jako substratu argininy. Jako czynnik gazowy szybko dyfunduje on w obręb komórek mięśniówki gładkiej powodując jej relaksację i poszerzenie naczyń. Przedostaje się on także do strumienia krwi, reagując głównie z oksyhemoglobina. Reakcja ta, w wyniku której powstaje methemoglobina, odpowiedzialna jest za bardzo szybkie wypłukiwanie NO. Dodatkowo dyfuzja NO do wnętrza erytrocytów, w celu wiązania się z hemoglobina, jest utrudniona przez błonę komórkową. NO reaguje także z grupami hemowymi deoxyhemoglobiny tworząc S-

nitrosohemoglobinę uważaną za transporter NO w układzie krążenia. Dzięki temu NO może wywierać efekty z dala od miejsca jego dostarczenia do krwi. Według ostatnich doniesień S-nitrosohemoglobina powstaje w tkankach przy dużych stężeniach parcjalnych tlenu, natomiast przy niskim ciśnieniu parcjalnym tlenu rozkłada się, uwalniając tlenek azotu, który rozszerza naczynia krwionośne. Taki mechanizm pozwala na kontrolę dostarczania tlenu do tkanek i w przypadku niedotlenienia, rozszerzenie naczyń i lepszą perfuzję (McMahon i inni, 2002). Proces transportu i odległego działania tlenku azotu jest bardzo niewydolny w warunkach fizjologicznych. Wydolność tego mechanizmu znacznie jednak wzrasta w przypadku farmakologicznych stężeń NO (stosowanego w postaci inhalacji) (Rassaf i inni, Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma, 2002). Dodatkowo NO podawany jest do oksygenatora, do mieszaniny oddechowej i po pokonaniu bariery (błona półprzepuszczalna w oksygenatorze) przedostaje się do krwi oraz odcinka drenu pomiędzy oksygenatorem a pacjentem, krew trafia do opuszki aorty, a jednym z pierwszych narządów, który jest perfundowany, jest serce.

Działanie protekcyjne w odniesieniu do mięśnia sercowego potwierdzono w grupie, która otrzymała inhalację NO. Wzrost wskaźników niedokrwienia i reperfuzji obserwowano w obu badanych grupach (wzrost CKMB, wzrost TnI), w grupie jednak NO.1 stężenie tych wskaźników po reperfuzji jest znacznie niższe (Ryc. 7.2.9., 7.2.10.). Lepsza funkcja serca obserwowana jest również w okresie pooperacyjnym, w którym w grupie z inhalacją tlenku azotu obserwowano niższy indeks katecholamin oraz krótszy czas wspomagania oddechu (Tab.7.3.1.). W dotychczasowych badaniach na grupie dorosłych operowanych z powodu zastawki aortalnej, NO podawany do roztworu krwistej kardioplegii (następnie do opuszki aorty) stwierdzono również niższe stężenie CKMB oraz TnI, które korelowało z mniejszym stężeniem selektyny P w krwi pobieranej bezpośrednio z zatoki wieńcowej (Gianetti i inni, 2004). Sugeruje to możliwy bezpośredni efekt przeciwzapalny i kardioprotekcyjny tlenku azotu. Inhalacja NO bezpośrednio do oksygenatora wydaje się najlepszą metodą podaży, ponieważ po opuszczeniu oksygenatora krew trafia do opuszki aorty i bezpośrednio do naczyń wieńcowych.

Nasilenie procesów odpowiedzi zapalnej związanych z lokalną reperfuzją, przyczynia się do nasilenia uogólnionej reakcji zapalnej. Lokalne działanie

stosowanego NO na reperfundowany mięsień sercowy może być jednym z mechanizmów hamujących uogólnioną odpowiedź zapalną. Stres jakiemu poddany zostaje mięsień sercowy podczas korekcji wady wrodzonej serca spowodowany jest nieadekwatnym zahamowaniem metabolizmu mięśnia sercowego. Główną zmianą obserwowaną na poziomie mikroskopowym po podaniu roztworu kardioplegicznego jest wzrost przepuszczalności kapilar i obrzęk serca. Bardziej zaawansowane i nieodwracalne zmiany w miokardium związane są z niedokrwieniem i zaburzeniem równowagi jonów sodowych oraz zmianami stężenia jonów wapniowych. Wskaźnikami niedokrwienia stosowanymi w praktyce klinicznej jest poziom troponin (troponina T, troponina I) i rzadziej CKMB. Dodatkowo protekcyjnie na mięsień sercowy działa hipotermia ogólna oraz stosowanie zimnej kardioplegii.

Tlenek azotu uważany jest za jeden z kluczowych elementów łączących uszkodzenie niedokrwienno – reperfuzyjne z odnową tkanki (Pabla i Curtis, 1996), a zaburzenia jego produkcji wpływają na zależność pomiędzy funkcją śródbłonna i odpowiedzią zapalną (Chello, Mastroberto, Perticone, Celi i Colonna, 1998). Znany jest od ponad dekady jako czynnik stosowany w leczeniu nadciśnienia płucnego (w postaci inhalacji do dróg oddechowych). Jego rola w procesach uszkodzenia tkanek, reperfuzji, regeneracji, apoptozy i regulacji procesów zapalnych nie została do końca wyjaśniona. Może on odgrywać istotną rolę w mechanizmach związanych z protekcją serca (Gianetti i inni, 2004). NO jest znanym regulatorem procesów apoptozy oraz czynnikiem hamującym agregację i adhezję płytek oraz blokującym adhezję i migrację monocytów (Uchiyama i inni, 2002), (Comini i inni, 1990). Dodatkowo jest znanym czynnikiem hamującym aktywację leukocytów, zapobiegającym interakcji pomiędzy neutrofilami i śródbłonkiem oraz hamującym produkcję wolnych rodników tlenowych. Każdy z tych mechanizmów może przyczynić się do terapeutycznego, pozytywnego efektu w trakcie krążenia pozaustrojowego.

W badaniach doświadczalnych na modelu zwierzęcym wykazano, że podawanie tlenu azotu do mieszaniny oddechowej w trakcie zawału i reperfuzji mięśnia sercowego ogranicza istotnie obszar objęty niedokrwieniem i poprawia funkcję komory lewej (Hataishi i inni, 2006). Egzogenny tlenek azotu działa kardioprotekcyjnie wpływając na uszkodzenie mięśnia sercowego mediowane przez neutrofile (Ambrosio i Tritto, 1999). W licznych badaniach wskazano mechanizmy

kardioprotekcyjnego działania NO (Jones i Bolli, 2006), (Schulz, Kelm i Heusch, 2004). Uszkodzenie niedokrwiennie – reperfuzyjne, jakie ma miejsce po zatrzymaniu serca przy pomocy roztworu kardioplegicznego, prowadzi do upośledzenia funkcji serca. W badanych grupach odzwierciedleniem uszkodzenia mięśnia sercowego jest wzrost stężenia TnI oraz aktywności CKMB. W grupie jednak, która otrzymała inhalację NO stopień uszkodzenia mięśnia serca wyrażony badanymi wskaźnikami jest mniejszy. Stężenie CKMB wzrasta istotnie w obydwu grupach (Ryc.7.2.9) do momentu reperfuzji. W grupie NO.1 reperfuzja, która ma miejsce w punkcie 2c, nie wpływa jednak na dalszy istotny wzrost aktywności CKMB, w grupie bez inhalacji NO, aktywność CKMB rośnie w kolejnych próbkach czasowych, osiągając wartości istotnie wyższe w porównaniu z grupą NO.1. w 4., 8., i 12. godzinie po operacji. Różnica ta staje się nieistotna 24 godziny po operacji (próbka 6., Ryc.7.2.9.). W obydwu badanych grupach aktywność CKMB nie obniża się do poziomu wyjściowego. W przypadku TnI, wzrost jej stężenia rozpoczyna się nieco wcześniej, na etapie zaklemowania aorty (punkt 2b, Ryc. 7.2.10.) i rośnie w obydwu grupach. W grupie NO.0 obserwuje się dalszy gwałtowny wzrost stężenia TnI w trakcie reperfuzji (po usunięciu klemu aortalnego, punkt 2c, Ryc.7.2.10.). W grupie, która otrzymała inhalację NO wzrost ten jest nieistotny. W próbkach pobranych po zakończeniu krążenia pozaustrojowego stwierdzono istotną różnicę stężenia TnI. W kolejnych godzinach po operacji obserwowano gwałtowny spadek TnI (próbka 3., 4., 5., i 6.), choć w obydwu grupach wartość ta nie obniżyła się do poziomu przedoperacyjnego w 24. godzinie po operacji.

