
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea influenței anesteziei
totale intravenoase (TIVA)
asupra nivelului seric de
interleukine și a moleculelor de
adeziune celulară

Doctorand **Adina-Norica Răduț**

Conducător de doctorat Prof. dr. **Victor Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Anestezia și imunitatea	19
1. 1. Răspunsul imun, celulele imune și inflamația	19
1.1.1. Citokinele proinflamatorii	21
1.1.2. Citokinele antiinflamatorii	22
1.1.3. Moleculele de adeziune celulară	22
1.1.4. Noi progrese în cercetarea citokinelor	23
1.2. Impactul anesteziei și chirurgiei asupra producției de citokine	24
1.2.1. Considerații generale	24
1.2.2. Efectul imunomodulator al anestezicelor utilizate în practica clinică	26
1.2.2.1. Agenți anestezici intravenoși	26
1.2.2.2. Anestezice opioide	28
1.2.2.3. Agenți anestezici volatili	29
2. Anestezia totală intravenoasă	31
2. 1. Concept și tehnică	31
2.2. Modalități de administrare a TIVA. Tehnica TCI (target controlled infusion)	32
2.3. Combinații de substanțe utilizate în TIVA-TCI	33
2.3.1. Propofolul	33
2.3.2. Remifentanilul	33
2.4. TIVA versus anestezia inhalatorie în modularea răspunsului imun	34
2.5. Agenți antiinflamatori asociați tehnicilor de anestezie	36
2.5.1. Anestezice locale	36
2.5.2. Dexametazona în modularea răspunsului inflamator perioperator	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	39
1. Ipoteza de lucru/obiective	41

2. Studiul 1. Influența alegerii tehnicii anestezice utilizate asupra concentrațiilor plasmatice ale interleukinelor și moleculelor de adeziune celulară	45
2.1. Introducere	45
2.2. Ipoteza de lucru	46
2.3. Material și metodă	46
2.4. Rezultate	49
2.5. Discuții	55
2.6. Concluzii	57
3. Studiul 2. Influența unei doze profilactice de dexametazonă (pentru profilaxia grețurilor și vărsăturilor postoperatorii) asupra nivelului plasmatic de interleukine după colecistectomia laparoscopică	59
3.1. Introducere	59
3.2. Ipoteza de lucru	60
3.3. Material și metodă	60
3.4. Rezultate	63
3.5. Discuții	69
3.6. Concluzii	71
4. Studiul 3. Anestezia totală intravenoasă (TIVA) versus anestezia inhalatorie la pacienți supuși colecistectomiei laparoscopice; efectele asupra a două citokine proinflamatorii:IL-32 și TNF-alfa	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru	74
4.3. Material și metodă	74
4.4. Rezultate	76
4.5. Discuții	81
4.6. Concluzii	82
5. Studiul 4. Influența variatelor concentrații de propofol	83

asupra expresiei citokinelor ex-vivo pe culturi de celule umane de pancreas - efectele antioxidante și antiapoptotice. Studiu experimental	
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de lucru	84
5.3. Material și metodă	84
5.4. Rezultate	86
5.5. Discuții	89
5.6. Concluzii	90
6. Concluzii generale	91
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	93
REFERINȚE	97
ANEXE	113

Cuvinte cheie: anestezie totală intravenoasă, anestezie inhalatorie, interleukine, molecule de adeziune celulară, chirurgie laparoscopică, tehnică anestezică, răspuns imun.

INTRODUCERE

În privința alegerii tehnicii anestezice, există câteva studii în literatură care au urmărit evoluția nivelului seric al interleukinelor în chirurgia laparoscopică practică în anestezie generală inhalatorie comparativ cu anestezia totală intravenoasă (TIVA), sau studii similare pe animale, sau pentru alte tipuri de intervenții chirurgicale, de la care a pornit și ideea cercetării. Implementarea tehnicii TIVA-TCI, care va fi descrisă în capitolele tezei a pornit inițial ca un proiect de cercetare PN II (PC 41-025), care a inclus mai multe centre partenere, cu profil chirurgical diferit, printre obiectivele acestui proiect amplu fiind și evaluarea influenței acestei tehnici anestezice asupra imunității.

Managementul anestezic poate influența efectele imunologice ale chirurgiei și anesteziei, cu ameliorarea evoluției pe termen lung, aspect important mai ales la pacienții cu cancer unde imunosupresia postoperatorie accelerează dezvoltarea celulelor neoplazice reziduale și apariția de noi metastaze.

Administrarea intravenoasă a devenit o alternativă tot mai populară de administrare a anesteziei, comparativ cu tehnica inhalatorie. Acest proces de evoluție s-a datorat unei mai bune înțelegeri a principiilor de farmacocinetică și farmacodinamică, precum și a interacțiunilor medicamentoase care se produc în timpul administrării continue a substanțelor.

Imunosupresia perioperatorie cu consecințele negative ale acesteia, inclusiv metastazarea tumorală și infecțiile postoperatorii, poate fi diminuată printr-o selecție adecvată a agenților anestezici și tehnicilor anestezice. Efectul antiinflamator al anestezicelor poate fi benefic în situații de ischemie-reperfuzie sau SIRS.

