Imunomodulacijski utjecaj opće i regionalne anestezije na serumsku razinu proupalnih i protuupalnih citokina

Žura, Marijana

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:575221

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Središnja medicinska knjižnica

Žura, Marijana (2012) ***Imunomodulacijski utjecaj opće i regionalne anestezije na serumsku razinu proupalnih i protuupalnih citokina [Immunomodulation effect of spinal and general anaesthesia on serum concentration of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1680

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Marijana Žura

Imunomodulacijski utjecaj opće i regionalne anestezije na serumsku razinu proupalnih i protuupalnih citokina

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intezivno liječenje, Odjel za liječenje uroloških pacijenata i Klinici za urologiju KBC-a Zagreb, a uzorci krvi su se obradili u Laboratoriju za imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Katarina Šakić

Popis oznaka i kratica:

APC - stanice koje limfocitima prezentiraju antigen
b FGF – bazični fibroblasni čimbenik rasta
CD molekule - prema engl. clusters of differentiation
EGF - endotelijalni čimbenik rasta
FGF - fibroblastni čimbenik rasta
GM – CSF – čimbenik poticanja granulocitno-makrofagnih kolonija
ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula -1
IFN - interferon
IL - interleukin
LAK - limfokinima aktivirane stanice
MAMP – „molekularni predlošci strukture“ mikroorganizama
MCP - monocitni kemoatraktički protein
MHC-1 - (prema engl. major histocompatibility complex) geni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti
MIF-1β – čimbenik inhibicije migracije makrofaga
MIP - makrofag upalni protein
NADPH - prema engl. „nicotinamide adenine dinucleotide phosphate“
NK – prirodnoubilačke stanice
PAMP - „molekularni predlošci strukture“ mikroorganizama
PGE – prostaglandin
PRR – receptori za prepoznavanje općih struktura
SIRS - sustavni upalni odgovor
Th - (prema engl. T-helper) pomagački limfocit T
TNF - čimbenik tumorske nekroze
TGF - transformirajući čimbenik rasta
VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela

Sadržaj

1 Uvod ... 1

1.1 Imunosni sustav ... 1
1.1.1 Urođena (nespecifična) imunost ... 1
1.1.2 Stečena (specifična) imunost ... 1
1.1.3 Limfociti T ... 2

1.2 Operativni zahvat i imunosni sustav ... 4
1.2.1 Hipotenzija ... 4
1.2.2 Hiperglikemija ... 4
1.2.3 Transfuzija krvi ... 4
1.2.4 Kirurški stres ... 4
1.2.5 Odgovor akutne faze ... 5
1.2.6 Citokini i imunosupresija nakon operativnog zahvata ... 6

1.3 Anestetici i imunosni sustav ... 6
1.3.1 Opioidi ... 7
1.3.2 Propofol ... 7
1.3.3 Inhalacijski anestetici ... 8
1.3.4 Lokalni anestetici ... 9

1.4 Anestezija i imunosni sustav ... 10
1.4.1 Usporedba utjecaja regionalne i opće anestezije na imunosni sustav ... 10
1.4.2 Usporedba utjecaja intravenske i inhalacijske anestezije na imunosni sustav ... 10

2 Citokini i citokinska mreža ... 12

2.1 Opća svojstva citokina ... 12

2.2 Sinteza, lučenje i mehanizam djelovanja citokina ... 12
2.2.1 Sinteza i lučenje citokina ... 12
2.2.2 Mehanizam djelovanja ... 13
2.2.3 Biološki učinci ... 13

2.3 Citokini ... 13
2.3.1 Proupalni citokini ... 13
2.3.2 Protuupalni citokini ... 17
2.3.3 Citokini koje luče pomagački limfociti T ... 19

3 Hipoteza ... 21

4 Cilj istraživanja ... 22

5 Plan istraživanja ... 23

5.1 Ispitanici ... 23

5.2 Način određivanja razine citokina u perifernoj krvi ... 24

5.3 Statistička analiza podataka ... 25

6 Rezultati ... 26

6.1 Demografske karakteristike i trajanje operacije u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji ... 26

6.2 Preoperativne i postoperativne vrijednosti laboratorijskih parametara u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji ... 27

6.3 Preoperativne i postoperativne vrijednosti laboratorijskih parametara u pacijenata u

općoj anesteziji 28
6.4 Preoperativne i postoperativne vrijednosti laboratorijskih parametara u pacijenata u spinalnoj anesteziji 31
6.5 Serumske koncentracije mjerenih citokina u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 34
6.6 Postoperativne koncentracije serumskih citokina u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 37
6.6.1 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-2 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 37
6.6.2 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-4 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 37
6.6.3 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-6 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 38
6.6.4 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-8 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 39
6.6.5 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-10 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 39
6.6.6 Usporedba postoperativnih koncentracija VEGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 40
6.6.7 Usporedba postoperativnih koncentracija IFN-γ u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 41
6.6.8 Usporedba postoperativnih koncentracija TNF-α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 41
6.6.9 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-1α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 42
6.6.10 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-1β u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 42
6.6.11 Usporedba postoperativnih koncentracija MCP-1 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 43
6.6.12 Usporedba postoperativnih koncentracija EGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji 43
7 Diskusija 44
8 Zaključak 47
9 Sažetak 48
10 Summary 49
11 Literatura 50
12 Životopis 58

1 UVOD

1.1 Imunosni sustav

Imunosni sustav u ljudi je izuzetno kompleksan i prilagodljiv sustav. Sposoban je prepoznati mnoštvo antigena i ukloniti raznolike strane stanice i molekule. Uloga imunoreakcije u organizmu jest obrana od infekcije, obrana od tumora i održavanje genomske i antigenomske homeostaze (1). Imunost može biti nespecifična (urođena) i specifična (stečena) (2).

Nespecifična (urođena, prirođena) otpornost na brojne antigene djelotvorna je u organizmu i prije dodira s njima. Ona je usmjerena protiv „molekularnih predložaka mikroorganizma“ (PAMP – pathogen-associated molecular pathern) i čini prvu crtu obrane te od rođenja osigurava vrlo dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama. Ako mikroorganizam, odnosno antigen prodre kroz tu zaštitu, aktivira se specifična imunost. Specifična (stečena, adaptivna) imunost ne djeluje neovisno o nespecifičnoj imunosti, nego se, naprotiv, na nju nadograđuje. Obje su imunosti toliko integrirane da ih je kadšto gotovo nemoguće promatrati odijeljeno. Zajedničkim djelovanjem one se nadopunjuju i pojačavaju, čime postižu mnogo učinkovitiju ukupnu obranu organizma.

1.1.1 Urođena (nespecifična) imunost

Kada strana tvar uđe u tijelo, neutrofili i makrofagi odmah je pokušaju ukloniti putem upalne reakcije. U borbi protiv stranih molekula neke stanice izlože strani antigen na staničnoj površini, te postanu stanice koje limfocitima prezentiraju antigen (APC – antigen presenting cells). One su uključene u početne faze stečene imunosti, te stvaraju i izlučuju citokine. Također stvaraju proteolitičke enzime i slobodne radikale.

U spajanju sa drugim stanicama imunosnog sustava, kao što su stanice NK i pomagački T limfociti, aktivacija makrofaga je izrazito ovisna o stvaranju citokina. Sustav komplementa ima važnu ulogu u nespecifičnom imunosnom odgovoru. Komplementski proteini su sintetizirani u jetri, aktivirani pojačavaju fagocitozu i izravno liziraju stanice. Stanice NK i limfokinima aktivirane stanice (LAK stanice) čine stanični mehanizam urođene imunosti.

Geni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. major histocompatibility complex) su skupina polimorfnih gena čiji su proizvodi (nazvani MHC- kodirani proteini ili MHC antigeni) izloženi na površini različitih stanica. Stoga NK stanični odgovor, djelujući na neovisan-MHC način, nije antigen ovisan. Stanice NK također oslobađaju TNF i interferone. Prilikom odgovora na IL-2 i IL-12, stanice NK su potentan izvor IFN-γ (interferon-γ) koji aktivira makrofage osiguravajući stanični odgovor. LAK stanice su formirane kada su stanice NK izložene visokoj koncentraciji IL-2 ili IFN-α (interferon –α). Oni napadaju širi raspon stanica od stanica NK, opet na nespecifičan način. Stanice NK djeluju u početnom odgovoru na strani antigen, pokušavajući ukloniti zaraženu stanicu prije pojave specifičnih citotoksičnih limfocita. Ako je podražaj dovoljno veliki, kao u reakcija presatka protiv primaoca (GVHD), stanice NK se diferenciraju u LAK stanice koje obično sa drugim aktiviranim stanicama oslobađaju citokine koji održavaju imunosni odgovor.

1.1.2 Stečena (specifična) imunost

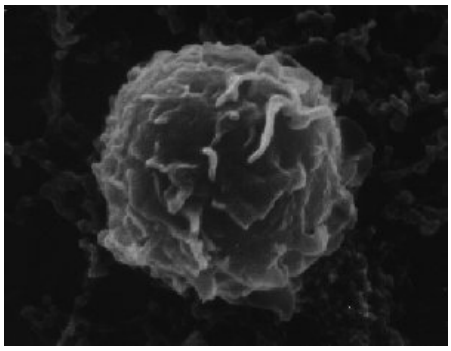
Specifični imunosni odgovor javlja se nakon izlaganja antigenima, kroz lanac događaja koji rezultiraju visoko specifičnim antitijelima (humoralna imunost) ili stvaranjem specifičnih limfocita (stanična imunost).

Humoralna imunost jest imunost posredovana protutijelima. Protutijela se stvaraju nakon ulaska antigena u organizam, bilo slobodno topljivog bilo vezanoga za površinu neke stanice. Završni oblici diferencijacije limfocita B, tj. kratkovjeke plazma-stanice, sintetiziraju te glikoproteine i izlučuju ih u izvanstaničnu tekućinu, u plazmu i u sekrete. One su izrazito

bifunkcijske molekule koje djeluju samostalno. Jedan dio molekule obavlja funkciju prepoznavanja, tj. veže se nekovalentno i reverzibilno sa specifičnim antigenom, a drugi dio molekule posreduje biološke funkcije za razaranje i uklanjanje antigena. Humoralna se imunost može prenijeti u neimunu jedinku prijenosom specifičnog antiseruma.

Stanična imunost jest imunost posredovana stanicama, pretežito limfocitima T i makrofagima. Ona se obično razvija protiv nekih unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica transplantata ili tumora. Osnovni izvršni mehanizam sastoji se u izravnom citotoksičnom izvanstaničnom djelovanju limfocita T ili učinku njihovih humoralnih produkata (citokina) koji na najrazličitije načine pridonose uništenju ciljnih stanica. Uz limfocite T, koji su nosioci stanične imunosti, izvršne stanice su makrofagi, te stanice koje posredovanjem specifičnih antitijela zadobiju sposobnost lize ciljnih stanica. Prepoznavanje cilja ne uključuje samo tuđe antigenske determinante nego i istodobno prepoznavanje vlastitih antigena tkivne podudarnosti (skupina I. MHC). Stanična se imunost može prenijeti iz imune u neimunu jedinku samo limfocitima T, a ne serumom.

1.1.3 Limfociti T

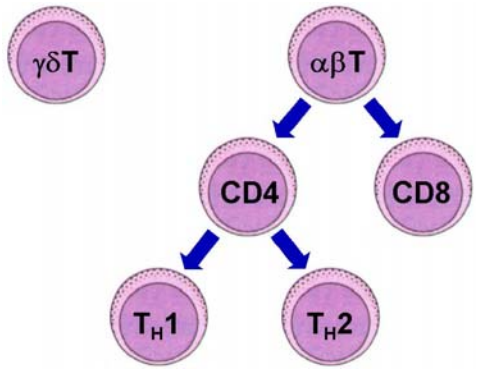


Slika 1. Limfocit T

Postoje tri funkcionalna tipa limfocita T : pomagački (Th), citotoksični (Tc) i regulacijski (Treg). Razlikuju se na temelju izražavanja različitih membranskih biljega. Ti membranski proteini spadaju u CD molekule (prema engl. „ clusters of differentiation „). Detektiraju se na protočnom citometru nakon obilježavanja sa specifičnim monoklonalnim antitijelima. Pomagački limfociti T izražavaju membranski biljeg CD4, a citotoksični limfociti T biljeg CD8. Uz nedvojbenu ulogu CD antigena u identificiranju, izolaciji i analizi specifičnosti različitih limfocitnih subpopulacija, CD antigeni su također važni u posredovanju staničnо-stanične interakcije, prianjanju i provođenju signala dovodeći do limfocitne aktivacije.

Pomagački limfociti T (CD4+) nakon fagocitoze (egzogeni antigeni) razgrađuju antigen na fragmente (epitope) koje izražavaju na membrani u sklopu MHC klase II. Nasuprot tome, peptidi nastali od proteina sintetiziranih u stanici (endogeni antigeni), izraženi na staničnoj membrani, općenito su vezani za MHC klase I. Njih prepoznaju citotoksični limfociti T (CD8+). Stoga, predočavanje antigena (endogen ili egzogen) određuje tip imunosne reakcije.

Podskupina limfocita T koja može inhibirati imunosni odgovor nazvana je regulacijski limfociti T .



Slika 2. Diferenciranje limfocita T

Pomagački limfociti T

Pomagački limfociti T (Th, prema engl. T-helper) su središnje stanice imunosnog odgovora, jer usmjeruju imunosnu reakciju u skladu s vrstom antigena. Nakon aktivacije, pomagački limfociti T proliferiraju i razvijaju se u jednu od funkcijskih subpopulacija - Th1, Th2 ili Th17. Niti jedna od tih subpopulacija ne izražava specifični membranski biljeg, nego se prepoznaju prema izražaju specifičnoga unutarstaničnog transkripcijskog faktora i vrsti citokina koje luče nakon aktivacije. Aktivirani limfociti Th stvaraju citokine, koji povećavaju broj citokinskih receptora na staničnim membranama potičući daljnji razvoj tih limfocita T. Citokini usmjeravaju razvoj aktivnosti pomagačkih limfocita T, u smjeru Th1, Th2 i Th17 koji izlučuju određene citokine. Razvoj Th u funkcijske podskupine važno je jer se neki patogeni najbolje kontroliraju stanično posredovanom (Th1) imunološkom reakcijom, a drugi humoralnom imunoreakcijom posredovanom protutijelima.

Limfociti Th1 izlučuju IFN-γ, IL-2 i TNF-β, a glavna im je zadaća razvoj stanične imunosti, tj. aktivacija makrofaga i pomoć u diferencijaciji citotoksičnih limfocita T. **Limfociti Th2** izlučuju IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 koji pomažu diferencijaciju limfocita B u plazma stanice i proizvodnju protutijela.

Limfociti Th17 tek su nedavno definirani kao stanice koje dovode do razvoja lokalne upale (proupalni limfociti), a to postižu povlačenjem granulocita na mjesto ulaska uljeza. Te stanice izlučuju citokine IL-17 i IL-22.

Citokini pojedine Th-podskupine inhibiraju razvoj limfocita drugih podskupina, čime se osigurava razvoj imunoreakcije u smjeru koji će na najbolji način spriječiti zarazu. Stoga citokini imaju glavnu ulogu u razvoju ili ograničavanju Th1 ili Th2, te u poticanju imunog odgovora na različite patogene.

Citotoksični limfociti T

Nakon dodira s antigenom limfociti se diferenciraju u efektorske citotoksične limfocite T koji u izravnom dodiru razaraju ciljne stanice (vlastite stanice zaražene virusom i stanice tuđeg presadka). Njihovo sazrijevanje iz naivnih (precititoksičnih) stanica u citotoksične (ubojičke) stanice u većini reakcija pomaže IL-2 koji luče pomagački limfociti Th1.

Regulacijski limfociti T

Regulacijski limfociti T koče imunosni odgovor na vlastite i tuđe antigene djelujući na pomagačke limfocite T ili izravno na limfocite B. Važni su za održavanje tolerancije (na vlastito) te za sprječavanje autoimunosti i neželjenih reakcija na tuđe antigene (npr. alergije). Regulacijskih limfocita T ima nekoliko vrsta, a mogu se podijeliti na prirođene (nTreg) (koji se razvijaju u timusu) i inducibilne (iTreg) (koji se razvijaju na periferiji). Smatra se da prirođeni regulacijski limfociti T svoj učinak ostvaruju izravnim dodirom s predočnom stanicom i lučenjem imunomodulacijskih

citokina IL-10 i TGF-β. Za imunosupresijski učinak potreban je IL-2.

Inducibilni regulacijski limfociti T također izražavaju biljeg CD4, a razvijaju se tek nakon susreta s određenim antigenom. Oni se dijele u dvije skupine –Th3 i Tr, a svoj učinak ne ostvaruju izravnim kontaktom s imunosnim stanicama niti im je za djelovanje potreban IL-2. Njihovo su glavno oruđe imunosupresijski citokini IL-10 i TGF-β koji inhibiraju razvoj limfocita Th1 i Th2. Inducibilni regulacijski limfociti primarno djeluju u sluznicama, pa moduliraju lokalni mukozni imunosni odgovor.

1.2 Operativni zahvat i imunosni sustav

Anestezija i kirurški zahvat akutno mijenjaju aktivnost imunosnog sustava putem različitih procesa (1). Imunoaktivacijski „signali“ u perioperativnom rezdoblju uključuju strah, ozljedu tkiva, hipotermiju, lijekove, transfuziju krvi, bol, infekciju, hiperglikemiju i povećani stres. Svaki od tih čimbenika utječe na imunosni sustav, bilo povećanjem imunosnog odgovora ili suprimiranjem adaptivne imunoreakcije (3,4).

1.2.1 Hipotenzija

Younes i autori (5) su pokazali da je broj hipotenzivnih epizoda tokom operativnog zahvata bio pojedinačno najznačajniji rizični čimbenik povezan sa pojavom recidiva bolesti nakon resekcije metastaze kolorektalnog karcinoma na jetri. Točan mehanizam kojom intraoperativna hipotenzija uzrokuje ubrzano pojavljivanje i/ili metastaziranje maligne bolesti nije do kraja jasan, ali aktivacija neuroendokrinog sustava može imati inhibicijski učinak na antitumorsko djelovanje, posebice NK stanica i limfocita.

Imunosupresija inducirana hipotermijom i postoperativnom boli vjerovatno je posredovana aktivacijom neuroendokrinog sustava, jer perioperativna hipotermija smanjuje funkciju neutrofila potičući termoregulacijsku vazokonstrikciju posredovanu autonomnim živčanim sustavom. Postoperativna bol također aktivira osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (2).

1.2.2 Hiperglikemija

Hiperglikemija tokom perioperativnog razdoblja povećava rizik bakterijske infekcije zbog glikozilacije cirkulirajućih imunoglobulina i smanjene sposobnosti fagocitoze neutrofila jer njihova sposobnost oksidacije ovisi o NADPH (prema engl. „nicotinamide adenine dinucleotide phosphate“). Kod pacijenata koji boluju od dijabetesa kod kojih je dostupna manja količina NADPH za funkciju neutrofila ta je pojava naročito izražena (6, 7).

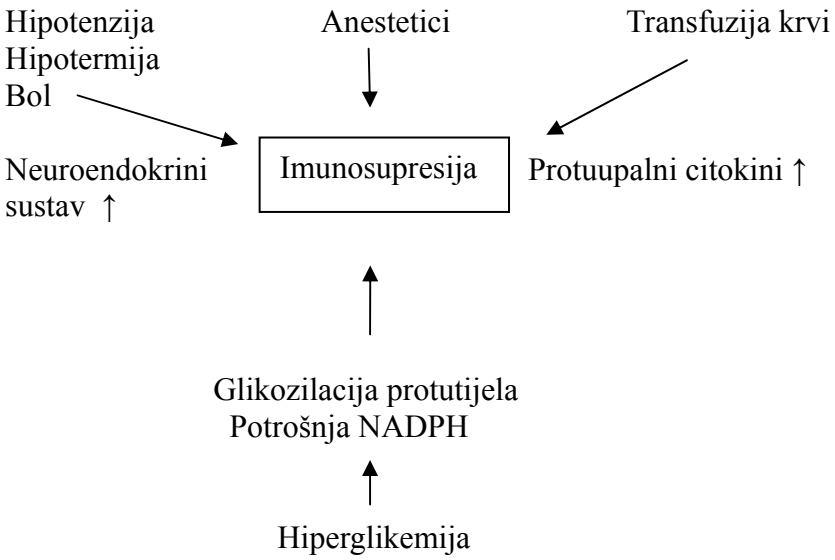
1.2.3 Transfuzija krvi

Mehanizam imunosupresije povezane s alogenom transfuzijom krvi ostaje nejasna. Nedavno je pokazano da alogena transfuzija krvi vjerojatno potiče na produkciju imunosupresivnih Th2 citokina kao što su IL-4 i IL-10 (8, 9).

1.2.4 Kirurški stres

Imunosni odgovor kirurških pacijenata je uzrokovan neuroendokrinim stresnim odgovorom i osovinom hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Kirurškim stresom potaknuto oslobađanje hormona kao što su katekolamini (noradrenalin i adrenalin), adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortizola putem autonomnog živčanog sustava i osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, uzrokuju inhibiciju imunosnih funkcija. Uzrok tome je prisutstvo β2-adrenergičkih i glukokortikoidnih receptora na monocitima, makrofagima i limfocitima T koji promoviraju stanično signaliziranje i inhibiciju stvaranja Th1 citokina kao što su interleukin (IL)-12

i interferon (IFN)-γ, te poticanje stvaranja protuupalnih Th2 citokina kao što su IL-4 i IL-10 (10). Th2 citokini ograničavaju upalni odgovor potaknut kiruškom traumom, nekontrolirana ili povećana sekrecija Th2 citokina povećava imunosupresiju. Proupalni citokini kao što su IL-1, IL-6 i čimbenik tumorske nekroze (TNF)-α izlučeni iz monocita, makrofaga i limfocita aktiviranih kirurškim stresom mogu aktivirati osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (11).