Mechanizm działania tlenu azotu w grupie NO.1. może obejmować hamowanie procesów zapalnych oraz wpływ na zjawisko apoptozy (Duranski i inni, 2005). Apoptoza w niedojrzałym miocardium dzieci z wadami wrodzonymi serca jest znanym i opisywanym wcześniej zjawiskiem uważanym za integralną część procesu dojrzewania miokardium. Może mieć istotny wpływ na występowanie dysfunkcji serca we wczesnym okresie pooperacyjnym. Stwierdzone w badaniu efekty działania NO mogą mieć charakter bezpośredni lub pośredni (poprzez wpływ na aktywność cytokin i innych czynników krążących w układzie, w trakcie krążenia pozaustrojowego). Udowodniono we wcześniejszych badaniach, że podaż NO w sytuacjach jego zmniejszonej biodostępności powoduje obniżenie oporu naczyniowego, zwiększenie przepływu krwi przez tkanki (lepiej perfuzja

tkankowa), zmniejszenie nasilenia odpowiedzi zapalnej i co za tym idzie mniejsze uszkodzenia tkankowe (Lundberg, Weitzberg i Gladwin, 2008). W związku z mechanizmem działania i wiązania NO przez wolną hemoglobinę, zjawiska te zbadano dokładnie w stanach chorobowych, w których dochodzi do hemolizy (np. niedokrwistość sierpowata). Podobna sytuacja ma miejsce w trakcie prowadzenia perfuzji pozaustrojowej. Wskutek mechanicznego uszkodzenia krwinek czerwonych, duża ilość hemoglobiny wydostaje się do osocza i w istotny sposób wpływa na farmakokinetykę NO. Wolna oksyhemoglobina natychmiast wiąże produkowany przez śródbłonek tlenek azotu, co doprowadza do znacznego i bardzo szybkiego spadku biodostępności NO w układzie krążenia. Niedobór aktywnego NO doprowadza do obkurczenia naczyń krwionośnych, aktywacji płytek krwi, nasilenie zjawiska przylegania pomiędzy leukocytami i śródbłonkiem oraz nasilenie produkcji wolnych rodników tlenowych (Vermeulen Windsant, Hanssen, Buurman i Jacobs, 2011). Fakty te wystarczą do wyjaśnienia zaburzeń wywoływanych przez krążenie pozaustrojowe u dzieci, obserwowanych w klinice.

Podanie tlenu azotu w postaci inhalacji w dawkach farmakologicznych wywołało szereg efektów obserwowanych na poziomie molekularnym jak i klinicznym sugerujących lepszą funkcję serca i naczyń. Uzyskane wyniki w sposób pośredni lub bezpośredni dowodzą lepszej funkcji układu sercowo – naczyniowego i potwierdzają, stwierdzone badaniem wskaźników niedokrwienia, mniejsze uszkodzenie mięśnia sercowego. W grupie dzieci, które otrzymało NO stwierdzono niższy poziom mleczanów po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, krótszy czas wspomagania oddechu oraz niższy indeks katecholamin (Tab.7.3.1).

7.7. Kliniczne efekty zastosowania tlenu azotu w trakcie krążenia pozaustrojowego.

Dobrze kontrolowana odpowiedź zapalna podczas różnego rodzaju operacji i interwencji chirurgicznych jest zjawiskiem pozytywnym i koniecznym do zapewnienia angiogenezy, uruchomienia odpowiedzi regeneracyjnej, gojenia się ran pooperacyjnych oraz obrony przed zakażeniami okołoperacyjnymi. Nie ma jednak wątpliwości, że nadmierna stymulacja procesów uogólnionej odpowiedzi zapalnej jest szkodliwa i może w znaczny sposób wpływać na wyniki leczenia wad wrodzonych serca, zwłaszcza u małych dzieci (noworodki, niemowlęta).

Według badań klinicznych, przeprowadzonych u dzieci poddawanych korekcjom wad wrodzonych serca, zespół uogólnionej reakcji zapalnej powoduje przedłużenie czasu hospitalizacji w oddziale IT, wiąże się z koniecznością zwiększonego wsparcia inotropowego i zwiększonym ryzykiem rozwoju niewydolności wielonarządowej. Wykazano wzrost aktywności białek ostrej fazy, IL-6, mleczanów oraz spadek ilości płytek (Bønding Andreasen, Hvas i Ravn, 2014), (Allan i inni, 2010). W badanej grupie dzieci wykazano, że śródoperacyjna podaż tlenu azotu może istotnie wpłynąć na niektóre parametry kliniczne. Wykazano istotnie krótszy czas wspomagania oddechu w oddziale intensywnej terapii pooperacyjnej oraz niższy indeks katecholamin stosowanych do wsparcia układu krążenia (Tab.7.3.1.). Wskazuje to na protekcyjne działanie inhalacji NO na funkcję serca (co potwierdziło również istotne niższe stężenie CKMB oraz TnI) oraz funkcję układu oddechowego.

Krażenie pozaustrojowe powoduje zaburzenie równowagi pomiędzy układem krzepnięcia i fibrynolizy. Kontakt krwi z obcą powierzchnią materiałów sztucznych powoduje aktywacją alternatywnej drogi układu dopełniacza. Dodatkowo pod koniec krążenia pozaustrojowego, aktywowana jest klasyczna droga przez kompleksy heparynowo – protaminowe (Chenoweth i inni, 1981), (Kirklin i inni, 1986). Aktywowane elementy układu dopełniacza wchodzi w różne interakcje z układem krzepnięcia oraz fibrynolizy. Inne czynniki wpływające na funkcję układu krzepnięcia i fibrynolizy to hemodilucja (zmniejszająca stężenie czynników krzepnięcia), hipotermia (zmniejszająca stężenie antytrombiny III i wpływająca na utratę receptorów odpowiedzialnych za adhezję na powierzchni płytek), bezpośredni wpływ uszkodzenia śródbłonna i aktywacji czynnika XII, XI, prekallikreiny i kininogenu. Generowana kallikreina i kininogen wpływają na produkcję bradykininy oraz plazminogenu, co aktywuje fibrynolizę. Aktywacja czynnika XII inicjuje kaskadę krzepnięcia. Procesy te prowadzą do zmniejszenia aktywności czynników antykoagulacyjnych i wzrostu aktywności czynników prokoagulacyjnych. Zjawisko takie prowadzi do formowania mikrozatorów i uszkodzenia niedokrwienno – reperfuzyjnego stymulującego produkcję czynników prozapalnych (Jaggers i Lawson, 2006). Wiadomo, że tlenek azotu posiada działanie antyagregacyjne. Stosowanie inhalacji NO może przyczynić się do zmniejszenia prozakrzepowej tendencji osocza i zmniejszenia negatywnych

skutków aktywacji układu krzepnięcia oraz skłonności do powstawania mikrozakrzepów. Zastosowanie inhalacji tlenu azotu w trakcie krążenia pozaustrojowego nie wpłynęło istotnie na objętość krwawienia pooperacyjnego, choć w grupie, która otrzymała inhalację, indeksowana objętość całkowitego krwawienia jest nieznacznie większa (Tab.7.3.1.).

Zespół małego rzutu u dzieci po operacjach kardiochirurgicznych wiąże się zwykle z dysfunkcją serca oraz narastającym oporem w krążeniu płucnym i systemowym (obkurczanie łożyska naczyniowego). Zjawiska te z kolei ściśle wiążą się z gwałtownym spadkiem dostępności tlenu azotu, produkcją działających kardiodepresyjnie cytokin prozapalnych, niedokrwieniem i reperfuzją oraz sekwestracją leukocytów. Przeprowadzone badanie dowiodło, że podanie tlenu azotu może przyczynić się do zmniejszenia nasilenia tych zjawisk i wpływać na poprawę funkcji serca i skrócenie czasu wspomaganego oddechu.