Pe viitor, va fi necesară o diferențiere clară între diferitele tehnici anestezice ținând cont de statusul imun al pacienților.

Ipoteza de lucru și obiective generale

Interleukinele proinflamatorii (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), precum și cele antiinflamatorii (IL-4, IL-10, IL-13) sunt eliberate sau inhibate de predominanța răspunsului inflamator sau a infecției, sau de necesitățile organismului de a echilibra un răspuns inflamator prea amplu.

Referitor la substanțele anestezice, rolul acestora asupra eliberării de interleukine sau al diverselor procese cu rol în apărarea organismului este încă incomplet stabilit și dificil de investigat din cauza suprapunerii influenței anestezicelor peste efectul intervenției chirurgicale și a patologiei de fond a pacientului.

Toate aspectele de influență a anestezicelor asupra mecanismelor imune continuă să fie obiect de cercetare și de actualitate, iar elucidarea lor ar putea indica tehnica anestezică de elecție la anumite categorii de pacienți, ținând cont de statusul lor imunologic.

Obiectivele generale ale cercetării de față au constat în:

1. Compararea efectelor a două tipuri de anestezie, totală intravenoasă (TIVA) și inhalatorie asupra concentrațiilor plasmatice de interleukine pro și antiinflamatorii, precum și a moleculelor de adeziune celulară la pacienți supuși chirurgiei laparoscopice electivă.

2. Evaluarea influenței unei doze mici de dexametazonă de 4 mg, utilizată frecvent pentru profilaxia grețurilor și vărsăturilor postoperatorii la pacienți supuși chirurgiei laparoscopice, asupra concentrației interleukinelor perioperator, pornind de la ipoteza că pacienții care au primit dexametazonă vor avea concentrații diferite ale interleukinelor proinflamatorii.

3. Compararea efectului celor două tehnici anestezice (TIVA și inhalatorie) asupra concentrației plasmatice a două citokine proinflamatorii potente (IL-32 și TNF- α), elementul de noutate fiind reprezentat de determinarea IL-32, implicată în activarea cascadei citokinelor proinflamatorii, precum și un inductor al TNF- α , ca răspuns la inflamație.

4. Evaluarea efectelor antioxidante și antiapoptotice ale propofolului, într-un studiu experimental pe culturi de celule pancreatice umane cu adenocarcinom (PANC), prin administrarea unor concentrații diferite de propofol, într-o manieră dependentă de concentrația utilizată.

Studiul 1. Influența alegerii tehnicii anestezice utilizate asupra concentrațiilor plasmatice ale interleukinelor și moleculelor de adeziune celulară

Ipoteza de lucru

Studiul de față prospectiv, randomizat și-a propus să compare efectele celor două tipuri de anestezie, totală intravenoasă (TIVA) și inhalatorie asupra concentrațiilor plasmatice de interleukine pro și antiinflamatorii, precum și a moleculelor de adeziune celulară la pacienți supuși chirurgiei laparoscopice electivă. În

mod specific, s-a testat ipoteza că TIVA atenuează răspunsul inflamator mai mult decât anestezia cu izofluran ca răspuns la colecistectomia laparoscopică. Tehnica laparoscopică a fost aleasă deoarece trauma tisulară este minimă și similară de la un caz la altul, astfel reducând influența chirurgiei *per se* asupra răspunsului imun.

Material și metodă

După obținerea acordului Comisiei de Etică al Universității (Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie 'Iuliu Hațieganu', Cluj-Napoca, nr. 178A/2007) și a consimțământului în scris, informat, s-au înrolat 88 de pacienți adulți cu vârsta peste 18 ani, ASA (American Society of Anesthesiologists physical status) 1 sau 2, programați pentru colecistectomie laparoscopică. S-au exclus pacienții cu afecțiuni inflamatorii (inclusiv colecistita acută) sau cu afecțiuni ale sistemului imun, astm bronșic, obezitate ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$), diabet, ulcer gastric sau alergii cunoscute. De asemenea au fost excluși pacienții care utilizează medicație steroidă fie cronic, sau în antecedentele recente, precum și pacienții cu leucocitoză $>10^4/\mu\text{L}$ sau o temperatură preoperatorie $> 37^\circ\text{C}$.

Pacienții au fost randomizați în două grupuri de studiu printr-o secvență generată de calculator: jumătate au fost alocați grupului TIVA-TCI cu propofol, iar cealaltă jumătate grupului cu anestezie inhalatorie. Conform randomizării la pacienții din lotul TIVA, inducția s-a realizat și menținut cu propofol în regim TCI, la care concentrația plasmatică inițială a fost setată la $4 \mu\text{g/ml}$ (pompa TCI Orchestra, Base Primea; Fresenius Kabi, Fresenius Vial SAS, Brézins, France). Infuzia de propofol a fost ulterior ajustată astfel încât să se mențină valoarea indicelui bispectral (BIS) între 40-55 (Covidien, Dublin, Ireland). În lotul inhalator cu izofluran, inducția anestezică s-a realizat cu propofol $1.5\text{-}2 \text{ mg/kg}$, iar menținerea s-a realizat cu izofluran ($1\text{-}1.5 \text{ MAC}$), titrat la valoarea BIS (40-55) și la parametri hemodinamici.