Slika 3. Potencijalni modulatori imunoreaktivnosti tijekom kirurškog zahvata i anestezije

1.2.5 Odgovor akutne faze

Odgovor akutne faze na ozljedu tkiva izolira i uništava infektivni organizam, te aktivira mehanizam cijeljenja koji je neophodan za vraćanje organizma u normalnu funkciju (10). Taj odgovor obično traje samo nekoliko dana. Međutim, u slučajevima kronične stimulacije upalnog odgovora, nastavak nekog aspekta odgovora akutne faze može doprinijeti nastanku bolesti (npr. reumatoidni artritis).

Odgovor akutne faze sastoji se od :

- promjene u vrijednostima temperature koji izazivaju reakciju hipotalamusa i stvaranje febrilnog odgovora posredovanog PGE2
- promjene u sastavu proteina plazme
- povećanje broja granulocita u perifernoj krvi, prvotno kao posljedica povećanog oslobađanja iz depoa koštane srži, te kasnije zbog povećane proizvodnje
- IL-1 i IL-6 potiču sekreciju ACTH i posljedično stvaranje kortizola.

Proteini akutne faze se sintetiziraju u jetri. Oni su uključeni u nespecifičnu/specifičnu imunosnu reaktivnost kao upalni medijatori, inhibitori proteaza, te sudjeluju u cijeljenju rana. Proteini akutne fazu su : CRP (C reaktivni protein) koji kao nespecifični opsonin potiče fagocitozu bakterija, α-2 makroglobulin i druge antiproteinaze, te fibrinogen. Uz njih tu spada još 30 različitih proteina (serumski amiloid A (SAA), α1-kiseli glikoprotein, α1-antitripsin, α1-antikimotripsin, ceruloplazmin, haptoglobin).

Indukcija odgovora akutne faze – makrofagi ili monociti su obično stanice koje započinju odgovor na mjestu tkivne ozljede oslobađajući široki spektar medijatora. Najvažniji su IL-1 i TNF-α. Djeluju lokalno na stromalne stanice (fibroblast i endotel) i distalno potičući drugu fazu oslobađanja citokina (11). IL-6 se oslobođa u drugom valu citokina i sudjeluje u stvaranju proteina akutne faze i stvaranju upalnih stanica.

Koncentracija IL-6 je povećana nakon svih operativnih zahvata. Opaža se već nakon 30 min nakon reza u koži, a značajno je povišena 2-3 sata nakon kirurškog zahvata. Porast koncentracije IL-6 odražava veličinu ozljede tkiva tijekom kirurškog zahvata (12). Porast koncentracije je znatno manji ako je kirurški zahvat izveden laparoskopskom tehnikom (13). Pacijenti sa kirurškim komplikacijama imaju normalan početni porast vrijednosti IL-6, dok je drugi porast koncentracije IL-6 praćen daljnjim povećanjem koncentracije C-reaktivnog proteina.

IL-6 zajedno s TNF-α i IL-1 inhibira metabolizam glutamina u kulturi sa humanim fibroblastima nakon 12 sati kultiviranja. Promijenjen metabolizam glutamina ima za posljedicu poremećen rast stanica i posljedično loše cijeljenje rana kritično bolesnih pacijenata (14).

1.2.6 Citokini i imunosupresija nakon operativnog zahvata

Imunosupresija nakon velike traume ili kirurškog zahvata posljedica je uglavnom disfunkcije limfocita T i očituje se poremećenom sintezom IL-2 i IFN-γ (15). Nesposobnost stvaranja dovoljne količine IL-2 inhibira proliferaciju pomagačkih limfocita T kao odgovor na stimulaciju antigenom, a manjak IFN-γ smanjuje sposobnost monocitne prezentacije antigena. Ova dva citokina su ključna za razvoj limfocita Th1 koji su odgovorni za stanično posredovanu imunost. Ovo smanjenje IL-2 i IFN-γ vjerovatno je posljedica stvaranja PGE2 kao dio odgovora akutne faze (15). Imunosupresijski učinak pokazuju klasični imunosupresivni citokini TGF-β i IL-10, te prirodni antagonisti sTNF-α i IL-1ra. TGF-β potiče daljnje stvaranje PGE2 u monocitima i u određenim uvjetima može poticati stvaranje TNF-α. TGF-β suprimira IL-2 i IL-4 ovisan razvoj pomagačkih limfocita T, te smanjuje ekspresiju receptora IL-1 na limfocitima T.

Ukratko, glavni nedostatak imunoreaktivnosti nakon traume ili kirurškog zahvata je smanjena stanično posredovana imunost zbog poremećaja NK-staničnog odgovora i diferencijacije limfocita Th1. To rezultira prevladavanjem limfocita Th2, vjerovatno kao rezultat supresije limfocita Th1.

Citokini imaju značajan učinak na stvaranje granulomatoznog tkiva i reepitelizaciju, što je osnovni problem kod opeklina i pacijenata sa kroničnim ulceracijama. Najznačajniji citokini su TGF-β, fibroblastni čimbenik rasta (FGF), epidermalni čimbenik rasta (EGF), IL-6 i proupalni citokini TNF-α, IL1-α i β (15).

Navedene promjene imunog sustava u mladih i zdravih pacijenata većinom prođu nezamjećene, ali kod visoko rizičnih pacijenata one mogu pridonijeti nastanku kardiovaskularnih komplikacija, poremetiti cijeljenje rane, povećati broj infekcija, uzrokovati višeorgansko zatajenje i povećati incidenciju metastaza (16, 17). Također je utvrđeno da više vrijednosti IL-4 i IL-5 nakon uklanjanja karcinoma prostate znače lošiju prognozu pacijenta (3). Ta činjenica bi se mogla iskoristiti kao biljeg progresije bolesti i može se koristiti za pacijente koji mogu imati koristi od imunomodulacije nakon operativnog zahvata.

1.3 Anestetici i imunosni sustav

Svaki anestetik ima direktan supresivni učinak na staničnu i humoralnu imunost djelujući na funkciju imunokompetentnih stanica, te gensku ekspresiju upalnih medijatora i njihovu sekreciju (8). Kod malignih bolesti, imunosupresija potencirana anesteticima (disfunkcija NK stanica i limfocita) može ubrzati rast i metastaziranje rezidualnih malignih stanica, te time pogoršati prognozu. S druge strane, protuupalno djelovanje anestetika može biti korisno u stanjima koji obuhvaćaju ishemiju, reperfuzijsku ozljedu i SIRS (18, 19). Stoga, anestetici nemaju samo negativan nego i poticajan učinak na perioperativni imunosni sustav. Analize djelovanja anestetika na imunosni sustav ekstrapolirane su većinom iz in vitro studija, jer studije izvedene na pacijentima imaju više varijabli kao što su vrsta i dužina operativnog zahvata, te komplikacije vezane uz pacijenta (20). Iako je teško razlikovati utjecaj kirurškog stresa, anestetika i anesteziološkog

postupka na imunosni sustav, ne smije se zanemariti imunosupresivan utjecaj anestetika na perioperativnu imunost.

1.3.1 Opioidi

Imunosupresivno djelovanje opioida poznato je više od desetljeća. Iako točan mehanizam djelovanja nije poznat, zna se da je opioidom inducirana imunomodulacija posredovana opiodnim receptorima, te aktivacijom automomnog živčanog sustava i osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (21). Aktivacija opiodnih receptora može regulirati periferni imunosni sustav stimulacijom osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda i simpatičkog živčanog sustava. Aktivacija opioidnih receptora potiče produkciju ACTH iz hipofize, što potiče stvaranje glukokortikoida koji suprimiraju imunosni sustav (22). Glukokortikosteroidi suprimiraju reaktivnost svih imunosnih stanica osim regulacijskih limfocita T (23, 24). Postoje četiri glavna tipa opiodnih receptora : δ, κ, μ i σ. Opiodni receptori osim na stanicama živčanog sustava, prisutni su i na imunokompetentnim stanicama. Neutrofili i NK stanice izražavaju μ i δ receptore, dok monociti, makrofagi i limfociti T imaju μ, κ i δ receptore. Klasični μ opiodni receptor se povezuje s imunonomodulacijom, jer djelovanje morfija blokira antagonist nalokson (25).

1.3.1.1 Morfij

Morfij suprimira funkciju neutrofila kao što je fagocitoza, oksidacija i ekspresija receptora komplementa zbog oslobađanja NO putem μ3 receptora (26). U studijama in vivo morfij inhibira proliferaciju i diferencijaciju makrofaga, fagocitozu monocita i makrofaga, te stvaranje IL-10 i IL-12 (27). Slabljenjem tih funkcija morfij djeluje na smanjenje obrane domaćina protiv različitih infekcija. Morfij smanjuje NK staničnu aktivnost (28), te aktivnost limfocita T i limfocita B (29). Smanjena je reaktivnost limfocita B na mitogene i stvaranje protutijela.

1.3.1.2 Sintetski opioidi - fentanil, remifentanil, alfentanil

Za razliku od inhibicijskog učinka morfija na imunosni sustav, sintetski opioidi kao što su fentanil i remifentanil, nemaju značajnog učinka na imunosne stanice zbog smanjene interakcije sa specifičnim opioidnim receptorima. Fentanil, remifentanil i alfentanil ne utječu na oksidacijske procese i fagocitozu neutrofila (30). Nasuprot tome, pokazano je na animalnom modelu da visoke doze fentanila suprimiraju NK staničnu aktivnost i otpornost na tumorske metastaze (31). Isto tako je pokazano da klinički relevantne doze fentanila povećavaju broj i aktivnost NK stanica, CD8 + citotoksičnih limfocita T u zdravih dobrovoljaca (32). Za razliku, broj cirkulirajućih limfocita T i limfocita B ostaje nepromjenjen u prisutnosti fentanila (33).

1.3.2 Propofol

Propofol pripada fenolnoj hidroksilnoj skupini lijekova i kemijski sliči antioksidansu α – tokoferolu (34). Dosadašnji podatci govore o tome da propofol ima inhibicijski učinak na neutrofile, monocite i funkciju makrofaga u prirođenoj imunosti, ali ne djeluje na NK stanice i limfocite. Ovaj učinak je vjerojatno povezan s lipidnim otapalom (35). Propofol ima protuupalna i anti-oksidativna djelovanja putem svojih inhibitornih djelovanja na prirođenu imunost (36).

1.3.2.1 Funkcija neutrofila, monocita, makrofaga i propofol

Propofol u pokusima in vitro pokazuje o dozi ovisnu inhibiciju neutrofilne kemotaksije i oksidacije (37), te poremećenu neutrofilnu fagocitozu Escherichiae coli i Staphylococcus aureus u klinički primjenjenim koncentracijama (38). S druge strane, objavljeni su i oprečni rezultati koji su pokazali da propofol u kliničkim koncentracijama ne utječe na neutrofilnu fagocitozu Escherichiae coli i Staphylococcus aureus (39).

Kliničke studije kod kritično bolesnih pacijenata su pokazale da propofol značajno ne utječe

na funkciju neutrofila (40). Smanjio je sekreciju IL-8 iz lipopolisaharidom stimuliranih neutrofila, iako je unutarstanična razina IL-8 i mRNA ostala nepromjenjena (41). Navedeni rezultati upućuju na to da je smanjeno lučenje IL-8 posljedica djelovanja propofola na posttranslacijskoj razini, a ne razini mRNA. Dokazano je da propofol utječe na monocitnu i makrofagnu kemotaksiju, oksidaciju i fagocitozu (38, 42). Supresivni učinak propofola na kemotaksiju i oksidaciju prestaje 6-24 sata nakon prestanka primjene propofola.

Stvaranje proupalnih citokina TNF-α, IL-1β i IL-6 u lipopolisaharidom aktiviranih makrofaga inhibirano je na pretranslacijskoj razini nakon primjene propofola (43). Međutim, podatci o mehanizmu djelovanja propofola na oslobađanje TNF-α i IL-1α iz monocita su kontradiktorni (44).

1.3.2.2 Funkcija NK stanica, limfocita i propofol

U literaturi je malo podataka o utjecaju propofola na NK staničnu funkciju u studijama in vivo i in vitro. Rezultati istraživanja na eksperimentalnim životinjskim modelima pokazuju da propofol nema učinka na NK staničnu funkciju ili na podložnost tumorskim metastazama u neoperiranih štakora nakon anestezije (45). Nasuprot tome, rezultati kliničkih studija na ljudima pokazuju izrazito smanjenje broja cirkulirajućih NK stanica u pacijenata anesteziranih propofolom i fentanilom (46).

Propofol nema utjecaja na proliferaciju limfocita in vitro. Doduše, u kirurških pacijenta smještenih u jedinicama intezivnog liječenja propofol inhibira limfocitnu proliferaciju kao odgovor na mitogen (47). Ovaj rezultat sugerira da proliferacija limfocita B u kritično bolesnih pacijenata može biti inhibirana sa propofolom.

1.3.3 Inhalacijski anestetici

Brojne studije in-vitro su pokazale imunosupresivan učinak ovisan o dozi i vremenu izlaganja inhalacijskih anestetika na različite imunosne stanice. Opisan je inhibicijski učinak na funkciju neutrofila, supresiju oslobađanja citokina u perifernim mononuklearnim stanicama, smanjenje limfocitne proliferacije i indukciju limfocitne apoptoze (2).

1.3.3.1 Funkcija neutrofila i inhalacijski anestetici

Inhibiciju oslobađanja slobodnih kisikovih radikala iz aktiviranih neutrofila pokazuju **halotan, enfluran, isofluran i sevofluran** (48). Mehanizam inhibicije oslobađanja kisikovih radikala je izravan inhibicijski učinak na NADPH oksidazu ili inhibicijski učinak na neko mjesto u signalnom putu NADPH oksidaze, kao što je protein kinaza C. Inhibicijski učinak inhalacijskih anestetika na funkciju neutrofila, osim smanjenja njihove sposobnosti ubijanja mikroorganizama uključuje i slabljenje sposobnosti neutrofila za počinjanje upalnog odgovora (49).

S druge strane, taj inhibicijski učinak na neutrofilnu funkciju osigurava povoljan terapijski utjecaj u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi. Najnovija istraživanja na različitim animalnim modelima i pacijentima govore da isofluran i sevofluran mogu povećati protektivno djelovanje u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi smanjenjem stvaranja kisikovih radikala i prianjanja neutrofila za endotelne stanice (50). Ovo djelovanje može biti vezano uz anesteziološko prekondicioniranje ishemijskog miokarda. **Sevofluran** dovodi do smanjenja miokardijalne ishemijsko-reperfuzijske ozljede tako što suprimira lučenje proupalnih citokina, IL-6 i IL-8, ali ne i IL-10 (51, 52). Poremećaj ravnoteže pro- i protuupalnih citokina može biti jedan od najvažnijih mehanizama kardioprotekcije sevoflurana.

1.3.3.2 Funkcija makrofaga, monocita i inhalacijski anestetici

Većina studija in vitro i in vivo o učinku inhalacijskih anestetika na funkciju makrofaga i monocita bazira se na analizi funkcije alveolarnih makrofaga. U in vivo studiji pokazano je da inhalacija isoflurana smanjuje lučenje proupalnog citokina IL-1β u bronhoalveolarnom lavatu (52).

Ovo istraživanje upućuje na inhibicijski učinak isoflurana na oslobađanje proupalnih citokina iz alveolarnih makrofaga, jer su glavni izvor u bronhoalveolarnom lavatu u tijeku endotoksemije alveolarni makrofagi. Također, studija pokazuje da inhalacija isoflurana povećava oslobađanje NO (dušićnog oksida) i ekspresiju inducibilne dušićni oksid sintaze (iNOS) u alveolarnim makrofagima, što je u potpunosti inhibirano antagonistom β receptora – propranololom. Tschaikowsky i suradnici (53) pokazali su da je ekspresija iNOS-a bila povećana sa inhalacijskim anesteticima (halotanom, isofluranom, enfluranom i desfluranom) kada je stanična linija stimulirana kombinacijom lipopolisaharida i IFN-γ. S druge strane, inhibirano je oslobađanje NO isofluranom ili sevofluranom.

1.3.3.3 Funkcija NK stanica i inhalacijski anestetici

NK stanice su stanični efektorski mehanizmi urođene imunosti. Prvenstveno eliminiraju virusom inficirane stanice i tumorske stanice u ranoj fazi razvoja tumora, uključivo i tumorske metastaze. Smanjena aktivnost NK stanica u perioperativnom periodu povezana je sa povećanom smrtnošću u pacijenata sa malignom bolesti. Brojne studije in vitro pokazale su da kirurgija i anestezija smanjuju NK staničnu citotoksičnu aktivnost, a anestezija sa halotanom i suprimirana aktivnost NK stanica povećava metastaze in vivo (44). Perioperativna supresija NK stanične citotoksičnosti povezana je i s aktivacijom neuroendokrinog sustava, jer je dokazan obrnutoproporcionalni odnos serumske razine kortizola i NK stanične aktivnosti tokom i nakon kirurškog zahvata.

1.3.3.4 Funkcija limfocita i inhalacijski anestetici

Mnoge studije su pokazale inhibicijski učinak inhalacijskih anestetika na limfocitnu proliferaciju i supresivni učinak na oslobađanje citokina (54). Halotan smanjuje sekreciju IFN-γ i proliferativni odgovor na mitogene. Drugi inhalacijski anestetici sevofluran, isofluran i enfluran suprimiraju oslobađanje IL-1β i TNF-α iz polimorfonukleara, uključujući limfocite i NK stanice (55). Inhibicijski učinak inhalacijskih anestetika na limfocitnu funkciju može smanjiti sposobnost tih stanica u borbi protiv mikroorganizama i tumorskih stanica. Naime, ovi učinci mogu doprinijeti protuupalnom odgovoru, regulirajući sekreciju proupalnih citokina važnih u patofiziologiji SIRS-a. Iako mehanizam kojim inhalacijski anestetici umanjuju limfocitnu funkciju ostaju nejasni, jedan od razloga može biti limfocitna apoptoza. Isofluran i sevofluran izravno induciraju limfocitnu apoptozu ovisno o dozi i vremenu izlaganja (56).

1.3.4 Lokalni anestetici

Mehanizam djelovanja lokalnih anestetika razumijeva se u kontekstu njihovog neurofiziološkog djelovanja kroz sposobnost blokiranja Na+ kanala. Također je manje poznato da imaju različiti učinak neovisno o Na+ kanalima – djelujući na druga molekularna mjesta (npr. m1 muskariski receptor, receptor vezan uz G protein) često u koncentracijama značajno ispod onih potrebnih za blokadu živca (58, 59).

Lokalni anestetici smanjuju upalu djelujući na upalnu kaskadu na različitim razinama, te su pokazali značajnu djelotvornost u liječenju akutnih i kroničnih upalnih bolesti. Postoje brojni dokazi da lokalni anestetici djeluju na granulocite (koji ne posjeduju Na + kanale), monocite i makrofage. Lokalni anestetici smanjuju proupalne efektorske funkcije kao što su ekspresija proadhezivnih leukocitnih integrina (npr.CD11b-CD18), stvaranje reaktivnih kisikovih metabolita, oslobađanje leukotriena (naročito LTB4), IL-1α i histamina (60). Tome u prilog govori i opažanje da bupivacaine u potpunosti spriječava (bez obzira na način primjene) produkciju TNF-α i IL-1β u kulturi cirkulirajućih krvih stanica nakon stimulacije lipopolisaharidom u štakora (61). Primjena bupivacaina nije imala utjecaja na proizvodnju IL-10.

Lokalni anestetici također poboljšavaju adheziju i migraciju leukocita, stvaranje edema i oštećenje tkiva u različitim animalnim modelima akutne ozljede (npr. akutni respiratorni distres

sindrom, termalna ozljeda, infarkt miokarda) i kroničnih upalnih bolesti (npr. upalne bolesti crijeva) (62). Važno je naglasiti da sa lokalnim anestetikom reducirana aktivacija leukocita nije kompenzirana klinički značajnom baktericidnom sposobnošću (63). Štoviše, u nekim istraživanjima pokazano je da lokalni anestetici mogu povećati rizik aktivacije bakterijske infekcije (64). Te studije najavljuju šire značenje lokalnih anestetika u perioperativnom razdoblju i potiču interes za definiranje njihove uloge u različitim upalnim bolestima.

1.4 Anestezija i imunosni sustav

Utjecaj anestezije, kirurškog zahvata i različitih terapijskih postupaka na imunosni sustav teško je definirati. Anestezija sama po sebi modulira imuni odgovor čineći operaciju bezbolnom i održavajući homeostazu, te na taj način reducira odgovor na kirurški zahvat. No, to su prolazni i minimalni učinci na imunosni sustav (65). Stoga modulacija imunosnog odgovora na anesteziju nije izražena u istoj mjeri kao što je izražena na endokrini i metabolički odgovor.

Anestezija ima direktni utjecaj na različite sustave kao što je cilijarna funkcija (66) i indirektno utječe na endokrini i metabolički odgovor , oksigenaciju, ventilaciju i tkivnu perfuziju.