Krążenie pozaustrojowe oraz operacja korekcji wady wywierają niekorzystny wpływ na funkcję płuc. Zmniejszenie przepływu krwi przez płuca i przerwanie krążenia płucnego (po zaklemowaniu aorty) prowadzi do znacznego zmniejszenia objętości płuc wzrostu oporu naczyń płucnych oraz spadku podatności tego narządu. Zmiany te nakładając się na efekty odpowiedzi zapalnej prowadzą do spadku FRC (functional residua capacity), obrzęku śródmiąższowego oraz zaburzeń wymiany gazowej. Niedokrwienie płuc indukuje odpowiedź zapalną poprzez uwalnianie cytokin prozapalnych z komórek śródbłonna. Przywrócenie przepływu krwi przez płuca i zjawiska związane z reperfuzją prowadzą do aktywacji neutrofilów i uwolnienia mieloperoksydazy powodującej bezpośrednio uszkodzenie struktury płuc (von Ungern-Sternberg i inni, 2007). Jedną z metod protekcji płuc przed uszkodzeniem w trakcie krążenia pozaustrojowego była kontynuacja wentylacji i utrzymanie perfuzji przez ten narząd. Obserwowano zmniejszenie zjawiska sekwestracji neutrofilów. Wpływało to jednak niekorzystnie na ukrwienie tkanki płucnej oraz błony śluzowej oskrzeli, wywołując niepożądane efekty (Ng i inni, 2008). Ostre uszkodzenie płuc do którego dochodzi po zastosowaniu krążenia pozaustrojowego powodowane jest przez szereg mediatorów zapalnych takich jak, interleukina IL-6, IL-1beta, IL-10, TNF-a, GM-CSF a także fragment dopełniacza C5a, chemokiny oraz wolne rodniki tlenowe (Bhatia i Moochhala, 2004). W badanej grupie pacjentów stwierdzono istotny wpływ śródoperacyjnej podaży NO na czas

wspomagania oddechu. W grupie, która otrzymała NO czas wspomagania oddechu był istotnie krótszy (Tab.7.3.1.). Analizując wpływ tlenu azotu na poszczególne czynniki osoczone dowiedziono, że powoduje istotne zmniejszenie działających prozapalnie interleukiny 1beta, Il-8 i IL-6, wzrost przeciwzapalnie działającej Il-10, obniżenie GM-CSF. Stężenie TNF α w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego nieznacznie wzrasta, ale w okresie pooperacyjnym obniża się ono po zakończeniu inhalacji NO, osiągając poziom zbliżony do wyjściowego (Ryc.7.2.3.).

Uszkodzenie śródbłonna i wzrost jego przepuszczalności (*capillary leak syndrome*) jest częstym zjawiskiem u dzieci, spotykanym w codziennej praktyce klinicznej. Charakteryzuje go przesunięcie (ucieczka) płynów do przestrzeni pozanaczyniowej z rozwojem uogólnionych obrzęków oraz przesieków do jam ciała. Brak odpowiedniego rozpoznania i leczenia, doprowadzić może do hipowolemii, hipoperfuzji i uszkodzenia narządów. Szczególnie podatną grupą na tego typu zaburzenia są noworodki i małe niemowlęta. Opisanymi czynnikami zwiększającymi ryzyko wystąpienia nasilonej reakcji są obecność zmian zapalnych przed operacją (leukocytoza, aktywacja dopełniacza), nasilona odpowiedź zapalna wywołana przez operację, wzmożone uwalnianie histaminy oraz TNF α . Udowodniono również ścisły związek pomiędzy nasileniem *capillary leak syndrome* i uwalnianiem cytokin prozapalnych a dysfunkcją mięśnia sercowego po operacji (Vazquez-Jimenez i inni, 2001). U noworodków, u których diagnozowano dysfunkcję mięśnia sercowego po operacji anatomicznej korekcji przełożenia wielkich pni tętniczych, stwierdzono wyższe stężenie cytokin prozapalnych, w porównaniu z pacjentami bez dysfunkcji serca. Wykazano ścisłą korelację pomiędzy stężeniem cytokin prozapalnych a stężeniem troponiny-T w osoczu (Hövels-Gürich i inni, 2002). W przeprowadzonym badaniu wykazano, że podaż tlenu azotu może zmniejszyć produkcję prozapalnych cytokin (Ryc.7.2.1., Ryc.7.2.2., Ryc.7.2.4.), jednocześnie powoduje to istotne zmniejszenie aktywności (stężenia) wskaźników niedokrwienia mięśnia sercowego takich jak CK-MB, Troponina I (Ryc.7.2.9., Ryc.7.2.10.). Może to potwierdzać hipotezę, że głównymi czynnikami (obok niedokrwienia) biorącymi udział w patogenezie dysfunkcji serca po operacji są czynniki zapalne.

TNF α oraz Il-1 β pochodzą głównie z aktywowanych makrofagów i działają poprzez specyficzne receptory błonowe. Ich stężenie jest istotnie wyższe we krwi

obwodowej u pacjentów, u których rozpoznawany jest wstrząs septyczny (Putensen i Wrigge, 2000). Ich uwalnianie rozpoczyna się już po 30 minutach od ekspozycji na czynniki stresowe i w następnej kolejności aktywują one kolejną fazę odpowiedzi zapalnej i immunologicznej (cytokiny, produkty przemiany lipidów, reaktywne rodniki tlenowe, cząsteczki adhezyjne). Ich stężenie wzrasta również w wydzielinie drzewa oskrzelowego u pacjentów z ostrą niewydolnością oddechową (RDS).

Operacja korekcji wady wrodzonej serca u dziecka z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego powoduje pobudzenie uogólnionej odpowiedzi zapalnej. W początkowym etapie, reakcja ta wiąże się z aktywacją dopełniacza, stymulacją i degranulacją leukocytów, syntezą cytokin i wzmożoną interakcją pomiędzy leukocytami i śródbłonkiem naczyniowym. Kontakt krwi ze sztucznymi powierzchniami krążenia pozaustrojowego oraz uszkodzenia niedokrwienno reperfuzyjne stanowią główny bodziec aktywujący i podtrzymujący reakcję stresową organizmu. Pod wpływem różnorodnych czynników przedoperacyjnych i śródoperacyjnych dochodzić może do nadmiernej stymulacji uogólnionej reakcji zapalnej, co przyczynić się może do poważnych powikłań pooperacyjnych, a nawet zgonu. Problemy takie jak wzrost przepuszczalności naczyń (capillary leak syndrome), dysfunkcja narządów prowadząca do zespołu niewydolności wielonarządowej oraz arytmie często pojawiają się u noworodków i niemowląt ze złożonymi wadami serca, w których współistnieje wiele zaburzeń patofizjologicznych. Opracowywane są liczne strategie technologiczne (związane z prowadzeniem krążenia pozaustrojowego) oraz interwencje farmakologiczne, których celem jest modulacja odpowiedzi zapalnej oraz protekcja narządów w trakcie krążenia pozaustrojowego. W pracy przedstawiono innowacyjne podejście do problemu, polegające na podaży (inhalacji) farmakologicznych dawek tlenu azotu do oksygenatora. Jego natychmiastowa biodostępność, działanie w kluczowych momentach operacji (okres dysfunkcji śródbłonka, okres reperfuzji) oraz w newralgicznych narządach (krew po inhalacji NO trafia bezpośrednio do naczyń wieńcowych) powodują modulujące działanie na odpowiedź zapalną, wzmacniające działanie na odpowiedź przeciwzapalną oraz przyczyniają się do lepszej protekcji serca i narządów w trakcie krążenia pozaustrojowego. Na podstawie przeprowadzonego badania wydaje się, że stosowanie tlenu azotu w

postaci inhalacji do oksygenatora może stać się ważnym elementem znieczulenia ogólnego prowadzonego w celu korekcji złożonych wad serca u dzieci.

8. WNIOSKI

1. Operacja korekcji złożonej wady wrodzonej serca u dzieci wywołuje znacznie nasiloną uogólnioną odpowiedź zapalną. Pomimo stosowanych strategii leczenia przeciwzapalnego, dochodzi do pobudzenia produkcji cytokin i hemokin prozapalnych, czynników przeciw-zapalnych oraz pobudzenie produkcji białek ostrej fazy.
2. Zastosowanie inhalacji tlenu azotu do oksygenatora podczas trwania krążenia pozaustrojowego powoduje obniżenie stężenia czynników prozapalnych, wzmocnienie odpowiedzi przeciw-zapalnej, lepszą protekcję mięśnia sercowego i perfuzję narządową oraz zmniejszenie stresu metabolicznego.
3. Zastosowanie inhalacji NO przyczynić się może do poprawy funkcji mięśnia sercowego, skrócenia czasu wspomaganego oddechu oraz czasu pobytu w oddziale intensywnej terapii.