Managementul intraanestezic ulterior a fost identic în cazul ambelor loturi din studiu. Probele de sânge în vederea determinării concentrației interleukinelor au fost prelevate preinducție (T1), imediat după inducție (T2), la 2 (T3) și 24 de ore postanestezic (T4).

Concentrațiile plasmatică ale interleukinelor și moleculelor de adeziune celulară (sICAM-1 și sVCAM-1), au fost determinate prin tehnica ELISA cu kituri disponibile în comerț (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conform instrucțiunilor producătorului.

Rezultate

Rezultatele prezentate aparțin celor 88 de pacienți rămași în studiu (44/fiecare grup).

Cel mai mare răspuns al citokinelor la actul chirurgical a fost observat pentru IL-6 și IL-10, în cazul ambelor citokine înregistrându-se o valoare semnificativ crescută la 2 h după intervenție. Valoarea IL-6 a fost semnificativ mai mare la pacienții din lotul care a primit izofluran: 46.4 (IC 95%: $34.3\text{-}70.7$) pg/ml , comparativ cu 17.6 (IC

95%:11.9-20.7) pg/ml, în lotul TIVA ($P < 0.01$) . În schimb, valoarea IL-10 a fost mai crescută la pacienții din lotul TIVA: 20.1 (IC 95%: 14.2-32.4) pg/ml comparativ cu 12.4 (IC 95%: 8.8-18.7) pg/ml, în lotul izofluran ($P=0.03$) . La 24 h după intervenția chirurgicală, concentrațiile plasmatică ale acestor citokine au revenit aproape de valorile inițiale înregistrate la T1, cu excepția IL-6, care a rămas constant crescută în ambele loturi ($P < 0.001$) și în cazul IL-10 care a rămas semnificativ mai crescută la pacienții care au primit izofluran ($P = 0.009$).

Rezultatele obținute de noi sunt dificil de comparat cu rezultatele altor studii, deoarece au existat protocoale anestezice diferite, intervenții chirurgicale diferite și în multe situații kiturile de determinare ale citokinelor au fost diferite. Cu toate acestea, rezultatele noastre sunt în general similare cu cele publicate în literatură, și în plus studiul nostru este printre cele mai mari care a evaluat un singur tip de intervenție chirurgicală.

Studiu 2. Influența unei doze profilactice de dexametazonă (pentru profilaxia grețurilor și vărsăturilor postoperatorii) asupra nivelului plasmatic de interleukine după colecistectomia laparoscopică

Ipoteza de lucru

Al doilea studiu de echipă și-a propus evaluarea influenței unei doze mici de dexametazonă de 4 mg, utilizată frecvent pentru profilaxia grețurilor și vărsăturilor postoperatorii la pacienți supuși chirurgiei laparoscopice, asupra concentrației interleukinelor perioperator, pornind de la ipoteza că pacienții care au primit dexametazonă vor avea concentrații diferite ale interleukinelor proinflamatorii.

Material și metodă

Aprobarea etică pentru acest studiu (nr. 178B/2007) a fost furnizată de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „ Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România, în 19 decembrie 2007. După obținerea consimțământului scris informat, au fost înrolați 46 de pacienți ASA 1 sau 2 programați pentru colecistectomie laparoscopică în anestezie generală (Clinica Chirurgie 3, Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie, Cluj Napoca). Între ianuarie 2008 și august 2009 pacienții au fost alocați în mod aleator într-unul din cele două grupuri de studiu (23 de pacienți/grup), utilizând o secvență generată de calculator. În grupul cu dexametazonă, pacienții au primit o doză de 4 mg pentru profilaxia GVPO; în grupul control pacienții nu au primit dexametazonă. Pacienții excluși din studiu au fost cei cu afecțiuni ale sistemului imun, afecțiuni inflamatorii cunoscute (inclusiv colecistita acută),

leucocitoză, astm bronșic, obezitate ($BMI \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$), diabet, ulcer gastric, alergii cunoscute, istoric de GVPO sau cei cu medicație steroidă sau antiinflamatoare cronică .

S-a utilizat TIVA ca și tehnică anestezică pentru profilaxia GVPO, cunoscut fiind faptul că intervențiile de colecistectomie laparoscopică au un risc crescut de GVPO și că în grupul control pacienții nu au fost premedicați cu dexametazonă. Anestezia a fost realizată la toți pacienții cu propofol în regim TCI (target-controlled infusion), cu o concentrație plasmatică inițială de $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ (model Marsh modificat) și cu remifentanil în regim de infuzie controlată manual (MCI), $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ în primul minut, ulterior $0.25 \mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Rezultate

Rezultatele prezentate aparțin unui număr de 42 de pacienți, care au încheiat studiul.