1.4.1 Usporedba utjecaja regionalne i opće anestezije na imunosni sustav

Prilikom kirurškog zahvata, regionalna anestezija s lokalnim anestetikom smanjuje aktivaciju neuroendokrinog sustava i stoga spriječava pojavu imunosupresije tokom operacije. Spinalna anestezija rezultira sa manjom imunosupresijom tj. održava broj Th1 stanica i time potiče staničnu imunost (67). Pacijentice kod kojih je učinjena histerektomija, inhibicija NK stanične citotoksičnosti prisutne kod opće anestezije smanjena je nakon zajedničke primjene opće i epiduralne anestezije. Inhibicijski učinak na NK staničnu funkciju je povezan sa supresijom lučenja kortizola (68). Nakon totalne endoproteze kuka, razina kortizola je bila niža u grupi regionalne anestezije nego u grupi opće anestezije (69). Ti rezultati pokazuju da je kirurškim stresom potaknuto lučenje kortizola smanjeno u regionalnoj anesteziji. Stoga je razumljivo da aferentni neuralni blok induciran spinalnom anestezijom smanjuje intraoperativni i postoperativni neuroendokrini stresni odgovor (70). Smanjenje limfocitne proliferacije i stvaranja citokina nakon opće anestezije nije opaženo kod pacijenata u regionalnoj anesteziji (71). Isto tako, epiduralna anestezija spriječava supresiju mitogenom indiciranu limfocitnu proliferaciju u pacijenata koji su bili u općoj anesteziji u kirurgiji prostate (72). Nedavna su istraživanja otkrila da dodatak epiduralne anestezije općoj anesteziji održavanoj sevofluranom za vrijeme laparotomije odgađa supresiju tumoricidne funkcije jetrenih mononuklearnih stanica, održava Th1/Th2 citokinsku ravnotežu i NK staničnu/NK-T staničnu funkciju, rezultirajući redukcijom tumorskih metastaza (73). Ovaj učinak regionalne anestezije na imunosupresiju induciranom kirurgijom i općom anestezijom mogu zaštiti pacijenta od postoperativnog razvoja infekcije i tumorskih metastaza (74).

Do sada izložene činjenice govore za to da su imunokompetentne stanice osjetljivije na djelovanje inhalacijskih anestetika nego propofola i sintetskih opioida (75). Isto tako, odgađanje stresnog odgovora sa kombinacijom epiduralne i opće anestezije štiti kirurške pacijente od daljnje imunosupresije tokom perioperativnog razdoblja. U tom kontekstu opća anestezija sa propofolom i fentanilom kombinirana sa epiduralnom/spinalnom anestezijom može biti optimalna za imunokompromitirane zbog prevencije tumorskim metastaza i razvoja bolničkih infekcija. S druge stane, inhalacijski anestetici su korisni kod kardiopulmonalnog bypasa ili SIRS-a gdje je prisutna ishemijsko/reperfuzijska ozljeda (76).

1.4.2 Usporedba utjecaja intravenske i inhalacijske anestezije na imunosni sustav

Studije in vivo pokazuju da inhalacijska anestezija uzrokuje veći postoperativni supresivni

učinak od intravenske anestezije (TIVA). Broj limfocita T i ekspresija HLA-DR smanjena je nakon inahalacijske anestezije u usporedbi sa TIVA (77). Razina IL-6 u plazmi, citokina važnog za stimulaciju neuroendokrinog sustava, značajno je povišena tokom i nakon abdominalne kirurgije u inhalacijskoj anesteziji (78). Niža razina serumskog kortizola je prisutna u pacijenata u TIVA u usporedbi sa pacijentima u inhalacijskoj anesteziji isofluranom (79, 80). Anestezija isofluranom smanjuje baktericidnu aktivnost makrofaga učinkovitije od anestezije propofolom (81). Na kraju, Th1/Th2 odnos je značajno smanjen nakon anestezije isofluranom, ali se ne mijenja nakon anestezije propofolom (82).

2 CITOKINI I CITOKINSKA MREŽA

2.1 Opća svojstva citokina

Citokini su nisko-molekularni glikoproteini (15-25 kDa) koji posreduju djelovanje jedne stanice na drugu (međustanična komunikacija). Prvenstveno ih luče imunosne i upalne stanice, iako ih mogu lučiti i druge stanice u organizmu. Djeluju na imunosne, upalne i hematopoetske stanice te na stanice kao što su fibroblasti, hepatociti i keratinociti (**parakrino djelovanje**).

Citokini se luče i prvenstveno djeluju lokalno, tj. djeluju na stanice koje ih luče (**autokrino djelovanje**). Manji broj citokina luči se u krv i djeluje na udaljena tkiva (u fiziološkim i patološkim stanjima). Tada govorimo o **endokrinom djelovanju**.

Slika 4. Mehanizam djelovanja citokina (A- autokrino, P- parakrino, E- endokrino djelovanje)

Citokini pokazuju brojne biološke učinke - djeluju na procese aktivacije, proliferacije (rasta) i diferencijacije stanica. U stanicama potiču nove funkcije, posreduju ili reguliraju nespecifične i specifične imunosne reakcije, djeluju kemotaksijski i reguliraju upalne procese. Neki citokini pak, inhibiraju rast stanica ili djeluju citotoksično te na taj način sudjeluju u procesima hemostaze. Postoje brojni agonisti i antagonisti citokina, koji se mogu rabiti za poticanje ili potiskivanje proliferacije, imunosti ili upale.

2.2 Sinteza, lučenje i mehanizam djelovanja citokina

2.2.1 Sinteza i lučenje citokina

Većina citokina nije pohranjena, već se stvaraju u reakciji na mikroorganizme i druge antigene koji potiču prirođenu ili stečenu (adaptivnu) imunost te razne proupalne agense. S druge strane, neki citokini su prethodno sintetizirani i pohranjeni u citoplazmatskim granulama. Primjerice, TGF-β1 (transformirajući čimbenik rasta – beta 1) je pohranjen u alfa granulama trombocita i oslobođa se stimulacijom trombina. Na isti način pohranjeni su TNF-α (čimbenik tumorske nekroze –α) u nekim mastocitima, GM-CSF (granulocit/makrofag kolonije stimulirajući čimbenik) itd. Prethodno sintetizirani citokini također mogu biti pohranjeni kao membranski proteini TNF-α, IL-1β (interleukin 1β), EGF (endotelijalni čimbenik rasta) i TGF-α (transformirajući čimbenik rasta –α) ili formiraju komplekse sa proteinima vezanima za staničnu površinu ili izvanstanični matriks, na primjer TGF –β, MIP-1β (makrofag upalni protein-1β) i IL-8 (interleukin-8). Oni služe kao trenutni izvor citokina kod ozljede tkiva i obnove tkiva.

2.2.2 Mehanizam djelovanja

Citokini djeluju na stanicu vežući se na odgovarajući receptor. Nakon interakcije citokina i receptora aktivira se unutarstanični signal preko „ drugih glasnika“ (slično kao kod hormona).

Mnogi se citokini luče i djeluju u kaskadi tj. jedan citokin potiče lučenje drugoga, ovaj trećega itd. Istodobno, neki citokini koče lučenje prethodnih citokina u kaskadi, a stvaraju se i luče specifični inhibitori citokina koji ograničavaju njihovo djelovanje. Tako nastaje složena citokinska mreža.

2.2.3 Biološki učinci

Citokini nadziru gotovo svaku funkciju urođene i specifične imunosti. Za djelovanje mnogih citokina svojstven je pleotropizam tj. isti citokin djeluje na nekoliko vrsta stanica i ima više različitih učinaka. Nadalje, za djelovanje citokina je karakteristična i redundacija tj. da isto djelovanje na istu stanicu može imati nekoliko citokina odnosno da se djelovanja različitih citokina dobrim dijelom preklapaju. Unatoč redundaciji, spektar djelovanja pojedinog citokina jest jedinstven.

, Na molekularnoj razini pleotropizam i redundacija tumače se rasporedom i građom receptora za citokine: receptor većine citokina građen je najmanje od dvaju polipeptidnih lanaca (podjedinica), od kojih je samo jedan specifičan (za njega se veže citokin), a drugi je nespecifičan (prenosi signal u stanicu). Različiti citokini koriste se istom nespecifičnom, transdukcijskom podjedinicom koja je prisutna na mnogim stanicama. Oslobađanjem specifične podjedinice od ciljne stanice, ona dospijeva i veže se sa nespecifičnom podjedinicom na drugim stanicama, što omogućuje vezanje i djelovanje citokina i na druge stanice.

Citokin u ciljnoj stanici dovodi do ekspresije karakterističnih gena, aktivacije stanične funkcije, proliferacije ali katkada i do smrti stanice. Primjerice, citokini često uzrokuju diferencijaciju limfocita B, aktivaciju i citotoksičnost makrofaga, imunoglobulinsko prekapčanje u limfocitima B, diferencijaciju stanica Th u Th1 i Th2 itd. Izuzetak su TNF-α, koji uzrokuje smrt stanica (apoptozu) i kemokini koji potiču usmjereno gibanje stanica.

2.3 Citokini

2.3.1 Proupalni citokini

U proupalne citokine ubrajamo – IL-1α i β, TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1 i EGF. Te citokine gotovo isključivo ili najvećim dijelom luče upalne stanice, prvenstveno monociti – makrofagi. Oni su važni inducirani (nastaju tek nakon podražaja) medijatori nespecifične (urođene) imunosti, a svojim dodatnim djelovanjima pomažu i reakcije specifične (adaptivne) imunosti. Sintezu i lučenje proupalnih citokina lokalno potiču bakterijski toksini, imuni kompleksi, virusna dvolančana DNA, fagocitoza, oksidativni radikali, leukotrieni, kemokini i drugi citokini. Osobito jak stimulans je lipopolisaharid (LPS) iz endotoksina gram-negativnih bakterija.

Svi proupalni citokini izravno ili neizravno potiču lučenje ACTH/ kortikosteroida, koji povratno inhibiraju njihovo lučenje. Nadalje, svi manje ili više djeluju na hipotalamus, gdje potiču porast tjelesne temperature (endogeni pirogeni), te potiču sintezu proteina akutne faze u jetri. Ta sistemska djelovanja proupalnih citokina pospješuju obranu organizma od infekcijskih agensa.

1. INTERLEUKIN 1 (IL-1)

IL-1- je prvi dobro poznati citokin. Strukturno i funkcionalno razlikujemo IL-1α i IL1-β. IL-1α se nalazi uglavnom na staničnoj membrani, a IL1-β se izlučuje u izvanstaničnu tekućinu. Djelovanja tih dviju molekula su gotovo identična, pa ih u daljnjoj raspravi nećemo dijeliti. Obitelji

IL-1, osim spomenuta dva, pripada još i antagonist receptora za IL-1 (IL-Ra), koji luče iste stanice nakon IL-1α i IL1- β.

Sistemski učinci su slični onima od TNF-α: proupalna djelovanja IL-1 su sinergistička i uvelike se preklapaju s djelovanjem TNF-α, osim što je IL-1 jači pirogen. Vjeruje se da IL-1 potiče sintezu prostaglandina E2 u hipotalamusu, koji potom povisuje tjelesnu temperaturu. Potiče sintezu proteina akutne faze u jetri.

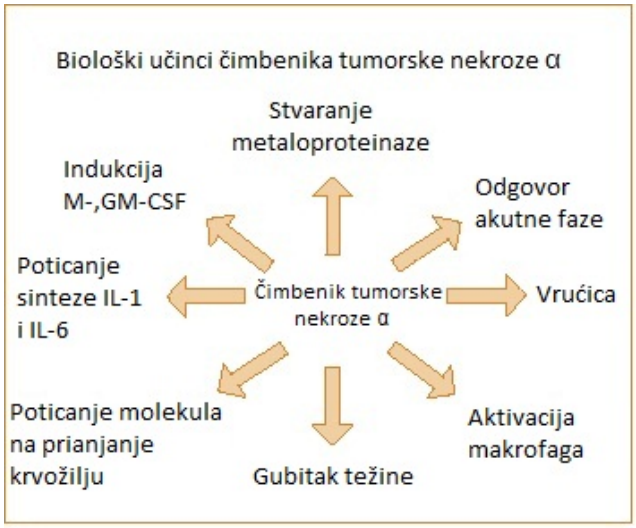
Lokalni učinci IL-1 su najizraženiji u zglobnim prostorima (gdje ga luče sinovijalne stanice nakon imunološke aktivacije), koži i trbušnoj šupljini. IL-1 potiče sintezu kolagenaze u sinovijalnim stanicama, metaloproteinaza u hondrocitima i povećava aktivnost osteoklasta, što uzrokuje destrukciju tkiva i resorpciju kosti (otuda prvotno ime katabolin). Suprotno tim učincima IL-1 povećava proliferaciju fibroblasta i sintezu kolagena. Prekomjerno lučenje IL-1 povećava mogućnost nastanka fibroze i skleroze.

IL-1 ima izraženo djelovanje na **imunosni i hematopoetski sustav**. Sudjeluje u aktivaciji limfocita T i B, te NK stanica izravno ili poticanjem sinteze stanovitih citokina (IL-2, IL-2R, IL-6, IFN-γ). Zbog snažnog stimulacijskog djelovanja na različite imunosne reakcije, IL-1 povećava otpornost organizma na različite infekcije. Prokoagulatno djelovanje IL-1 na endotel krvnih žila i aktivacija endotelnih stanica je znatno slabije od djelovanja TNF- α.

IL-1 ima izrazito citoprotektivno djelovanje na mnoge stanice u organizmu, slično onome PGE2. Budući da IL-1 potiče sintezu PGE2, moguće je da je taj citoprotektivni učinak posredovan s PGE2. Međutim, protiv toga govore opažanja da je citoprotektivan učinak IL-1 znatno jači i da se taj učinak ne može (barem ne u potpunosti) potisnuti inhibitorima sinteze prostaglandina (npr. indometacinom). Mehanizam citoprotektivnog učinka IL-1 se intezivno istražuje.

2. ČIMBENIK TUMORSKE NEKROZE (TNF-α)

Sintezu i lučenje TNF-α potiču infekcije mikroorganizmima, maligni tumori te različiti topljivi faktori koji aktiviraju monocite-makrofage, kao što su endotoksin iz gram negativnih bakterija, IFN-γ, kemotaksijski i drugi podražaji. Za masovno lučenje TNF-α potrebna su dva podražaja: „poticajni“ (prema engl. „priming“) podražaj koji dovodi do hiperplazije monocita-makrofaga i „okidački“ (prema engl. „triggering“) podražaj koji dovodi do oslobađanja TNF-α iz stanica. Osim monocita-makrofaga, u normalnim okolnostima TNF-α luče i mastociti, a pri bakterijskim infekcijama druge upalne i imunosne stanice.



Slika 5. Biološki učinci TNF-α

TNF-α (i drugi proupalni citokini) djeluje na endotel krvnih žila u upalnom području povećavajući ekspresiju adhezijskih molekula. On pojačava ekspresiju adhezijskih molekula na leukocitima i kemotaksijsko djelovanje na neutrofile i monocite te tako povećava prianjanje upalnih stanica uz endotel i njihov prolaz u upalno područje. Neutrofilija u početnim fazama upale posljedica je stimulacijskog djelovanja citokina na koštanu srž i mobilizacije neutrofila koji su normalno slabo pričvršćeni uz stjenke krvnih žila (marginacija). Istodobno, TNF-α povećava prokoagulacijsko djelovanje endotelnih stanica i drugih prokoagulatnih čimbenika, što uzrokuje lokalno zgrušavanje krvi. Nadalje, mobilizira metabolite, što je sve dio dobro usklađenog procesa kojim se nastoji lokalizirati upala i usmjeriti dreniranje i obradu štetnog agensa prema regionalnom limfnom čvoru.

Od **sistemskih učinaka**, TNF-α je slabiji pirogen od IL-1, ali zato izaziva znatno jaču kaheksiju. Nadalje, izaziva sliku endotoksinskog šoka i u velikim dozama inhibira rast eritropoetskih i mijelopoetskih kolonija. Pri septičnom šoku, TNF-α je glavni čimbenik koji potiče diseminiranu intravaskularnu koagulaciju. Osim toga, TNF-α dilatira postkapilarne venule i povećava njihovu propusnost, što na početku može dovesti do krvarenja u međustaničnu tekućinu.

Premda TNF-α djeluje citotoksično, u malim dozama ima citoprotektivno djelovanje, koje je znatno slabije od onoga IL-1. Mehanizam protektivnog djelovanja mogao bi se temeljiti na indukciji sinteze Mn-superoksid–dismutaze, kojom se neutraliziraju slobodni kisikovi radikali nastali toksičnim oštećenjima stanice (83).

Proteini akutne faze u jetri, koji se sintetiziraju pod utjecajem TNF-α su po spektru nešto drugačiji od onih koje stimulira IL-1 ili IL-6. Također, inhibira oksidaze sustava citokroma P-450.

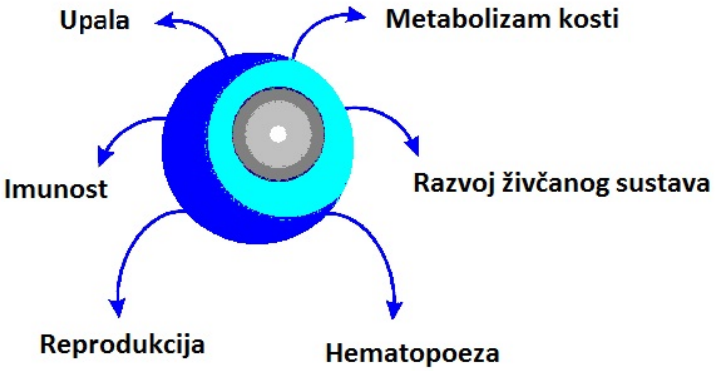
Od **lokalnih učinaka**, TNF-α se luči i izaziva upalne i degenerativne promjene u zglobnoj šupljini pri reumatoidnom artritisu. Može se naći u likvoru i lezijama bolesnika s multiplom sklerozom, pa se misli da TNF-α igra ulogu u patogenezi te i drugih autoimunih bolesti. Anti -TNF-α protutijela ili topljivi receptor za TNF-α uspješno se primjenjuje za liječenje reumatoidnog artritisa i Chronove bolesti (84).

TNF-α ima također izraženo djelovanje na **imunosni i hematopoetski sustav**. Najvažnije je njegovo djelovanje na makrofage. Uz IFN-γ, najvažniji je aktivator makrofaga. Aktivirani makrofagi pod utjecajem TNF-α postaju toksični za intracelularne parazite i maligne stanice. TNF-α potiče specifične imunosne reakcije na taj način što povećava ekspresiju antigena MHC klase II na stanicama koje prezentiraju antigen (uključujući i endotelne stanice kapilara), receptora za IL-2 na limfocitima, aktivira citotoksične limfocite i neutrofilne leukocite, pojačava sekreciju drugih citokina (IL-1 i IL-6) i važna je efektorska molekula u reakciji odbacivanja alotransplantanata tkiva i organa. Stoga se drži da je TNF-α jedan od najvažnijih lokalnih humoralnih čimbenika u posredovanju i regulaciji imunosnih i upalnih reakcija u organizmu.

3. INTERLEUKIN 6 (IL-6)

Luče ga gotovo sve stanice u organizmu, a ponajviše limfociti T i makrofagi. Činjenica da ga luče brojne stanice i da djeluje na različite stanice, govori u prilog shvaćanju da IL-6 djeluje kao **autokrini i parakrini čimbenik**.

Mnogi citokini i hormoni djeluju na lučenje IL-6. Veoma jaki stimulatori sinteze i lučenja IL-6 su IL-1, TNF-α i PEG2. Moguće je stoga, da IL-6 posreduje neke efekte IL-1 i TNF-α. Ciklični adenozinmonofosfat (cAMP) potiče sekreciju IL-6, a čini se da IL-6 potiče sintezu cAMP. Negativna povratna sprega s lučenjem ACTH i glukokortikoida , ista je kao i za IL-1 i TNF-α.



Slika 6. Biološki učinci IL- 6

Najvažnija djelovanja IL-6 su **stimulacija imunosne reakcije, stimulacija hematopoetskih stanica** (pospješuje rast hematopoetskih matica – stanica, potiče sazrijevanje megakariocita) i **sinteza proteina akutne faze** (PAP). IL-1, TNF-α i IL-6 potiču sintezu PAP, pri čemu je IL-6 (Slika 6.) najvažniji i/ili zadnji čimbenik koji uzrokuje ovu stimulaciju. Od ostalih djelovanja važno je istaknuti da IL-6 stimulira rast nekih tumora (plazmacitom, bubrežni karcinom) (85), a inhibira rast drugih (rast stanica karcinoma dojke). Različitost učinka na različite tumorske stanice vjerovatno je posljedica drukčijeg sastava staničnih receptora, odnosno drukčijih putova prijenosa unutarstaničnog signala. Daljnja djelovanja IL-6 su poticanja aktivnosti osteoklasta, rast keratinocita, indukcija rasta i mitoza jetrenih stanica in vitro i druga. Konačno, IL-6 je jedan od endogenih pirogena, što je posljedica njegovog izravnog djelovanja na centre u mozgu.

IL-6 potiče imunosnu reakciju na taj način što stimulira limfocite T i B.

4. INTERLEUKIN 8 (IL-8)

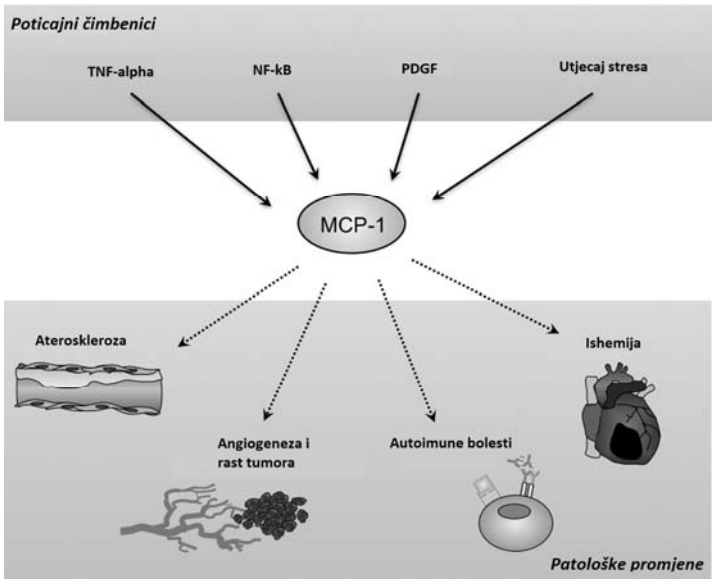
Kemokin IL-8 je jedan od glavnih medijatora upalne reakcije. Luče ga razne stanice, a funkcija mu je **kemotaksija neutrofila i angiogeneza**. U neutrofilima potrebna je serija staničnih fizioloških odgovora za migraciju i njihovu osnovnu funkciju – fagocitozu antigena. Osim na neutrofile IL-8 djeluje na endotelne stanice, makrofage, mastocite i keratinocite.

