



**IOSUD UNIVERSITATEA TITU MAIORESCU DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ DOMENIUL MEDICINĂ**

**STUDIU COMPARATIV A DOUĂ TEHNICI
ANESTEZICE ASUPRA STATUSULUI IMUN
ÎN CANCERELE COLO-RECTALE**

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Habil CRISTIANA TĂNASE

Student-doctorand:

ISADORA ZAHARESCU (MIHAI)

BUCUREȘTI 2020

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PROPRII PUBLICATE REPREZENTATIVE PENTRU STUDIUL DOCTORAL	iv
LISTA ABREVIERILOR	vi
INTRODUCERE.....	1
Motivația personală a alegerii acestei teme	6
PARTEA GENERALĂ	7
Capitolul 1. IMUNITATEA CELULARĂ ANTITUMORALĂ.....	8
1.1 Noțiuni generale despre imunitate	8
1.2. Celulele Natural Killer (NK) și citotoxicitatea	10
1.3. Interacțiunea dintre celulele tumorale și sistemul imun.....	13
<i>1.3.1. Teoria evadării tumorale. Imunosupraveghere. Imunoeditare.</i>	<i>13</i>
<i>1.3.2. Imunitatea celulară antitumorală</i>	<i>14</i>
1.4. Celulele NK și procesul de metastazare	17
Capitolul 2. CITOTOXICITATEA CELULELOR NK ÎN PERIOADA PEROPERATORIE.....	20
Capitolul 3. ACTUL ANESTEZICO-CHIRURGICAL ȘI IMUNITATEA ANTITUMORALĂ.....	23
3.1. Modificarea nivelului citokinelor în perioada peroperatorie.....	23
3.2. Actul chirurgical și răspunsul imun	24
3.3. Factori perioperatori ce pot modifica răspunsul imun.....	29
3.4. Efectul anestezicelor asupra funcției imune	32
<i>3.4.1. Influența opioizilor asupra sistemului imun</i>	<i>34</i>
<i>3.4.2. Influența anestezicelor volatile asupra imunității celulare</i>	<i>39</i>
<i>3.4.3. Influența substanțelor hipnotice asupra imunității celulare (propofol,dexmedetomidine, midazolam, ketamina, N₂O)</i>	<i>45</i>
<i>3.4.4. Influența altor substanțe asupra imunității celulare (anestezice locale, clonidina).....</i>	<i>46</i>
3.4.5. Concluzii	48

Capitolul 4. IMUNITATEA CELULARĂ ȘI TIPURILE DE ANESTEZII	49
4.1. Tipuri de anestezii și rata de supraviețuire. Studii existente la momentul actual.	49
.....	
4.2. Anestezie generală vs anestezie loco-regională în cancerul colo-rectal.....	53
4.3. Anestezie generală vs anestezie loco-regională în alte tipuri de cancere	55
4.3.1. <i>Anestezie generală vs anestezie loco-regională în cancerul mamar.....</i>	<i>55</i>
4.3.2. <i>Anestezie generală vs anestezie loco-regională în cancerul de prostată</i>	<i>55</i>
4.3.3. <i>Anestezie generală vs anestezie loco-regională în alte localizări neoplazice</i>	
.....	56
4.4 Concluzii.....	57
4.5. Stadiul actual al impactului actului anestezic asupra funcției imune	61
4.5.1. <i>Rezultatele studiilor existente</i>	<i>61</i>
4.5.2. <i>Studii aflate în desfășurare</i>	<i>65</i>
Capitolul 5. CONCLUZII	62
PARTEA SPECIALĂ.....	63
Capitolul 6. MATERIAL ȘI METODĂ.....	64
6.1. Materialul de studiu	64
6.2. Metodele de studiu	65
6.2.1. <i>Tipul de studiu</i>	<i>65</i>
6.2.2. <i>Criterii de eligibilitate</i>	<i>66</i>
6.2.3. <i>Criterii de admitere</i>	<i>66</i>
6.2.4. <i>Criterii de excludere</i>	<i>66</i>
6.3. Principii și metodă.....	67
6.3.1. <i>Metoda de lucru.....</i>	<i>67</i>
6.3.2. <i>Parametrii urmăriți</i>	<i>71</i>
6.4. Prelucrarea și interpretarea datelor	83
6.4.1. <i>Analiza statistică descriptivă.....</i>	<i>83</i>
6.4.2. <i>Analiză statistică inferențială.....</i>	<i>84</i>
Capitolul 7. REZULTATE.....	85
7.1. Descrierea lotului studiat.....	85

7.1.1. Caracteristici socio- demografice și antropometrice.....	85
7.1.2. Date despre tipul intervenției chirurgicale și tipul de anestezie	89
7.1.3. Date despre prezența/absența comorbidităților	90
7.1.4. Date despre medicația personală	91
7.1.5. Date despre administrarea de transfuzii sanguine în perioada peroperatorie	92
7.1.6. Date privind administrarea de agenți anestezici și alte substanțe	94
7.2. Cuantificarea reacției inflamatorii în funcție de parametri studiați.....	102
7.2.1. Analiza hemoleucogramei (HLG)	102
7.2.2. Analiza markerilor inflamatori	113
7.3. Analiza citotoxicității (CTX) celulelor Natural Killer (NK).....	123
7.4. Evaluarea profilului citokinelor	126
7.5. Corelații între agenți anestezici, parametri studiați.....	136
7.5.1. Relația opioizi-markeri inflamatori.....	137
7.5.2. Relația Sevoflurane- activitate citotoxică celule NK	137
7.5.3. Relație opioizi- profil citokine	138
7.5.4. Citotoxicitate celule NK- IFN- γ	140
7.5.5. Anestezice locale – activitate citotoxică celule NK.....	142
7.5.6. Influența transfuziilor sanguine	143
Cap. 8. DISCUȚII	149
Cap. 9 CONCLUZII FINALE	159
REFERINȚE	167

PARTEA GENERALĂ

Partea generală este structurată în cinci capitole.

Capitolul 1 sintetizează noțiuni generale despre imunitatea celulară antitumorală. Astfel, în această parte sunt sumarizate date despre imunitatea celulară înăscută și dobândită, celulele natural killer, activitatea citotoxică a acestora precum și interacțiunea dintre celulele tumorale și sistemul imun.

Capitolul 2 descrie modificările capacității citotoxice a celulelor NK în perioada peroperatorie, fiind consemnate rezultatele studiilor care au analizat aceste aspecte până la momentul actual. Concluzia unanimă este faptul că în perioada postoperatorie, capacitatea citotoxică a celulelor NK este afectată, nefiind un consens în privința perioadei de reducere a activității citotoxice sau a unei corelații între numărul, funcția celulelor NK și prognostic.

În **capitolul 3** este analizată influența actului anestezico-chirurgical asupra sistemului imunitar, fiind detaliate în subcapitole modificările profilului citokinelor în perioada peroperatorie, factorii peroperatori ce pot modifica răspunsul imun precum și influența stresului chirurgical și a substanțelor anestezice asupra imunității celulare.

Este unanim recunoscut faptul că în perioada peroperatorie există o imunosupresie datorată activării sistemului nervos simpatic și a axului hipotalamo-hipofizar. Actul chirurgical este urmat de un status inflamator modulată de citokine pro- și antiinflamatorii. Citokinele sunt proteine produse de exponenți ai sistemului imunitar și nu numai, care prin acțiune directă asupra receptorilor specifici de pe suprafața celulară exercită efecte de modulare a unor procese precum proliferarea, apoptoza, imunoreglarea. Printre cele mai studiate citokine în domeniul abordat sunt TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 și IFN- γ . Deasemenea, intervenția chirurgicală prin stresul indus, inhibă activitatea celulelor NK responsabile de atacul asupra celulelor tumorale și favorizează stimularea factorilor pro-angiogenetici. Având în vedere corelația răspunsului imunitar cu intensitatea actului chirurgical, multiple studii au demonstrat faptul că tehnica laparoscopică este superioară metodei clasice prin faptul că produce o depresie mai puțin accentuată a răspunsului imun.

Dintre factorii perioperatori ce pot influența răspunsul imun, am menționat hipotensiunea intraoperatorie, hipoxia, hipotermia, hiperglicemia, transfuzia alogenă de sânge, substanțele β -mimetice și catecolaminele, inhibitorii pompei de protoni, antiinflamatoarele steroidiene și nesteroidiene.

Referitor la actul anestezic, există studii care susțin că anumite droguri anestezice ar influența componente ale imunității celulare dar sunt foarte greu de delimitat doar efectele anesteziei în totalitate deoarece aceasta este asociată cu factori care, după cum am descris mai sus, au la rândul lor efecte asupra răspunsului imun (act operator, extensia tumorală, tipul de tumoră, statusul pacientului etc). În ceea ce privește administrarea de opioizi, comunitatea medicală nu a ajuns la un consens în privința efectelor antitumorale dar o certitudine o reprezintă efectul imunosupresor. Legătura dintre opioizi și sistemul imunitar se face prin intermediul receptorilor MOR (μ -opioid receptor), receptori influențați de citokinele pro-inflamatorii. Anestezicele volatile exercită un efect imunomodulator cert, acționând asupra celulelor NK, celulelor dendritice, neutrofilelor, macrofagelor și limfocitelor, deprimând astfel atât imunitatea înăscută cât și pe cea dobândită. Dintre substanțele hipnotice descrise, propofol se remarcă prin posibile efecte antitumorale prin stimularea LTh1 și neafectarea celulelor NK; pentru midazolam nu sunt studii pe subiecți umani care să permită menționarea unor concluzii în timp ce ketamina se pare că ar avea proprietăți pro-tumorale. Anestezicele locale exercită efecte anti-tumorale în strictă dependență cu gradul de lipofilie și potență.

Capitolul 4 descrie tipurile de tehnici anestezice precum și influența acestora asupra imunității, cu particularitățile aferente fiecărei patologii chirurgicale neoplazice. Tipurile de anestezii existente sunt clasificate în:

1. anestezii generale cu efecte asupra întregului organism
2. anestezii/analgezii loco-regionale cu efecte asupra diverselor segmente ale organismului supuse intervențiilor chirurgicale. Anestezia regională poate fi de mai multe tipuri: spinală, epidurală, blocuri nervoase și anestezia regională intravenoasă.

Marele avantaj al anesteziei peridurale este posibilitatea montării cateterului peridural, care aduce următoarele avantaje:

- permite prelungirea anesteziei, în concordanță cu durata intervenției chirurgicale;
- permite realizarea analgeziei postoperatorii prin injectarea pe cateter a unei concentrații mai mici de anestezic local +/- opioide, ceea ce va genera analgezie fără bloc motor.

Anestezia generală poate fi asociată cu anestezie epidurală rezultând o tehnică combinată care poate fi folosită atât intra- cât și postoperator. Avantajele utilizării anesteziei loco-regionale constau în reducerea durerii postoperatorii cu scăderea implicită a consumului de opioizi precum și în efectele antiinflamatorii ale anestezicelor locale utilizate.

Un interes aparte îl suscită efectele anesteziei combinate asupra evoluției pacienților neoplazici, având în vedere efectele benefice ale tehnicii loco-regionale enumerate mai sus

(reducerea consumului de opioizi, reducerea gradului de stres și efectele directe ale anesteziilor locale asupra statusului imun). În acest sens s-au făcut multiple cercetări asupra pacienților cu cancere abdominale, de prostată, de sân, laringiene, ovariene și uterine, în vederea căutării unor legături între diverse tipuri de anestezii și rata de supraviețuire precum și posibilitatea unei influențe a anesteziei asupra ratei de recidivă tumorală, studii ce nu s-au soldat cu concluzii convergente în toate cazurile. Deasemenea, se vorbește din ce în ce mai mult de anestezia fără opioizi la pacienți neoplazici, luând în considerare posibila intervenție a acestora asupra citotoxicității celulelor NK precum și asupra proceselor de proliferare și metastazare, rămânând un subiect insuficient clarificat până în prezent.

Sumarizând cele relatate mai sus, în momentul de față nu există rezultate unanim acceptate despre influențele pe care le-ar putea avea anestezia asupra imunității antitumorale. În schimb, există date care descriu existența unei imunodepresii peroperatorii, fenomen care poate fi modelat atât de actul chirurgical prin folosirea unor metode cât mai puțin invazive dar și de actul anestezic prin folosirea unor tehnici care să afecteze cât mai puțin răspunsul imunitar antitumoral înăscut.

Aspectele prezentate în prima parte a lucrării constituie o bază justificativă pentru studiul care face obiectul celei de-a doua părți a tezei, cea a contribuției personale. Din acest punct de vedere, lucrarea de față abordează o temă de actualitate pluridisciplinară și își propune să cerceteze influența a două tehnici anestezice asupra răspunsului imun în cancerul colorectal.