Rezultatele studiului nostru au indicat că nu au existat diferențe semnificative legate de administrarea dexametazonei în doză de 4 mg asupra concentrațiilor plasmatică ale IL-1 β , TNF α sau IL-13, evaluate ca și procent al ariei de sub curba concentrațiilor plasmatică față de valorile de bază, în primele 24 h postoperator. Variațiile ariei de sub curba concentrațiilor plasmatică pentru IL-6 și IL-8 au fost semnificativ mai mari în grupul control, în timp ce pentru IL-10, au existat diferențe mai mari în grupul cu dexametazonă. La 2 h postoperator, concentrațiile IL-6 și IL-10 au fost semnificativ mai crescute în ambele grupuri, în timp ce IL-8 a fost semnificativ mai crescută în grupul control. La 24 h postoperator, doar concentrațiile IL-6 au rămas semnificativ mai crescute în ambele grupuri, cu o valoare mai mare în grupul control (deși nu semnificativă statistic). IL-10 a rămas constant crescută doar în grupul control, cel mai probabil pentru a contracara efectele anormal crescute ale IL-6.

Studiu 3. Anestezia totală intravenoasă (TIVA) versus anestezia inhalatorie la pacienți supuși colecistectomiei laparoscopice; efectele asupra a două citokine proinflamatorii: IL-32 și TNF-alfa

Ipoteza de lucru

Studiul de față își propune să compare efectele TIVA cu cele ale anesteziei inhalatorii asupra concentrațiilor plasmatică a două citokine proinflamatorii potente (IL-32 și TNF- α), cunoscut fiind faptul că IL-32 este un inductor al TNF- α , ca răspuns la inflamație. În același timp, am testat ipoteza că TIVA atenuează răspunsul inflamator declanșat de chirurgia laparoscopică mai mult decât anestezia cu izofluran, și că putem stabili o corelație între cele două citokine, în chirurgia minoră, similar altor studii.

Material și metodă

După obținerea acordului Comisiei de Etică a Instituției (Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie “Prof dr Octavian Fodor”, Cluj Napoca) și a consimțământului scris informat al pacienților, s-au înrolat 22 de pacienți ASA I-II, conform clasificării Societății Americane de Anesteziologie, programați pentru colecistectomie laparoscopică. Pacienții au fost randomizați printr-o secvență generată de computer în două grupuri de studiu: grupul 1 (n=11), în care au fost incluși pacienții care au primit anestezie intravenoasă (TIVA) și grupul 2 (n=11), care a inclus pacienții care au primit anestezie inhalatorie. Criteriile de excludere au fost identice cu cele din studiile precedente. Tehnicile anestezice utilizate (TIVA și inhalatorie) au fost identice cu cele prezentate în primul studiu. Concentrațiile plasmatice ale interleukinelor au fost determinate imediat înainte de inducție (T1), după intubație (T2), la 2 (T3) și 24 de ore postoperator (T4), cu kituri ELISA (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, USA). Personalul de laborator nu a avut cunoștință de alocarea pacienților pe grupuri de studiu sau de procedura anestezică.

Rezultate

Toți pacienții înrolați au finalizat studiul.

Compararea concentrațiilor plasmatice ale interleukinelor între grupurile de studiu, la diferite intervale de timp nu a evidențiat diferențe semnificative statistic între IL-32 și TNF- α .

TNF- α a prezentat o variabilitate mai mare în grupul TIVA, cu o creștere a valorilor la 2 h postoperator (T3), comparativ cu grupul izofluran, în timp ce la 24 h postoperator (T4), valorile TNF- α au rămas crescute în ambele grupuri față de valorile de referință (T1).

Studiu 4. Influența variatelor concentrații de propofol asupra expresiei citokinelor ex-vivo pe culturi de celule umane de pancreas (PANC-1) - efectele antioxidante și antiapoptotice. Studiu experimental.

Ipoteza de lucru

Ne-am propus să investigăm dacă concentrații diferite de propofol exercită efecte antiapoptotice asupra liniei celulare PANC -1 (adenocarcinom pancreatic uman),

fie prin creșterea viabilității celulare, sau prin efectele antioxidante (*scavenger* al radicalilor liberi de oxigen).

Material și metodă

După cultivarea liniei celulare PANC-1 în condiții standard, s-a testat viabilitatea celulară prin cuantificarea concentrației de formazan după expunerea liniei celulare la concentrații diferite de propofol, N-acetilcisteină (NAC) sau la combinații de propofol (toate concentrațiile) și N-acetilcisteină (10mM). Celulele au fost ulterior incubate cu soluție MTT (37°, 3 ore), iar concentrația de formazan a fost determinată prin metode spectrofotometrice.

Testul de apoptoză a presupus utilizarea unui kit comercial, pentru a testa prezența fosfatidil serinei (PS) pe suprafața membranei. Designul experimental a inclus două grupuri: grupul de control (mediu de cultură) și grupul tratat cu propofol (50 μg/mL). Speciile reactive de oxigen generate au fost cuantificate utilizând citometria în flux, după protocolul descris de producător.