IL-8 kao potentni kemotaksijski čimbenik za neutrofile zajedno s upalnim citokinima uzrokuje ishemijsko/reperfuzijsku ozljedu (86). Plućna disfunkcija nakon kardiopulmonalnog bypasa je česta i smatra se da nastaje zbog oštećenja endotela uzrokovanog neutrofilima i reperfuzijskom ozljedom. Oslobađanje IL-8 je u značajnoj korelaciji s trajanjem kardiopulmonalnog bypasa.

5. MONOCITNI KEMOTAKSIJSKI PROTEIN - 1 (MCP-1)

MCP-1 (prema engl. „Monocyte Chemoattractant Protein -1“) djeluje kemotaksijski na monocite i makrofage u području upale. Izlučuju ga fibroblasti, endotelne stanice, glatke mišićne stanice krvožilja, monociti, limfociti T i druge stanice koje posreduju migraciju stanica prema upali (87).

MCP-1 je pronađen u **mnogim upalnim stanjima, uključujući aterosklerozu** (Slika 7.). Stoga, ekpresija MCP-1 koji je ključan u borbi protiv upalnih bolesti mora biti precizno regulirana. Povezan je također i s **angiogenezom**. Pokazano je da MCP-1 može inducirati angiogenezu, bilo direktno ili mobiliziranjem drugih stanica kao što su makrofagi vezani uz tumor i angiogeni čimbenici (vaskularni endotelijalni čimbenik rasta (VEGF) i bazični fibroblastni čimbenik rasta).



Slika 7. Biološki učinci MCP-1

MCP-1 je kemokin koji uspješno sudjeluje u **koordinaciji imunomodulacijskih čimbenika**. Zajedno s IL-8 potiče čvrsto prianjanje monocita za vaskularni endotel i njihovu ekstravazaciju .

MCP-1 je također uključen u alergijsku reakciju posredovanu mastocitima i bazofilima sa utjecajem na sintezu leukotriena, oslobađanje histamina i kemotaksiju.

Svi noviji znanstveni dokazi govore u prilog tome da je MCP-1 novi cilj u borbi rijetkih i široko rasprostranjenih upalnih bolesti, uključujući aterosklerozu i malignu bolest.

6. EPIDERMALNI ČIMBENIK RASTA (EGF)

EGF (prema engl. „Epidermal Growth Factor) ima važnu ulogu u regulaciji staničnog rasta, proliferacije i diferencijacije stanica. Navedene biološke učinke uzrokuje vežući se za specifični receptor – EGFR (88).

EGF je polipeptid male molekularne težine koji je prvi puta izoliran iz submandibularne žlijezde slinovnice. Biološki učinci EGF-a iz žlijezda slinovnica je cijeljenje oralnih i gastroezofagalnih vrijedova, smanjenje lučenja želučane kiseline, poticanje sinteze DNA, te mukozna zaštita od oštećenja kao što su želučana kiselina, žučna kiselina, pepsin i tripsin te različiti fizički, kemijski i bakterijski agensi (89).

Zbog povećanog rizika nastanka maligne bolesti putem EGF, inhibicija EGF-a smanjuje rizik malignoma. Lijekovi se većinom baziraju na blokadi EGF receptora i to kao monoklonalna protutijela.

2.3.2 Protuupalni citokini

1. ČIMBENIK RASTA KRVOŽILNOG ENDOTELA (VEGF)

VEGF (prema engl „Vascular Endothelial Growth Factor „) potiče stvaranje novih krvnih žila tokom embrionalnog razvoja, nakon ozljede i stvaranje novih žila (kolateralna cirkulacija) za zaobilaženje područja opstrukcije.

Prekomjerna ekpresija VEGF može doprinijeti razvoju bolesti. Primjerice, karcinomi koji sintetiziraju VEGF brže rastu i metastaziraju. Prevelika ekspresija VEGF–a može uzrokovati

vaskularnu bolest retine i drugih tkiva. Lijekovi kao što su bevacizumab mogu inhibirati VEGF, te na taj način kontrolirati ili usporiti razvoj bolesti.

VEGF je podtip faktora rasta koji su važni signalni proteini uključeni u **vaskulogenezi** (de novo stvaranje embrionalne cirkulacije) i **angiogenezi** (rast krvnih žila iz već prisutne vaskulature) (90).

2. INTERLEUKIN 4 (IL-4)

IL-4 djeluje na limfocite T i B, te monocite, endotelne stanice i fibroblaste. Stimulira ekspresiju važnih kostimulacijskih molekula kao što su CD40, CD80, CD86 i CD 23 te pojačava antigen-prezentirajuću sposobnost limfocita B.

Pored IL-2, IL-4 **potiče rast limfocita T**. Međutim, limfociti T koji izlučuju IL-2 i oni koji izlučuju IL-4 pripadaju različitim podgrupama limfocita T. Izlučivanje IL-4 karakteristično je za limfocite Th2. Naime, limfociti T nakon prepoznavanja antigena razvijaju se u efektorske stanice koje će odstraniti potencijalnu opasnost za jedinku. CD4+ limfociti T nakon aktivacije s antigenom, diferenciraju se u upalne (Th1) i tzv. pomagačke (Th2) limfocite. Čimbenici koji usmjeravaju diferenciranje limfocita T su citokini IL-4 (prema Th2) i IL-12 (prema Th1). Tako Th1 limfociti aktiviraju makrofage i proizvode interferon–γ (IFN-γ), IL-2 i TNF, a Th2 limfociti proizvode IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13.

Diferencijacija limfocita T u Th1 ili Th2 smjeru važno je u imunopatogenezi raznih bolesti (Tablica 1).

Tablica 1. Primjeri bolesti posredovanih limfocitima Th1 i Th2

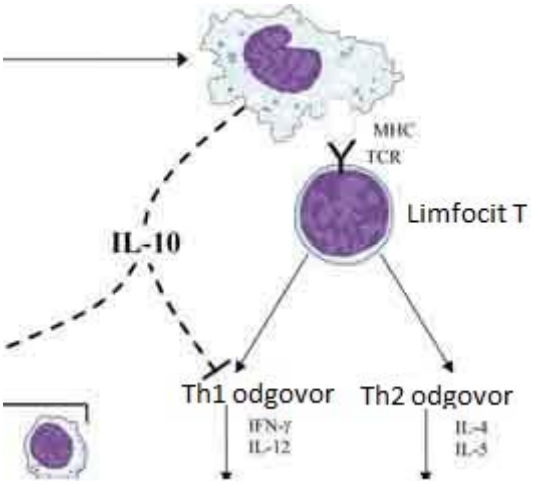
Th1	Th2
Chronova bolest	Alergija
Infekcije helmitima	Gubavost
Reumatoidni artritis	Infekcije protozoama
Trudnoća	Virusne infekcije
Ulkusna bolest (Helicobacter pylori)	(npr. HIV, morbili)

Kritični čimbenik koji usmjerava na diferencijaciju u Th2 smjeru jest rano izlučivanje IL-4. Iako potiče i ekspresiju molekula važnih pri prezentiranju antigena, IL-4 inhibira makrofagima posredovanu upalnu imunoreakciju, o antitijelima ovisnu staničnu citotoksičnost, smanjuje ekspresiju Fcγ receptora i izlučivanje upalnih citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF-α, te produkciju H2O2, dušičnog oksida i PGE2.

Kao i IL-2, IL-4 ima **antitumorsko djelovanje** (91). Pretpostavlja se da potkožna primjena IL-4 aktivira za tumorske antigene specifične limfocite T, pa su u toku klinička istraživanja o anti-tumorskom djelovanju IL-4 u bolesnika s karcinomom bubrega i metastatskim melanomom.

3. INTERLEUKIN 10 (IL-10)

IL-10 je protuupalni citokin koji prvenstveno stvaraju monociti i u manjoj mjeri limfociti. Njegovo imunosupresivno djelovanje posljedica je **inhibicije aktivnosti antigen prezentirajućih stanica (APC)**. IL-10 značajno suprimira aktivnost makrofaga inhibirajući njihovu sposobnost izlučivanja citokina, te potiče limfocite T i NK staničnu funkciju (Slika 8.).

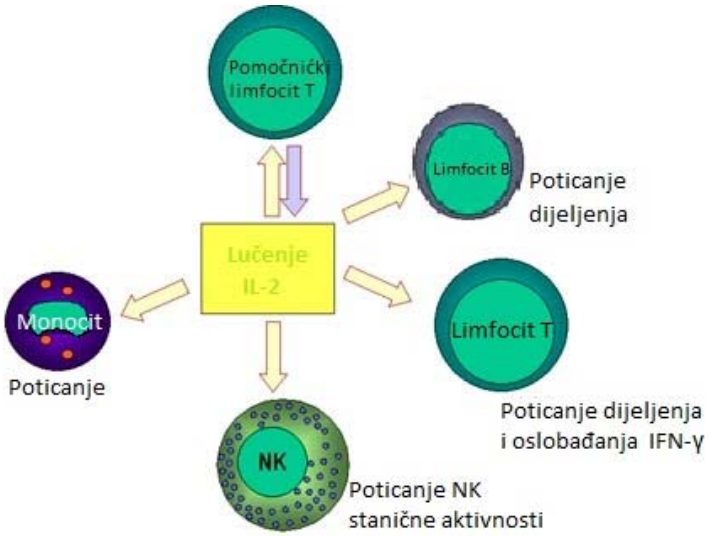


Slika 8. Biološki učinci IL-10

IL-10 **suprimira staničnu imunost** potiskujući stvaranje PGE2 i proupalnih citokina, te IL-2 i IFN-γ. Isto tako, potiče oslobađanje topljivog TNF receptora i inhibira ekpresiju adhezijske molekule ICAM-1. Epstein-Barrov virus uzrokuje imunosupresiju sličnu onoj izazvanoj s IL-10. Indukcija sinteze IL-10 tokom infekcije može biti važna strategija putem koje mikroorganizmi zaobilaze staničnu imunost organizma posredovano uništenje. IL-10 također stimulira rast i diferencijaciju limfocita B.

2.3.3 Citokini koje luče pomagački limfociti T

1. INTERLEUKIN 2 (IL-2)



Slika 9. Biološki učinci IL-2

IL-2 je citokin kojeg prvenstveno luče aktivirani pomagački limfociti T. Nakon aktivacije s antigenom, pomagački limfociti T izlučuju IL-2 i izražavaju specifične receptore pa autokrinim djelovanjem potiče klonsku ekspanziju samo antigenom potaknutih limfocita T. Time se povećava njihov broj i omogućava povoljan ishod imunoreakcije u npr. virusnoj infekciji. Kada limfocit T prepozna antigen svojim receptorom, u stanici se inducira više faktora prepisivanja koji se vežu za

promotorske regije gena za IL-2 i njegovog receptora, te pokreću njihovo prepisivanje (Slika 9.). Tako će samo limfociti T specifični za antigen koji je pokrenuo imunoreakciju biti potaknuti na proliferaciju. Prepisivanje gena za IL-2 u limfocitima T neće nužno dovesti do izlučivanja IL-2. Ako pored antigena predočenog limfocitu T, ta stanica ne primi tzv. drugi signal preko kostimulacijske molekule CD28, količina izlučenog IL-2 bit će nedovoljna za proliferiranje limfocita T. To stanje zovemo **anergija.** Vezivanjem CD28 na limfocitu T s njegovim ligandima CD80 i/ili CD86 na antigen prezentirajućoj stanici, limfocit T prima signal koji dovodi do stabiliziranja glasničke RNK za IL-2 i daljnjeg pojačanja njenog prepisivanja. Izlučeni IL-2 djeluje na stanicu koja ga izlučuje (**autokrino djelovanje**) i na okolne limfocite T ako izražavaju receptor za IL-2 (**parakrino djelovanje**). Pored pomagačkih limfocita T pokazano je da IL-2 izlučuju i timociti, limfociti γδ T, limfociti B, citotoksični limfociti (CD8 +), neuroni i astrociti.

Osim **proliferacije limfocita T**, IL-2 potiče **rast i diferencijaciju limfocita B**, te **pojačava aktivnost prirodnoubilačkih stanica** (slika 9). Stanice koje nazivamo limfokinima aktivirane stanice (LAK) nastaju iz IL-2 aktiviranih NK stanica. On aktivira i pojačava funkciju neutrofila, monocita i limfocita γδ T. IL-2 djeluje i kao imunomodulator jer potiče rast stanica glije, a u obliku dimera obnavlja aksone štakorskih optičkih živaca (92).

2. INTERFERON GAMA (IFN-γ)

IFN-γ luče CD4+ i CD8+ limfociti T i NK stanice. Ima značajno imunoregulacijsko djelovanje. Zajedno sa IFN-α i β, IFN-γ je inhibitor replikacije virusa. IFN-γ utječe na razred protutijela koja stvaraju limfociti, potiče ekspresiju MHC klase I i II antigena, važan je aktivator nastanka limfocita Th1 i stanično posredovane imunosti. Povećava učinkovitost makrofaga u uništenju intracelularnih parazita i inhibira aktivnost limfocita Th 2.

3 HIPOTEZA

Pretpostavka predloženog istraživanja je da će tip anestezije i operativnim zahvatom uzrokovana bol dovesti do imunomodulacijskih promjena u citokinskoj mreži proupalnih i protuupalnih citokina koje mogu biti na korist ili na štetu bolesnika.

4 CILJ ISTRAŽIVANJA

U pacijenata prije i nakon operativnog zahvata koji su bili podvrgnuti regionalnoj (spinalnoj) ili općoj anesteziji želimo utvrditi da li regionalna ili opća anestezija uzrokuje karakterističan uzorak citokina.

Cilj je istražiti da li regionalnu (spinalnu) ili opću anesteziju prati veća incidencija komplikacija (infekcije, potreba za transfuzijom krvnih derivata itd.) .

5 PLAN ISTRAŽIVANJA

5.1 Ispitanici

Istraživanje je obuhvatilo mjerenje koncentracije serumskih proupalnih i protuupalnih citokina u 40 pacijenata koji su oboljeli od benigne hiperplazije prostate te su se podvrgli TURP-u . Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe : pacijenti anesteziranu u općoj anesteziji i pacijenti anesteziranu u reginalnoj (spinalnoj) anesteziji.

Kriteriji za odabir ispitanika su pacijenti koji spadaju po ASA klasifikaciji u grupu I ili II. U ispitivanje nisu uključeni ispitanici kod kojih nalazimo takva stanja ili bolesti koja bi mogla utjecati na usmjerenje imunološkog odgovora , a to su: primarne i sekundarne imunodeficijencije, autoimune bolesti, endokrine bolesti, kortikosteroidna supresivna terapija, primjena citostatika i radioterapije, zarazne i maligne bolesti.

Kontrolna skupina sastojala se od 20 zdravih dobrovoljaca, iste dobi kao i ispitanici koji su podvrgnuti operativnom zahvatu. Ispitanici su prije uzimanja uzorka krvi dali svoju pismenu suglasnost. Nakon operativnog zahvata pratila potreba za transfuzijom krvnih derivata, pojava infekcije, te sve druge komplikacije koje budu vezane uz anesteziju ili sami operativni zahvat.

Transfuzija krvi se ordinirala pri vrijednosti Hgb nižim od 90g/L ili Htc 0.30 obzirom da se radi o pacijentima starije životne dobi.

Potrebno je zadovoljiti minimalno dva navedena kriterija za definiciju infekcije :

- Izoliran patološki mikroorganizam iz uzetog mikrobiološkog uzorka
- Vrućica – unutrašnja temperatura ↑ od 38.3˚ C
- Hipotermija – unutrašnja temperatura ↓ 36˚ C
- Frekvencija otkucaja srca veća od 9o u minuti
- Respiratorna frekvencija veća od 30 u minuti
- Hiperglikemija (glukoza u plazmi veća od 120 mg/dl) uz odsutnost dijabetesa
- Broj leukocita veći od 12x 10 9 ili manji od 4x 10 9
- Normalan broj leukocita uz 10% nezrelih oblika
- C- reaktivni protein u plazmi ↑ 2 SD iznad normalnih vrijednosti

Protokoli za provođenje opće i regionalne (spinalne) anestezije:

Svi pacijenti kao premedikaciju su primili 7.5 mg midazolama p.o. sat vremena prije ulaska u operativnu salu.

Opća anestezija inducirala se sa propofolom (2mg/kg) i fentanylom (2 μg/ kg),a održavala se sa sevofluranom (1.0- 2.0 vol%, end- tidal koncentracije) i smjesom dušićnog oksidula/ kisika (frakcija inspiratornog kisika 0.3).

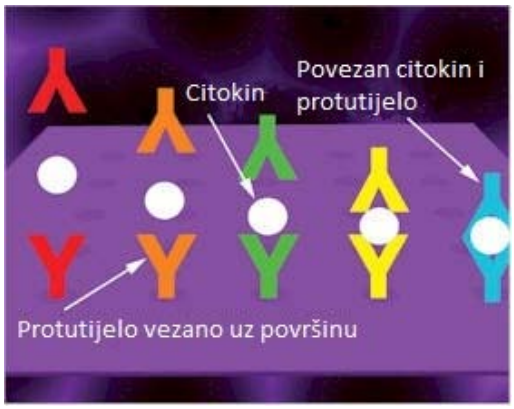
Regionalna (spinalna) anestezija inducirala se lokalnim anestetikom 0.5% levobupivacainom (15 mg) koji se aplicirao Whitacre/Quincke spinalnom iglom debljine 25 Gy u L3-L4 subduralni prostor. Prije apliciranja lokalnog anestetika koža u zadanom području se infiltrirala sa 2% lidocainom (20 mg).

Kontinuirana infuzija elektrolitskih otopina (5 ml/kg /h) provodila se tokom operativnog zahvata. Monitoring uključuje srčanu frekvenciju, sistolički i dijastolički krvni tlak, srednji arterijski tlak, saturaciju, te u grupi koja je bila u općoj anesteziji end-ekspiratorne vrijednosti sevoflurana.

5.2 Način određivanja razine citokina u perifernoj krvi

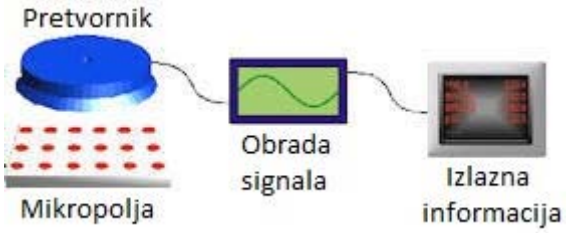
Proupalne (IL-1α; IL-1β; TNF-α; IL-6; IL-8; MCP-1; VEGF; EGF) i protuupalne citokine (IL-4; IL-10), te citokine koje luče pomagački limfociti Th1 (IL-2; IFN-γ) odredilo se u serumu bolesnika na mikročipu tvrtke Randox (Crumlin, UK) pomoću analizatora Evidence Biochip Array Analyser. Uzorci su se uzimali 2 sata prije operacije, te prvi, treći i peti dan nakon operativnog zahvata.

Biochip Array tehnologija se koristi u simultanom kvantitativnom određivanju različitih citokina iz jednog pacijentovog uzorka (93). Osnovna tehnologija je mikročip tvrtke Randox koji sadrži polja testnih regija sa mobiliziranim protutijelima specifičnim za različite citokine i faktore rasta (prema engl.“ sandwich chemiluminescent immunoassay”). Analizom uzorka, citokini se vežu za protutijelo vezano uz površinu biočipa (Slika 10.). U uzorak se potom doda sekundarno protutijelo (konjugirano) koje se veže na drugu funkcionalnu grupu vezanog citokina. Povećana vrijednost citokina u uzorku dovesti će do povećanog vezivanja protutijela vezanog uz peroksidazu (HRP) i pojačanja kemiluminiscentnog signala.



Slika 10. Prikaz spajanja citokina i protutijela vezanog uz površinu biočipa

Svjetlosni signal generiran iz svake testne regije na biočipu zabilježen je digitalnom tehnologijom i uspoređen sa referalnim vrijednostima. Koncentracija citokina prisutna u uzorku izračunata je putem kalibracijske krivulje (Slika 11.) i prikazana na ekranu.



Slika 11. Princip generiranja signala i njegova bilježenja

5.3 Statistička analiza podataka

Podatci su prikazani tablično i grafički. Napravljena je deskriptivna statistika s odgovarajućim mjerama centralne tendencije (aritmetičke sredine i standardne devijacije, odnosno medijani i pripadajući interkvartilni rasponi). Analiza normalnosti raspodjele je provedena Smirnov-Kolmogorovljevim testom, te su se shodno dobivenim rezultatima u daljnoj analizi koristili parametrijski testovi (nezavisni i zavisni t test, analiza varijance i opći linearni model za ponavljana mjerenja). Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška PASW for Windows, verzija 17.02.