9. STRESZCZENIE

Chirurgiczne leczenie wad wrodzonych serca wiąże się z koniecznością zastosowania krążenia pozaustrojowego (sztuczne płuco – serce), hipotermii oraz zatrzymania serca roztworem kardioplegicznym. Czynniki te, wraz z procesami niedokrwienia i reperfuzji, wprowadzają patologiczne warunki kontrolowanego wstrząsu ze szczególnym narażeniem na uszkodzenie takich narządów jak serce, mózg, płuca czy nerki

Pomimo wdrożenia nowoczesnych metod operacyjnych, rozwoju technologii krążenia pozaustrojowego, protekcji serca i innych narządów przed skutkami niedokrwienia i reperfuzji, indukowana odpowiedź zapalna w istotny sposób wpływa na wczesne i odległe wyniki leczenia operacyjnego złożonych wad wrodzonych serca.

W pracy podjęto próbę zbadania wpływu śródoperacyjnej podaży tlenu azotu do oksygatora, w trakcie krążenia pozaustrojowego, na zjawiska związane z uogólnioną odpowiedzią zapalną w grupie dzieci ze złożonymi, sinicznymi wadami wrodzonymi serca, których leczenie obarczone jest najwyższym ryzykiem okołoperacyjnym. Dodatkowo analizie poddano wpływ inhalacji NO na wybrane parametry metaboliczne, wskaźniki niedokrwienia serca oraz dane kliniczne, na które bezpośredni wpływ ma indukowana przez operację odpowiedź zapalna.

Badaniem objęto grupę 30 kolejnych pacjentów ze złożonymi, sinicznymi wadami serca, którzy operowani byli w Klinice Kardiologii Dziecięcej, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. W przedoperacyjnych badaniach diagnostycznych, u wszystkich pacjentów, zakwalifikowanych do badania, stwierdzono złożone, współistniejące zaburzenia patofizjologiczne tj. przeciążenie ciśnieniowo – objętościowe serca, z towarzyszącą sinicą. U 14 spośród nich, w sposób randomizowany przez zespół perfuzjonistów, w trakcie operacji korekcji stosowano tlenek azotu. Gaz podawany był w trakcie trwania krążenia pozaustrojowego, bezpośrednio do oksygatora w dawce 20 ppm. Protokół stosowania tlenu azotu, zgodnie ze wskazaniami klinicznymi oraz zaleceniami producenta był identyczny u wszystkich dzieci.

U wszystkich pacjentów, w ramach rutynowych oznaczeń hematologicznych i / lub biochemicznych, wykonywanych w trakcie leczenia operacyjnego lub intensywnej

terapii, pobierano próbki krwi (9 oznaczeń: 1 – przedoperacyjne, referencyjne; 4 oznaczenia śródoperacyjne; 4 oznaczenia pooperacyjne)

Wszystkie operacje w badanej grupie pacjentów przeprowadzono w standaryzowany, identyczny sposób używając tej samej metodologii i technologii. Korekcji wady dokonywano w znieczuleniu ogólnym, przy użyciu krążenia pozaustrojowego i hipotermii ogólnej.

W celu wyznaczenia odpowiedniego profilu białek do analizy wysokiej czułości, wykonano badanie przesiewowe pobranych próbek krwi, przy pomocy komercyjnie dostępnych macierzy Human Proteome Profiler Arrays (R&D) obejmujących 96 typowych czynników związanych z odpowiedzią zapalną, metaboliczną, angiogenną oraz podstawowe wskaźniki niedokrwienia i niewydolności serca.

Do ilościowego oznaczenia stężenia badanych czynników osoczowych użyto macierzy Miliplex Map Kit assays (Merck Millipore), która oparta jest o magnetyczną detekcję i połączona z platformą Luminex xMAP. Analizie poddano panel czynników wyselekcjonowanych na podstawie przeprowadzonego screeningu.

Analizę zmiennych objętych powtarzanymi pomiarami wykonano przy pomocy nieparametrycznej analizy wariancji powtarzanych pomiarów Friedmana. Testy post hoc przeprowadzono przy użyciu metody Dunna, przyjmując poprawkę dla wielokrotnych porównań. Analizę międzygrupową przeprowadzono testem ANOVA Kruskala-Wallisa, stosując procedurę Holmsa-Bonferoniego dla wielokrotnych porównań. Za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0.05$.

Hipoteza badawcza zakłada, że podaż NO w trakcie operacji korekcji złożonej wady wrodzonej, z użyciem krążenia pozaustrojowego i zatrzymaniem serca przy pomocy roztworu kardioplegicznego, może działać modulująco na opisywane zjawiska, wpływając na wyniki leczenia pooperacyjnego. Inhalacja tlenu azotu bezpośrednio do oksygenatora pozwala na uzyskanie jego natychmiastowej biodostępności w trakcie niedokrwienia i reperfuzji. Może on wywierać bezpośrednie i pośrednie działania, hamując odpowiedź stresową, uogólnioną odpowiedź zapalną oraz zmniejszać nasilenie uszkodzenia reperfuzyjnego, przyczyniając się do lepszej protekcji narządów, a w szczególności serca. W grupie pacjentów ze złożonymi, sinicznymi wadami serca, w której stosowano tlenek azotu wykazano zahamowanie uogólnionej odpowiedzi zapalnej (wyrażone mniejszym stężeniem cytokin

prozapalnych) i metabolicznej (niższe stężenie insuliny, glukozy i pentraksyny), wzmocnienie odpowiedzi antyzapalnej, lepszą perfuzję narządową w trakcie krążenia pozaustrojowego (wyrażoną niższym stężeniem mleczanów) i lepszą protekcję mięśnia sercowego (monitorowaną stężeniem wskaźników niedokrwienia). Efekty te obserwowano również analizując dane kliniczne, gdzie w grupie pacjentów która otrzymała NO, wykazano krótszy czas wspomagania oddechu oraz mniejszy indeks katecholamin.

Influence of intraoperative nitric oxide inhalation on systemic inflammatory response during treatment of congenital heart disease in children.

Surgical treatment of congenital heart disease demands application of cardiopulmonary – by-pass (CPB). It induces systemic inflammatory response influencing early and late results.

In this work an influence of nitric oxide (NO) inhalation into the oxygenator during CPB on inflammatory response was assessed.

Thirty patients were enrolled to the study and 14 randomly obtained NO inhalation. 9 samples of blood were taken preoperatively, intraoperatively and during postoperative period. All procedures were carried out using identical methodology and technique.

Screening of 96 factors using Human Proteome Profiler Arrays was carried out. Based on it, 12 factors were selected for high sensitivity analysis with Miliplex Map Kit assays.

Descriptive statistics and repeated measures ANOVA were used for statistical evaluation and $p < 0.05$ was accepted as significant. Patients who received NO inhalation revealed inhibition of inflammatory (lower concentration of pro-inflammatory cytokines) and metabolic (lower insulin, glucose and pentraxin level) response, amplification of anti-inflammatory response (anti-inflammatory interleukins) lower organ and heart protection (lower lactate, CKMB and TnI levels). Patients with NO inhalation showed also shorter respiratory support time and lower catecholamine index.

10. SPIS RYCIN

Ryc.2.3.1. Schemat krążenia pozaustrojowego (.....)	15
Ryc.2.3.2. Sztuczne płuco – serce. Obecnie stosowany zestaw do prowadzenia krążenia pozaustrojowego.....	15
Ryc.2.4.1. Schemat aktywacji układu dopełniacza.....	21
Tab.6.1.1 Charakterystyka grupy pacjentów poddanych badaniu.	34
Ryc.6.2.1. Zestaw do podawania i monitorowania tlenu azotu bezpośrednio do oksygenatora, wraz z mieszaniną gazów oddechowych.....	37
Ryc.6.6.1. Przykładowy wynik badania screeningowego przy pomocy macierzy obrazujący wpływ podaży tlenu azotu (NO) na panel badanych czynników osoczowych.	40
Ryc.6.6.2. Przykładowy wynik screeningowego badania wpływ tlenu azotu na ekspresję wybranych czynników	41
Ryc.7.2.1. Wpływ śródoperacyjnej podaży tlenu azotu na średnie stężenie IL6 u pacjentów ze złożonymi wadami serca.	46
Ryc.7.2.2. Wpływ śródoperacyjnej podaży NO na średnie stężenie IL-8 u pacjentów ze złożonymi wadami serca.....	47
Ryc.7.2.3. Średnie stężenie TNF alfa u pacjentów z wrodzonymi wadami serca w zależności od stosowania tlenu azotu.....	48
Ryc.7.2.4. Średnie stężenie IL1beta u pacjentów z wrodzonymi wadami serca w zależności od podaży tlenu azotu	49
Ryc.7.2.5. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenie IL10	50
Ryc.7.2.6. Wpływ podaży NO na stężenie IL1-ra.	51
Ryc.7.2.7. Średnie stężenie GM-CSF w badanych próbkach krwi, w zależności od zastosowania tlenu azotu	52
Ryc.7.2.8. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenie pentraksyny.	53
Ryc.7.2.9. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenia CKMB	54
Ryc.7.2.10. Wpływ podaży tlenu azotu na stężenie Troponiny I.....	55
Ryc.7.2.11. Wpływ NO na stężenie insuliny.....	56
Ryc.7.2.12. Wpływ NO na poziom glukozy	57
Ryc.7.2.13. Wpływ NO na leukocytozę w okresie okołoperacyjnym	58
Tab.7.3.1. Charakterystyka wybranych parametrów klinicznych oraz wpływu podaży tlenu azotu na te parametry.	59

11. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, N. (2000, Kwiecień). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*, strony 20(2):131-47.
- Allan, C., Newburger, J., McGrath, E., Elder, J., Psinos, C., Laussen, P., . . . McGowan, F. (2010). The relationship between inflammatory activation and clinical outcome after infant cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*, strony 111:1244-51.
- Allan, L. (2000, Październik). The outcome of fetal congenital heart disease. *Semin Perinatol*, strony 24(5):380-4.
- Amark, K., Berggren, H., Björk, K., Ekroth, A., Ekroth, R., Nilsson, K. i Sunnegårdh, J. (2005, Wrzesień). Blood cardioplegia provides superior protection in infant cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*, strony 80(3):989-94.
- Ambrosio, G. i Tritto, I. (1999, Sierpień). Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*, strony 138(2 Pt 2):S69-75.
- Anand, K., Hansen, D. i Hickey, P. (1990, Październik). Hormonal-metabolic stress responses in neonates undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology*, strony 73(4):661-70.
- Arkader, R., Malbouisson, L., Del Negro, G., Yamamoto, L. i Okay, T. (2013, Styczeń). Factors associated with hyperglycemia and low insulin levels in children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass who received a single high dose of methylprednisolone. *Clinics*, strony 68(1):85-92.
- Bacha, E., Sellak, H., Murakami, S., Mazmanian, G., Détruit, H., de Montpreville, V., . . . Hervé, P. (1997, Maj 27). Inhaled nitric oxide attenuates reperfusion injury in non-heartbeating-donor lung transplantation. Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *Transplantation*, strony 63(10):1380-6.
- Barnes, P. i Karin, M. (1997, Kwiecień 10). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, strony 336(15):1066-71.
- Barr, F. i Macrae, D. (2010, Marzec). Inhaled nitric oxide and related therapies. *Pediatr Crit Care Med*. 2010 Mar;11(2 Suppl):S30-6, strony 11(2 Suppl):S30-6.
- Barry, A., Chaney, M. i London, M. (2015, Kwiecień). Anesthetic management during cardiopulmonary bypass: a systematic review. *Anesth Analg*, strony 120(4):749-69.
- Belhaj, A. (2012, Grudzień 7). Actual knowledge of systemic inflammation reaction during cardiopulmonary bypass. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, strony 165-9.
- Benedetto, M., Romano, R., Baca, G., Sarridou, D., Fischer, A., Simon, A. i Marczin, N. (2015, Wrzesień 15). Inhaled nitric oxide in cardiac surgery: Evidence or tradition? *Nitric Oxide*, strony 49:67-79.
- Bestic, M. i Reed, M. (2005). The ontogeny of human kidney development: influence on neonatal diuretic therapy. *NeoReviews*, strony 6:e363-8.
- Bhatia, M. i Moochhala, S. (2004, Luty). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, strony 202(2):145-56.

- Bhatraju, P., Crawford, J., Hall, M. i Lang, J. J. (2015, Sierpień 31). Inhaled nitric oxide: Current clinical concepts. *Nitric Oxide*, strony 50:114-128.
- Bizzarro, M., Gross, I. i Barbosa, F. (2014, Lipiec). Inhaled nitric oxide for the postoperative management of pulmonary hypertension in infants and children with congenital heart disease. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Bloch, K., Ichinose, F., Roberts, J. J. i Zapol, W. (2007, Lipeć 15). Inhaled NO as a therapeutic agent. *Cardiovasc Res*, strony 75(2):339-48.
- Bønding Andreassen, J., Hvas, A. i Ravn, H. (2014, Kwiecień). Marked changes in platelet count and function following pediatric congenital heart surgery. *Paediatr Anaesth*, strony 24(4):386-92.
- Borówka, M., Stycuła, W., Kamycka, E., Madeja, Z., Zuba-Surma, E., Skalski, J. i Kołcz, J. (2013). Mobilization of stem cells into the peripheral blood in children with congenital heart disease. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*, strony 10 (4): 403-409.
- Bove, T., Calabrò, M., Landoni, G., Aletti, G., Marino, G., Crescenzi, G., . . . Zangrillo, A. (2004, Sierpień). The incidence and risk of acute renal failure after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, strony 18(4):442-5.
- Boyle, E. J., Pohlman, T., Johnson, M. i Verrier, E. (1997, Styczeń). Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg*, strony 63(1):277-84.
- Brix-Christensen, V. (2001). The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand.*, strony 45:671-679.
- Brix-Christensen, V., Petersen, T., Ravn, H., Hjortdal, V., Andersen, N. i Tønnesen, E. (2001, Kwiecień). Cardiopulmonary bypass elicits a pro- and anti-inflammatory cytokine response and impaired neutrophil chemotaxis in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand*, strony 45(4):407-13.
- Bronicki, R., Backer, C. i Baden, H. (2000). Dexamethasone reduces the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in children. *Ann Thorac Surg*, strony 69:1490-5.
- Chai, P., Nassar, R., Oakeley, A., Craig, D., Quick, G., Jagers, J., . . . Anderson, P. (2000, Luty 8). Soluble complement receptor-1 protects heart, lung, and cardiac myofilament function from cardiopulmonary bypass damage. *Circulation*, strony 101(5):541-6.
- Checchia, P., Backer, C., Bronicki, R., Baden, H., Crawford, S., Green, T. i Mavroudis, C. (2003, Czerwiec). Dexamethasone reduces postoperative troponin levels in children undergoing cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med*, strony 31(6):1742-5.
- Checchia, P., Bronicki, R., Muenzer, J., Dixon, D., Raithel, S., Gandhi, S. i Huddleston, C. (2013, Wrzesień). Nitric oxide delivery during cardiopulmonary bypass reduces postoperative morbidity in children--a randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 146(3):530-6.
- Chello, M., Mastroberto, P., Perticone, F., Celi, V. i Colonna, A. (1998, Marzec 15). Nitric oxide modulation of neutrophil-endothelium interaction: difference between arterial and venous coronary bypass grafts. *J Am Coll Cardiol*, strony 31(4):823-6.