Rezultate

Viabilitatea celulară a grupurilor expuse la concentrații diferite de propofol a fost direct proporțională cu concentrația. Testul de apoptoză utilizând Annexin-V a prezentat nivele reduse de fluorescență roșie la grupul propofol 50 μg/mL, comparativ cu grupul de control sau cu grupurile tratate cu concentrații inferioare de propofol. Analizele de citometrie în flux au arătat că atât intensitatea cât și numărul speciilor reactive de oxigen sunt reduse în grupul tratat cu propofol.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea cercetării cuprinde mai multe aspecte:

- Noul mod de administrare a TIVA- *target controlled infusion(TCI)*, care permite menținerea unei concentrații la nivelul creierului, într-un echilibru strâns cu concentrația plasmatică, și crește astfel acuratețea tehnicii
- În *primul studiu*, s-a testat ipoteza că TIVA atenuează răspunsul inflamator mai mult decât anestezia cu izofluran ca răspuns la colecistectomia laparoscopică. A fost aleasă tehnica laparoscopică deoarece trauma tisulară este minimă și similară de la un caz la altul, și astfel se reduce influența chirurgiei *per se* asupra

răspunsului imun. Elementul de noutate a fost determinarea moleculelor de adeziune celulară ca răspuns la tehnica anestezică, studiul fiind printre cele mai mari care a evaluat un singur tip de intervenție chirurgicală. În privința moleculelor de adeziune celulară, rezultatele obținute de noi sunt similare altor studii, și confirmă faptul că izofluranul are un efect inhibitor asupra moleculelor de adeziune celulară.

- În *cel de-al doilea studiu*, s-a urmărit dacă administrarea unei doze profilactice de dexametazonă, utilizată frecvent pentru profilaxia grețurilor și vărsăturilor, are vreă influență asupra altor componente ale răspunsului imun înăscut la om. Dexametazona (4 mg) a scăzut concentrațiile citokinelor inflamatorii (IL-6, IL-8) imediat după inducția anesteziei și în timpul intervenției chirurgicale, rezultate similare altor studii, dar la doze mult mai mari de dexametazonă. Un răspuns inflamator mai redus după administrarea unei doze mici de dexametazonă ar putea constitui un argument în favoarea extinderii utilizării și la alte categorii de pacienți sau pentru alte tipuri de intervenții chirurgicale.
- În *studiul al treilea*, am ales să determinăm IL-32, care joacă un rol important în modularea răspunsului înăscut și adaptativ la infecție. IL-32 este implicată și în inflamația vasculară, cauzând inducția altor citokine inflamatorii ca și ale TNF- α sau ale moleculelor de adeziune celulară. Studiul este primul de acest gen care a investigat influența tehnicii anestezice asupra celor două citokine proinflamatorii în chirurgia laparoscopică, dimensiunea eșantionului fiind prea mică pentru a putea stabili o corelație între cele două citokine. Nu au existat diferențe semnificative asupra concentrațiilor plasmatiche ale IL-32 și TNF- α după colecistectomia laparoscopică în primele 24 ore postoperator, în schimb efectele tehnicii anestezice asupra TNF- α , au fost similare cu cele publicate anterior.
- În *ultimul studiu*, experimental am investigat dacă concentrații diferite de propofol exercită efecte asupra culturilor de celule pancreatice umane (PANC-1), și am demonstrat că propofolul exercită un puternic efect antioxidant *in vitro*, direct proporțional cu concentrația utilizată, similar altor studii *in vitro* și *in vivo*, legate de proprietățile antioxidante ale acestui anestezic. Propofolul rămâne astfel agentul anestezic ideal pentru pacienții expuși riscului de leziuni oxidative prin ischemie-reperfuzie sau pentru pacienții cu cancer.

Evaluation of the influence of total intravenous anesthesia (TIVA) on the serum levels of interleukins and cell adhesion molecules

PhD student **Adina - Norica Răduț**

Scientific coordinator **Prof. Dr. Victor Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Anesthesia and immunity	19
1. Immune response, immune cells and inflammation	19
1.1.1. Proinflammatory cytokines	21
1.1.2. Anti-inflammatory cytokines	22
1.1.3. Cell adhesion molecules	22
1.1.4. New progress in cytokine research	23
1.2. Impact of anesthesia and surgery on cytokine production	24
1.2.1. General considerations	24
1.2.2. Immunomodulating effect of anesthetics used in clinical practice	26
1.2.2.1. <i>Intravenous anesthetic agents</i>	26
1.2.2.2. <i>Opiates</i>	28
1.2.2.3. <i>Volatile anesthetic agents</i>	29
2. Total intravenous anesthesia	31
2.1. Concept and technique	31
2.2. TIVA administration modes. TCI technique (target-controlled infusion)	32
2.3. Combination of substances used in TIVA	33
2.3.1. Propofol	33
2.3.2. Remifentanyl	33
2.4. TIVA versus inhalation anesthesia in modulating immune response	34
2.5. Antiinflammatory agents associated with anesthetic regimens	36
2.5.1. Local anesthetics	36
2.5.2. Dexamethasone in modulating perioperative immune response	37
PERSONAL CONTRIBUTION	39
1. Working hypothesis/objectives	41
2. 1st study. Choice of anesthetic technique on plasma concentrations of interleukins and cell adhesion molecules	45

2.1. Introduction	45
2.2. Working hypothesis	46
2.3. Material and method	46
2.4. Results	49
2.5. Discussions	55
2.6. Conclusions	57
3. 2nd study. The influence of a prophylactic dose of dexamethasone for postoperative nausea and vomiting on plasma interleukin concentrations after laparoscopic cholecistectomy	59
3.1. Introduction	59
3.2. Working hypothesis	60
3.3. Material and method	60
3.4. Results	63
3.5. Discussions	69
3.6. Conclusions	71
4. 3rd study. Total intravenous versus inhalation anesthesia in patients undergoing laparoscopic cholecistectomies. Effects on two proinflammatory cytokines serum levels: IL-32 and TNF-alfa	73
4.1. Introduction	73
4.2. Working hypothesis	74
4.3. Material and method	74
4.4. Results	76
4.5. Discussions	81
4.6. Conclusions	82
5. 4th study. How do various concentrations of propofol influence ex-vivo cytokine response in cultured human PANC-cells – antioxidant and antiapoptotic effects. Experimental study	83