6 REZULTATI

6.1 Demografske karakteristike i trajanje operacije u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

U Tablici 2. prikazana je prosječna dob, tjelesna težina i visina, indeks tjelesne mase (BMI) i trajanje operacije u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji. Kao što se vidi iz tabličnog prikaza ne postoje značajna odstupanja u tjelesnim proporcijama i dobi pacijenta. U obje skupine, spinalnoj i općoj anesteziji, radi se o pacijentima muškog spola i starije životne dobi. Prosječna dob je 69 godina što je očekivano obzirom na promatranu patologiju – benigna hipertrofija prostate, te BMI 26.72. Prosječno trajanje operacije pacijenata u općoj anesteziji je bilo 50 minuta, a prosječno trajanje operacije pacijenata u spinalnoj anesteziji bilo je 45 minuta. Ta razlika nije statistički značajna (p=0.123).

Tablica 2. Demografske karakteristike pacijenata u studiji

Karakteristika	Spinalna anestezija (n =20)	Opća anestezija (n =20)	P **
Dob (godine)	69.00 (65.00-74.75)*	73.00 (65.00-75.00)	0.63
Tjelesna visina (cm)	175.00 (172.25-177.75)	175.00 (170.00-180.00)	0.728
Tjelesna težina (kg)	83.06 (60-110)	74.000 (71.00 -82.00)	0.259
BMI	26.72 (23.81-31.19)	25.10 (23.03-26.72)	0.150
Trajanje operacije (min)	45.00 (41.25-63.75)	50.00 (40.00-80.00)	0.123

* Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon

** t-test za nezavisne uzorke

6.2 Preoperativne i postoperativne vrijednosti laboratorijskih parametara u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

U Tablici 3. prikazane su vrijednosti leukocita, eritrocita, hematokrita, hemoglobina, trombocita, protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, C-reaktivnog proteina i fibrinogena prije i nakon operacije u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji. Statistička usporedba navedenih laboratorijskih parametara pokazala je da nema značajne razlike između tih skupina ispitanika.

Tablica 3. Usporedba preoperativnih i postoperativnih laboratorijskih parametara u pacijenta u općoj i spinalnoj anesteziji

Parametar	Preoperativno			Postoperativno		
	Opća anestezija	Spinalna anestezija	P	Opća anestezija	Spinalna anestezija	P **
Leukociti (10^9/L)	7.30 * (5.80-8.00)	6.88 (6.23 -8.10)	0.974	8.60 (7.30-9.20)	8.75 (7.45-10.15)	0.314
Eritrociti (10^{12}/L)	4.60 (4.47-5.08)	4.84 (4.48-5.08)	0.377	4.43 (4.08-4.81)	4.46 (3.68-4.80)	0.455
Hematokrit (L/L)	0.42 (0.40-0.44)	0.45 (0.40-0.46)	0.535	0.39 (0.37-0.41)	0.39 (0.36-0.42)	0.460
Hemoglobin (g/L)	143.00 (136.0-150.0)	149.50 (138.75-154.0)	0.301	121.00 (118.00-129.00)	126.50 (116.50-34.00)	0.974
Trombociti (10^9/L)	266.00 (207.0-311.0)	233.00 (188.25-271.75)	0.176	210.00 (161.00-276.00)	191.00 (163.0-256.75)	0.301
PV (protrombinsko vrijeme)	1.05 (0.95-1.19)	1.05 (0.96-1.15)	0.333	1.05 (0.92-1.16)	1.04 (0.93-1.10)	0.708
APTV(aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme) (s)	27.00 (24.20-30.40)	28.00 (26.13-30.18)	0.392	29.30 (25.70-30.50)	29.50 (24.63-30.60)	0.479
CRP (C-reaktivni protein) (mg/L)	5.60 (3.40-8.60)	5.75 (4.40-10.10)	0.508	12.90 (9.30-20.80)	9.75 (17.90-17.63)	0.784
Fibrinogen (g/L)	2.80 (2.50-3.60)	3.10 (2.83-3.48)	0.922	3.40 (3.10-3.80)	3.15 (2.93-3.55)	0.922

* Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon
** t-test za nezavisne uzorke

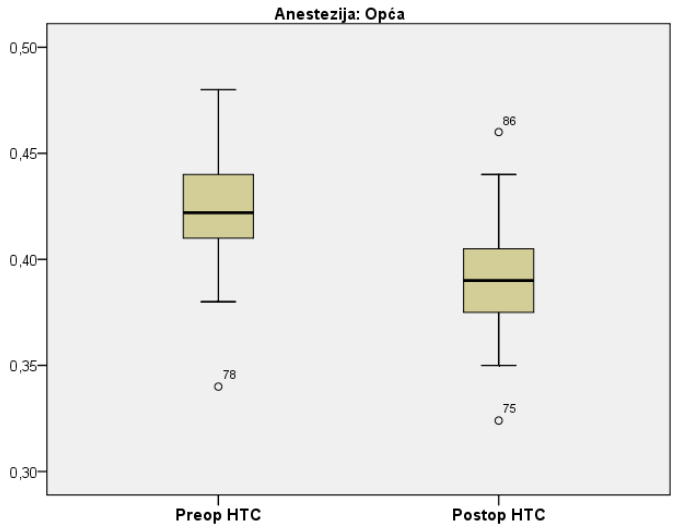
6.3 Preoperativne i postoperativne vrijednosti laboratorijskih parametara u pacijenata u općoj anesteziji

Postoperativne promjene praćenih laboratorijskih parametara u pacijenata u općoj anesteziji prikazane su u Tablici 4. Opažene promjene u broju leukocita i eritrocita nisu statistički značajne. Nasuprot tome, opća anestezija dovela je do statistički značajnog pada hematokrita (Tablica 4., Slika 12.; p=0.026) i hemoglobina (Tablica 4., Slika 13.; p=0.01). Postoperativne vrijednosti hemoglobina (125±14) i hematokrita (0.39±0.04) nisu zahtijevale nadoknadu koncentratima eritrocita. Isto tako, opća je anestezija dovela do statistički značajnog postoperativnog pada trombocita (Tablica 4., Slika 14.; p=0.03). Uzrok tome je vjerojatno krvarenje kao što se predmnijeva i za postoperativni pad vrijednosti hemoglobina i hematokrita. Opća anestezija ne uzrokuje značajne promjene PV, APTV i fibrinogena (Tablica 4.). Nasuprot tome, u pacijenata u općoj anesteziji dolazi do statistički značajnog porasta upalnog parametra CRP-a (Tablica 4., Slika 15.; p=0.02).

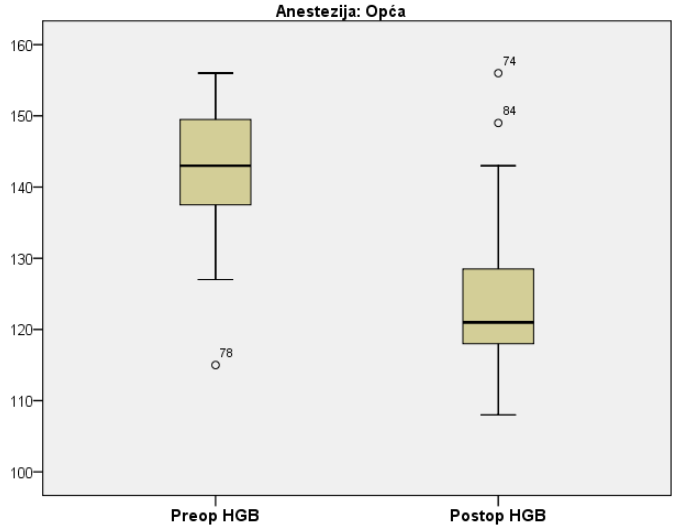
Tablica 4. Usporedba preoperativnih i postoperativnih laboratorijskih parametara u pacijenata u općoj anesteziji

Parametar	Opća anestezija		
	Preoperativno	Postoperativno	P **
Leukociti (10^9/L)	7.36 ± 1.71*	8.24 ± 1.30	0.104
Eritrociti (10^{12}/L)	4.66 ± 0.40	4.42 ± 0.44	0.107
Hematokrit (L/L)	0.42 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.026
Hemoglobin (g/L)	141.87± 0.93	125.53 ± 14.00	0.001
Trombociti (10^9/L)	268.07± 6.33	229.07 ± 72.66	0.003
PV (protrombinsko vrijeme)	1.07 ± 0.15	1.05 ± 0.14	0.451
APTV(aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme) (s)	26.33 ± 8.29	28.53 ± 3.78	0.297
CRP(C-reaktivni protein) (mg/L)	6.49 ± 3.37	15.29 ± 8.19	0.002
Fibrinogen (g/L)	3.00 ± 1.08	3.34 ± 0.66	0.241

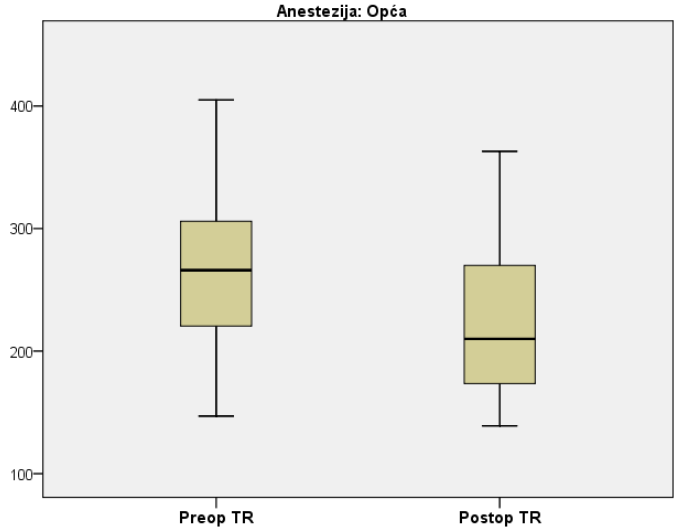
* Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom pogreškom
** t-test za zavisne uzorke



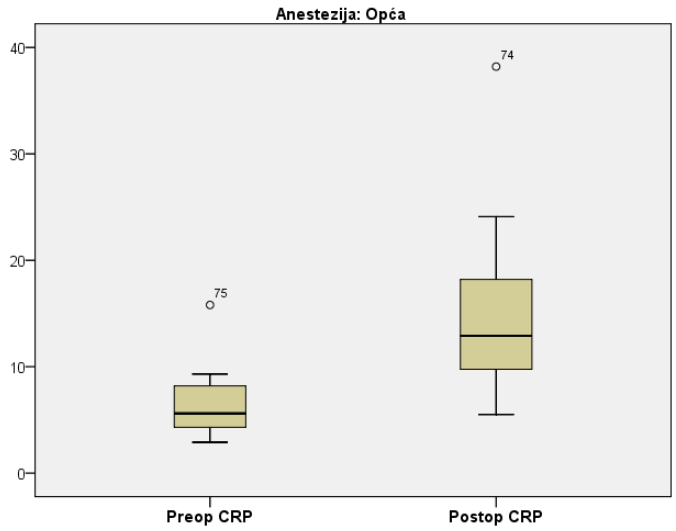
Slika 12. Preoperativne i postoperativne vrijednosti hematokrita u pacijenata u općoj anesteziji.



Slika 13. Preoperativne i postoperativne vrijednosti hemoglobina u pacijenata u općoj anesteziji.



Slika 14. Preoperativne i postoperativne vrijednosti trombocita u pacijenata u općoj anesteziji.



Slika 15. Preoperativne i postoperativne vrijednosti CRP-a u pacijenata u općoj anesteziji.

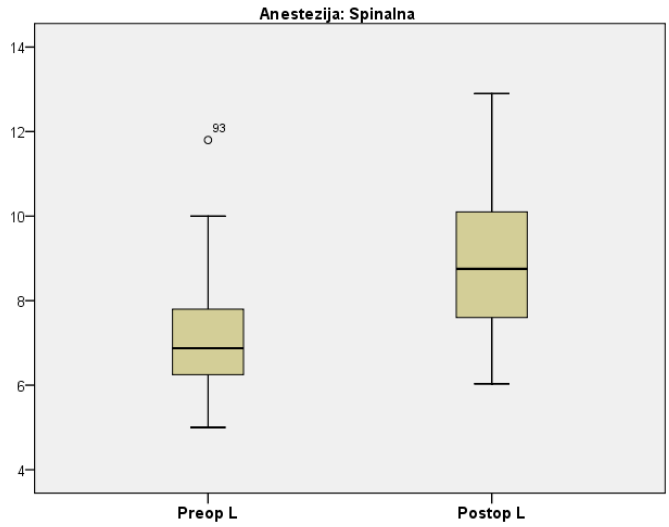
6.4 Preoperativne i postoperativne vrijednosti laboratorijskih parametara u pacijenata u spinalnoj anesteziji

Postoperativne promjene laboratorijskih parametara u pacijenata u spinalnoj anesteziji prikazane su u Tablici 5. Nakon spinalne anestezije dolazi do značajnog porasta leukocita nakon operacije (Tablica 5., Slika 16.; p=0.027). Nasuprot tome, u tih pacijenta dolazi do značajnog pada hematokrita (Tablica 5., Slika 17.; p<0.001), eritrocita (Tablica 5., Slika 18.; p=0.001) i hemoglobina (Tablica 5., Slika 19.; p<0.001). Isto tako, postoperativno je značajno snižen broj trombocita (Tablica 5., Slika 20.; p=0.015). Spinalna anestezija ne uzrokuje promjene PV, APTV niti fibrinogena (Tablica 5.). Kao i nakon opće anestezije postoperativno se opaža statistički značajan porast CRP-a (Tablica 5., Slika 21.; p=0.011).

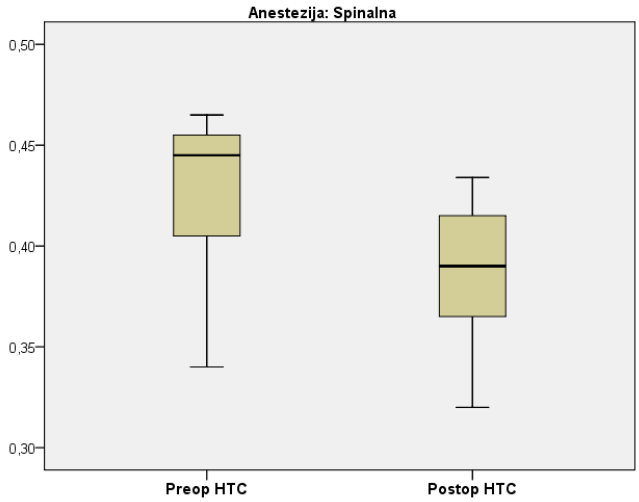
Tablica 5. Usporedba preoperativnih i postoperativnih laboratorijskih parametara u pacijenata u spinalnoj anesteziji

Parametar	Spinalna anestezija		
	Preoperativno	Postoperativno	P **
Leukociti (10^9/L)	7.38 ± 1.80*	8.82 ± 1.80	0.027
Eritrociti (10^{12}/L)	4.79 ± 0.40	4.28 ± 0.57	0.001
Hematokrit (L/L)	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.04	< 0.001
Hemoglobin (g/L)	146.13± 1.54	125.38± 12.89	< 0.001
Trombociti (10^9/L)	234.69± 57.0	204.94± 54.19	0.015
PV (protrombinsko vrijeme)	1.02 ± 0.15	1.03 ± 0.14	0.814
APTV(aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme) (s)	28.21 ± 2.58	26.96 ± 7.64	0.562
CRP(C-reaktivni protein) (mg/L)	7.41 ± 4.15	14.31 ± 11.27	0.011
Fibrinogen (g/L)	3.03 ± 0.66	3.36 ± 0.60	0.062

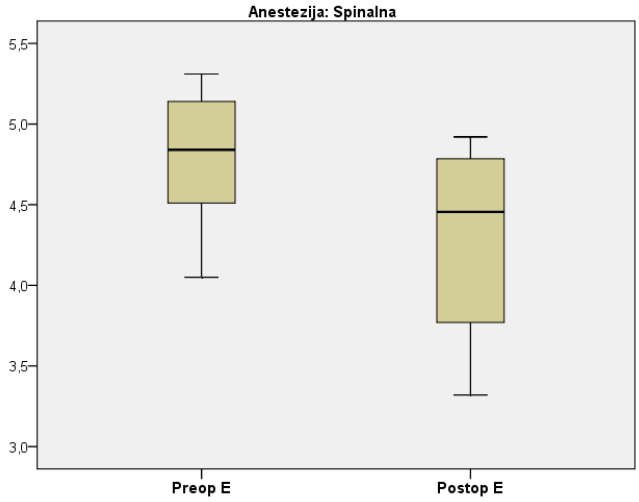
* Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina s standardnom pogreškom
** t-test za zavisne uzorke



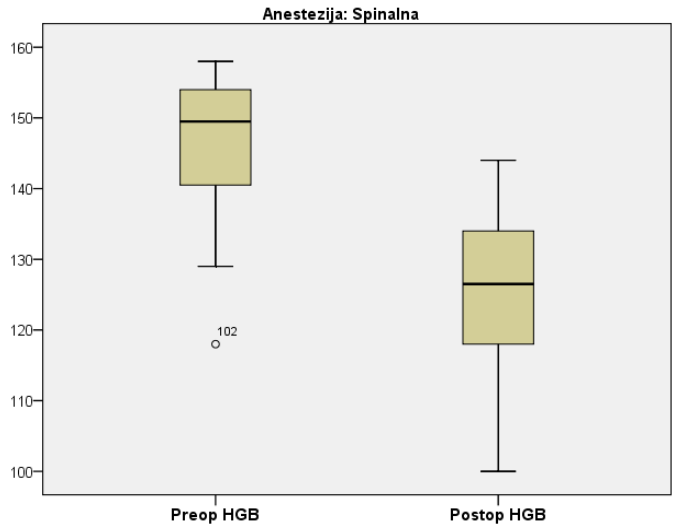
Slika 16. Preoperativne i postoperativne vrijednosti leukocita u pacijenata u spinalnoj anesteziji.



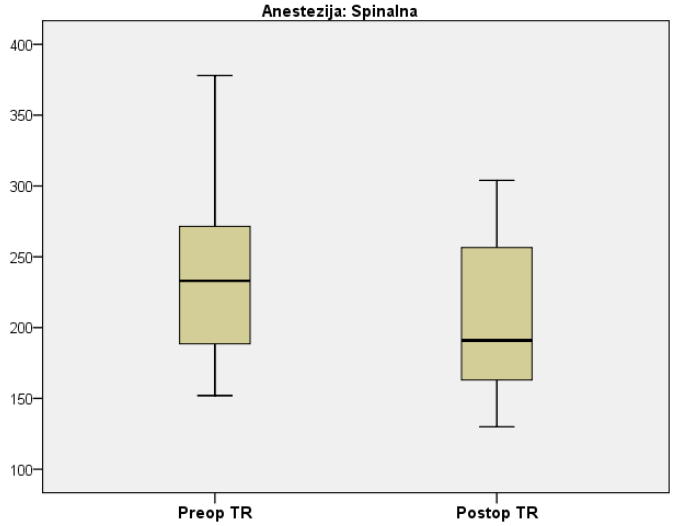
Slika 17. Preoperativne i postoperativne vrijednosti hematokrita u pacijenata u spinalnoj anesteziji.



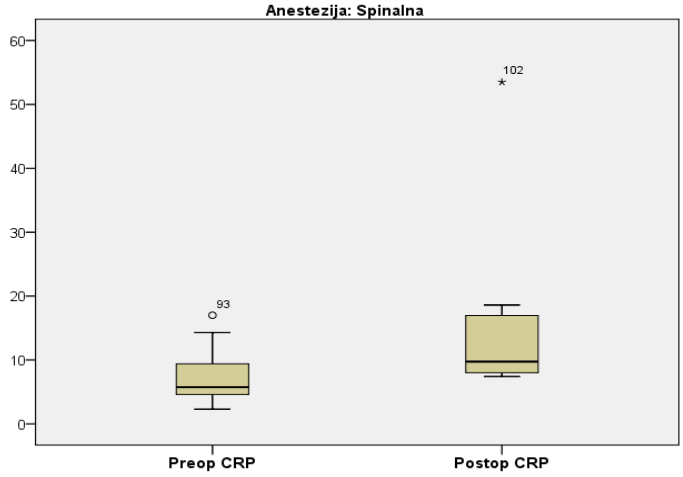
Slika 18. Preoperativne i postoperativne vrijednosti eritrocita u pacijenata u spinalnoj anesteziji.



Slika 19. Preoperativne i postoperativne vrijednosti hemoglobina u pacijenata u spinalnoj anesteziji.



Slika 20. Preoperativne i postoperativne vrijednosti trombocita u pacijenata u spinalnoj anesteziji.



Slika 21. Preoperativne i postoperativne vrijednosti CRP-a u pacijenata u spinalnoj anesteziji.

6.5 Serumske koncentracije mjerenih citokina u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

Preoperativne koncentracije, te koncentracije prvi, treći i peti postoperativni dan svih analiziranih citokina u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazane su u Tablici 6. Od svih istraživanih citokina samo se preoperativne koncentracije IL-2 razlikuju između pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji. Statistička analiza pokazala je da je preoperativna koncentracija IL-2 značajno snižena u skupini pacijenata sa spinalnom anestezijom u usporedbi s koncentracijom u pacijenata sa općom anestezijom (Tablica 6., Slika 22.; p=0.028). Ovu razliku je teško objasniti s obzirom na to da su pacijenti randomizirano odabrani za svaki pojedini tip anestezije te se s razlogom očekivala njihova normalna raspodjela u ispitivane skupine.