- Chenoweth, D., Cooper, S., Hugli, T., Stewart, R., Blackstone, E. i Kirklin, J. (1981, Luty 26). Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med*, strony 304(9):497-50.
- Chesnokova, V. i Melmed, S. (2002, Maj). Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology*, strony 143(5):1571-4.
- Chew, M., Brandslund, I., Brix-Christensen, V., Ravn, H., Hjortdal, V., Pedersen, J., . . . Tønnesen, E. (2001, Maj). Tissue injury and the inflammatory response to pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a descriptive study. *Anesthesiology*, strony 94(5):745-53.
- Chowdhury, D. (2007, Styczeń 10). Pathophysiology of congenital heart diseases. *Ann Card Anaesth*, strony 19-26.
- Chugani, H. (1998). Biological basis of emotions: brain systems and brain development. *Pediatrics*, strony 102:1225-9.
- Colagrande, L., Formica, F., Porta, F., Brustia, M., Avalli, L., Sangalli, F., . . . Paolini, G. (2005, Listopad). L-arginine effects on myocardial stress in cardiac surgery: preliminary results. *Ital Heart J*, strony 6(11):904-10.
- Colagrande, L., Formica, F., Porta, F., Martino, A., Sangalli, F., Avalli, L. i Paolini, G. (2006, Kwiecień). Reduced cytokines release and myocardial damage in coronary artery bypass patients due to L-arginine cardioplegia supplementation. *Ann Thorac Surg*, strony 81(4):1256-61.
- Comini, L., Bachetti, T., Agnoletti, L., Gaia, G., Curello, S., Milanese, B., . . . Ferrari, R. (1990, Październik). Induction of functional inducible nitric oxide synthase in monocytes of patients with congestive heart failure. Link with tumour necrosis factor-alpha. *Eur Heart J*, strony 20(20):1503-13.
- Cooper, W., Duarte, I., Thourani, V., Nakamura, M., Wang, N., Brown, W., . . . Guyton, R. (2000, Marzec). Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. *Ann Thorac Surg*, strony 69(3):696-702.
- Dieleman, J., van Paassen, J., van Dijk, D., Arbous, M., Kalkman, C., Vandenbroucke, J., . . . Dekkers, O. (2011, Maj 11). Prophylactic corticosteroids for cardiopulmonary bypass in adults. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Dinarello, C. (2000, Sierpień). Proinflammatory cytokines. *Chest*, strony 118(2):503-8.
- Dobson, G., Faggian, G., Onorati, F. i Vinten-Johansen, J. (2013, Sierpień 28). Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era? *Front Physiol*, str. 4:228.
- Downing, S. i Edmunds, L. (1992, Grudzień). Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, strony 54(6):1236-43.
- Dreher, M., Glatz, A., Kennedy, A., Rosenthal, T. i Gaynor, J. (2015, Wrzesień). A Single-Center Analysis of Methylprednisolone Use during Pediatric Cardiopulmonary Bypass. *J Extra Corpor Technol*, strony 47(3):155-9.

- Durandy, Y. (2014, Styczeń). Minimizing systemic inflammation during cardiopulmonary bypass in the pediatric population. *Artif Organs*, strony 38(1):11-8.
- Duranski, M., Greer, J., Dejam, A., Jaganmohan, S., Hogg, N., Langston, W., . . . Lefer, D. (2005, Maj). Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*, strony 115(5):1232-40.
- Duval, E., Kavelaars, A., Veenhuizen, L., van Vught, A., van de Wal, H. i Heijnen, C. (1999, Maj). Pro- and anti-inflammatory cytokine patterns during and after cardiac surgery in young children. *Eur J Pediatr*, strony 158(5):387-93.
- Edmunds, L., Ellison, N. i Colman, R. (1982). Platelet function during cardiac operations: comparison of membrane and bubble oxygenators. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 83:805-12.
- Ferrari, R. i Andrade, C. (2015, Styczeń 20). Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Finkel, M., Oddis, C., Jacob, T., Watkins, S., Hattler, B. i Simmons, R. (1992, Czerwiec 17). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*, strony 257(5068):387-9.
- Finn, A., Naik, S., Klein, N., Levinsky, R., Strobel, S. i Elliott, M. (1993, Luty). Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 105(2):234-41.
- Fitch, J., Rollins, S., Matis, L., Alford, B., Aranki, S., Collard, C., . . . Shernan, S. (1999, Grudzień 21-28). Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation*, strony 100(25):2499-506.
- Gaynor, J. (1998). Use of modified ultrafiltration after repair of congenital heart defects. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, strony 1:81-90.
- Gessler, P., Hohl, V., Carrel, T., Pfenninger, J., Schmid, E., Baenziger, O. i Prêtre, R. (2005, Wrzesień-Październik). Administration of steroids in pediatric cardiac surgery: impact on clinical outcome and systemic inflammatory response. *Pediatr Cardiol*, strony 26(5):595-600.
- Gianetti, J., Del Sarto, P., Bevilacqua, S., Vassalle, C., De Filippis, R., Kacila, M., . . . Biagini, A. (2004, Styczeń). Supplemental nitric oxide and its effect on myocardial injury and function in patients undergoing cardiac surgery with extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 127(1):44-50.
- Göl, M., Nisanoğlu, V., Işcan, Z., Balci, M., Kandemir, O. i Taşdemir, O. (2002, Grudzień). Inhibition of systemic inflammatory response with sodium nitroprusside in open heart surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, strony 43(6):803-9.
- Goldstein, B., Giroir, B. i Randolph, A. (2005, Styczeń). International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*, strony 6(1):2-8.

- Granger, D. i Kubes, P. (1996). Nitric oxide as antiinflammatory agent. *Methods Enzymol.*, strony 269:434-42.
- Greeley, W., Bushman, G., Kong, D., Oldham, H. i Peterson, M. (1988, Maj). Effects of cardiopulmonary bypass on eicosanoid metabolism during pediatric cardiovascular surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 95(5):842-9.
- Gries, A., Bode, C., Peter, K., Herr, A., Böhrer, H., Motsch, J. i Martin, E. (1998, Kwiecień 21). Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation*, strony 97(15):1481-7.
- Gunaydin, S., Farsak, B., Kocakulak, M., Sari, T., Yorgancioglu, C. i Zorlutuna, Y. (2002, Wrzesień). Clinical performance and biocompatibility of poly(2-methoxyethylacrylate)-coated extracorporeal circuits. *Ann Thorac Surg*, strony 74(3):819-24.
- Güvener, M., Korun, O. i Demirtürk, O. (2015, Styczeń). Risk factors for systemic inflammatory response after congenital cardiac surgery. *J Card Surg*, strony 30(1):92-6.
- Hall, R. (2002, Luty 16). Cardiopulmonary bypass and the systemic inflammatory response: effects on drug action. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, strony 83-98.
- Hall, R., Smith, M. i Rocker, G. (1997, Październik). The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg*, strony 85(4):766-82.
- Hansen, P., Svendsen, J., Høyer, S., Kharazmi, A., Bendtzen, K. i Haunsø, S. (1994, Styczeń). Tumor necrosis factor-alpha increases myocardial microvascular transport in vivo. *Am J Physiol*, strony 266(1 Pt 2):H60-7.
- Hataishi, R., Rodrigues, A., Neilan, T., Morgan, J., Buys, E., Shiva, S., . . . Scherrer-Crosbie, M. (2006, Czerwiec). Inhaled nitric oxide decreases infarction size and improves left ventricular function in a murinemodel of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, strony 291(1):H379-84.
- Heinrich, P., Castell, J. i Andus, T. (1990, Luty 1). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, strony 265(3):621-36.
- Heuertz, R. i Webster, R. (1997, Grudzień). Role of C-reactive protein in acute lung injury. *Mol Med Today*, strony 3(12):539-45.
- Hirsch, R., Dent, C., Wood, M., Huddleston, C., Mendeloff, E., Balzer, D., . . . Canter, C. (1998, Maj). Patterns and potential value of cardiac troponin I elevations after pediatric cardiac operations. *Ann Thorac Surg*, strony 65(5):1394-9.
- Hövels-Gürich, H., Schumacher, K., Vazquez-Jimenez, J., Qing, M., Hüffmeier, U., Buding, B., . . . Seghaye, M. (2002, Luty). Cytokine balance in infants undergoing cardiac operation. *Ann Thorac Surg*, strony 73(2):601-8.
- Hövels-Gürich, H., Vazquez-Jimenez, J., Silvestri, A., Schumacher, K., Minkenberg, R., Duchateau, J., . . . Seghaye, M. (2002, Październik). Production of proinflammatory cytokines and myocardial dysfunction after arterial switch operation in neonates with transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 124(4):811-20.