Contribuția personală descrie la început ipoteza de lucru generală, obiectivele studiului și metodologia generală a acestora. Se menționează obținerea aprobării Comisiei de Etică a Spitalului Clinic nr.1 C.F. Witing București, precum și cea a consimțământului informat al subiecților incluși.

Ipoteza de lucru a cercetării doctorale a constat în studierea comparativă a influenței a două tipuri de anestezii asupra imunității postoperatorii la pacienți cu cancer colo-rectal operați, în vederea evidențierii avantajului anesteziei combinate (anestezie generală combinată cu tehnică locoregională).

Obiectivele principale ale cercetării doctorale au fost următoarele:

1. Cuantificarea procesului inflamator în evaluarea celor două tehnici anestezice, funcție de parametri studiați
2. Analiza citotoxicității celulelor natural killer (NKCC) funcție de tipul de anestezie

3. Evaluarea profilului unor citokine pro- și antiinflamatorii în contextul celor două tehnici anestezice.

Obiectivele secundare derivate sunt reprezentate de:

- analiza unor corelații între diverși parametri ai statusului imun studiat
- corelații între diverse substanțe anestezice și non-anestezice administrate în perioada preoperatorie și unele componente ale răspunsului imun.

PARTEA SPECIALA

Material și metodă

Material

S-a efectuat un studiu prospectiv, observațional, nerandomizat, pe un număr de 33 de pacienți selectați folosind criteriile de excludere dintr-un număr de 45 de pacienți cu cancer colo-rectale, internați și operați în Clinica de Chirurgie Generală a Spitalului Clinic C.F. Witing, în perioada 2015-2018. Acești pacienți au fost împărțiți în două loturi:

- **Lotul 1:** 16 pacienți care au primit anestezie generală;
- **Lotul 2:** 17 pacienți care au primit anestezie combinată: anestezie generală cu anestezie locoregională (de tipul anestezie epidurală continuă)

Criterii de admitere: 18-80 ani, indiferent de sex; diagnostic cert de cancer colo-rectal; să permită montarea unui cateter epidural.

Criterii de excludere: risc ASA IV și cu grade de risc mai mari decât ASA IV; intoleranță, alergii, sau orice alte contraindicații pentru folosirea de opioizi/ropivacaina; boli semnificative ale arterelor coronare (test de efort pozitiv, infarct miocardic în ultimele 3 luni); hipertensiune arterială necontrolată (TA > 140/90mmHg); aritmii cardiace și cu precădere cele cu interval QT mărit; medicamente cunoscute care măresc intervalul QT: clasa IA antiaritmice (chinidina, procainamida, dysopyramide), clasa III antiaritmice (sotalol, dofetalide, ibutalide, amiodarone), haloperidol, thioridazine, arsenic trioxid, antidepressive triciclice); pacienți cu tulburări psihologice semnificative: schizofrenie, sindrom maniacal, tulburări bipolare sau psihoze; gravide sau femei în perioada de lactație ; obezitate morbidă (BMI > 40 kg/m²) și/sau greutatea peste 150 kg; insuficiență renală cronică (creatinina serică > 2.0 mg/dL); insuficiență hepatică, ciroză hepatică decompensată; alcool sau ingestie de droguri în ultimele 3 luni; tulburări ale echilibrului hidro-electrolitic necorectate; durere de tip neuropatic; consum cronic

de opioizi (>30mg oxycodona pe zi); cașexia; administrare sistemică de corticosteroizi mai mult de 2 săptămâni cu 6 luni preoperator; HIV sau alte stări imunosupresoare; preoperator INR > 1.4, trombocite < 100/mm³; sepsis sau celulită la locul de inserție al cateterului; imposibilitatea de a tolera un cateter epidural din varii motive (de ex.dureri de spate în regiunea lombară, teama pacientului de orice fel de consecințe, refuzul pacientului).

Anestezia este metoda terapeutică prin care se obține pierderea temporară a sensibilității pe baza unor reacții complet reversibile, datorată administrării unor substanțe chimice sau aplicării unor agenți fizici. Anestezia presupune obținerea următoarelor 4 obiective:

- Hipnoza
- Analgezia
- Relaxarea musculară
- Menținerea homeostaziei pe perioada intervenției chirurgicale

Anestezia combinată pe pivot volatil este tipul de anestezie generală folosit la lotul 1, în care fiecare dintre cele 4 componente ale anesteziei generale utilizează un anumit agent anestezic.

Etapele anesteziei generale sunt următoarele:

1. Examenul preanestezic – are ca obiectiv evaluarea pacientului din punctul de vedere al anamnezei, al examenului clinic și al examinărilor paraclinice astfel încât să se poată obține o concluzie privind tipul de anestezie care urmează a fi administrat precum și încadrarea pacientului într-un grad de risc. Riscul anestezic se evaluează după clasa de risc ASA (Societatea Americană de Anestezie):

- I – pacient sănătos
- II – pacient cu o afecțiune sistemică ușoară
- III – pacient cu o afecțiune sistemică severă ce îi limitează activitatea
- IV – pacient cu o boală invalidantă cu risc vital
- V – pacient muribund
- Pentru operațiile făcute în urgență se adaugă indicele E (Emergency)

2. Premedicația – reprezintă medicamentele administrate pacientului înaintea începerii anesteziei propriu-zise, cu scopul de a asigura: anxioliza, sedarea, amnezia, diminuarea activității sistemului nervos autonom, efectul antisialog, profilaxia tromboflebitei profunde, profilaxia pneumoniei de aspirație, desensibilizarea la cei cu risc alergic. Uzual, în premedicație se administrează:

- Un parasimpatolitic – atropină
- O benzodiazepină – midazolam sau diazepam
- Un opioid – petidină – dacă dorim și un efect analgetic

3. Inducția anesteziei – este perioada de tranziție de la starea de conștiență la cea de inconștiență cu instituirea suportului ventilator și menținerea stabilității hemodinamice. Are următoarele etape:

- Montarea unei linii venoase
- Inițierea monitorizării parametrilor hemodinamici și respiratori
- Inducția propriu-zisă care presupune oxigenare prealabilă pe mască, administrarea unui analgetic de tip opioid (Fentanyl), a unui hipnotic (Propofol) și a unui miorelaxant (Succinilcolina) în vederea intubației oro-traheale
- Conectarea la aparatul de anestezie reglat corespunzător

4. Menținerea anesteziei – este perioada în care: se continuă administrarea drogurilor anestezice inhalatorii (Sevoflurane) și/sau intravenoase, se ventilează bolnavul în regim controlat și se asigură monitorizarea hemodinamică, respiratorie, temperatură, bloc neuro-muscular, profunzimea anesteziei, parametri sanguini. Este perioada în care se desfășoară intervenția chirurgicală.

5. Trezirea din anestezie – este perioada în care pacientului îi revine starea de conștiență și respirația spontană, în condiții de stabilitate hemodinamică. În această perioadă se sistează administrarea gazelor anestezice, se antagonizează (dacă e cazul) efectele opioizilor și ale curarelor, se administrează doar oxigen și, în condițiile de siguranță, se deconectează de aparatul de anestezie și apoi se detubează.

Anestezia combinată pe pivot volatil este tipul de anestezie generală folosit la lotul 1, în care fiecare dintre cele 4 componente ale anesteziei generale utilizează un anumit agent anestezic. Introducerea unui cateter în spațiul epidural permite administrarea de anestezice locale (Ropivacaina) pe această cale, permițând o reducere considerabilă a necesarului de opioizi atât intraoperator cât și postoperator. Această tehnică a fost folosită la lotul 2 de pacienți.

Premedicația tuturor pacienților a fost asigurată de Midazolam 0,05mg/kg im. cu 30 minute preoperator. În sala de operație, pacienții au fost monitorizați de rutină conform protocoalelor existente: ECG, SpO₂, TA. Pentru pacienții din lotul 2 a fost nevoie de inserția unui cateter epidural, act medical care s-a desfășurat conform protocoalelor aflate în vigoare, în condiții de asepsie și antisepsie absolute.

Înainte de momentul inducției anestezice, s-a cateterizat o linie venoasă periferică și s-au prelevat probele sanguine preoperatorii (**momentul T1**).

La **lotul 1**, anestezia a constat din inducție cu Propofol (1.5 to 2 μg/kg) și menținută cu Sevoflurane și Fentanyl.

La **lotul 2** (anestezice locale) anestezia generala a constat din inducție cu Propofol (1.5 to 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) și menținută cu Sevoflurane (doze mici) și Ropivacaină 1% (administrată pe cateterul epidural). Au fost administrate doze mici de Fentanyl (0,1-0,3mg iv) pentru a asigura analgezia până la intrarea în acțiune a Ropivacainei.

La ambele grupuri s-a folosit Succinilcolina 1mg/kg în inducție iar în menținere pentru a asigura curarizarea s-a folosit Tracrium 0,5mg/kg post-inducție cu reinjecții la 20-30 min de 0,1-0,2 mg/kg. Tensiunea arterială medie și frecvența cardiacă au fost menținute într-un interval de 25% față de valorile bazale ale pacientului.

La finalul intervenției chirurgicale, ca analgetic, grupul 1 a primit pentazocina iar grupul 2 a primit Ketoprofen + Paracetamol.

Pacienții eligibili au fost informați în preziua operației atât despre riscurile anestezico-chirurgicale cât și despre includerea lor în acest studiu, urmând să semneze atât consimțământul informat anestezic cât și formularul Comisiei de Etică privind acceptul de a intra în studiu și de a folosi datele personale.

Toți parametrii determinați au fost cuantificați din sângele venos periferic, analizele biochimice fiind prelucrate în laboratorul Spitalului Witing. Probele pentru evaluarea profilului citokinelor și a citotoxicității celulelor NK au fost trimise și analizate la Institutul Victor Babeș. Probele sanguine au fost recoltate în 3 timpi diferiți:

1. **T₁**: În ziua operației, înainte de inducția anesteziei generale;
2. **T₂**: În ziua 1 postoperator, la 24h de prima recoltare;
3. **T₃**: La externare.

Metode

Având în vedere faptul că obiectivul principal al acestei lucrări este reprezentat de influența anesteziei asupra imunității organismului la pacienții cu cancer colo-rectal operați, am folosit drept markeri ai sistemului imun reacția inflamatoare, activitatea citotoxică a celulelor NK și un panel de citokine. Prin urmare, răspunsul sistemului imun a fost determinat prin:

1. **Cuantificarea reacției inflamatorii**: s-a făcut prin determinări ale valorilor VSH, fibrinogen, proteina C reactivă, hemoleucogramă, formula leucocitară din sângele periferic.

Metoda de determinare a numărului de leucocite și a formulei leucocitare s-a făcut automat pe principiul citometriei în flux.

Metoda de determinare a VSH: sânge venos prin metoda manuală Westergren.

Metoda de determinare a fibrinogenului: sânge venos prin metoda coagulometrică Clauss.

Metoda de determinare a proteinei C reactive : sânge venos latex–imunoturbidimetrie.

2. Evaluarea citotoxicității celulelor NK s-a realizat prin sistemul The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Sângele proaspăt recoltat se repartizează în tuburi de centrifugă pe un strat de mediu polimer lichid izoton, netoxic pentru celule, cu densitatea relativă 1,077. În urma centrifugării la 600g se obține distribuția spațială de populații celulare sanguine. Celulele mononucleare (limfocite, monocite) au fost izolate din sânge periferic integral, recoltat pe heparină (10UI/ml sânge), de la cei 33 pacienți cu cancer colo-rectal propuși pentru intervenție chirurgicală. Sângele a fost separat în gradient de densitate pe mediu Biocoll (Histopaque), pentru obținerea populațiilor celulare de interes (Boyum, 1968). Limfocitele umane periferice cu funcție NK au proprietatea de a liza *in vitro* linia mieloidă umană K562, țintă înalt sensibilă în studii de citotoxicitate mediată de celulele NK. Aceasta este o linie celulară de leucemie mieloidă cronică umană, cu morfologie de limfoblast. Linia celulară K562 este întreținută conform indicațiilor furnizorului (Lozzio și colab., 1975). Determinarea viabilității celulare s-a făcut cu Trypan. Această metodă permite evaluarea numărului de celule vii dintr-o suspensie celulară. Este o metodă rapidă de verificare a viabilității și de calcul al concentrației celulare. Pentru evaluarea efectului citotoxic pe care celulele limfoide/NK (efectorii), îl manifestă față de celulele tumorale (țintele) a fost utilizat sistemul The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). Pentru fiecare triplicat se calculează valoarea medie a DO, SD și CV. Se calculează citotoxicitatea (%) cu următoarea formulă:

$$CTX\% = (DO_{\text{experimental}} - DO_{\text{spontan efector}} - DO_{\text{spontan țintă}}) / (DO_{\text{total țintă}} - DO_{\text{spontan țintă}}) \times 100$$

3. Evaluarea profilului citokinelor IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ .

Determinarea nivelului interleukinelor s-a efectuat în Institutul Național “Victor Babeș”, Departamentul de Biochimie Proteomică. Pentru protocolul de lucru prin metoda X-MAP-array Luminex® a fost folosit kit-ul HUMAN CYTOKINE/CHEMOKINE MAGNETIC BEAD PANEL R & D (6 plex: IL-1beta, IFN-gamma, IL-2, IL-10, IL-6, TNF-alfa); s-au respectat instrucțiunile producătorului. Concentrațiile moleculelor analizate au fost obținute interpolând valorile MFI rezultate în urma analizei probelor pe curbele 5-Parameter Logistics

(5-PL). Coeficientul de regresie (R²) a prezentat valori apropiate de 1 pentru toate cele 6 curbe 5-PL. Determinările s-au efectuat în triplicat.