Tablica 6. Serumske koncentracije citokina prije uvoda u anesteziju (t_0), te prvi (t_1), treći (t_3) i peti (t_5) postoperativni dan

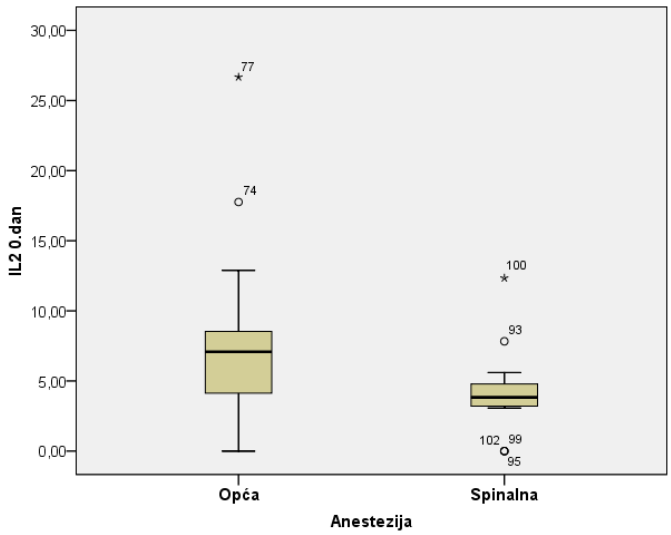
Citokin	Vrijeme	Spinalna anestezija	Opća anestezija
IL-2 (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	4.00 ± 0.76 3.62 ± 0.69 3.62 ± 0.91 4.00 ± 2.57	8.22 ± 1.70** 6.20 ± 1.12** 6.06 ± 0.98** 8.70 ± 3.73
IFN-γ (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	2.68 ± 0.57 4.77 ± 1.60 5.39 ± 2.11 2.94 ± 0.62	5.21 ± 2.08 8.64 ± 3.46 1.63 ± 0.35 2.76 ± 0.61
IL-6 (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	2.08 ± 0.37 43.67 ± 20.91* 15.57 ± 12.22 10.36 ± 8-99	1.67 ± 0.30 48.40 ± 18.56* 9.96 ± 1.66 6.09 ± 4.33
TNF-α (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	5.33 ± 0.92 7.08 ± 2.39 5.97 ± 0.73 4.76 ± 0.91	5.42 ± 0.69 7.13 ± 1.31 4.18 ± 0.45 6.14 ± 0.93
IL-1α (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	0.31 ± 0.11 0.22 ± 0.09 0.17± 0.08 0.20 ± 0.08	0.57 ± 0.15 0.32 ± 0.09 0.25 ± 0.05 0.36 ± 0.10

IL-1β (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	0.86 ± 0.37 1.09 ± 0.44 0.88 ± 0.37 0.67 ± 0.38	0.79 ± 0.39 0.61 ± 0.17 1.32 ± 0.78 0.43 ± 0.11
IL-8 (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	48.35 ± 11.35 131.25 ± 99.67 62.63 ± 32.86 62.56 ± 32.39	44.26 ± 21.34 56.48 ± 22.06 208.61 ± 128.02 27.63 ± 16.16
MCP-1 (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	361.03 ± 111.88 350.35 ± 44.92 269.55 ± 19.94 272.05 ± 21.20	245.32 ± 23.52 350.60 ± 58.81 243.98 ± 27.91 240.52 ± 21.95
IL-4 (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	1.76 ± 1.09 1.80 ± 0.82 0.98 ± 0.50 8.18 ± 6.88	2.25 ± 0.93 2.06 ± 0.73 2.13 ± 0.51 1.84 ± 0.65
IL-10 (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	0.35 ± 0.15 1.01 ± 0.25 0.58 ± 0.16 0.66 ± 0.21	1.08 ± 0.41 22.58 ± 20.72 0.73 ± 0.19 1.17 ± 0.47
VEGF (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	150.24 ± 21.95 175.54 ± 22.77 201.91± 33.21 192.51 ± 26.67	200.25 ± 34.26 187.92 ± 19.02 207.39 ± 24.46 274.42 ± 37.16
EGF (pg/ml)	t_0 t_1 t_3 t_5	225.69 (114.78) 176.18 (71.57) 257.29 (170.29) 186.29 (118.87)	176.76 ± 22.71 162.52 ± 21.26 169.61± 29.35 165.75 ± 34.78

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina sa standardnom pogreškom

*$p<0.05$ usporedba sa preoperativnim vrijednostima
**$p<0.05$ usporedba između grupa

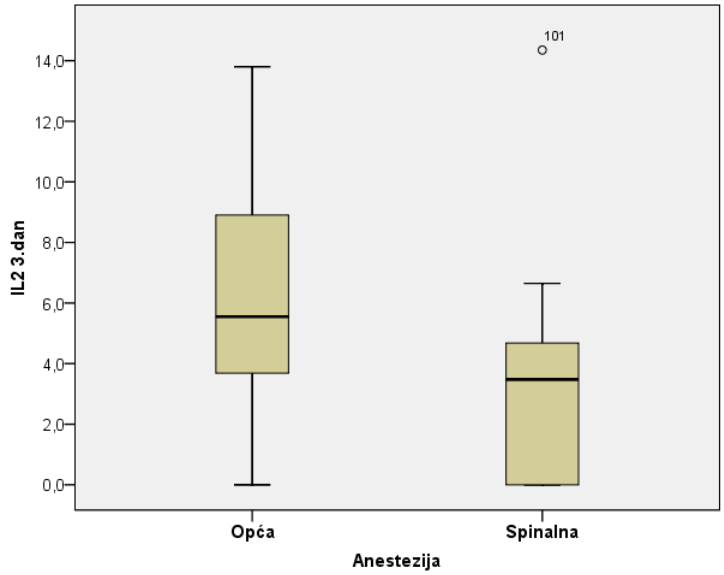
Opažene razlike u koncentracijama analiziranih proupalnih, protuupalnih i citokina koji luče pomagački limfociti Th1 među skupinama ispitanika prvi postoperativni dan nisu statistički značajne (Tablica 6.).



Slika 22. Usporedba preoperativnih koncentracija IL-2 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.

Serumske koncentracije analiziranih citokina treći postoperativni dan u skupinama pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji također su prikazani u Tablici 6. Opažena serumska koncentracija IL-2 u skupini ispitanika u općoj anesteziji je statistički značajno veća u usporedbi s koncentracijom u ispitanika u spinalnoj anesteziji (Tablica 6., Slika 23.; p=0.048). Razlike u serumskoj koncentraciji ostalih citokina nisu statistički značajne.

Serumske koncentracije analiziranih citokina peti postoperativni dan u skupinama pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazani su u Tablici 6. Opažene razlike u koncentracijama analiziranih proupalnih, protuupalnih i citokina koji luče pomagački limfociti Th1 među skupinama ispitanika nisu statistički značajne.

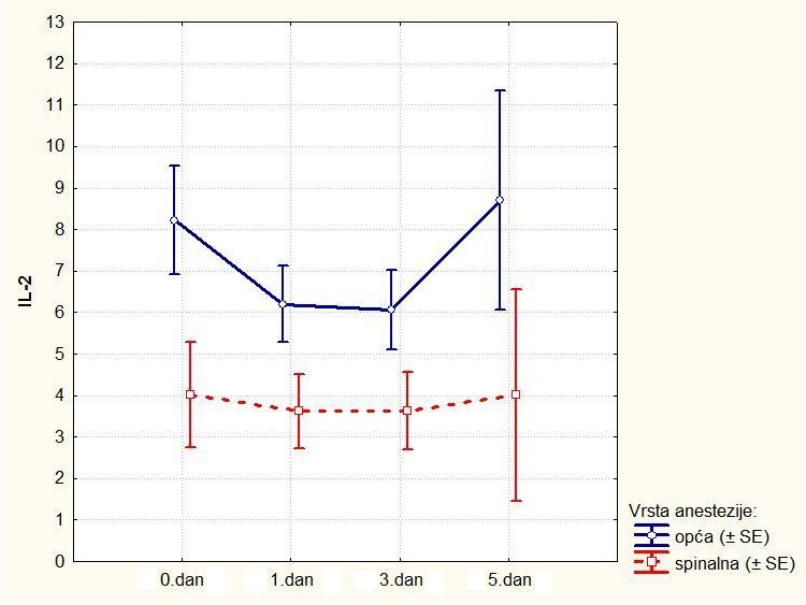


Slika 23. Usporedba koncentracija IL-2 izmjerenih treći postoperativni dan u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.

6.6 Postoperativne koncentracije serumskih citokina u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.1 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-2 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

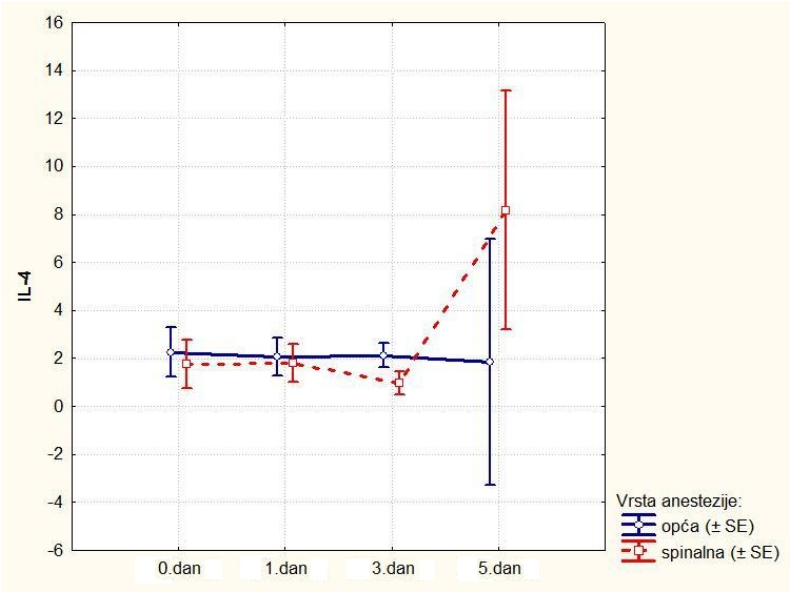
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-2 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 24. Vrijednosti IL-2 grafički su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna pogreška. Spinalna anestezija ne uzrokuje značajne promjene u postoperativnim serumskim koncentracijama IL-2. Nasuprot tome, opća anestezija smanjuje serumsku koncentraciju IL-2 prvi i treći postoperativni dan. Te razlike nisu statistički značajne u usporedbi s preoperativnom koncentracijom IL-2 ($p>0.05$). Nakon trećeg postoperativnog dana, koncentracija IL-2 se povećava i dostiže preoperativnu razinu petog postoperativnog dana. Serumska razina IL-2 je statistički značajno veća u svim točkama mjerenja, osim petog postoperativnog dana, u pacijenata u općoj anesteziji u usporedbi sa koncentracijama pacijenata u spinalnoj anesteziji ($p=0.043$).



Slika 24. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-2 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.2 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-4 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

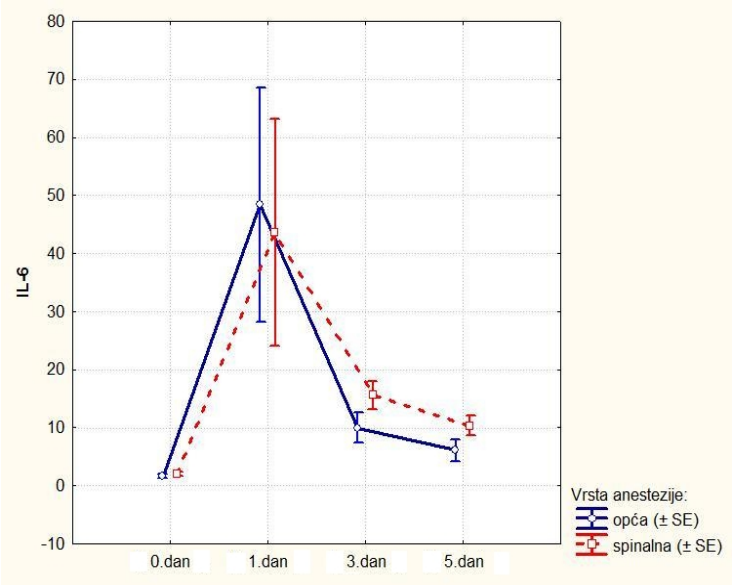
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-4 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 25. Vrijednosti IL-4 grafički su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna pogreška. Porast serumske koncentracije IL-4 opažen je peti postoperativni dan u pacijenata u spinalnoj anesteziji. Ta razlika nije statistički značajna u odnosu na preoperativnu koncentraciju u tih pacijenata. Isto tako, nema značajne razlike u dinamici IL-4 između opće i spinalne anestezije ($p=0.571$).



Slika 25. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-4 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.3 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-6 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

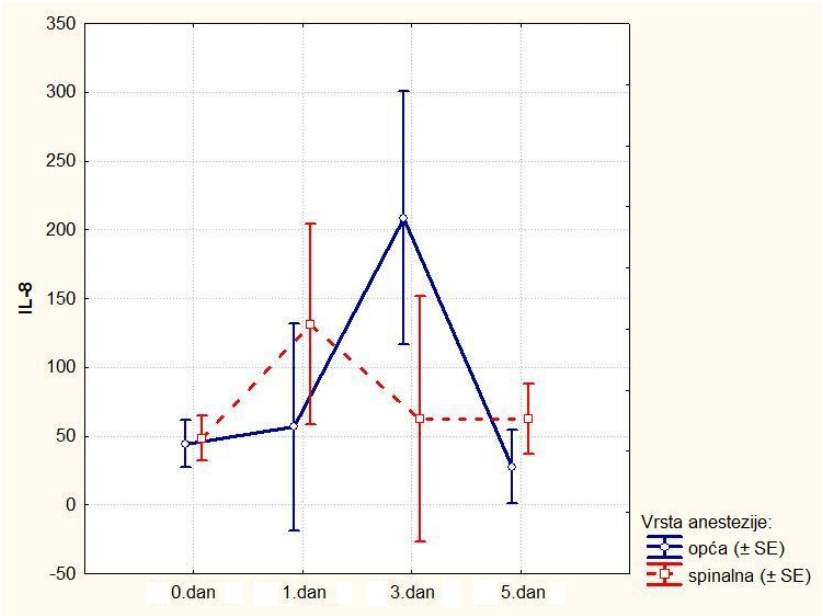
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-6 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 26. Vrijednosti IL-6 grafički su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna pogreška. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-6 u pacijenta u općoj i spinalnoj anesteziji statistički se značajno ne razlikuje (p=0.860). Značajan porast IL-6 opaža se prvi postoperativni dan u pacijenata u općoj (p=0.03) i spinalnoj (p=0.043) anesteziji. Nakon toga, koncentracija IL-6 opada i petog postoperativnog dana se približava preoperativnim vrijednostima (Slika 26.).



Slika 26. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-6 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.4 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-8 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

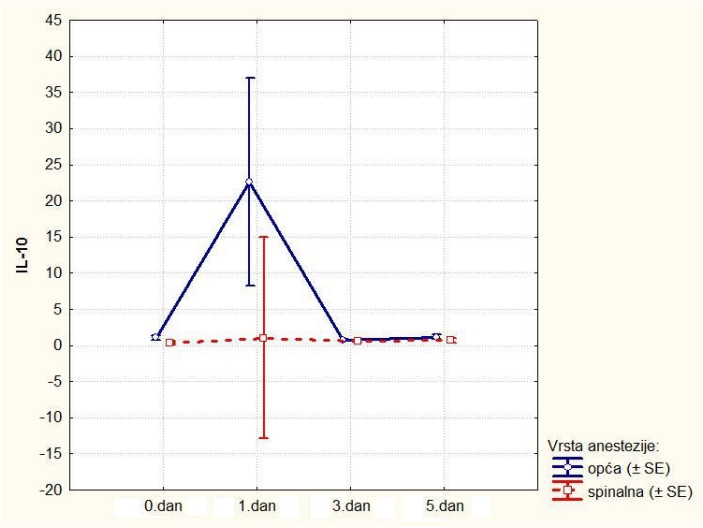
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-8 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 27. Vrijednosti IL-8 grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Prolazni porast IL-8 opažen je prvi postoperativni dan u pacijenata u spinalnoj anesteziji i treći postoperativni dan u pacijenata u općoj anesteziji. Ove razlike u dinamici između pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji nisu statistički značajne (p= 0.844). Isto tako, nema statistički značajne razlike između opaženih vrijednosti unutar opće i spinalne anestezije (Scheffeov post hoc test variable).



Slika 27. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-8 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.5 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-10 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

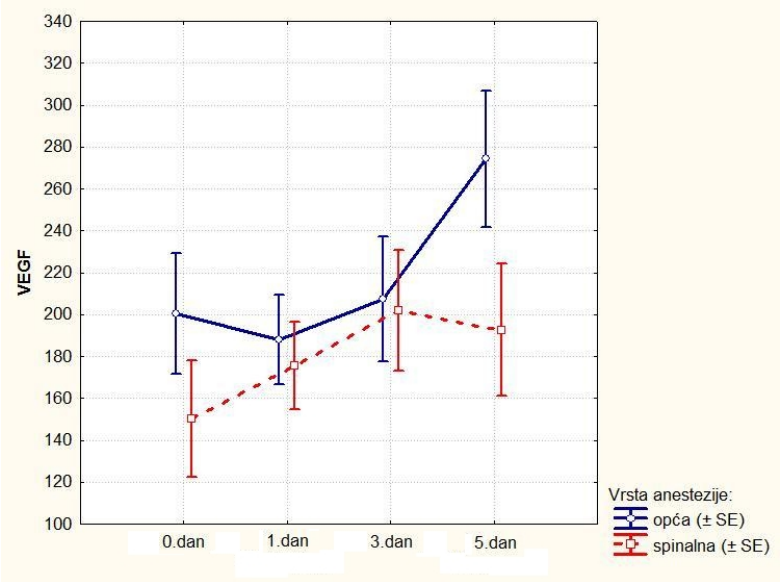
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-10 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 28. Vrijednosti IL-10 grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Izraziti porast IL-10 opažen je prvi postoperativni dan u pacijenata u općoj anesteziji. Taj porast nije značajan u odnosu na preoperativnu koncentraciju u pacijenata u općoj anesteziji. Isto tako, nema statistički značajne razlike nakon usporedbe svih izmjerenih vrijednosti u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji (p=0.263).



Slika 28. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-10 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.6 Usporedba postoperativnih koncentracija VEGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

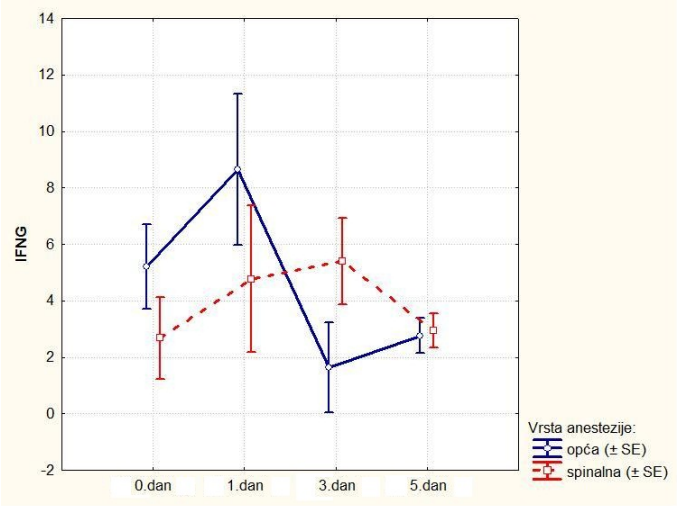
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija VEGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 29. Vrijednosti VEGF grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Serumska koncentracija VEGF postoperativno raste sve do petog postoperativnog dana u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji. Te opažene razlike u općoj i spinalnoj anesteziji nisu statistički značajne (p=0.280). Isto tako, nema statističke razlike niti između opaženih postoperativnih razlika unutar opće i spinalne anestezije (Scheffeov post hoc test variable).



Slika 29. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija VEGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.7 Usporedba postoperativnih koncentracija IFN-γ u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

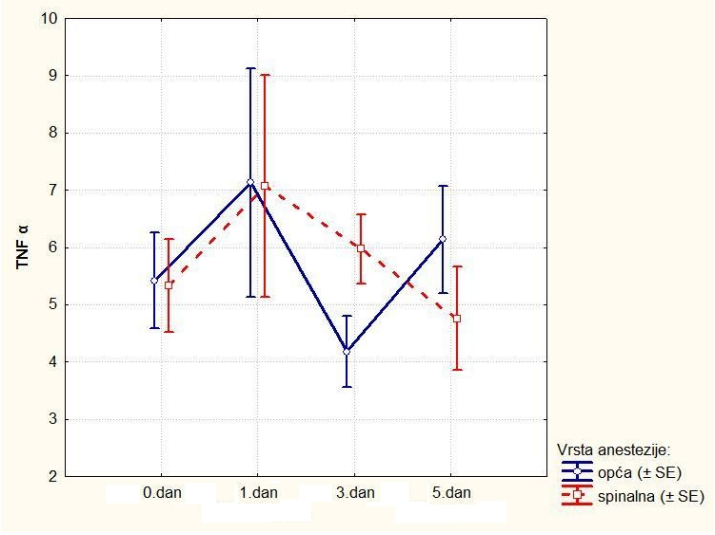
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IFN-**γ** u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 30. Vrijednosti IFN-**γ** grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Opažen je prolazni porast IFN-**γ** prvi postoperativni dan u općoj, te prvi i treći postoperativni dan u spinalnoj anesteziji.