5.1. Introduction	83
5.2. Working hypothesis	84
5.3. Material and method	84
5.4. Results	86
5.5. Discussions	89
5.6. Conclusions	90
6. General conclusions (synthesis)	91
7. Originality and innovative contributions of the thesis	93
REFERENCES	97
APPENDIX	113

Keywords: total intravenous anesthesia, inhalation anesthesia, interleukins, cell adhesion molecules, laparoscopic surgery, anesthetic technique, immune response.

INTRODUCTION

In choosing anesthetic technique, there are few studies in the literature that have followed the evolution of serum interleukins in laparoscopic surgery practiced under general inhalation anesthesia versus total intravenous anesthesia (TIVA), or similar studies in animals, or other types of surgery, which started from the idea of research. TIVA-TCI technique implementation, which will be outlined in the following chapters of the thesis originally started as a research project PN II (PC 41-025), which included several partner centers with different surgical profile, among the objectives of this extensive project being also the evaluation of the influence of intravenous anesthesia technique over immune response.

Anesthetic management may influence the immunological effects of both surgery and anesthesia, to improve long-term evolution, which is important especially in patients with cancer, in whom postoperative immunosuppression accelerates the development of residual cancer cells, as well as the appearance of new metastases.

Intravenous administration has become an increasingly popular alternative to administration of anesthesia compared with inhalation technique. This process of evolution was due to a better understanding of the principles of pharmacokinetics and pharmacodynamics, as well as drug interactions that occur during continuous administration of substances.

Perioperative immunosuppression negative consequences, including tumor metastasis and postoperative infections can be reduced by proper selection of anesthetic agents and anesthetic techniques. Inflammatory effect of anesthetics may be beneficial in situations of ischemia-reperfusion or SIRS.

The future will require a clear distinction between the different anesthetic techniques taking into account the patient's immune status.

Working hypothesis and general objectives

Proinflammatory interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), as well as anti-inflammatory (IL-4, IL-10, IL-13) interleukins are released or inhibited by the predominance of the inflammatory response or infection, or when the body needs to counterbalance a wide inflammatory response. Regarding the anesthetic substances, their role on the release of interleukins through various processes involved in defending the organism is not yet fully established and is also difficult to investigate due to overlapping influence of anesthesia over the surgical act and the medical history of the patient.

All aspects of influence of anesthetics on immune mechanisms continue to be an object of interest and research and this findings could indicate the anesthetic technique of choice in certain categories of patients, taking into account their immunological status.

The general objectives were:

1. Comparison of the effects of two types of anesthesia, total intravenous (TIVA) and inhalation anesthesia on plasma concentrations of pro and anti-inflammatory interleukins, as well as cell adhesion molecules in patients undergoing elective laparoscopic surgery.
2. Evaluation of the influence of low-dose dexamethasone 4 mg, which is commonly used for the prophylaxis of postoperative nausea and vomiting in patients undergoing laparoscopic surgery, on the concentration of interleukins, based on the hypothesis that there would be differences in pro-inflammatory interleukin concentrations in patients who received dexamethasone.
3. Comparison of the effect of two anesthetic techniques (TIVA and inhalation) on plasma levels of two potent proinflammatory cytokines (IL-32 and TNF- α), the novelty being the determination of IL-32, involved in the activation cascade of proinflammatory cytokines, as well as a potent inducer of TNF- α in response to inflammation.
4. Evaluation of antioxidant and anti-apoptotic effects of propofol in an experimental study in cell cultures of human pancreatic adenocarcinoma (PANC), by administration of different concentrations of propofol in a concentration dependent manner.

1st study. Choice of anesthetic technique on plasma concentrations of interleukins and cell adhesion molecules**Working hypothesis.**

This prospective, randomized study was designed to compare the effects of TIVA and volatile anesthesia on plasma concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory interleukins and on cell adhesion molecules in patients undergoing elective laparoscopic surgery. Specifically, we tested the hypothesis that TIVA blunts the inflammatory response to laparoscopic cholecystectomy more than isoflurane anesthesia. Laparoscopic surgery was chosen because the amount of tissue injury is small and similar from case to case, thus reducing the impact of surgery *per se* on immune responses.

Methods.

After obtaining University Ethics Committee approval (Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie 'Iuliu Hațieganu', Cluj-Napoca, nr. 178A/2007) and written informed consent, we enrolled 88 patients with ASA 1 or 2 who were scheduled for laparoscopic cholecystectomy. We excluded patients with known inflammatory diseases (including acute cholecystitis) or immune system disorders, asthma, obesity (BMI ≥ 30 kg/m²), diabetes, gastric ulcers and allergies. We also excluded patients who currently or recently used steroids or anti-inflammatory medication, or who had white blood cell count $>10^4/\mu\text{L}$ or a preoperative core temperature $> 37^\circ\text{C}$.