Analiza statistică descriptivă

Pentru fiecare unitate de observare, reprezentată de pacientul inclus în studiu, s-au colectat, în condiții de confidențialitate și siguranță, având ca sursă materialul de studiu menționat mai sus, următorii parametri: date de identificare, demografice, antropometrice, diagnostice și date despre intervenția chirurgicală, date preoperatorii (HLG, citotoxicitate celule NK, nivel citokine, valori markeri inflamatori), date anestezie și terapie-intensivă (tipul de anestezie, clasa de aneestezice și dozele aferente, dozele de analgezice administrate în primele 24 h, transfuziile sanguine administrate, modificările valorilor hemoleucogramei pe perioada peroperatorie (preoperator, la 24 ore postoperator și la externare), modificările citotoxicității celulelor NK pe perioada peroperatorie (preoperator, la 24 ore postoperator și la externare), evaluarea profilului citokinelor pe perioada peroperatorie (preoperator, la 24 ore postoperator și la externare), modificările markerilor reacției inflamatorii (VSH, proteina C reactivă, fibrinogen) pe perioada peroperatorie (preoperator, la 24 ore postoperator și la externare), valori la externare ale HLG, citotoxicității celulelor NK, profilului citokinelor, markerilor inflamatori, numărul de zile de internare. Fiecare dintre parametrii prezentați a fost studiat individual, dar s-au efectuat și corelații între aceste variabile și tipul de anestezie aplicat pacienților.

Analiză statistică inferențială

Datele au fost introduse într-o bază de date Excel, proiectată pentru studiu, care a fost ulterior procesată cu ajutorul softului specializat SPSS 17. Descrierea variabilelor studiate s-a făcut ținând cont de tipul acestora; pentru variabilele categoriale (expl. tipul anesteziei, sex, rezidență, dg operator, s.a.) s-au utilizat indicatori de frecvență (absolută și procentuală) și de structură, pentru variabilele numerice de tip continuu (expl. vârsta, determinări sanguine, s.a.) descriptorii majoritari au fost indicatorii de tendință centrală și dispersie (media și deviația standard). Pentru a evidenția efectul anesteziei asupra imunității s-a evaluat modificarea parametrilor sangvini (HLG, citotoxicitate celule NK, nivel de citokine, markeri inflamatori) în 3 momente diferite:

1. Preoperator - în ziua operației, înainte de inducția anesteziei generale
2. la 24 ore de la operatie față de momentul (inițial) preoperator

3. modificarea determinărilor sanguine în momentul externării față de momentele anterioare de evaluare (inițial) preoperator și postoperator.

Cantitativ, s-a notat „ $X_{T_i T_j}$ ”, $i=1-3$, $j=1-3$ diferența dintre valoarea parametrului „X” la momentul T_i și valoarea parametrului „X” la momentul T_j , considerând T_1 - moment preoperator, T_2 – moment postoperator la 24 ore, T_3 – momentul externării. „X” reprezintă fie elementele leucogramei, celulele NK, citokinele sau respectiv, markerii inflamatori.

Calitativ, s-a notat „ $X_{M_i M_j}$ ”, $i=1-3$, $j=1-3$ evoluția parametrului „X” la momentul M_i față de momentul M_j , unde M_1 - momentul preoperator, M_2 – momentul postoperator la 24 ore, M_3 – momentul externării. „X” reprezintă fie elementele leucogramei, citokinele sau respectiv, ale markerilor inflamatori.

Testarea diferențelor dintre loturi, s-a realizat prin aplicarea testelor t-Student pentru eșantioane mici, one-way Anova, chi-pătrat (χ^2), Fischer exact test. Diferențele au fost considerate semnificative statistic la un prag de semnificație p-value sub 0.05. În raport de obiectivele studiului analiza s-a stratificat pe subploturi de interes. Testarea legăturii dintre două serii de date s-a realizat prin aplicarea analizei de corelație Pearson. Pentru reprezentarea grafică a rezultatelor s-au folosit majoritar graficele tip “*plăcinta*” (grafice de structură), graficele “*box-wishker*” (grafice care prezintă seria de date a unei variabile marcând extremele) și punctele sub care se găsesc 25% (cuartila 1), 50% (cuartila 2), și respectiv 75% (cuartila 3) din seria de date) și respectiv, graficele tip *scatter plot* care ilustrează corelația dintre două variabile.

Testele au fost considerate cu semnificație statistică pentru o valoare $p \leq 0.05$.

REZULTATE

Rezultatele au fost obținute prin prelucrarea datelor în urma rezultatelor experimentale prin metode de analiză descriptivă și comparativă între cele două loturi și sunt prezentate în funcție de obiectivele studiului și metodele folosite:

1. Cuantificarea procesului inflamator în evaluarea celor două tehnici anestezice, funcție de parametrii studiați.

A) Analiza HLG:

Preoperator (T_1), între cele două loturi nu există diferențe semnificative statistic ($p > 0.05$). Rezultatele determinărilor sanguine efectuate la 24 ore postoperator (T_2), evidențiază

diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$) între cele două loturi pentru neutrofile (10910,78 lot 1 vs 7458,16 lot 2) sugerând un răspuns inflamator mai mare. Pentru leucocite, eozinofile, bazofile, au fost înregistrate valori mai mari în lotul 1, fără a atinge însă pragul semnificației statistice ($p > 0.05$). Evaluarea la momentul externării (T_3) nu evidențiază între cele două loturi diferențe semnificative statistic.

Calculul diferențelor dintre valorile HLG la 24 h postoperator față de cele consemnate la momentul preoperator ($T_2 - T_1$) a evidențiat diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$) între cele două loturi pentru limfocite % ($p < 0.001$), respectiv, raportul neutro/limfo ($p = 0.002$) astfel:

- Numărul de limfocite a scăzut mai puțin în lotul 2 comparativ cu lotul 1 (- 445,41 lot 1 vs - 21,23 lot 2);
- Raportul neutrofile/limfocite a crescut mai mult postoperator în lotul 1 față de lotul 2 (4,56 lot 1 vs 2,16 lot 2).

Calculul diferenței dintre valorile HLG la momentul externării și cele preoperatorii ($T_3 - T_1$) a evidențiat diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$) între cele două loturi pentru raportul neutrofile/limfocite: creșterea raportului este semnificativ statistic mai mare în lotul 1 comparativ cu lotul 2 (1,2 vs 0.003).

B. Analiza markerilor inflamatori: (VSH=viteza de sedimentare a hematiilor(mm)
PCR=proteina C reactivă (mg/l) FIBR- fibrinogen (mg).

Preoperator (T_1) valorile markerilor inflamatori sunt apropiate la cele două loturi.

Postoperator (T_2) valorile markerilor inflamatori se diferențiază între loturi, valorile VSH, PCR și Fibrinogen sunt mai mari în lotul 1 comparativ cu lotul 2; între cele două loturi se evidențiază diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$).

La momentul externării (T_3), valorile VSH, PCR și respectiv Fibrinogen, sunt superioare în lotul 1 celor din lotul 2, fără a atinge limita semnificației statistice ($p > 0.05$).

Diferența dintre valorile VSH, PCR, FIBR la 24 ore după operație (T_2) și valorile la momentul preoperator (T_1) atinge semnificația statistică ($p < 0.05$) în raport cu tipul de anestezie cu excepția VSH.

Concluzii la momentul T_2 vs T_1 :

- valorile VSH și fibrinogen cresc la ambele loturi, creșterea fiind mai mare la lotul 1: VSH (18,5 vs 12,8) iar la fibrinogen (154,3 vs.54,1);
- valorile proteinei C reactive cresc la lotul 1 și scad la lotul 2;

- modificările valorilor sunt semnificative statistic doar pentru valorile proteinei C reactive și fibrinogen.

La momentul externării (T₃), valorile parametrilor procesului inflamator studiat au revenit la nivelul celor preoperatorii sau ușor inferioare acestor valori, cu excepția fibrinogenului (ușor crescut la lotul 1), modificări statistic nesemnificative.

3. Analiza citotoxicității (CTX) celulelor Natural Killer (NK)

Cele două loturi au fost comparabile atât d.p.d.v. al caracteristicilor pacienților (sociodemografice, antropometrice, comorbidități, medicație personală,) cât și al factorilor chirurgicali (tip de intervenție, durata intervenției, stadializarea cancerului colo-rectal).

Preoperator (T₁), valorile CTX celulelor Natural Killer (NKCC, %) sunt apropiate în cele două loturi: 16.43% la lotul 1 vs. 16.65% la lotul 2.

La 24 h postoperator (T₂), (NKCC %) a înregistrat o scădere a valorii la ambele loturi astfel: la lotul1, NKCC(%) a scăzut semnificativ statistic de la 16.43+/-1.87 la 11.94+/-1.11 (**p=0,048**) în timp ce la lotul 2 valorile NKCC (%) au scăzut de la 16.65+/-1.41 la 14.52+/-1.19. De remarcat faptul că doar pacienții care au primit numai anestezie generală (lotul1) au prezentat scăderi semnificative ale NKCC (%) la 24 h postoperator (Fig.1, fig.2).

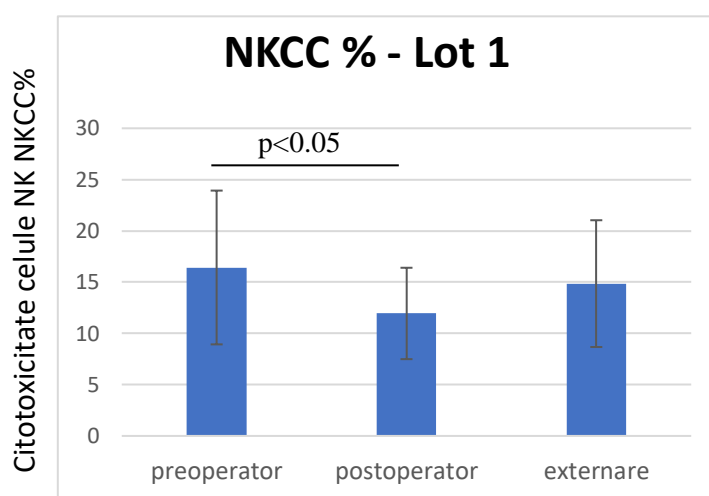


Figura 1. Modificările NKCC (%) la 24 h postoperator la lotul 1(anestezie generală)

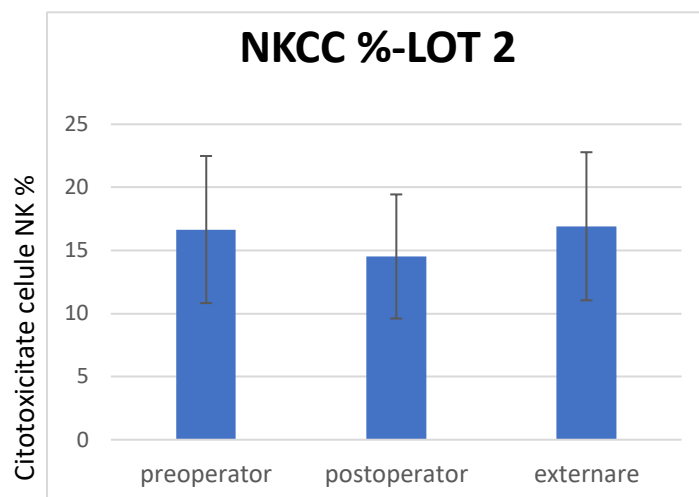


Figura 2. Modificările NKCC (%) la 24 h postoperator la lotul 2(anestezie combinată).

Valorile citotoxicității celulelor NK au înregistrat scăderi cu 24% la lotul care a primit doar anestezie generală comparativ cu doar 12%, cât a reprezentat scăderea valorilor NKCC (%) ale lotului care a primit anestezie combinată (Fig. nr.3).