Slika 30. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IFN-γ u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.8 Usporedba postoperativnih koncentracija TNF-α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

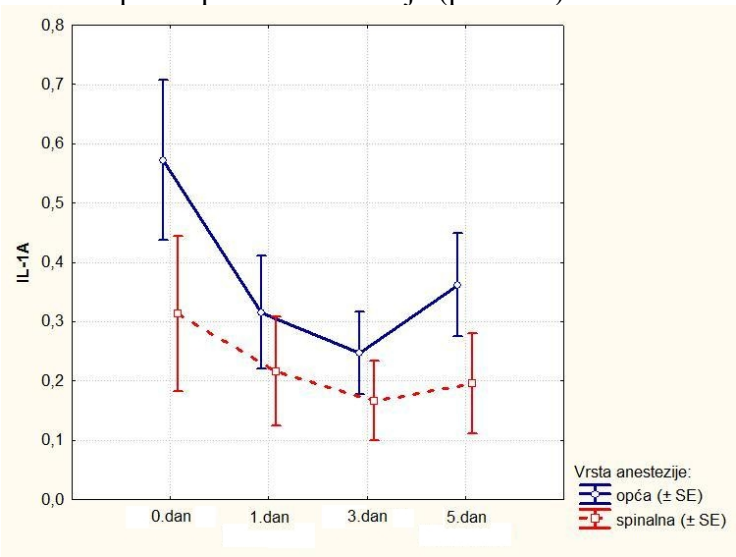
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija TNF-α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 31. Vrijednosti TNF-α grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Prvi postoperativni dan opažen je prolazni porast TNF-α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.



Slika 31. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija TNF-α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.9 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-1α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

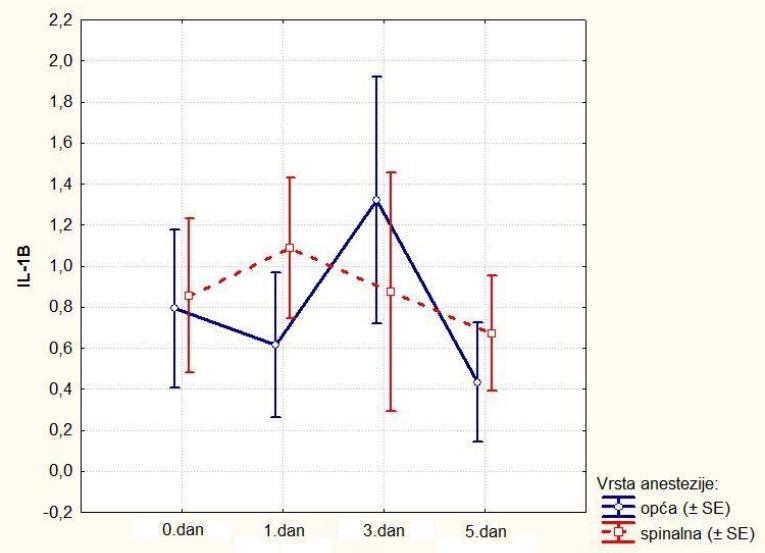
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-1α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 32. Vrijednosti IL-1α grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Opća i spinalna anestezija prolazno smanjuju serumsku koncentraciju IL-1α prvi i treći postoperativni dan. Taj pad nije statistički značajan što smo dokazali Scheffeovim post hoc testom variable. Isto tako, nema značajne razlike u dinamici IL-1α uspoređujući sva mjerenja između opće i spinalne anestezije (p=0.168).



Slika 32. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-1α u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.10 Usporedba postoperativnih koncentracija IL-1β u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

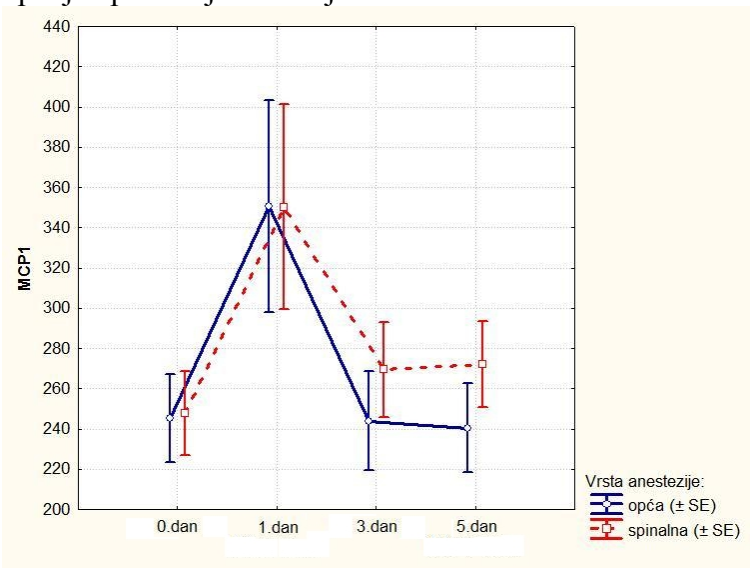
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-1β u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 33. Vrijednosti IL-1β grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška.



Slika 33. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija IL-1β u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.11 Usporedba postoperativnih koncentracija MCP-1 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

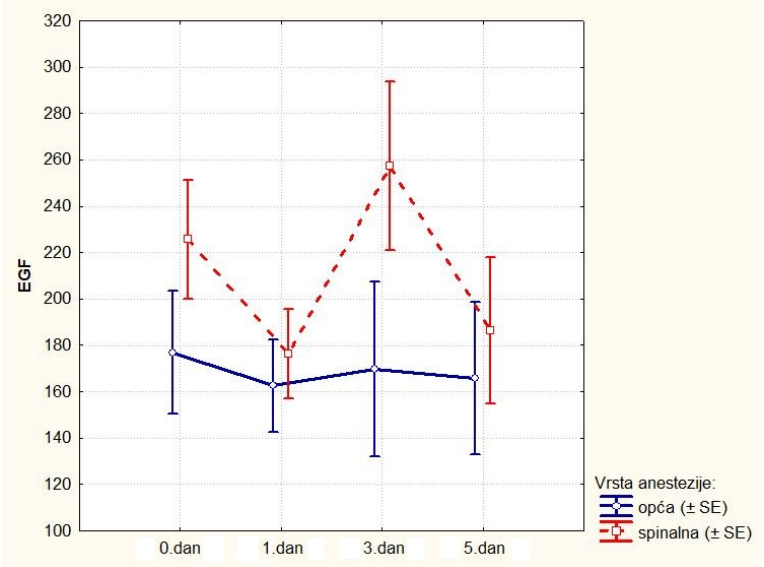
Postoperativna dinamika serumskih koncentracija MCP-1 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 34. Vrijednosti MCP-1 grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Porast koncentracije MCP-1 opažen je prvi postoperativni dan u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.



Slika 34. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija MCP-1 u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

6.6.12 Usporedba postoperativnih koncentracija EGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

Postoperativna dinamika serumskih koncentracija EGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji prikazana je na Slici 35. Vrijednosti EGF grafički su prikazane kao aritmetička sredina i standardna pogreška. Porast koncentracije MCP-1 opažen je prvi postoperativni dan u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.



Slika 35. Postoperativna dinamika serumskih koncentracija EGF u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji

7 DISKUSIJA

Do sada je jasno definirano da je odgovor na stres imunosupresivan, što je u prvom mahu zaštita organizma. Međutim, u slučaju produženog i intezivnog stresnog podražaja taj odgovor može biti izrazito štetan (74, 75). Stoga, smanjenje postoperativnog stresa jedan je od najznačajnih ciljeva u liječenju pacijenta.

Kirurški zahvat uzrokuje postoperativne promjene imunosnog sustava koje su rezultat oštećenja tkiva, anesteziološkog postupka, postoperativne boli i psihološkog stresa (1). Ovisno o prirodi i trajanju stresora i imunosnih pokazatelja koje analiziramo, učinak stresora na imunosni odgovor može biti stimulacijski, supresijski ili bez učinka (94, 95). Ravnoteža između poticajnih i suprimirajućih mehanizama ovisi o preoperativnom stanju organizma, opsegu i trajanju operativnog zahvata, anesteticima, anksioznosti i boli (17). Obzirom na blisku biološku povezanost između živčanog, endokrinog i imunosnog sustava, promjene u imunosnim mehanizmima zbog kirurškog stresa uzrokovane su složenom interakcijom različitih hormona (naročito kortikoida), citokina i proteina akutne faze (15, 17). Poznato je da stres djeluje imunosupresivno što u prvi čas može biti biološki protektivno, ali u postoperativnom periodu može biti štetno pogotovo ako djeluje pojačano i produženo (74, 96, 97). Imunosupresija nakon kirurškog zahvata očituje se kao poremećaj T-limfocitne i monocitne funkcije (98, 99). Disfunkcija limfocita T karakterizirana je promjenom broja limfocita T, njihova proliferativnog odgovora na mitogene i antigene, te poremećajem sinteze različitih proupalnih i protuupalnih citokina uključujući IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-6 i IL-10 (1, 78, 100, 101).

Anesteziološki postupak može imati različiti utjecaj na postoperativni imunosni odgovor. Na primjer, dokazano je da balansirana inhalacijska anestezija ima veći utjecaj na postoperativni upalni odgovor (IL-6) i stanično posredovanu imunost nego intravenska anestezija kod pacijenata kojima je učinjena minimalno invazivna parcijalna resekcija diska (78). S druge strane, podatci o utjecaju epiduralne anestezije na postoperativni imunosni sustav su kontradiktorni. Neki istraživači navode da epiduralna anestezija održava NK staničnu aktivnost i smanjuje stresni odgovor nakon histerektomije (88, 102). Drugi istraživači navode da epiduralna anestezija ne utječe na stresni odgovor nakon operacija gornjeg abdomena (gastrektomija i parcijalna hepatektomija) (103, 104, 105). Važno je naglasiti da epiduralna anestezija također značajno smanjuje razine adrenalina, noradrenalina i kortizola, odnos NK stanica i promjene u distribuciji limfocita u nekirurških pacijenata neovisno o jačini boli (106). Međutim, nakon velikog abdominalnog zahvata i postavljanja kontinuirane epiduralne analgezije dolazi do smanjenja limfocitne mitogene proliferacije i odgođenog proupalnog citokinskog odgovora (IL-1β, IL-2, IL-6) u postoperativnom razdoblju u usporedbi sa kontroliranom analgezijom od strane pacijenta i intermitentnim davanjem opioida (88). Valja napomenuti da su objavljeni rezultati o imunosupresivnom učinku opioida kontradiktorni (107).

Rezultati istraživanja pokazali su da spinalna i opća anestezija uzrokuju prolaznu promjenu serumske koncentracije različitih proupalnih i protuupalnih citokina. Uočeno je kirurškim zahvatom potaknuto lučenje IL-2, IFN-γ, IL-1α, IL-1β i IL-10 i prisutne povećane vrijednosti u usporedbi sa zdravim dobrovoljcima. S druge strane, serumska koncentracija MCP-1 je snižena u grupi pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji. Također nisu zabilježene promjene u serumskoj koncentraciji IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, EGF i VEGF u obje grupe anesteziranih pacijenata.

U skladu sa dosada objavljenim studijama rezultati ovog istraživanja pokazuju smanjenu serumsku koncentraciju IL-2 prvi i treći postoperativni dan u odnosu na preoperativnu vrijednost u pacijenata u općoj anesteziji. S druge strane, nije bilo značajnih promjena u serumskoj koncentraciji

IL-2 prije i poslije kirurškog zahvata u pacijenata u spinalnoj anesteziji. Također je značajno naglasiti da su preoperativne serumske koncentracije IL-2 značajno više u općoj nego u pacijenata anesteziranih u spinalnoj anesteziji. Obzirom da su pacijenti odabrani metodom slučajnog odabira, a u istraživanje je uključena relativno ujednačena skupina pacijenata (gledajući spol, dob, tjelesnu težinu i ostale karakteristike) statistički značajna razlika u preoperativnoj razini IL-2 između pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji je teže objašnjiva. Ili se radi o biološkoj različitosti koja se slučajno ispoljila u našoj skupini pacijenta ili se radi o malom uzorku pacijenata. Navedenu pojavu također ne možemo objasniti niti anesteziološkim niti kirurškim postupkom obzirom da su vrijednosti IL-2 dobivene iz seruma uzetog prije ulaska pacijenta u operacijsku salu i bilo kakve naše intervencije. Druge promjene u analiziranim citokinima nisu uočene.

Uspoređujući aritmetičke sredine vrijednosti IL-6 nije zabilježena značajna razlika u dinamici IL-6 između opće i spinalne anestezije gledajući sva mjerenja zajedno (p=0.860). Prisutan je značajan porast serumske koncentracije IL-6 prvi postoperativni dan, te kasniji pad treći i peti postoperativni dan u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.
Drugi su autori pokazali da povećanje razine IL-6 ukazuje na opseg tkivnog oštećenja (108), tako da je razina niža kod operacija učinjenih laparoskopskom tehnikom (109). Anesteziološki postupak može također mijenjati postoperativnu produkciju IL-6 (74, 78, 88). Regionalna anestezija ima malo utjecaja na stvaranje IL-6 nakon operacije u zdjelici (109), ali je opisano da visoke doze alfentanila suprimiraju sekreciju IL-6 u sličnom kirurškom modelu (110). IL-6, TNF i IL-1 su posrednici odgovora akutne faze i imaju brojne biološke učinke. Jedan od mehanizama djelovanja jeste aktivacija hepatocita i indukcija stvaranja reaktanata odgovora akutne faze kao što je CRP (111). U provedenom istraživanju uočeno je značajno povećanje CRP-a u spinalnoj i općoj anesteziji što odgovara gore navedenim tvrdnjama.

Blago povećanje razine IL-10 u pacijenata u općoj anesteziji može biti uzrokovano protuupalnim djelovanjem intravenskih anestetika. Nekoliko studija pokazalo je da se serumska koncentracija IL-10 povećava tokom perioperativnog perioda i vraća se na preoperativnu razinu četvrti postoperativni dan (112). IL-10 inhibira induciranu sintezu IL-6 i djeluje kao prirodni antagonist proupalnih citokina u smislu zaštite organizma (113). Povećano oslobađanje IL-10 nakon operacije u pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji vjerovatno reflektira ograničavanje proupalnog odgovora ili može biti rezultat direktnog utjecaja propofola i fentanyla na stvaranje IL-10. Gilliband i sur. (114) također su uočili povećane razine IL-10 i IL-1Ra postoperativno nakon intravenske anestezije sa propofolom i alfentanilom, te su zaključili da se radi o povećanom protuupalnom odgovoru u intravenskoj anesteziji.

Uspoređujući preoperativne vrijednosti leukocita, eritrocita, hematokrita, hemoglobina, trombocita, PV (protrombinskog vremena), APTV (aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena), CRP (C-reaktivnog proteina) i fibrinogena između opće i spinalne anestezije nisu statistički značajne. Također je isti uzorak uočen uspoređujući postoperativne vrijednosti između opće i spinalne anestezije. Međutim, postoji statistički značajan pad hematokrita (p=0.026) i hemoglobina (p=0.01) uspoređujući preoperativne i postoperativne vrijednosti u općoj anesteziji što je očekivajuće obzirom na učinjeni operativni zahvat. Konačne vrijednosti hemoglobina (hgb=125±14) i hematokrita (Htc=0.39±0.04) nisu zahtijevale nadoknadu koncentratom eritrocita što nije bilo potrebno učiniti prema smjernicama kojima je vođeno istraživanje. Statistički značajna razlika postoji analizirajući preoperativnu i postoperativnu vrijednost trombocita (p=0.03) pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji. To je kao i vrijednosti hemoglobina i hematokrita posljedica krvarenja. Postoji i očekivajući porast upalnog parametra CRP (C-reaktivni protein) koji je statistički značajan (p=0.02). Nije prisutna statistički značajna promjena u preoperativnim i postoperativnim vrijednostima koagulograma pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji.

Uspoređujući preoperativne i postoperativne vrijednosti leukocita pacijenata anesteziranih u

spinalnoj anesteziji postoji statistički značajan porast (p=0.027) nakon operacije. Kao i kod pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji, u grupi pacijenata anesteziranih u spinalnoj anesteziji postoji statistički značajan pad eritrocita (p=0.001), hematokrita (p=<0.001) i hemoglobina (p=<0.001). Sve navedeno je i očekivano obzirom na učinjeni operativni zahvat. Prisutan je u grupi spinalne anestezije pad trombocita postoperativno (p=0.015) koji je statistički značajan, dok promjene koagulograma nisu značajne: PV (p=0.814), APTV (p=0.562) i fibrinogen (p=0.062). Uz navedeno bitno je još napomenuti statistički značajan porast upalnog parametra CRP-a (p=0.011).

Kao zaključak, u ovoj studiji je prikazano da anesteziološki postupak kod malog kirurškog zahvata može blago i kratkotrajno utjecati na postoperativno stvaranje citokina. Ove promjene mogu se odnositi na poremećaj imunosnog sustava tokom perioperativnog razdoblja. Iako ove promjene mogu imati mali utjecaj na pacijenta sa normalnim imunosnim sustavom, promjene u citokinskoj mreži mogu biti od značaja kod pacijenata koji imaju već prisutan poremećaj imunosnog sustava.

8 ZAKLJUČAK

- Kirurški zahvat uzrokuje postoperativne promjene imunosnog sustava koje su rezultat oštećenja tkiva, anesteziološkog postupka, postoperativne boli i psihološkog stresa. Ovisno o prirodi i trajanju stresora, te imunosnih pokazatelja koje analiziramo, učinak stresora na imunosni odgovor može biti stimulacijski, supresijski ili bez učinka.

- Anesteziološki postupak kod malog kirurškog zahvata može blago i kratkotrajno utjecati na postoperativno stvaranje citokina. Ove promjene mogu se odnositi na poremećaj imunosnog sustava tokom perioperativnog razdoblja. Iako ove promjene mogu imati mali utjecaj na pacijenta sa normalnim imunosnim sustavom, promjene u citokinskoj mreži mogu biti od značaja kod pacijenata koji imaju već prisutan poremećaj imunosnog sustava.

- Uočeno je kirurškim zahvatom potaknuto lučenje IL-2, IFN-γ, IL-1α, IL-1β i IL-10, te snižena serumska koncentracija MCP-1 u grupi pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji.

- Nisu zabilježene razlike u serumskoj koncentraciji IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, EGF i VEGF uspoređujući pacijente u općoj i spinalnoj anesteziji.

- Prisutan je značajan porast serumske koncentracije IL-6 prvi postoperativni dan, te pad treći i peti postoperativni dan. Taj porast je statistički značajan u pacijenata u općoj i spinalnoj anesteziji.

- Smanjena je serumska koncentracija IL-2 prvog i trećeg postoperativnog dana u odnosu na preoperativnu vrijednost u pacijenata u općoj anesteziji. S druge strane, nije bilo značajnih promjena u serumskoj koncentraciji IL-2 prije i poslije kirurškog zahvata u pacijenata u spinalnoj anesteziji.

- Blago povećanje razine IL-10 u pacijenata u općoj anesteziji može biti uzrokovano protuupalnim djelovanjem intravenskih anestetika. Povećano oslobađanje IL-10 nakon operacije u pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji vjerovatno reflektira ograničavanje proupalnog odgovora ili može biti rezultat direktnog utjecaja propofola i fentanyla na stvaranje IL-10.

9 SAŽETAK

Kirurški zahvat potiče oslobađanje neuroendokrinih hormona, citokina i proteina akutne faze. Cilj ove studije bio je procjeniti utjecaj spinalne i opće anestezije na serumsku razinu proupalnih (interleukin-1α (IL-1α), interleukin-1β (IL-1β), Čimbenik tumorske nekroze-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), Monocitni kemotaksijski protein–1 (MCP-1), Čimbenik rasta krvožilnog endotela (VEGF), Epidermalni čimbenik rasta (EGF), protuupalnih citokina (interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10)) i citokina koje izlučuju pomoćnički Th1 limfociti (interleukin-2 (IL-2), interferon-γ (IFN-γ)).

40 pacijenata koji su bili klasa I ili II prema Američkom uduženju anesteziologa i predviđeni za transuretralnu resekciju prostate anesteziranі su spinalnom ili općom anestezijom. Uzorci periferne venske krvi uzeti su dva sata prije operativnog zahvata, prvi, treći i peti postoperativni dan. Iz uzoraka krvi odredile su se vrijednosti proupalnih, protuupalnih i citokina koje izlučuju pomoćnički Th1 limfociti u cilju određivanja razlike prije i poslije operativnog zahvata.

Statistički značajna razlika uočena je u serumskim vrijednostima interleukina-2 (IL-2) između spinalne i opće anestezije (p=0.043). Koncentracija IL-2 stalno je povišena u općoj, ali ne i spinalnoj anesteziji. Prisutno je i statistički značajno povećanje interleukina-6 (IL-6) u spinalnoj (p=0.043) i općoj anesteziji (p=0.03) uspoređujući sa preoperativnom vrijednošću.

Kirurškim zahvatom uvjetovano postoperativno stvaranje proupalnog citokina IL-6 je povećano u spinalnoj i općoj anesteziji. U našem istraživanju, povišene vrijednosti IL-2 pronađene su kod pacijenata anesteziranih u općoj anesteziji u usporedbi s spinalnom anestezijom.

Serumske vrijednosti drugih proupalnih, protuupalnih i citokina koje izlučuju pomoćnički Th1 limfociti nisu pokazale statistički značajnu razliku prije i poslije operativnog zahvata u grupi spinalne i opće anestezije.

Ključne riječi: imunosupresija, spinalna anestezija, opća anestezija, IL-2, IL-6

10 SUMMARY

Immunomodulation effect of spinal and general anaesthesia on serum concentration of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines

Surgery induces release of neuroendocrine hormones, cytokines and acute phase proteins. The aim of this study was to assess the effect of spinal and general anaesthesia on serum concentration of pro-inflammatory (interleukin-1α (IL-1α), interleukin-1β (IL-1β), Tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein–1), VEGF (Vascular endothelial growth factor), EGF (Epidermal growth factor), anti-inflammatory cytokines (interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) and cytokines which are secreted by Th1 helper lymphocytes (interleukin-2 (IL-2), interferon-γ (IFN-γ).