Patients were randomized into two study groups using a computer-generated sequence: one-half were assigned to target-controlled infusion TIVA with propofol, and one-half to isoflurane volatile anesthesia. TIVA was induced and maintained with a target plasma concentration of 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Orchestra, Base Primea; Fresenius Kabi, Fresenius Vial SAS, Brézins, France). The propofol infusion was adjusted to target a Bispectral Index between 40 and 55 (Covidien, Dublin, Ireland). Isoflurane anesthesia was induced with propofol 1.5-2 mg/kg and maintained with isoflurane 1 -1.5 MAC titrated to Bispectral Index 40 to 55 and hemodynamic parameters. Intraoperative anesthetic management for similar for the two groups. Venous blood was sampled before induction of anesthesia

(T1), after intubation (T2), 2 hours after emergence (T3) and 24 hours after anesthesia (T4). Plasma concentration of interleukins and CAMs were measured by an ELISA technique using commercially available kits (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Results.

We present the results from 88 remaining patients (44/group).

The largest cytokine response to surgery were observed for IL-6 and IL-10, each with significant peak concentrations 2 hours after surgery. IL-6 was significantly greater in patients assigned to isoflurane: 46.4 (95% CI: 34.3-70.7) pg/ml, versus 17.6 (95% CI:11.9-20.7) pg/ml ($P < 0.01$). In contrast IL-10 was greater in patients assigned to TIVA: 20.1 (95% CI: 14.2-32.4) pg/ml versus 12.4 (95% CI: 8.8-18.7) pg/ml ($P=0.03$). By 24 hours after surgery, concentrations were similar in each group and similar to baseline values, except for IL-6 that remained significantly increased in both groups ($P < 0.001$) and for IL-10 that remained significantly increased in patients given isoflurane ($P = 0.009$).

Our results are difficult to compare with previous studies, since each study evaluated different anesthetic protocols, different surgical interventions, and used different cytokine assays. Nonetheless, our results are generally consistent with the previous literature and are among the largest that evaluated a single typical operation.

2nd study. The influence of a prophylactic dose of dexamethasone for postoperative nausea and vomiting on plasma interleukin concentrations after laparoscopic cholecistectomy

Working Hypothesis

This second study aimed to investigate the influence of a small dose of dexamethasone 4 mg, commonly used for prophylaxis against nausea and vomiting (PONV) on the perioperative plasma concentrations of interleukins after laparoscopic cholecystectomy. We hypothesized that there would be differences in proinflammatory interleukin concentrations in patients who received dexamethasone.

Methods.

Ethics approval for this study (no.178B/2007) was provided by the Ethical Committee of the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Romania, on 19 December 2007. After obtaining written informed consent, 46 ASA status 1 or 2 patients scheduled for laparoscopic cholecystectomy under general anesthesia (3rd Surgical Clinic, Regional Institute for Gastroenterology and Hepatology, Cluj-Napoca) between January 2008 and August 2009 were allocated randomly to one of two study groups (23/each group) using a computer-generated sequence. In the dexamethasone group, patients received dexamethasone 4 mg for prophylaxis against PONV; patients in the second group received no dexamethasone (control group). Patients with immune system disorders, known inflammatory diseases (including acute cholecystitis), an abnormal white cell count, asthma, obesity (BMI ≥ 30 kg/m²), diabetes, gastric ulcer, allergies, history of PONV and current steroid or anti-inflammatory medication were excluded from participation. We used TIVA as an intervention for PONV prophylaxis, taking into consideration the increased risk of PONV after

laparoscopic cholecystectomy and the absence of PONV prophylaxis with dexamethasone in one of the study groups. Anesthesia was induced in all patients with a target-controlled (TCI) infusion of propofol with an initial target plasma concentration of 4 µg/ml (model Marsh modification) and a manually controlled infusion (MCI) of remifentanyl with 0.5 0.5 µg kg⁻¹min⁻¹ in the first minute and then 0.25 µg kg⁻¹min⁻¹.

Results.

We present the results for 42 patients who completed the study.

Our findings indicate that there were no significant differences produced by dexamethasone 4 mg in the concentrations of IL-1β, TNFα sau IL-13 evaluated as AUC of percentages from baseline values of the plasma concentrations for the first 24 h postoperatively. The AUC of plasma concentration variation of IL-6 and IL-8 were significantly higher in the control group, whereas for IL-10, differences were slightly greater in the dexamethasone group. Two hours postoperatively, concentrations of IL-6 and IL-10 were significantly increased in both groups, while IL-8 was significantly increased in the control group. At 24 h, only IL-6 concentrations remained significantly increased in both groups, with a higher median value in the control group (although not statistically significant). IL-10 remained increased only in the control group, probably to counteract the abnormally increased concentration of IL-6.

3rd study. Total intravenous versus inhalation anesthesia in patients undergoing laparoscopic cholecistectomies. Effects on two proinflammatory cytokines serum levels: IL-32 and TNF-alfa

Working hypothesis

The present study was designed to compare the effects of TIVA and inhalation anesthesia on plasma concentrations of two potent proinflammatory interleukins (IL-32 and TNF-α), knowing that IL-32 is a potent inducer of TNF-α, in response to inflammation. At the same time, we tested the hypothesis that TIVA blunts the inflammatory response to laparoscopic cholecystectomy more than isoflurane anesthesia, and a correlation may be found between the two cytokines in response to minor surgery, similar to other studies.