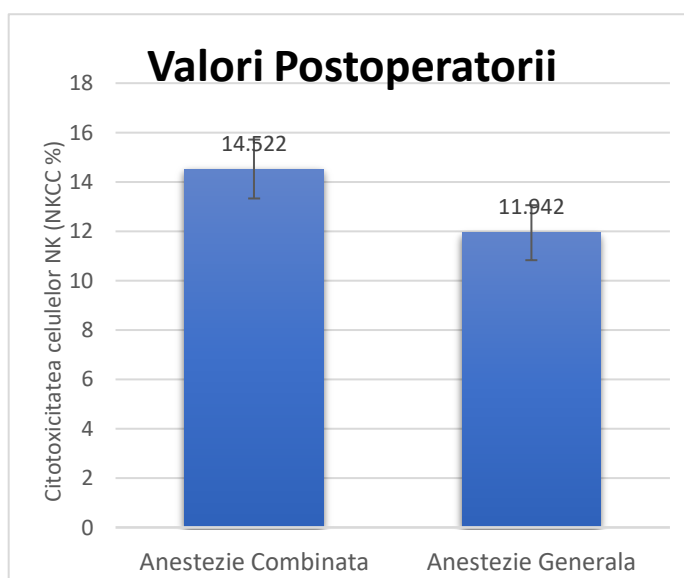


Figura 3. Analiză comparativă a valorilor NKCC% la 24 h postoperator la cele două loturi.

Diferența dintre valorile citotoxicității celulelor NK la 24 ore după operație (T₂) și valorile la momentul preoperator (T₁) atinge semnificația statistică (**p=0.007**) în raport de anestezie; se înregistrează o scădere a valorilor CTX. mai accentuată la lotul 1 comparativ cu lotul 2 (4.48+/-0.8 vs. 2.13+/-0.26),(Fig.nr.4).

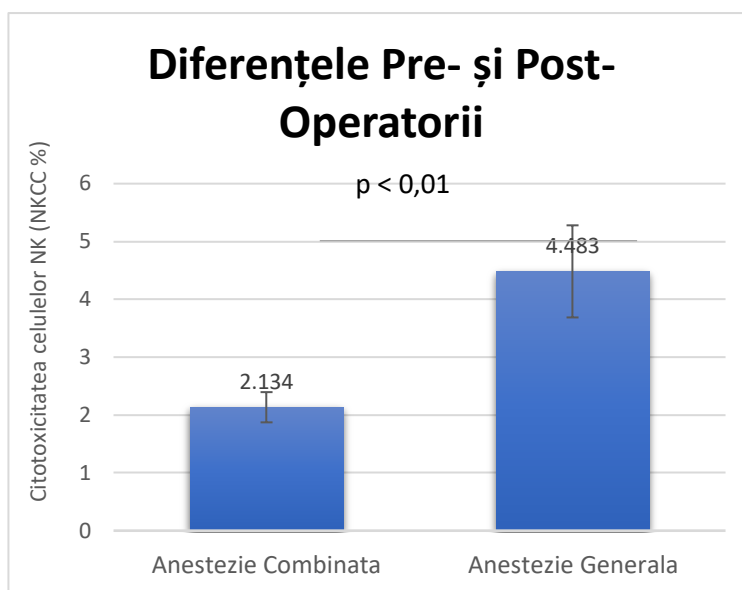


Figura 4. Analiză comparativă a valorilor NKCC% preoperatorii vs. postoperatorii (24 h postoperator) la cele două loturi.

La momentul externării (T₃), se constată faptul că valorile NKCC ale lotului 2 sunt ușor superioare celor de la internare, spre deosebire de valorile NKCC ale lotului 1 care sunt inferioare celor din perioada preoperatorie (Tabel nr.1).

Citotoxicitate NK (%)	Preoperator (T ₁)		Postoperator (T ₂)		Externare (T ₃)	
	Tip anestezie		Tip anestezie		Tip anestezie	
	Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
N	16	17	16	17	16	17
Minimum	7,45	7,20	6,48	6,62	7,42	7,41
Maximum	31,70	27,60	20,60	23,46	26,94	27,73
Medie	16,43	16,65	11,94	14,52	14,85	16,91
Deviația std.	1,87	1,41	1,11	1,19	1,54	1,42
p	ns		ns		ns	

Tabel nr.1 Citotoxicitatea celulelor NK în raport cu anestezia, în cele trei momente de evaluare.

Diferența dintre valorile citotoxicității celulelor NK la 24 ore după operație (T₂) și valorile la momentul preoperator (T₁) atinge semnificația statistică ($p < 0,05$) în raport de anestezie; celulele NK prezintă o scădere a valorilor CTX. mai accentuată în lotul 1 comparativ cu lotul 2 cu 4,48 față de 2,13 (Tabel nr.2)

CTX. NK T ₂ -T ₁	Tip anestezie	
	Lot 1	Lot 2

CTX. NK T ₂ -T ₁		Lot 1	Lot2
	Medie	-4,48	-2,13
	Deviatia std.	0,79	0,26
	Minimum	-11,09	-4,14
	Maximum	-0,96	-0,57
p		0.007	

Tabel nr.2 Diferența dintre valorile celulelor NK la 24 ore după operație (T₂) și valorile preoperatorii (T₁), în raport de anestezie.

Din evoluția citotoxicității celulelor NK în funcție de timpii operatori și tipul de anestezie observăm faptul că activitatea citotoxică a celulelor NK nu numai că a scăzut mai mult în perioada postoperatorie la pacienții care au primit doar anestezie generală dar nici nu a reușit la momentul externării să atingă valorile preoperatorii, în timp ce valorile NKCC% ale lotului 2 au prezentat scăderi mai mici imediat postoperator, cu tendințe de revenire la valorile inițiale, sugerând un efect mai bun al anesteziei combinate asupra NKCC% (Fig. nr.5).

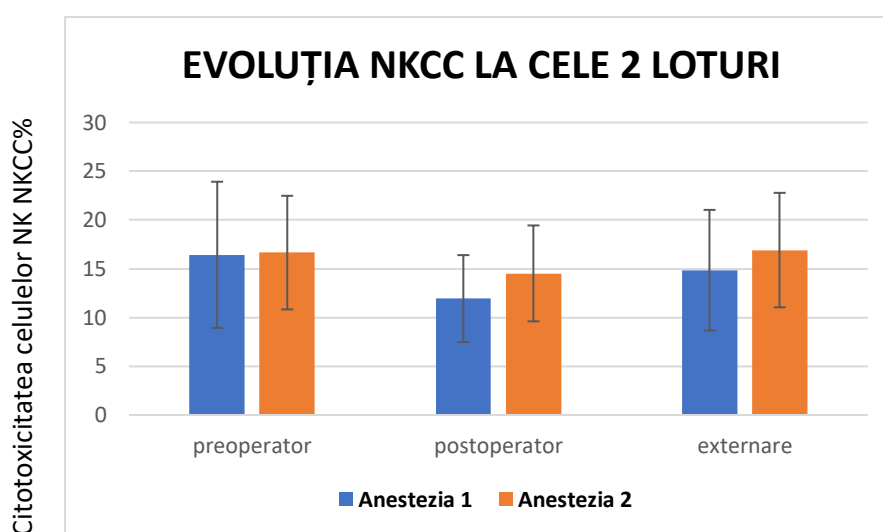


Fig.nr.5 Evoluția în dinamică a NKCC% la cele 2 loturi

4. Evaluarea profilului citokinelor

Analiza IL-2:

- valorile IL-2 scad la ambele loturi la 24 h postoperator (Fig.nr. 6)

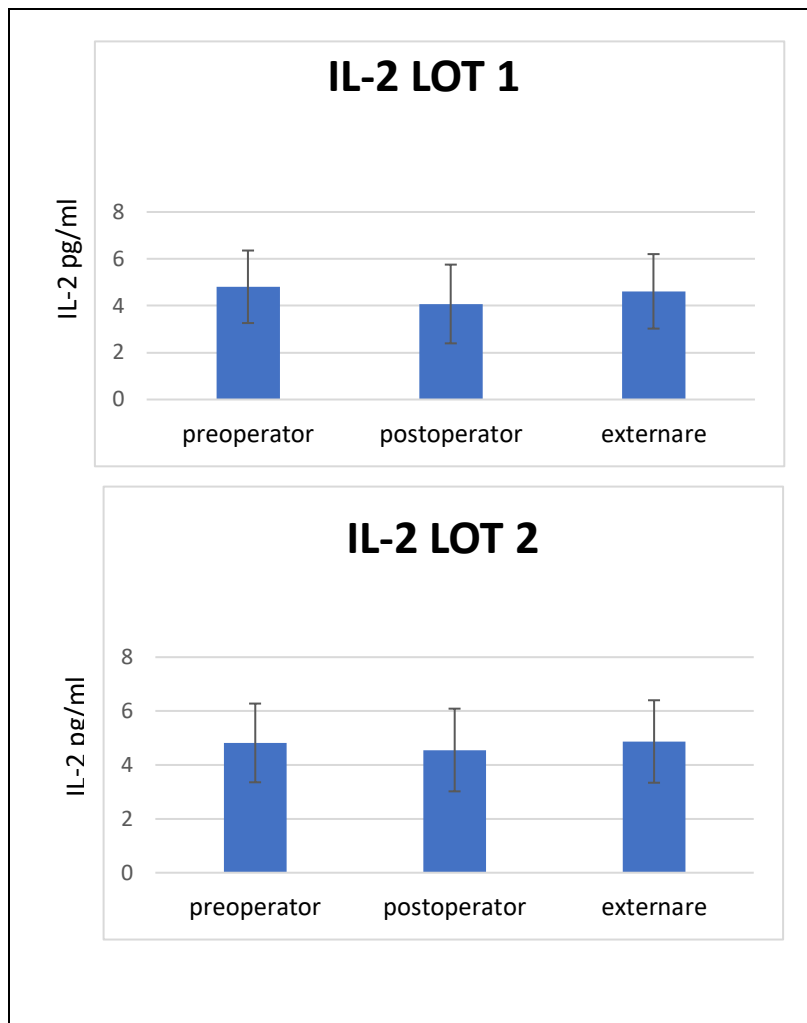


Fig.nr.6 Evoluția în dinamică a valorilor IL-2 la cele 2 loturi

- diferența dintre valorile IL-2 a 24 ore după operație (T₂) și valorile la momentul preoperator (T₁) între cele 2 loturi atinge semnificația statistică (**p<0.05**) în raport de anestezie ; la lotul 1, scăderea este mai accentuată în comparație cu lotul 2 (0,73 vs.0,26).(Tabel nr.4)

IL-2 T ₂ -T ₁	Tip anestezie	
	Lot 1	Lot 2
Medie	-0,73	-0,26
Deviatia std.	0,18	0,11
Minimum	-0,8	-0,6
Maximum	-2,6	-0,8
p	0.03	

Tabel nr.4 Diferența dintre valorile IL-2 la 24 h postoperator (T₂) și valorile preoperatorii (T₁), în raport de anestezie

- la externare , valorile IL-2 s-au apropiat de cele avute la internare la lotul1 în timp ce la lotul 2 valorile au prezentat o ușoară tendință de depășire a celor existente în perioada preoperatorie.
 -modificările sunt ne semnificative statistic

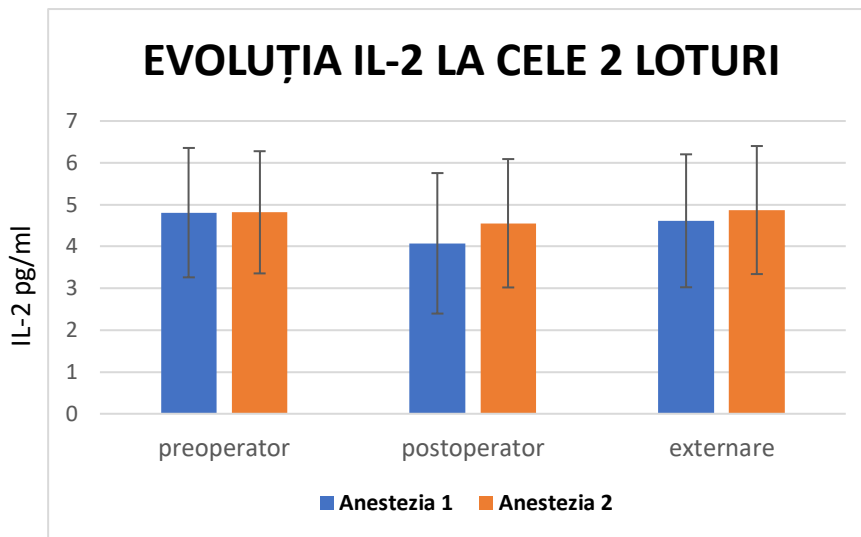
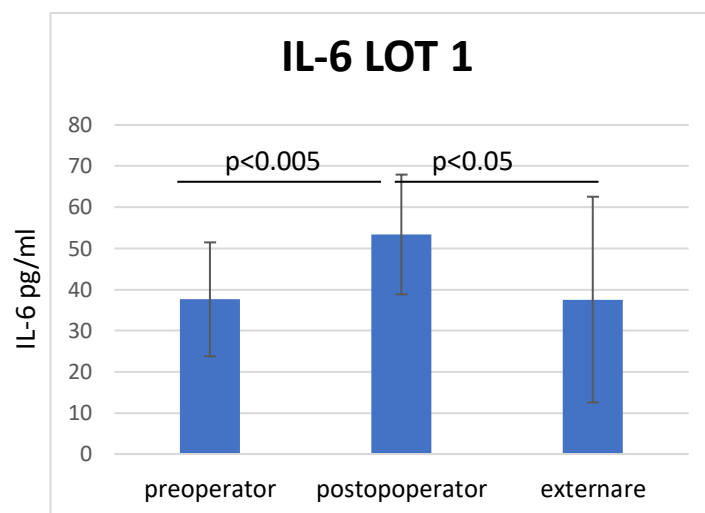