- Jacobs, J., Pasquali, S., Jeffries, H., Jones, S., Cooper, D. i Vincent, R. (2011). Outcomes Analysis and Quality Improvement for the Treatment of Patients With Pediatric and Congenital Cardiac Disease. *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery*, strony 2:620-633.
- Jacobson, J. (2002, Czerwiec). Nitric oxide: platelet protectant properties during cardiopulmonary bypass/ECMO. *J Extra Corpor Technol*, strony 34(2):144-7.
- Jaggers, J. i Lawson, J. (2006, Czerwiec). Coagulopathy and inflammation in neonatal heart surgery: mechanisms and strategies. *Ann Thorac Surg*, strony 81(6):S2360-6.
- Jaggers, J. i Lawson, J. (2006, Czerwiec). Effect of cardiopulmonary bypass and aortic clamping on functional residual capacity and ventilation distribution in children. *Ann Thorac Surg*, strony 81(6):S2360-6.
- Jansen, N., van Oeveren, W., Gu, Y., van Vliet, M., Eijssman, L. i Wildevuur, C. (1992, Październik). Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, strony 54(4):744-7.
- Jensen, E., Bengtsson, A., Berggren, H., Ekroth, R. i Andréasson, S. (2001, Lipiec). Clinical variables and pro-inflammatory activation in paediatric heart surgery. *Scand Cardiovasc J*, strony 35(3):201-6.
- Johnston, G. i Webster, N. (2009, Kwiecień). Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus. *Br J Anaesth*, strony 102(4):453-62.
- Jones, S. i Bolli, R. (2006, Styczeń). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, strony 40(1):16-23.
- Kalfin, R., Engelman, R., Rousou, J., Flack, J., Deaton, D., Kreutzer, D. i Das, D. (1993, Listopad). Induction of interleukin-8 expression during cardiopulmonary bypass. *Circulation*, strony 88(5 Pt 2):II401-6.
- Keski-Nisula, J., Pesonen, E., Olkkola, K., Peltola, K., Neuvonen, P., Tuominen, N., . . . Suominen, P. (2013). Methylprednisolone in Neonatal Cardiac Surgery: Reduced Inflammation Without Improved Clinical Outcome. *Ann. Thorac. Surg*, strony 95:2126-2132.
- Kirklin, J., Chenoweth, D., Naftel, D., Blackstone, E., Kirklin, J., Bitran, D., . . . Samuelson, P. (1986, Luty). Effects of protamine administration after cardiopulmonary bypass on complement, blood elements, and the hemodynamic state. *Ann Thorac Surg*, strony 41(2):193-9.
- Kirklin, J., Westaby, S., Blackstone, E., Kirklin, J., Chenoweth, D. i Pacifico, A. (1983, Grudzień). Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 86(6):845-57.
- Komai, H., Naito, Y. i Fujiwara, K. (2002, Grudzień). Plasma hepatocyte growth factor levels after open heart surgery for congenital heart disease. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, strony 43(6):799-802.

- Kubes, P., Ibbotson, G., Russell, J., Wallace, J. i Granger, D. (1990, Sierpień). Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol*, strony 259(2 Pt 1):G300-5.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. i Palkovits, M. (2009, Kwiecień). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, strony 89(2):535-606.
- Landis, R., Brown, J., Fitzgerald, D., Likosky, D., Shore-Lesserson, L., Baker, R. i Hammon, J. (2014, Sierpień). Attenuating the Systemic Inflammatory Response to Adult Cardiopulmonary Bypass: A Critical Review of the Evidence Base. *J Extra Corpor Technol*, strony 46(3):197-211.
- Lappegård, K., Riesenfeld, J., Brekke, O., Bergseth, G., Lambris, J. i Mollnes, T. (2005, Marzec). Differential effect of heparin coating and complement inhibition on artificial surface-induced eicosanoid production. *Ann Thorac Surg*, strony 79(3):917-23.
- Larmann, J. i Theilmeier, G. (2004, Wrzesień). Inflammatory response to cardiac surgery: cardiopulmonary bypass versus non-cardiopulmonary bypass surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, strony 18(3):425-38.
- Lefer, A. i Lefer, D. (1996, Październik). The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*, strony 32(4):743-51.
- Levy, J. i Tanaka, K. (2003, Luty). Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, strony 75(2):S715-20.
- Lodge, A., Chai, P. i Dagget, C. (1999). Methylprednisolone reduces the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in neonatal piglets: timing of dose is important. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 117:515-22.
- Lundberg, J., Weitzberg, E. i Gladwin, M. (2008, Luty). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, strony 7(2):156-67.
- Madhok, A., Ojamaa, K., Haridas, V., Parnell, V., Pahwa, S. i Chowdhury, D. (2006, Lipeć-Sierpień). Cytokine response in children undergoing surgery for congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*, strony 27(4):408-13.
- Mahle, W. (2001, Październik). Neurologic and cognitive outcomes in children with congenital heart disease. *Curr Opin Pediatr*, strony 13(5):482-6.
- Mastropietro, C., Barrett, R., Davalos, M., Zidan, M., Valentine, K., Delius, R. i Walters, H. (2013, Czerwiec). Cumulative Corticosteroid Exposure and Infection Risk After Complex Pediatric Cardiac Surgery Circulation. *Ann Thorac Surg*, strony 95(6):2133-9.
- McBride, W., Armstrong, M., Gilliland, H. i McMurray, T. (1996, Wrzesień). The balance of pro and anti-inflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) at paediatric cardiac surgery. *Cytokine*, strony 8(9):724-9.
- McMahon, T., Moon, R., Luschinger, B., Carraway, M., Stone, A., Stolp, B., . . . Stamler, J. (2002, Czerwiec). Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med*, strony 8(7):711-7.

- Meldrum, D. i Donnahoo, K. (1999, Sierpień). Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardiorenal syndrome. *J Surg Res*, strony 85(2):185-99.
- Miller, O., Tang, S., Keech, A., Pigott, N., Beller, E. i Celermajer, D. (2000, Październik 28). Inhaled nitric oxide and prevention of pulmonary hypertension after congenital heart surgery: a randomised double-blind study. *Lancet*, strony 356(9240):1464-9.
- Mojcik, C. i Levy, J. (2001). Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, strony 71:745-54.
- Morariu, A., Loef, B., Aarts, L., Rietman, G., Rakhorst, G., van Oeveren, W. i Epema, A. (2005, Październik). Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. *Chest*, strony 128(4):2677-87.
- Ng, C., Arifi, A., Wan, S., Ho, A., Wan, I., Wong, E. i Yim, A. (2008, Styczeń). Ventilation during cardiopulmonary bypass: impact on cytokine response and cardiopulmonary function. *Ann Thorac Surg*, strony 85(1):154-62.
- Ng, C., Wan, S., Yim, A. i Arifi, A. (2002, Kwiecień). Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. *Chest*, strony 121(4):1269-77.
- Nijsten, M., H. C., Helle, M., ten Duis, H., Klasen, H. i Aarden, L. (1991, Styczeń). Interleukin-6 and its relation to the humoral immune response and clinical parameters in burned patients. *Surgery*, strony 109(6):761-7.
- Oka, Y., Murata, A., Nishijima, J., Yasuda, T., Hiraoka, N., Ohmachi, Y., . . . Tanaka, N. (1992, Czerwiec). Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications. *Cytokine*, strony 4(4):298-304.
- Pabla, R. i Curtis, M. (1996, Październik). Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *J Mol Cell Cardiol*, strony 28(10):2111-21.
- Paparella, D., Yau, T. i Young, E. (2002, Luty 21). Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.*, strony 232-44.
- Pasquali, S., Hall, M., Li, J., Peterson, E., Jagers, J., Lodge, A., . . . Shah, D. (2010). Corticosteroids and outcome in children undergoing congenital heart surgery: analysis of the Pediatric Health Information Systems database. *Circulation*, strony 122(21):2123-30.
- Putensen, C. i Wrigge, H. (2000, Październik). Ventilator-associated systemic inflammation in acute lung injury. *Intensive Care Med*, strony 26(10):1411-3.
- Qing, M., Schumacher, K., Heise, R., Wöltje, M., Vazquez-Jimenez, J., Richter, T., . . . Seghaye, M. (2003, Czerwiec 18). Intramyocardial synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines in infants with congenital cardiac defects. *J Am Coll Cardiol*, strony 41(12):2266-74.
- Qing, M., Vazquez-Jimenez, J., Klosterhalfen, B., Sigler, M., Schumacher, K., Duchateau, J., . . . Seghaye, M. (2001, Maj). Influence of temperature during cardiopulmonary bypass on