Methods.

After approval by the Ethics Committee of our institution (Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof dr Octavian Fodor", Cluj Napoca) and after having written informed consent, 22 patients ASA physical status I-II, scheduled for laparoscopic cholecystectomy were included in the study. Patients were randomized by a computer-generated sequence in 2 study groups: group 1 (n=11) included patients undergoing TIVA and group 2 (n=11), included patients undergoing inhalation anesthesia. Exclusion criteria were the same as in the previous studies. Interleukins plasma concentrations were sampled immediately before induction (T1), after intubation (T2), at 2 and 24 hours postoperatively and were measured using ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Laboratory staff were blinded to the study groups and were

not involved in the anesthetic procedures.

Results. All the enrolled patients completed the study. When comparing interleukin concentrations between groups at different time intervals, there was no significant difference in plasma concentration of IL-32 and TNF- α .

TNF- α showed a larger variability in the TIVA group, with a small increase at two hours postoperatively (T3) as compared to isoflurane group, while at 24 postoperative hours (T4), TNF- α remained increased in both groups compared to baseline values (T1).

4th study. How do various concentrations of propofol influence ex-vivo cytokine response in cultured human PANC-cells – antioxidant and antiapoptotic effects. Experimental study

Working hypothesis

We aimed to investigate whether various concentrations of propofol exert antiapoptotic effects on human pancreatic adenocarcinoma cell line (PANC), either through increased cell viability or through its antioxidant properties (direct ROS scavenger).

Methods.

After seeding PANC-1 cells under standard growth conditions, cell culture viability was tested by quantifying the concentration of formazan after exposure of cell lines to various concentrations of propofol, N-acetylcysteine (NAC), or combinations of propofol (all concentrations) and N-acetylcysteine (10 mM). The cells were then incubated with MTT solution (37 °C, 3 hours) and the concentration of formazan was determined by spectrophotometric methods.

Apoptosis assay involved the use of a commercial kit to test for the presence of phosphatidylserine (PS) on the surface of the membrane. The experimental design included two groups: control group (culture medium) and propofol-treated group (50 mg / mL). Generated reactive oxygen species were quantified using flow cytometry, according to the protocol described by the manufacturer.

Results.

Viability levels of groups exposed to different concentrations of Propofol solution were directly proportional to concentration. Apoptosis assay using Annexin-V revealed diminished red fluorescence staining on 50 μ g/mL Propofol-exposed group as compared to Control or to groups treated with lower concentration of Propofol. Flowcytometric analysis revealed that both intensity of fluorescence and the number of ROS-producing cells is reduced in Propofol-treated group.

Originality and innovative contribution of the thesis

The originality of this research comprises several aspects:

- New ways of administering TIVA- *target controlled infusion (TCI)*, which helps to maintain concentrations in the brain, in a tight balance with the plasma concentration, and increases the accuracy of the technique

- In the first study, we tested the hypothesis that TIVA attenuates the inflammatory response more than isoflurane anesthesia in response to laparoscopic cholecystectomy. A laparoscopic technique was chosen because of minimal tissue trauma, similar from case to case, thus reducing the influence of surgery *per se* on the immune response. The novelty was the determination of cell adhesion molecules in response to anesthetic technique; the study is among the largest evaluating one type of surgery. In terms of cell adhesion molecules, our results are similar to other studies, and confirm that isoflurane has an inhibitory effect on cell adhesion molecules.

- The second study, followed if a prophylactic dose of dexamethasone, commonly used for prophylaxis against nausea and vomiting, has any influence on other components of the innate immune response in humans. Dexamethasone (4 mg) decreased the levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-8) soon after induction of anesthesia and during surgery, results, similar to other studies, but at much higher doses of dexamethasone. A reduced inflammatory response following administration of low-dose dexamethasone could be an argument in favor of extending the use to other categories of patients or other types of surgery.

- In the third study, we chose to determine IL-32, which plays an important role in modulating innate and adaptive response to infection. IL-32 is involved in vascular inflammation, leading to induction of other inflammatory cytokines like TNF- α or cell adhesion molecules. The study is the first of its kind to investigate the influence of anesthetic technique on the two proinflammatory cytokines in laparoscopic surgery; the sample size is too small to establish a correlation between the two cytokines. There were no significant differences in plasma concentrations of IL-32 and TNF- α after laparoscopic cholecystectomy within 24 hours after surgery. Anesthetic technique effects on TNF- α concentrations were similar to those previously published.

- In the final study, experimental, we investigated whether various concentrations of propofol exert effects on cell cultures of human pancreatic adenocarcinoma (PANC-1), and we managed to demonstrate that propofol exerts a powerful antioxidant effect *in vitro* in direct proportion to the concentration used, similar to other studies in *vitro* and *in vivo*, related to the antioxidant properties of this anesthetic. Propofol remains the ideal anesthetic agent for patients at risk of oxidative damage by ischemia-reperfusion injury or cancer patients.