Fig.nr.6 Evoluția în dinamică a valorilor IL-2 la cele 2 loturi

Analiza IL-6 :

- la ambele loturi , valorile IL-6 cresc la 24 h postoperator, statistic semnificativ ($p=0,003$) doar la lotul1 (de la $37,61 \pm 3,46$ la $53,37 \pm 3,64$). Ulterior, ambele loturi prezintă, la momentul externării, scăderi statistic semnificative ale valorilor IL-6 fata de momentul postoperator : lotul 1 (de la $53,37 \pm 3,64$ la $37,54 \pm 6,25$, $p=0,03$) și lotul 2(de la $42,09 \pm 3,26$ la $31,06 \pm 3,07$, $p=0,02$),(Fig. nr 7).



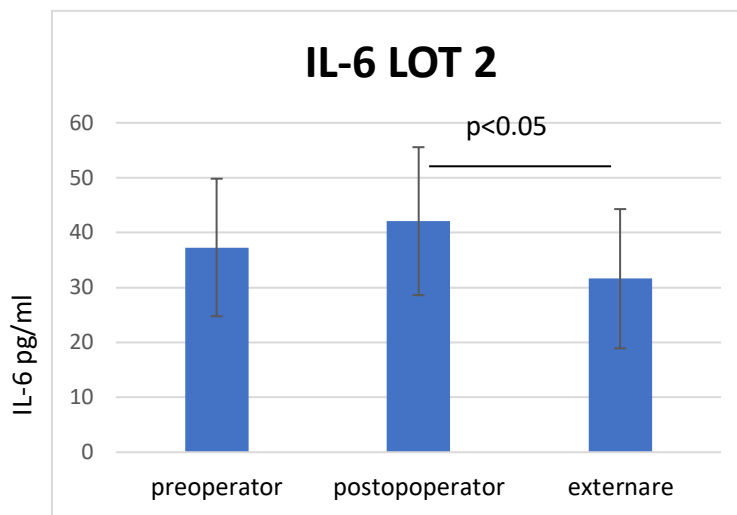


Fig.nr.7 Evoluția valorilor IL-6 la cele 2 loturi

- diferența dintre valorile IL-6 la 24 ore după operație (T₂) și valorile la momentul preoperator (T₁) atinge semnificația statistică (**p<0.001**) în raport de anestezie ; la lotul 1, creșterea este mai accentuată în comparație cu lotul 2 (15,75+/-0,68 vs.4,79+/-0,35) (Tabel nr.5).

IL-6 T ₂ -T ₁	Tip anestezie	
	Lot 1	Lot 2
Medie	15,75	4,79
Deviatia std.	0,68	0,35
Minimum	11	2,33
Maximum	19,68	8,13
p	<0,001	

Tabel nr.5 Diferența dintre valorile IL-6 la 24 h postoperator (T₂) și valorile preoperatorii (T₁), în raport de anestezie

- de remarcat că la 24 h postoperator, valorile IL-6 ale pacienților care au primit doar anestezie generală sunt statistic semnificativ mai mari comparativ cu cele ale pacienților care au primit anestezie combinată (53,37+/-3,64 vs 42,09+/-3,26, **p=0,02**).(Fig.nr.8)

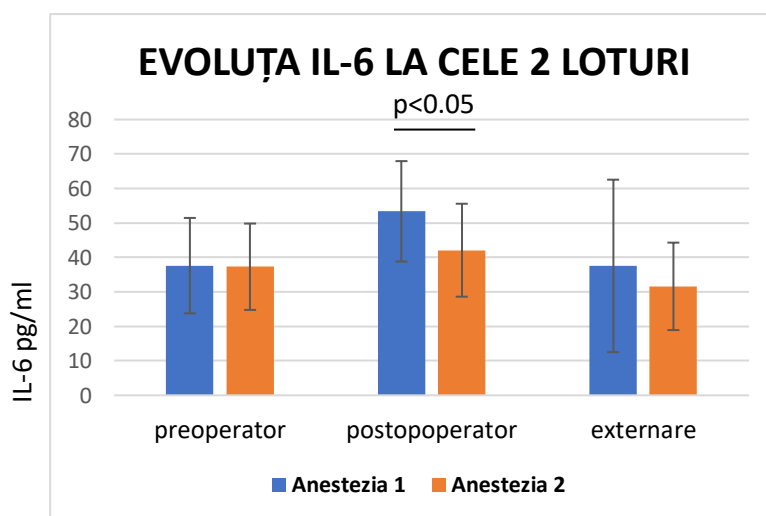
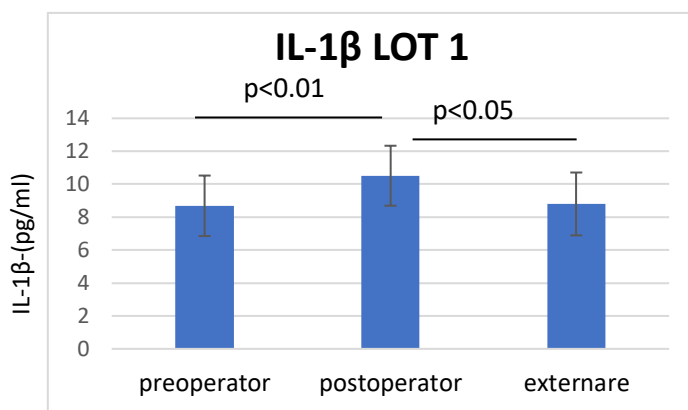


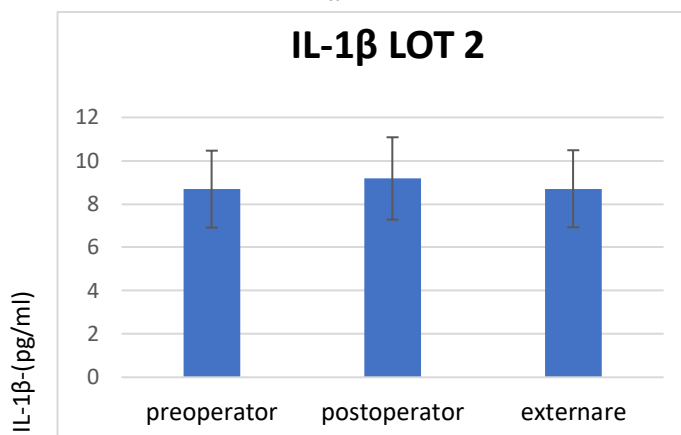
Fig.nr.8 Evoluția în dinamică a valorilor IL-6 la cele 2 loturi

Valorile IL-1 β :

- profilul citokinei IL-1 β este similar la ambele tipuri de anestezii, în sensul creșterii valorilor la 24 h postoperator urmată de o tendință de revenire la valorile de la internare, modificări statistic semnificative doar în cazul lotului 1 : momentul T₂ (8,68 \pm 1,57 la 10,52 \pm 1,6, p=0,008) , momentul T₃ (10,52 \pm 1,6 la 8,8 \pm 1,6, p=0,01),(Fig.nr.9)



a



b

Fig.nr.9 Evoluția valorilor IL-1 β la cele 2 loturi

- de remarcat faptul că valorile IL-1 β la 24 h postoperator sunt semnificativ mai mari la lotul 1 comparativ cu lotul 2 (10,52 \pm 1,6 vs 9,18 \pm 1,75, p<0,05),(Fig.nr.10).

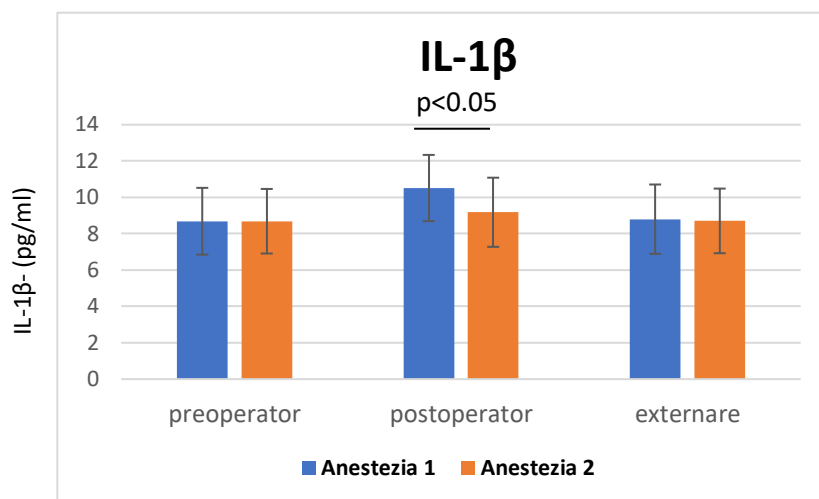


Fig.nr.10 Evoluția în dinamică a valorilor IL-1 β la cele 2 loturi

- diferența dintre valorile IL-1 β la 24 ore după operație (T₂) și valorile la momentul preoperator β (T₁) atinge semnificația statistică în raport de anestezie: la lotul 1, diferența valorilor dintre cele două momente este mai accentuată în comparație cu lotul 2 (1,83+/-0,1 vs.0,49+/-0,1, **p<0,001**), (Fig.nr.11).

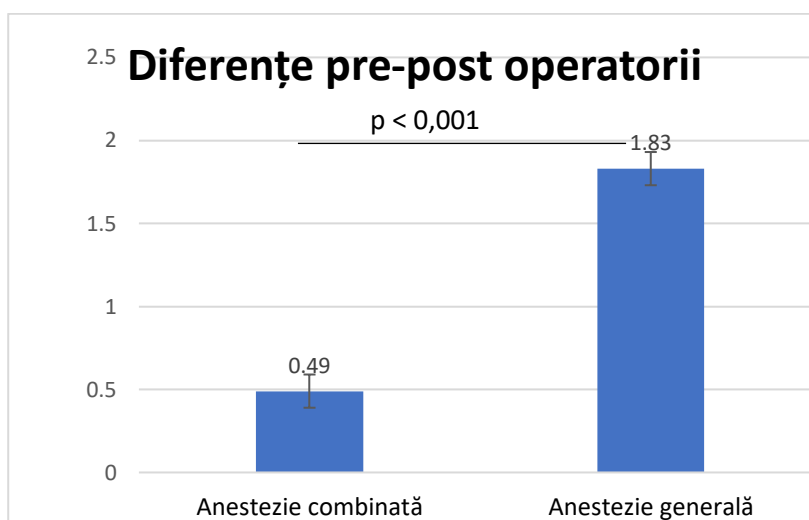
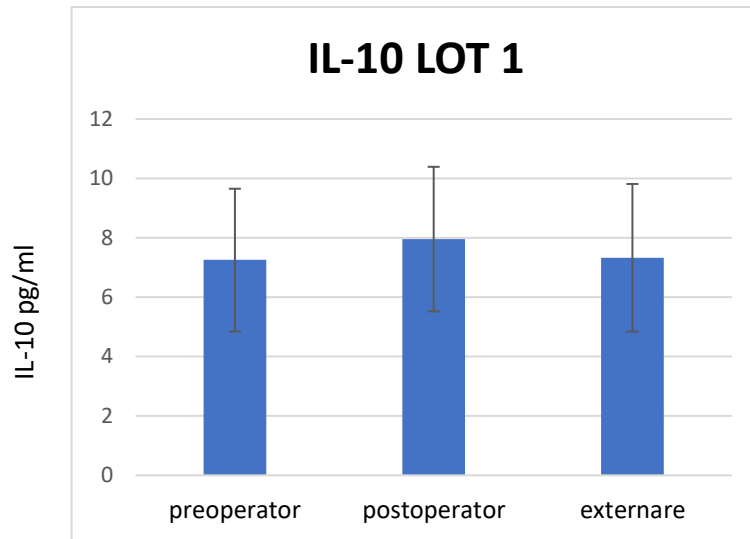