40 patients with American Society of Anesthesiologists status I and II who were scheduled for Transurethral Resection of the Prostatae were anesthetized in spinal or general anesthesia. Peripheral venous blood samples were collected 2 hours before surgery on the first, third and fifth postoperative days. We measured pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines and cytokines which are secreted by Th1 helper lymphocytes in order to establish differences in patients before and after surgery.

Statistically significant differences were found in serum levels of interleukin-2 (IL-2) between general and spinal anesthesia ($p=0.043$). The concentration of IL-2 was continously elevated in general anesthesia, but not in spinal anesthesia. There was also statistically significant increase of interleukin-6 (IL-6) in spinal ($p=0.043$) and general anesthesia ($p=0.03$) in comparison to preoperative value.

Surgery-related postoperative release of the pro-inflammatory cytokine IL-6 was increased in patients after spinal and general anesthesia. In our study, increased levels of IL-2 were found in patients anesthetized by general anesthesia compared to spinal anesthesia.

Serum concentrations of other pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines and cytokines which are secreted by Th1 helper lymphocytes showed no statistical difference before and after surgery under general and spinal anesthesia.

Key Words: immunomodulation, spinal anesthesia, general anesthesia, IL-2, IL-6

LITERATURA

1. Salo M. Effects of anaesthesia and surgery on immune response. Acta Anaesthesiol Scand 1992;36:201-220.

2. Desborough JP.The stress response to trauma and surgery. Br J Anaesth 2000;85:109-17.

3. Homburger JA, Meiler SE. Anesthesia drugs,immunity and long –term outcome. Current Opinion Anaesthesiol 2006;19:423-428.

4. Kennedy BC,Hall BM. Neuroendocrine and inflammatory aspects of surgery : do they affect outcome? Acta Anaesth Belg 1998;50:205-9.

5. Younes RN , Rogatko A, Brennan MF. The influence of intraoperative hypotension and perioperative blood transfusion on disease free interval in patients with complete resection of colorectal liver metastases. Ann Surg 1991;214:107-13.

6. Black CT, Hennessey PJ, Andrassy RJ. Short-term hyperglicemia depresses immunity through nonenzymatic glycosylation of circulating immunoglobulin. J Trauma 1990;30:830-3.

7. Wilson RM. Neutrophil function in diabetes. Diabetic Med 1986;3:509-12.

8. Kirkley SA, Cowles J, Pellegrini VD Jr, Harris CM, Boyd AD, Blumberg N. Cytokine secretion after allogeneic or autologous blood transfusion (letter).Lancet 1995;345:527.

9. Kirkley S, Cowles J, Pellegrini V, Harris C, Boyd A, Blumberg N. Increased T helper 2 (Th2) type cytokine secretion found in surgical patients receiving allogeneic blood. Transfusion 1995 (Suppl):44.

10. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflymmatory cytokines and atoimmunity. Ann NY Acad Sci 2002;966;290-303.

11. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunology Today 1994;15:74-80.

12. Chuickshank AM, Fraser WD, Burns HJG, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varyin severity. Clinical Science 1990;79:161-165.

13. Joris J, Cigarini I, Legrand M, Jacquet N, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Metabolic and respiratory changes after cholecystectomy perfomed via laparotomy or laparoscopy. British Journal of Anaesthesia 1992;69:341-345.

14. Sarantos P, Abouhamze A, Abcouwer S, Chakrabarti R, Copeland EM, Souba WW. Cytokines decrease glutaminase expression in human fibroblasts. Surgery 1994;116:276-283.

15. Sheeran P,Hall GM. Cytokines in anaesthesia. British Journal of Anaesthesia 1997;78:201-219.

16. Chrousos GP. Seminar sin medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: the hypotalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. N Eng J Med 1995;332;1351-62.

17. Lin E, Calvano SE et al. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery 2000;127: 117-26.

18. Kelbel I, Weiss M. Anaesthetics and immune function. Current Opinion Anaesthesiol. 2001;14:685-691.

19. Kurosawa S, Kato M. Anaesthetics,immune cells and immune responses. J Anaesth 2008;22:263-277.

20. Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T. Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 1998;42:518-26.

21. Flores LR, Dretchen KL,Bayer BM. Potential role of the autonomic nervous system in the immunosupressive effects of the acute morphine administration. Eur J Pharmacol 1996;318:437-46.

22. Freier DO, Fucks BA. A mechanism of action for morphine induced immunosuppression: corticosteroids mediates morphine induced suppression of NK cell activity.J Pharmacol Exp Ther 1996;270:1127-33.

23. Liu Z, Yuan X, Luo Y, He Y, Jiang Y, Chen ZK, Sun E. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. Cytokine 2009; 45(2):141-7.

24. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. Autoimmun Rev 2011;doi:10.1016/y.autrev.2010.11.009.

25. Sacerdote P, Limiroli E, Gaspani L. Experimental evidence for immunomodulatory effects of opioids. Adv Exp Mad Biol 2003;521:106-16.

26. Welters ID, Fimiani C, Bilfinger TV, Stefano GB. NF-κB nitric oxide and opiate signaling. Med Hypotheses 2000; 54:263-8.

27. Einstein TK, Hillburger ME. Opioid modulation of immune responses : effects on facocyte and lymphoid cell population. J Neuroimmunol 1998;83:500-8.

28. Yaeger MP, Collacchio TA, Yu CT, Hildebrant L, Howell AL, Weiss J, Guyre PM. Morphine inhibits spontaneous and cytokine –enhanced natural killer cell cytotoxicity in volunteers Anaesthesiology. 1995;83:500-8.

29. Bryant HU, Roudebush RE. Suppressive effects of morphine pellet implants on in vivo parameters of immune function. J Pharmacol Exp Ther 1990;255:410-4.

30. Jaeger K, Scheinichen D, Heine J, Andre M, Bund M, Pipenbrock S,Leuwer M. Remifentanil, fentanyl and alfentanil have no effect on the respiratory burst of neutophils in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 1998;42:1110-3.

31. Shavit Y, Ben-Eliyahu S, Zeidel A, Beilin B. Effects of fentanyl on natural killer cell activity and on resistance to tumor metastasis in rats. Neuroimmunomodulation 2004;11:255-60.

32. Yeager MP, Procopio MA, DeLeo JA et. Al. Intravenous fentanyl increases natural killer cell cytotoxicity and circulating in humansCD16 (+). Anaesthesia-Analgesia 2002;94:94-99.

33. Jacobs R, Karst M, Scheinichen D, Belilacqua C, Schneider U, Heine J, Schedlowski M, Schmidt RE. Effects of fentanyl on cellular immune function in man. Int J Immunopharmacol 1999;21:445-54.

34. Aarts L, van der Hee R, Dekker I , De Jong J, Langermeiger H, Bast A. The widely used anaesthetic agent propofol can replace α-tocoferol as an oxidant FESB Lett.1995;357:83-5.

35. Marik PE. Propofol: an immunomodulating agent. Pharmacotherapy 2005;25(5 Pt 2) 28S-33S

36. Heine J, Leuwer M, Scheinichen D, Arseniev L, Jaeger K, Pipenbrock S. Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four iv. Anaesthetics on respiratory burst of neutrophils. Br J Anaesth 1996;77:387-92.

37. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y. Propofol inhibits human neutrofil functions. Anaesth Anal 1998;87:695-700.

38. Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T. Effects of intravenous anaesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 1998;42:518-26.

39. Davidson JA, Boom SJ, Pearsall FJ, Zhang P, Ramsay G. Comparison of the effects of four iv. anaethetic agents on polymorphonuclear leukocyte function. Br J Anaesth 1995;74:315-8.

40. Huetteman E, Jung A, Vogelsang H, Hout N , Sakka SG. Effects of propofol vrs methohexital on neutrophil function and imune status in critically ill patients. J Anaesth 2006;20:86-91.

41. Larsen B, Hoff G, Wilchem W et al. Effects of intravenous anesthetics on spontaneus and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. Anesthesiology 1998;89(5):1218-27.

42. Chen RM, WU CH, Chang HC, WU GJ, Lin YL, Sheu JR, Chen TL. Propofol supresses macrophage functions and modulates mitochondrial membrane potential and cellular adenosine triphosphate synthesis. Anesthesiology 2003;98:1178-85.

43. Chen RM, Chen TG, Chen Tl , Lin LL, Chang CC, Chang HC, Wu HC. Anti-inflammatory and antioxidative effects of propofol on lipopolysaccharide-activated macrophages. Ann NY Acad Sci 2005;1042:262-71.

44. Rossano F, Tufano R, Cipollaro de L Ero G, Servillo G , Baroni A, Tufano MA. Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. Immunopharmacol Immunotoxicol 1992;14:439-50.

45. Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. Suppression of natural killer cell activity and promotion of tumor metastasis by ketamine, thiopental and halotane, but not by propofol; mediating mechanisms and prophylactic measures. Anesth Analg. 2003;97:1331-9.

46. Brand JM, Frohn C, Luhm J, Kirchner H, Schmucker P. Early alterations in the number of circulating lymphocyte subpopulations end enhanced proinflammatory immune response during opioid-based general anesthesia. Shock 2003;20:213-7.

47. Pirttinkangas Co, Perttila J, Salo M. Propofol emulsion reduces proliferative responses to lymphocytes from intensive care patients. Intensive Care Med 1993;19:299-302.

48. Nakagawara M, Takeshige K, Takamatsu J, Takahashi S, Yoshitake J, Minakami S. Inhibition of superoxide production and Ca 2+ mobilisation in human neutrophils by halotane, enflurane and isoflurane. Anesthesiology 1986;64:4-12

49. Mitsuhata H, Shimizu R, Yokoyama MM. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. International Journal of Immunopharmacology 1995;17(6):529-34.

50. Vinten–Johansen J. Involvement of neutophils in pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. Cardiovasc Res 2004;61:481-97.

51. De Hert SG, Turani F, Martur S , Stowe DF. Cardioprotection with volatile anaesthetics: Mechanisms and clinical implications. Anest Anal 2005;100:1584-93.

52. Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Kaise A, Suzuki H, Endo S, Wei J, Inada K. Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surger. Journal of Cardiothoracic & Vascular Anesthesia 2006;20(4):503-8.

53. Boost KA, Flondor M, Hofstetter C, Platacis I, Stegewerth K, Hoegl S et al. The beta-adrenoreceptor antagonist propranolol counteracts anti-inflammatory effects of isoflurane in rat endotoxemia. Acta Anaesthesiol Scand 2007;51:900-8.

54. Tschaikowsky K ,Ritter J, Schroppel K , Kuhn M. Volatile anaesthetics differentially affect immunostimulated expresion of inducible nitric oxide synthase: role of intracellular calcium. Anesthesiology 2000;92:1093-102.

55. Mitsuhata H, Shimizu R, Yokoyama MM. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. Int J Immunopharmacol 1995;17:529-34.

56. Matsuoka H, Kurosawa S, Horinouchi T, Kato M, Hashimoto Y. Inhalation anesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro. Anesthesiology 2001;95:1467-72.

57. Hollmann MW , Derieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication ? Anesthesiology 2000;93:858-875.

58. Hollmann MW ,Fisher LG, Byford AM, Derieux ME. Local anesthetic inhibition of m1 muscarinic acetylcholine signaling. Anesthesiology 2000;93:497-509.

59. Nitgen GW, Chan CK, Derieux ME. Inhibition of lysophosphatidate signaling by lidocaine and bupivacaine. Anesthesiology 1997;86;1112-1119.

60. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C et al. Inhibitory effects of amide local anaesthestics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB4 release and IL-1 secretion in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 1993;37:159-165.

61. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D. Effects of Bupivacaine and Tetrodotoxin on Carrageenan- induced Hind Paw Inflammation in Rats : Hyperalgesia, Edema and Systemic Cytokines. Anesthesiology 2006;105:128–38.

62. Bjorck S, Dahlstrom A,Ahlman H. Treatment of distal colitis with local anaesthetic agents. Pharmacol Toxicol 2002;90:173-180.

63. Powell DM, Rodeheaver GT, Foresman PA et al. Damage to tissue defenses by EMLA cream . J Emerg Med 1991;9:205-209.

64. Drage M. Caution in the use of lidocaine infusion in surgical patient. Anesth Analg 1998;87:1213.

65. Procopio MA. The in vivo effects of general and epidural anesthesia on human immune function. Anaesthesia-Analgesia 2001;93(2):460-5.

66. Lee KS, Park SS. Effect of halotane, enflurane and nitrous oxide on tracheal ciliar activity in vitro. Anesth Analg 1980;59:426-430.

67. Le Cras AE. Spinal but not general anesthesia increses the ratio of T helper 1 to T helper 2 cell. Anaesthesia-Analgesia 1998;87(6):1421-5.

68. Tonnesen E,Wahlgreen C. Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte subpopulation in patients undergoing hysterectomy. Br J Anaesth 1998;60:500-7.

69. Hogevold HE, Lyberg T, Kahler H, Haug E, Reikeras O. Changes in plasma IL-1β, TNF-α and IL-6 after total hip replacement surgery in general or regional anaesthesia. Cytokine 2000;12:1156-9.

70. Kehlet H. Manipulation of metabolic response in clinical practice. World J Surg 2000;24:690-5.

71. Wada H, Seki S, Takahashi T et al. Combined and general anesthesia attenuates liver metastasis by preserving Th1/Th2 cytokine balance. Anesthesiology 2007;106:499-506.

72. Liu S, Carpenter RL, Neal JM. Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome. Anesthesiology 1995;82:1474-506.

73. Helmy SA,Wahby MA,El-Nawaway M. The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production. Anaesthesia 1999;54(8):733-8.

74. Schneemilch CE, Bank U. Release of pro- and anti-inflammatory cytokines during different anesthesia procedures. Anaesthesiol.Reanim 2001;26(1):4-10

75. Benzion Beilin, Yehuda Shavit et al. The effects of postoperative pain menagment on immune response to surgery. Anaesth Analg 2003;97:822-7

76. Roth-Isigkeit A, Hasselbach L, Ocklitz E et al. Inter-individual differences in cytokine release

in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Clin Exp Immunol 2001;125(1):80-8.
77. Ciepichal J, Kubler A. Effect of general and regional anaesthesia on some neutrophil functions. Arch Immunal Ther Exp 1998;46(4):183-92.

78. Schnnemilch CE et al. Effect of 2 anestetic techniques on the postoperative proinflammatory and anti-inflammatory cytokine response and cellular immune function to minor surgery. Journal of Clinical Anaesthesia 2005;17:517-527.

79. Crozier TA, Muller JE, Quittkat D, Sydow M, Wuttke W, Kettler D. Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. Br J Anaesth 1994;72:280-5.

80. Pirttikangas CO, Salo M, Mansikka M, Gronroos J, Pulkki K ,Pentol O. The infuence of anaesthetic techinique upon the immune response to hysterectomy. A comparion of propofol infusion and isoflurane. Anaesthesia 1998;20:1056-61.

81. Kotani N, Muraoka M, Matsuki A, Intraoperative modulation of alveolar macrophage function during isoflurane and propofol anaesthesia. Anesthesiology 1998;89:1125-32.

82. Inada T, Yamanouchi Y, Jomura S, Sakamoto S, Takahashi M, Kambara T, Shingu K. Effect of propofol and isoflurane anaesthesia on imune response to surgery. Anaesthesia 2004;59:954-9.

83. Mortensen J, Shames B, Johnson CP, Nilakantan V. MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic, decreases inflammatory indices in ischemic acute kidney injury. Inflamm Res 2011 Mar;60(3):299-307.

84. Salliot C, Finckh A, Katchamart W, Lu Y, Sun Y, Bombardier C, Keystone E. Indirect comparisons of the efficacy of biological antirheumatic agents in rheumatoid arthritis in patients with an inadequate response to conventional disease-modifying antirheumatic drugs or to an anti-tumour necrosis factor agent: a meta-analysis. Ann Rheum Dis 2011; 70(2):266-71.

85. Becker C, Fantini MC, Wirtz S, Nikolaev A, Lehr HA, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. Cell Cycle 2005; 4(2):217-20.

86. Lin Ln, Wang LR, Wang WT, Jin LL, Zhao XY, Zheng LP, Jin LD, Jiang LM, Xiong XQ. Ischemic preconditioning attenuates pulmonary dysfunction after unilateral thigh tourniquet-induced ischemia-reperfusion. Anesth Analg 2010; 111(2):539-43.

87. Malgarejo E, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1 : A key mediator in inflammatory processes. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41(5):998-1001.

88. Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C,Hieida M, Inoue H, Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: Beyond receptor ligands. Cancer Sci 2008;99:214-220.

89. Carpenter G, Stanley C. Epidermal growth factor. J Biol Chem 1990;265:7709-7712.

90. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cell Signal

2007;19:2003-2012.

91. Li Z, Chen L, Qin Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. Cell Mol Immunol 2009;6(6):415-22.

92. Azzarone B, Pottin-Clemenceau C, Krief P, Rubinstein E, Jasmin C, Scudeletti M, Indiveri F. Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells? Eur Cytokine Netw 1996; 7(1):27-36.

93. Sertic J, Slavicek J, Bozina N, Malenica B, Kes P, Reiner Z. Cytokines and growth factors in mostly atherosclerotic patients on hemodialysis determined by biochip array technology. Clin Chem Lab Med 2007;45(10):1347-52.

94. Pruett BS. Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. Intern Immunopharm 2001; 1: 507-20.

95. Beilin B, Shavit Y, Trabekin E, Mordashev B, Maybard E, Zeidel A, Bessler H. The effects of postoperative pain management on immune respose to surgery. Anesth Analg 2003; 97:822-7.

96. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and autoimmunity. Ann N. Y. Acad Sci 2002; 966: 290-303.

97. Hensler Th, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Brthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. Infection and Immunity 1997; 65: 2283-91.

98. Faist E, Shinckel C, Zimmer S, Kremer JP, von Donnersmack GH, Schildberg FW. Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling. J Trauma 1993; 43: 846-53.

99. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. Br J Surg 1990; 77: 204-7.

100. Faist E, Storck M, Hultner L, Redl H, Ertel W, Walz A, Schildberg FW. Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. Surgery 1992; 112: 562-72.

101. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JRT, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. Br J surg 1993; 80: 205-9.

102. Tonnensen E, Wahlgreen C. Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte subpopulations in patients undergoing hysterectomy. Br J Anaesth 1988; 60: 500-7.

103. Tonnensen E, Huttel MS, Christensen NJ, Schmitz O. Natural killer cell activity in patients undergoing upper abdominal surgery:relatioship to the endocrine stress response. Acta Anaesthesiol Scand 1984; 28: 654-60.

104. Norman JG, Fink GW.The effect of epidural anaesthesia on the neuroendocrine response to major surgical stress: a randomized propsective trial. Am Surg 1997; 63:75-80.

105. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Okamoto K, Sata T. Effects of epidural anaesthesia on surgical stress-induced immunosuppression during upper abdominal surgery. Br J Anaesth 2007; 98: 196-203.

106. Yokoyama M, Itano Y, Mizobuchi S, Nakatsuka H, Kaku R, Takashima T, Hirakawa M. The effects of epidural block on the distribution of lymphocyte subsets and natural-killer cell activity in patients with and without pain. Anesth Analg 2001; 92: 463-9.

107. Rittner LH, Roewer N, Brack A.The clinical (ir)relevance of opoid-induced immune suppression. Curr Opin Anaesthesiol 2010; 23: 588-92.

108. Chuickshank AM, Fraser WD, Burns HJG, VanDamme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. Clinical Science 1990; 79: 161-5.

109. Joris J, Cigarini I, Legrand M, Jaquet N, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Metabolic and respiratory changes after cholecystectomy performed via laparotomy or laparoscopy. Brit J Anaesth 1992; 69: 341-5.

110. Moore CM, Desborough JP, Powell H, Burrin JM, Hall GM. Effects of extradural anaesthesia on interleukin-6 and acute phase response to surgery. Brit J Anaesth 1994; 72: 272-9.

111. Crozier TA, Muller JE, Quittkat D, Sydow M, Wuttke W, Kettler D. Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. Brit J Anaesth 1994; 72: 280-5.

112. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today 1994;15: 74-80.

113. Kato M, Honda I, Suzuki H, Murakami M, Matsukawa S,, Hashimoto Y. Interleukin-10 production during and after upper abdominal surgery. J Clin Anaesth 1998; 10: 184-8.

114. Gilliland HE, Amstrong MA, Carabine U, McMurray TJ. The choice of anaesthetic maintenance technique influences the anti-inflammatory cytokine response to abdominal surgery. Anaesth Analg 1997; 85: 1394-8.

11 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7.7.1976. u Splitu. Nakon završenog osnovnog obrazovanja, školovanje nastavljam kao učenik Matematičke gimnazije u Splitu, gdje srednjoškolsko obrazovanje zbog odličnog uspjeha završavam oslobođena polaganja maturalnog ispita.

1994. godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, te sam diplomirala u jesen 2000. godine. Nakon obveznog staža i polaganja stručnog ispita zapošljavam se kao liječnik opće prakse 2002. godine. Tokom staža upisujem poslijediplomski magistarski studij Temeljne i kliničke medicinske znanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, da bi doktorski studij Biomedicina i zdravstvo završila na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Specijalizaciju iz Anesteziologije, reanimacije i intezivnog liječenja započinjem 2004. godine, a specijalistički ispit polažem 2008. godine. Od tada sam u stalnom radnom odnosu pri Klinici za anesteziologiju, reanimaciju i intezivno liječenje, Odjel za liječenje uroloških bolesnika KBC-a Zagreb. Od 2009. godine sam na subspecijalizaciji iz Intezivne medicine.

Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva za regionalnu anesteziju i analgeziju.