- leukocyte activation, cytokine balance, and post-operative organ damage. *Shock*, strony 15(5):372-7.
- Raja, S. i Berg, G. (2007, Wrzesień). Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on systemic inflammation: current best available evidence. *J Card Surg*, strony 22(5):445-55.
- Raja, S. i Dreyfus, G. (2005, Grudzień). Modulation of systemic inflammatory response after cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, strony 382-95.
- Rassaf, T., Preik, M., Kleinbongard, P., Lauer, T., Heiss, C., Strauer, B., . . . Kelm, M. (2002, Maj). Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *J Clin Invest*, strony 109(9):1241-8.
- Rassaf, T., Preik, M., Kleinbongard, P., Lauer, T., Heiss, C., Strauer, B., . . . Kelm, M. (2002, Maj). Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest*, strony 109(9):1241-8.
- Rennick, D., Berg, D. i Holland, G. (1992). Interleukin 10: an overview. *Prog Growth Factor Res*, strony 4(3):207-27.
- Schechter, A. i Gladwin, M. (2003, Kwiecień 10). Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med*, strony 348(15):1483-5.
- Schulz, R., Kelm, M. i Heusch, G. (2004, Luty 15). Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, strony 61(3):402-13.
- Seghaye, M. (2003, Czerwiec). The clinical implications of the systemic inflammatory reaction related to cardiac operations in children. *Cardiol Young*, strony 13(3):228-39.
- Seghaye, M., Duchateau, J., Bruniaux, J., Demontoux, S., Bosson, C., Serraf, A., . . . Planche, C. (1996, Marzec). Interleukin-10 release related to cardiopulmonary bypass in infants undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 111(3):545-53.
- Seghaye, M., Duchateau, J., Grabitz, R., Faymonville, M., Messmer, B., Buro-Rathsmann, K. i von Bernuth, G. (1993, Grudzień). Complement activation during cardiopulmonary bypass in infants and children. Relation to postoperative multiple system organ failure. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 106(6):978-87.
- Seghaye, M., Duchateau, J., Grabitz, R., Wolff, T., Marcus, C., Engelhardt, W., . . . von Bernuth, G. (1996, Kwiecień). Effect of sodium nitroprusside on complement activation induced by cardiopulmonary bypass: a clinical and experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 111(4):882-92.
- Seitz, M., Loetscher, P., Dewald, B., Towbin, H., Gallati, H. i Baggiolini, M. (1995, Kwiecień). Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol*, strony 25(4):1129-32.
- Serraf, A., Robotin, M., Bonnet, N., Détruit, H., Baudet, B., Mazmanian, M., . . . Planché, C. (1997, Grudzień). Alteration of the neonatal pulmonary physiology after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 114(6):1061-9.
- Serrano, C. J., Souza, J., Lopes, N., Fernandes, J., Nicolau, J., Blotta, M., . . . Hueb, W. (2010, Styczeń). Reduced expression of systemic proinflammatory and myocardial biomarkers after

- off-pump versus on-pump coronary artery bypass surgery: a prospective randomized study. *J Crit Care*, strony 25(2):305-12.
- Simon, J., Duglan, D., Casadei, B. i Carnicer, R. (2014, Sierpień). Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*, strony 73:80-91.
- Siriussawakul, A., Zaky, A. i Lang, J. (2010, Grudzień 28). Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*, strony 16(48):6079-86.
- Soares, L., Ribas, D., Spring, R., Silva, J. i Miyague, N. (2010, Styczeń). Clinical profile of systemic inflammatory response after pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Arq Bras Cardiol*, strony 94(1):127-33.
- Sommer, R., Hijazi, Z. i Rhodes, J. (2008, Marzec 11). Pathophysiology of congenital heart disease in the adult: part III: Complex congenital heart disease. *Circulation*, strony 117(10):1340-50.
- Stapleton, R., Wang, B., Hudson, L., Rubenfeld, G., Caldwell, I. E. i Steinberg, K. (2005, Sierpień). Causes and timing of death in patients with ARDS. *Chest*, strony 128(2):525-32.
- Steinberg, J., Kapelanski, D., Olson, J. i Weiler, J. (1993, Grudzień). Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 106(6):1008-16.
- Studel, W., Hurford, W. i Zapol, W. (1999, Październik). Inhaled nitric oxide: basic biology and clinical applications. *Anesthesiology*, strony 91(4):1090-121.
- Suleiman, M., Zacharowski, K. i Angelini, G. (2008, Styczeń). Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol*, strony 153(1):21-33.
- Takabayashi, T., Vannier, E., Clark, B., Margolis, N., Dinarello, C., Burke, J. i Gelfand, J. (1996, Maj 1). A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J Immunol*, strony 156(9):3455-60.
- Taniguchi, T., Koido, Y., Aiboshi, J., Yamashita, T., Suzaki, S. i Kurokawa, A. (1999, Lipiec). Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, strony 27(7):1262-4.
- te Velthuis, H., Jansen, P., Oudemans-van Straaten, H., van Kamp, G., Sturk, A., Eijssman, L. i Wildevuur, C. (1996, Marzec). Circulating endothelin in cardiac operations: influence of blood pressure and endotoxin. *Ann Thorac Surg*, strony 61(3):904-8.
- Tennenberg, S., Clardy, C., Bailey, W. i Solomkin, J. (1990, Październik). Complement activation and lung permeability during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, strony 50(4):597-601.
- Tilg, H., Dinarello, C. i Mier, J. (1997, Wrzesień). IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today*, strony 18(9):428-32.
- Trapnell, B. i Whitsett, J. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol*, strony 64:775-802.

- Trittenwein, G., Nardi, A., Pansi, H., Golej, J., Burda, G., Hermon, M., . . . Wollenek, G. (2003, Sierpień). Early postoperative prediction of cerebral damage after pediatric cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*, strony 76(2):576-80.
- Tsao, P., Aoki, N., Lefer, D., Johnson, G. i Lefer, A. (1990, Październik). Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation*, strony 82(4):1402-12.
- Uchiyama, T., Otani, H., Okada, T., Ninomiya, H., Kido, M., Imamura, H., . . . Kobayashi, Y. (2002, Sierpień). Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, strony 34(8):1049-61.
- Ungureanu-Longrois, D., Balligand, J., Kelly, R. i Smith, T. (1995). Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Moll Cell Cardiol*, strony 27:155-67.
- Valen, G., Yan, Z. i Hansson, G. (2001, Sierpień). Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol*, strony 38(2):307-14.
- vanPelt, L., Huisman, M., Weening, R., von dem Borne, A., Roos, D. i van Oers, R. (1996, Czerwiec 15). A single dose of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces systemic interleukin-8 release and neutrophil activation in healthy volunteers. *Blood*, strony 87(12):5305-13.
- Vazquez-Jimenez, J., Qing, M., Hermanns, B., Klosterhalfen, B., Wöltje, M., Chakupurakal, R., . . . Seghaye, M. (2001, Październik). Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass reduces myocardial cell damage and myocardial cell death related to cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol*, strony 38(4):1216-23.
- Vermeulen Windsant, I., Hanssen, S., Buurman, W. i Jacobs, M. (2011, Czerwiec). Cardiovascular surgery and organ damage: time to reconsider the role of hemolysis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 142(1):1-11.
- Vidal Melo, M. (2004). Clinical respiratory physiology of the neonate and infant with congenital heart disease. *Int Anesthesiol Clin*, strony Fall;42(4):29-43.
- Vlasselaers, D., Mesotten, D., Langouche, L., Vanhorebeek, I., Van den Heuvel, I., Milants, I., . . . Van den Berghe, G. (2010, Lipiec). Tight glycemic control protects the myocardium and reduces inflammation in neonatal heart surgery. *Ann Thorac Surg*, strony 90(1):22-9.
- von Ungern-Sternberg, B., Petak, F., Saudan, S., Pellegrini, M., Erb, T. i Habre, W. (2007, Listopad). Effect of cardiopulmonary bypass and aortic clamping on functional residual capacity and ventilation distribution in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*, strony 134(5):1193-8.
- Wan, S., LeClerc, J. i Vincent, J. (1997). Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest*, strony 112:676-692.
- Warren, O., Smith, A., Alexiou, C., Rogers, P., Jawad, N., Vincent, C., . . . Athanasiou, T. (2009, Kwiecień). The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, strony 23(2):223-31.

- Wernovsky, G., Shillingford, A. i Gaynor, J. (2005, Marzec). Central nervous system outcomes in children with complex congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol*, strony 20(2):94-9.
- Wernovsky, G., Wypij, D., Jonas, R., Mayer, J., Hanley, F., Hickey, P., . . . Wessel, D. (1995, Październik 15). Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Circulation*, strony 92(8):2226-35.
- Wong, S., Fukuchi, M., Melnyk, P., Rodger, I. i Giaid, A. (1998, Lipiec 14). Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation*, strony 98(2):100-3.
- Young, R. (2014, Czerwiec). Prevention of lung injury in cardiac surgery: a review. *J Extra Corpor Technol*, strony 46(2):130-41.
- Zhang, P., Kirk, J., Ji, W., dos Remedios, C., Kass, D., Van Eyk, J. i Murphy, A. (2012, Październik 9). Multiple reaction monitoring to identify site-specific troponin I phosphorylated residues in the failing human heart. *Circulation*, strony 126(15):1828-37.