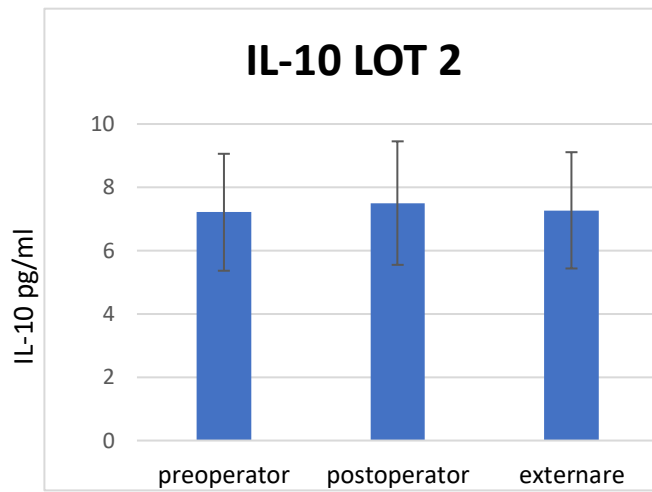
Fig.nr.11 Diferența dintre valorile IL-1 β la 24 h postoperator (T₂) și valorile preoperatorii (T₁), în raport de anestezie

Valorile IL-10:

- la lotul 1: cresc la 24 h postoperator apoi scad spre valorile de la internare
 - la lotul 2: prezintă o ușoară creștere la 24 h postoperator apoi scad spre valorile celor avute la internare (Fig.nr.12).



a



b

Fig.nr.12 Evoluția valorilor IL-10 la cele 2 loturi

-remarcăm o creștere mai mare a valorilor IL-10 la 24 h postoperator la lotul 1 față de lotul 2 , creștere ne semnificativă din punct de vedere statistic.(Fig.nr.13)

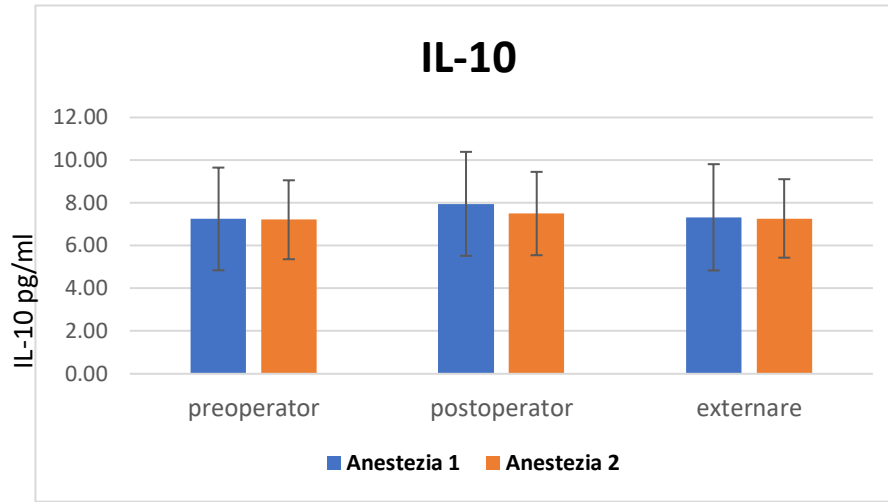


Fig.nr.13 Evoluția în dinamică a valorilor IL-10 la cele 2 loturi

- diferența dintre valorile IL-10 la 24 ore după operație (T₂) și valorile la momentul preoperator (T₁) atinge semnificația statistică (**p<0.05**) în raport de anestezie ; la lotul 1 este mai accentuată în comparație cu lotul 2 (0,71+/-0,13 vs.0,29+/-0,07, p=0,01),(Fig.nr.14).

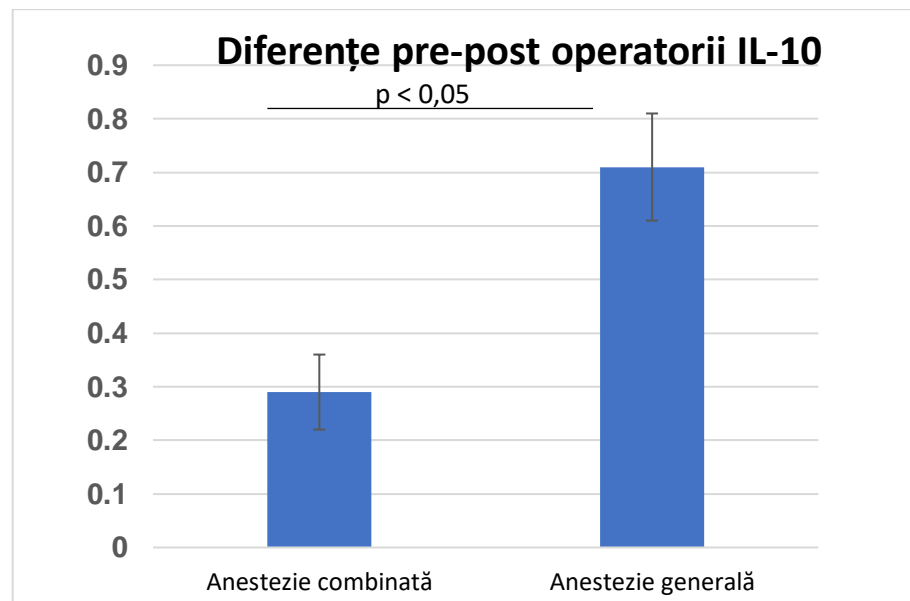


Fig.nr.14 Diferența dintre valorile IL-10 la 24 h postoperator (T₂) și valorile preoperatorii (T₁), în raport de anestezie

Analiza TNF- α :

-profilul valorilor TNF- α prezintă o tendință similară la ambele loturi: valorile cresc la 24 h postoperator (statistic semnificativ la lotul 1 10,02+/-1,8 vs. 12,64+/-2,01, **p=0,001**) cu o scădere ulterioară (semnificativ statistic la lotul1, 12,64+/-2,01vs. 10,2+/-1,72, **p=0,003**), astfel încât la externare valorile sunt comparabile cu cele de la internare (Fig. nr.15).

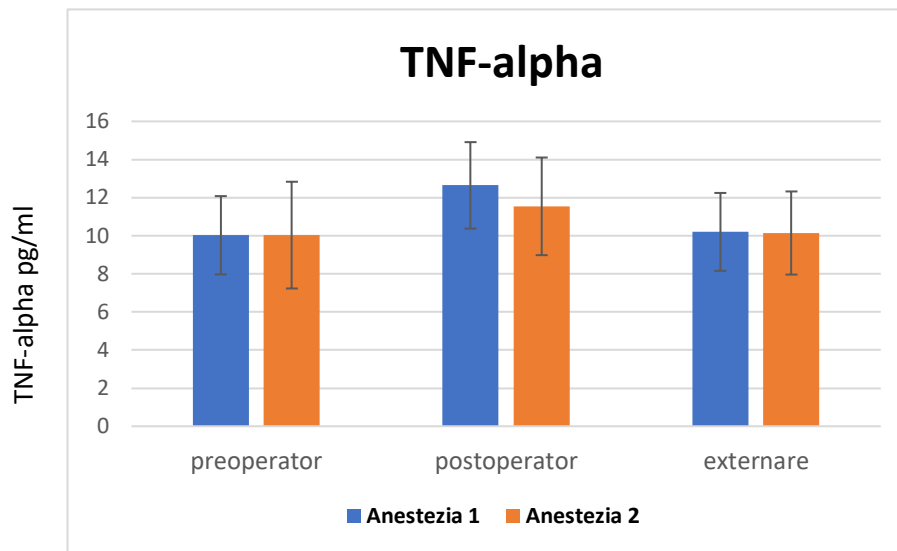


Fig.nr.15 Evoluția în dinamică a valorilor TNF-a la cele 2 loturi

-de remarcat faptul că valorile TNF- α atât la 24 h postoperator cât și la externare au atins semnificație statistică doar la pacienții care au primit doar anestezie generală (10,02 \pm 1,8 vs 12,64 \pm 2,01 la momentul T₂ **p=0,001**, 12,64 \pm 2,01 vs 10,2 \pm 1,72 la momentul T₃ **p=0,003**). (Fig.nr.16)

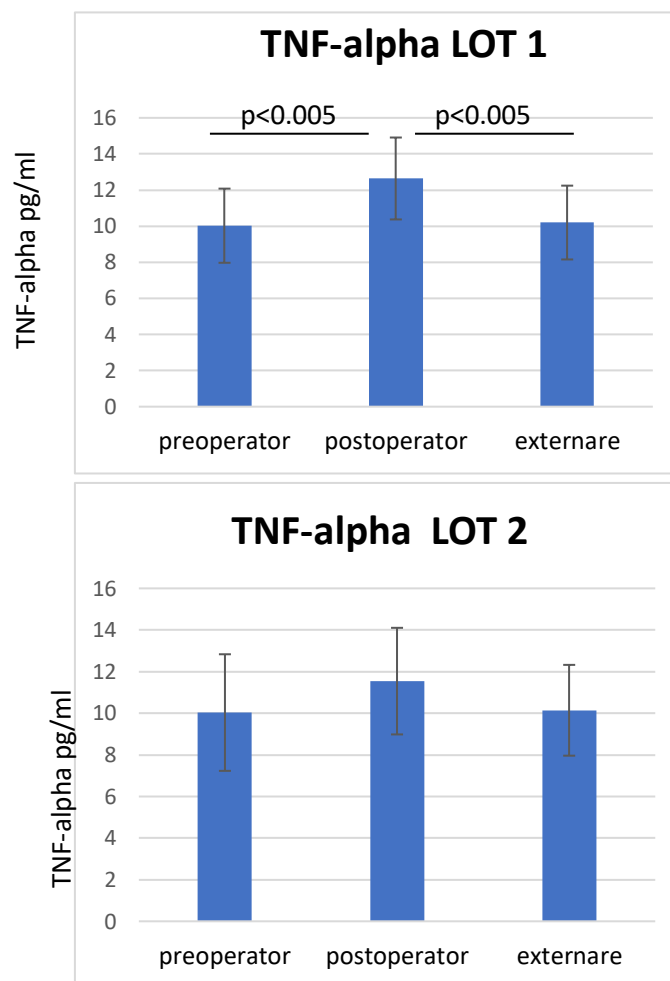


Fig.nr.16 Evoluția valorilor TNF- α la cele 2 loturi

Analiza IFN- γ :

- valorile IFN- γ prezintă o scădere la ambele loturi la 24 h postoperator urmată de o creștere cu tendință la revenire la valorile inițiale doar în cazul pacienților care au primit anestezie combinată cu epidurală continuă (Lot 2)

-valorile înregistrate la momentele T₂ (24h postoperator) și T₃ (externare) vs valorile preoperatorii (T₁) au prezentat semnificație statistică doar la lotul1: T₂ vs. T₁ (210,02+/-22,38 vs. 307,08+/-33,07, **p<0,0001**) și T₃ vs.T₁ (278,31+/-32,89 vs. 307,08+/-33,07, **p<0,05**). (Fig.nr.17)

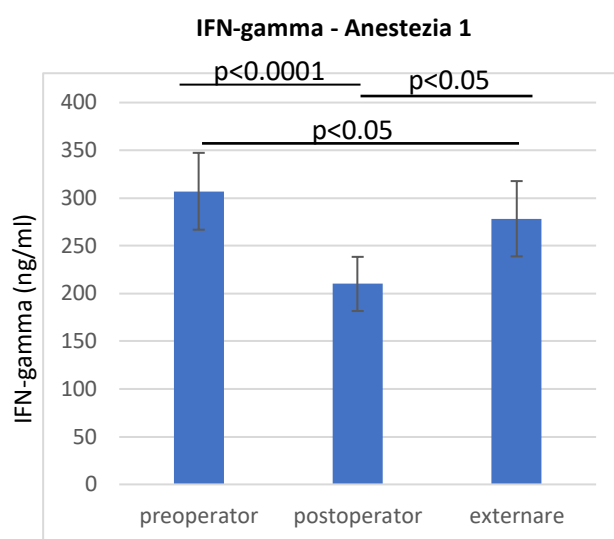


Fig.nr.17 Evoluția valorilor IFN- γ la lotul 1

- la lotul 2 , doar valorile înregistrate la 24 h postoperator au prezentat semnificație statistică (267,69+/-28,88 vs. 305,47+/-33,75, p<0,01). (Fig.nr.18)

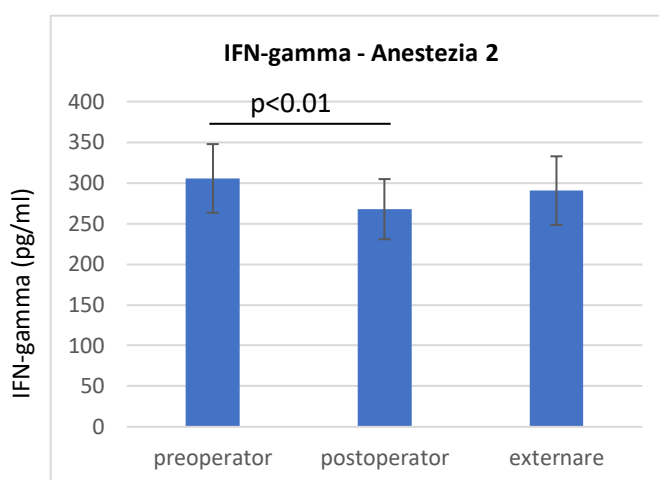


Fig.nr.18 Evoluția valorilor IFN- γ la lotul2

- între cele două loturi se evidențiază diferențe semnificative statistic doar la 24 h postoperator (210,02±22,38 vs. 267,69±28,88 $p<0,0001$). (Fig.nr.19)

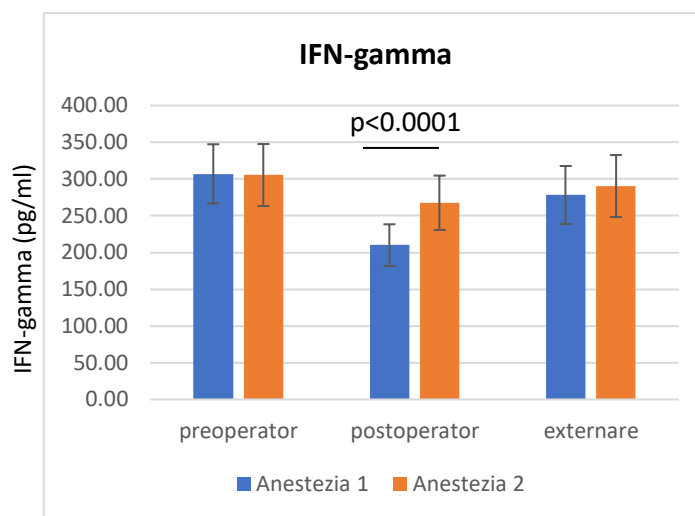


Fig.nr.19 Evoluția în dinamică a valorilor IFN- γ la cele 2 loturi

Concluzii privind profilul citokinelor:

Preoperator, valorile sunt comparabile în ceea ce privește profilul citokinelor.

La 24 h postoperator, între cele două loturi se evidențiază diferențe semnificative statistic ($p<0.05$) doar pentru valorile IFN- γ , IL-1 β și IL-6.

Postoperator, la data externării, între cele două loturi nu se mențin diferențe semnificative statistic.

Diferența între valorile citokinelor la momentul postoperator și cele preoperatorii sugerează influența ($p<0.05$) tipului de anestezie asupra modificării profilului citokinelor la 24 h postoperator: pentru toate citokinele, diferența T₂T₁ consemnată în lotul 1 este superioară celei din lotul 2, sugerând ideea că pacienții care au primit doar anestezie generală au eliberat în circulație o cantitate mai mare de citokine, ca răspuns la o reacție inflamatoare mai mare în comparație cu pacienții care au primit anestezie combinată. (Tabel nr.3)

Tip anestezie		IL-1 β T ₂ T ₁	IL-2 T ₂ T ₁	IL-6 T ₂ T ₁	IL-10 T ₂ T ₁	TNF T ₂ T ₁	IFN T ₂ T ₁
Lot 1	Medie	1,83	-0,73	15,75	0,71	2,61	-97,06
	Deviația std.	0,1	0,18	0,68	0,13	0,12	3,34
Lot 2	Medie	0,49	0,26	4,79	0,29	0,91	-37,77
	Deviația std.	0,1	0,11	0,35	0,07	0,07	1,85
p		<0.001	<0,05	<0.001	<0.05	<0.001	<0.001

Tabel nr.3 Diferența profilurilor citokinelor la 24 ore după operație (T₂) față de valorile preoperatorii (T₁), în raport de anestezie

La externare valorile citokinelor au demonstrat o evoluție favorabilă în special la pacienții din lotul 2 care au primit **anestezie combinată** -generală cu epidurală continuă.

Discuții

Tratamentul cancerului colo-rectal la momentul actual este rezultatul unei abordări multidisciplinare constituită din exereza chirurgicală completată de terapii adjuvante (chimioterapie, radioterapie, terapie țintită și terapia imunologică). Suportul pacienților în perioada operatorie este asigurat de multiple tehnici anestezice, adaptate fiecărui pacient în funcție de patologia prezentată. Societatea Europeană de Anestezie a prezentat în 2009 conceptul de “anticancer anesthesia technology” cu scopul ca pacienții cu cancer să primească o anestezie care, în afara rolului pe care îl are de a asigura condiții optime pentru desfășurarea actului chirurgical, să nu deprime/ să stimuleze mecanismele proprii antitumorale (2). În acest context, o provocare a comunității științifice la ora actuală o reprezintă modularea interdependenței dintre efectele drogurilor anestezice și componente ale sistemului imun.

Studiul de față și-a propus să analizeze influența a două tehnici anestezice asupra răspunsului imun. Majoritatea pacienților au fost de sex masculin (61%), 51,5% dintre subiecți fiind din mediul urban iar 48,5% dintre pacienți au fost supraponderali. Aceste date confirmă statisticile la nivel mondial, statistici care ne arată că neoplazia colo-rectală este mai frecventă la bărbați decât la femei în țările foarte bine dezvoltate (1). Dintre factorii de risc, un rol important îl prezintă greutatea în exces, fapt confirmat și în acest studiu (72). Cele două loturi au fost comparabile în ceea ce privește prezența comorbidităților, HTA fiind cea mai frecventă patologie asociată. Efectele HTA care, prin intermediul receptorilor adrenergici, exercită un efect negativ asupra prognosticului în cancerul colorectal (73) pot fi contracarate prin medicație antihipertensivă asociată cu medicație antidiabetică fiind demonstrat faptul că cele două comorbidități (HTA și diabetul zaharat non insulino-necesar) se asociază destul de frecvent, mai ales în prezența obezității (74, 75).

Sunt puține studii la nivel internațional privind influența opioizilor asupra activității imune, și cu atât mai puține privind interdependența dintre anestezie, activitatea citotoxică a celulelor NK și modificarea profilului citokinelor (12, 13, 25, 32, 33). Având în vedere lipsa de concordanță între rezultatele acestor cercetări, am încercat în studiul de față să realizăm o diferențiere între cele două tipuri de tehnici anestezice administrate la cele două loturi de pacienți, în vederea selectării tehnicii anestezice cu cel mai mare beneficiu pentru pacient :

- lotul 1 -anestezie generală

- a. intraoperator analgezia să fie asigurată de opioizi (fentanyl > 0,3 mg iv.)
- b. postoperator analgezia să fie asigurată de opioizi (pentazocina, tramadol, petidina) în asociere cu AINS

- lotul 2 – anestezie combinată –locoregională + generală

- a. intraoperator analgezia să fie asigurată de ropivacaină 1% (anestezic local) în asociere cu doze mici de opioid (fentanyl < 0,3 mg iv)
- b. postoperator analgezia să fie asigurată de asocierea de fentanyl 50µg/10ml + ropivacaina 0,3% cu un ritm de administrare de 4-6 ml/h pe cateterul epidural.

În menținerea anesteziei am folosit sevoflurane, un agent anestezic volatil cu proprietăți analgetice, hipnotice și miorelaxante. Având în vedere efectele imunosupresorii ale anestezicelor volatile (12, 13, 14, 36) am folosit concentrații diferite la cele două loturi pentru o acuratețe mai bună a rezultatelor. Astfel la lotul 1 s-au administrat concentrații mai mari de sevoflurane (>1 MAC) în timp ce lotul 2 a beneficiat de concentrații mai mici (< 1 MAC). Prin urmare, diferența esențială între cele două loturi în primele 24 h e reprezentată de prezența agenților imunosupresori (opioizi, anestezice inhalatorii) în concentrații mai mari la pacienții din lotul 1 față de pacienții din lotul 2.

În cadrul **reacției inflamatorii**, au fost monitorizați următorii parametri: HLG, VSH, fibrinogen, proteina C reactivă. În acest context, constatăm faptul că valoarea numărului neutrofilelor este statistic semnificativ ($p < 0,05$) crescută la lotul 1, alături de raportul neutrofile/limfocite și de numărul de leucocite. Cu cât numărul de neutrofile este mai mare, cu atât este inhibată mai mult apărarea antitumorală organismului, favorizând creșterea celulelor neoplazice și diseminarea metastatică (78, 79). Prin urmare un tablou cu leucocitoză, neutrofilie, raport crescut neutrofile/limfocite, reducerea numărului de limfocite, reducerea numărului de monocite, ne confirmă existența unui proces inflamator. Având în vedere faptul că aceste modificări ale HLG sunt mai accentuate la lotul 1 putem trage concluzia că pacienții din lotul 1 au dezvoltat o reacție inflamatorie mai mare comparativ cu pacienții din lotul 2. Din datele statistice a rezultat faptul că valorile VSH și fibrinogen înregistrează creșteri la ambele loturi la 24h postoperator, în timp ce nivelul proteina C reactive crește la lotul 1 și scade la lotul 2 (modificările valorilor sunt semnificative statistic doar pentru valorile proteinei C reactivă și VSH). Deasemenea, creșterea acestor valori ale VSH și fibrinogen a fost mai mare în cazul lotului 1 față de lotul 2. Prin urmare, aceste date coroborate cu rezultatele de mai sus, întăresc faptul că pacienții lotului 1 prezintă la 24 h postoperator o reacție inflamatorie mai

puternică decât pacienții lotului 2. Având în vedere asocierea dintre inflamație și imunosupresie, multiple studii au stabilit legături între valorile/asocierea markerilor de inflamație și prognostic (80, 81, 82). În studiul de față, nivelul proteinei C reactive a scăzut la 24 h postoperator [13,02 (3,23) la 11,57 (2,78), $p < 0,001$] la pacienții din lotul 2 care au primit anestezie combinată. Pacienții din lotul 1 au prezentat creșteri ale valorilor proteinei C reactive [16,48 (7,39) la 19,27(8,95), $p = 0,002$], ceea ce arată din nou amploarea diferită a reacției inflamatorii. Totuși nivelurile nu au atins valori foarte mari, fapt ce susține absența sepsisului precum și faptul că pacienții nu au fost septici (proteina C reactivă la valori mari, alături de procalcitonină atestă prezența unei infecții). În acest sens, un studiu pe pacienți operați în urgență cu diferite afecțiuni chirurgicale arată, că la pacienții infectați, există creșteri considerabile ale valorilor acestui parametru (83).

Sistemul imunitar al pacienților în perioada perioperatorie poate fi afectat direct sau indirect de anestezie și alte medicamente conexe și, astfel, poate afecta evoluția tratamentului și prognosticul pacienților cu cancer colorectal. Efectele anesteziei asupra imunității au fost studiate pe mai mulți factori, incluzând efectul asupra leucocitelor, limfocitelor B, limfocitelor T, celulelor NK, macrofagelor și secreției unor citokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN, IFN-7, receptor Interleukin-2 solubil (sIL-2R) (6).

În studiul nostru, capacitatea citotoxică a celulelor ucigașe naturale (NKCC%) a înregistrat o scădere la 24 h după intervenția chirurgicală la ambele grupuri cu corelație statistică semnificativă doar în grupul GA. Între cele două momente T2-T1, NKCC% arată o rată de scădere mai accentuată în grupul GA cu 24% comparativ cu grupul GAE, cu 12% ($p = 0,007$).

Prin urmare, observăm că pacienții care au primit doar anestezie generală și analgezie postoperatorie cu opioide + AINS au dezvoltat sistemic o reducere semnificativă a capacității citotoxice a celulelor NK, comparativ cu cei care au primit anestezie combinată (anestezie generală cu analgezie epidurală postoperatorie), dovedind efectele favorabile ale anesteziei combinate. Subliniez că aceste modificări au fost semnificative din punct de vedere statistic și în concordanță cu majoritatea studiilor (11, 16, 25, 59, 61). Aceste rezultate pot fi parțial explicate și prin stresul indus de manevra chirurgicală care inhibă activitatea celulelor NK responsabile de lizarea celulelor tumorale și promovează stimularea factorilor pro-angiogenici. Imunosupresia perioperatorie poate fi atribuită activării sistemului nervos simpatic și a axei hipotalamice-hipofizare. Catecolaminele eliberate de activarea sistemului nervos simpatic se leagă de adrenoceptorii celulelor NK, determinând inhibarea activității celulelor NK și stimularea producției de LTh2 având drept consecință creșterea balanței LTh1/LTh2 în

favorizarea celor din urmă. Subliniez că aceste modificări au fost semnificative din punct de vedere statistic și în concordanță cu majoritatea studiilor (11, 16, 25, 59, 61).

Pentru **evaluarea profilului inflamator**, am analizat evoluția în dinamică a unui panel de citokine:

-proinflamatoare (interleukina-1 (IL-1- β), interleukina-6 (IL-6), factorul de necroză tumorală (TNF- α),

-imunoreglatoare interleukina-2(IL-2),

- interleukina-10 (IL-10), citokina cu posibil rol dual în inițierea și dezvoltarea neoplasmelor

-citokina antitumorală interferon- γ (IFN- γ).

Observăm faptul că la 24 h postoperator, la ambele loturi se constată o tendință similară de creștere a valorilor citokinelor proinflamatorii (IL-1 β , IL-6 , IL-10 și TNF- α) și de scădere a valorilor IL-2 și IFN- γ . Nivelurile citokinelor la 24h postoperator ating pragul de semnificație statistică la ambele loturi pentru IFN- γ și IL-6 iar cazul IL-1 β și TNF- α , doar la pacienții care au primit anestezie (generală Lotul 1). Intre cele două loturi se evidențiază diferențe semnificative statistic 24 h postoperator pentru IFN- γ , IL-1 β și IL-6. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu majoritatea datelor existente în literatură până la acest moment (23). Având în vedere cele menționate mai sus, constatăm că citokinele care au prezentat modificări semnificative atât la 24h postoperator în cadrul aceluiași lot cât și în cadrul studiului comparativ între loturi sunt IFN- γ și IL-6. Principala sursă de IFN- γ o reprezintă celulele NK, motiv pentru care valorile procentuale de scădere ale acestor doi parametri sunt foarte apropiate (24% NK vs 32% IFN- γ). Intr-un studiu pe 27 pacienți operați pentru cancer colo-rectal, Angka L. și colab. au arătat faptul că, datorită scăderii postoperatorii a citotoxicității celulelor NK, este scăzută și cantitatea de IFN- γ secretată de aceste celule (17). Acest studiu menționat folosește un singur tip de anestezie, și anume anestezia generală cu pivot inhalator. In literatura de specialitate sunt puține date despre influența actului anestezico-chirurgical asupra IFN- γ . In studiul de față este evidentă prezervarea unei citotoxicități mai bune la pacienții care au primit anestezie combinată, rezultând o scădere mai puțin importantă a secreției de IFN- γ .

O citokină cu acțiune protumorală ale căror valori sunt modificate statistic semnificativ este IL-6 care prezintă la 24 h creșteri semnificative la lotul 1 comparativ cu lotul 2. Această citokină se secretă în situații de stress și injurie tisulară și stimulează ulterior activarea reacțiilor imune și a reacțiilor de fază acută. Deasemenea, această citokină este prezentă în valori crescute în cancere, fiind exponentul relației dintre tumoră și zona peritumorală inflamatorie, având multiple roluri pro-tumorale (24, 85).

O altă citokină ce prezintă activitate protumorală este TNF- α care prezintă creșteri semnificative ale valorilor la 24 h la pacienții care au primit doar anestezie generală. Un studiu interesant arată că valorile TNF- α sunt mai importante în lichidul peritoneal, valori crescute ale acestora fiind asociate cu un risc mai mare de diseminare și metastazare (86).

IL-10, o citokină încă insuficient elucidată, cu efecte contradictorii, implicată în neoplasme și boli autoimune (94,95), nu a prezentat modificări semnificative la cele 3 momente de evaluare între cele 2 loturi.

IL-2, prima citokină clonată se leagă de receptorul solubil aferent și determină activarea și proliferarea limfocitelor T helper, T supresoare și T citotoxice care mediază reacțiile imune. Pe baza acestor acțiuni s-a încercat stimularea mecanismelor înnăscute anti-tumorale prin administrarea de IL-2 (96). În acest studiu, monitorizarea evoluției valorilor IL-2 arată valori mai scăzute la momentul T₂ la pacienții care au primit anestezie generală, modificări ne semnificative d.p.d.v. statistic.

Având în vedere comportamentul citokinelor pro-inflamatorii la cele 2 loturi, putem trage concluzia că folosirea anesteziei combinate (anestezie generală combinată cu epidurală continuă) reduce eliberarea acestora, permițând mecanismelor antitumorale să acționeze la parametri cât mai buni. Un studiu similar publicat de curând pe 120 pacienți cu cancer colorectal confirmă aceste rezultate cu mențiunea că și profunzimea hipnozei anesteziei trebuie să fie luată în seamă (87).

În urma analizei complexe a efectelor celor două tipuri de anestezii în relație cu cei trei parametri majori investigați (răspunsul inflamator, activitatea citotoxică a celulelor NK, profilul citokinelor) am încercat să găsim posibile influențe ale opioizilor, AINS, anestezicelor locale asupra parametrilor studiați. În acest sens pot fi menționate mai multe corelații, unele cu semnificație statistică:

- în raport cu administrarea de pentazocină (opioid), valorile IL-10 la momentul T₂ cresc direct proporțional cu dozele de pentazocină în timp ce valorile TNF- α la momentul T₂ prezintă creșteri mai mari la doze crescute de opioid.
- administrarea de fentanyl a înregistrat o corelație negativă cu activitatea citotoxică a celulelor NK, cu cât dozele de fentanyl au fost mai mari, cu atât depresia celulelor NK a fost mai mare, rezultate similare cu cele din studiile lui Wang (91), Kim R (31), Cui JH (34), Boland (92), dar diferite de cele ale lui Kim SY (35).
- diversele corelații între agenți anestezici inhalatori și valorile citotoxicității celulelor NK nu au întrunit semnificație statistică dar am observat că la lotul 1 unde s-a administrat anestezic inhalator la doze mai mari, activitatea citotoxică a celulelor NK

au fost mai depresată, în concordanță cu studiul lui Cho JS (51), Tazawa (6), Liu S (95), dar spre deosebire de studiul lui Lim Ja care nu a detectat nicio modificare la pacienți cu cancer de sân (39).

- datele statistice nu au evidențiat modificări semnificative ale activității celulelor NK în relație cu dozele de ropivacaină, totuși din studiu reiese faptul că doze mai mari de 200 mg ropivacaină sunt asociate cu valori mai scăzute ale citotoxicității celulelor NK comparativ cu cele ale pacienților care au primit doze mai mici de 200mg (-3,14 vs -3.42), concluzie confirmată și de Wodehouse și colab. (66). Este cunoscut efectul anti-tumoral al anestezicelor locale (96), confirmat de multiple studii în localizări diferite de cancer: neoplasm mamar și melanom malign (97), hepatocarcinom (98), cancer gastric (99), cancer de colon (100).
- administrarea de sânge în perioada peroperatorie a prezentat o corelație pozitivă în relație cu markerii inflamatori la pacienții lotului 1 și cu valorile TNF- α la pacienții lotului 2. Datele din literatură arată un efect imunodeprimant al transfuziilor sanguine (101, 102) dar încă există dezbateri asupra acestui subiect (103).

Din toate aceste date reiese faptul că lotul 1 este asociat cu o reacție inflamatoare mai mare, o reducere mai mare a citotoxicității celulelor NK precum și cu niveluri mai crescute ale citokinelor proinflamatorii, în timp ce lotul 2 este asociat cu valori mai mici ale citokinelor proinflamatorii, o afectare mai redusă a activității citotoxice a celulelor NK precum și de o reacție inflamatoare mai puțin intensă, fapt ce susține încă o dată superioritatea anesteziei combinate (locoregională + generală).

Concluzii

Rezultatele atestă faptul că **pacienții care au primit anestezie combinată : generală cu anestezie/analgzie epidurală (lot 2)** în comparație cu cei care au primit doar anestezie generală (lot 1) au prezentat următoarele avantaje (modificări statistic semnificative):

1. valori ale citotoxicității celulelor NK postoperator mai mari atât la 24 h cât și la externare fata de lotul 1;
2. un grad de scădere al activității citotoxice al celulelor NK mai redus atât la 24 h cât și la externare;
3. creșteri mai mici ale valorilor citokinelor proinflamatorii IL-1 β , IL-6 și TNF- α la 24 h;

4. pentru toate citokinele, diferența T₂T₁ consemnată este inferioară celei din cadrul lotului 1;
5. valori ale citokinelor la externare apropiate celor de la internare
6. neutrofilie mai mică la 24 h postoperator
7. o creștere mai redusă a valorii raportului neutrofile/limfocite la 24 h postoperator, tendință care s-a menținut și la externare
8. limfopenie mai redusă
9. valori ale VSH, PCR, FIBR. la 24 ore după operație mai mici
10. valorile proteinei C reactive au scăzut la 24 h postoperator, în timp ce valorile fibrinogen și VSH au crescut, cu valori inferioare celor din lotul 1
11. în majoritatea cazurilor, la externare valorile markerilor inflamatori revin către valorile normale

Aceste rezultate confirmă faptul că în perioada postoperatorie există la ambele tipuri de anestezii un grad de imunodepresie asociat cu un răspuns inflamator, **procese de intensitate mai scăzută în cazul pacienților care au primit anestezie combinată** (Anestezie generală + tehnică locoregională).

Aceste concluzii trebuie analizate în contextul limitărilor acestui studiu:

- ❖ numărul redus de pacienți, număr care deschide calea unei analize pe o cohorta mai mare
- ❖ folosirea la ambele loturi a opioizilor, chiar dacă în doze diferite și pe căi diferite de administrare. Am folosit fentanyl iv. la doze <0,3mg. la lotul 2 pentru a asigura analgezia până la momentul instalării acțiunii ropivacainei. Deasemenea, fentanyl a mai fost folosit la lotul 2 pe cale epidurală în perioada postoperatorie în combinație cu ropivacaina pentru a potența efectele acesteia.
- ❖ nu putem izola efectele fiecărei substanțe asupra parametrilor urmăriți. Din acest motiv am apreciat la modul general influența celor două tipuri de anestezii, anestezii care sunt compuse din agenți anestezici diferiți fie ca entitate, fie ca doze. Modificările mai mari ale citotoxicității celulelor NK sunt rezultatul asocierii opioizi iv.+agenți halogenați±transfuzii sanguine±AINS.
- ❖ complexitatea studiului dată atât de numărul de parametri determinați, cât și de echipa multidisciplinară implicată

- ❖ Loturile de pacienți trebuie să fie comparabile ca diagnostic, extensie tumorală, comorbidități, ceea ce face ca numărul de pacienți să fie redus
- ❖ costurile unui asemenea studiu nu sunt de neglijat

În **concluzie**, rezultatele acestui studiu sunt încurajatoare în majoritatea lor, confirmând efectul benefic pe care îl are **anestezia combinată- generală cu tehnica loco-regională** asupra imunității peroperatorii la pacienții cu cancer colorectal. Datorită numărului nu foarte mare de pacienți care să îndeplinească toate cerințele de includere în studiu, rezultatele necesită să fie validate pe o cohortă mai mare de subiecți.

Referințe

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Dang Y, Shi X, Xu W, Zuo M. The Effect of Anesthesia on the Immune System in Colorectal Cancer Patients. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*. 2018;2018:7940603.
3. Kurosawa S. Anesthesia in patients with cancer disorders. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2012;25(3):376-84.
4. Song P, Dong T, Zhang J, Li J, Lu W. Effects of different methods of anesthesia and analgesia on immune function and serum tumor marker levels in critically ill patients. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;14(3):2206-10.
5. Neeman E, Zmora O, Ben-Eliyahu S. A new approach to reducing postsurgical cancer recurrence: perioperative targeting of catecholamines and prostaglandins. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(18):4895-902.
6. Isadora Zaharescu, Adina D. Moldovan, Tanase C. Natural killer (NK) cells and their involvement in different types of cancer. Current status of clinical research. *JMMS*. 2017;4(1).
7. Tazawa K, Koutsogiannaki S, Chamberlain M, Yuki K. The effect of different anesthetics on tumor cytotoxicity by natural killer cells. *Toxicology letters*. 2017;266:23-31.
8. Neagu M, Constantin C, Popescu ID, Zipeto D, Tzanakakis G, Nikitovic D, et al. Inflammation and Metabolism in Cancer Cell-Mitochondria Key Player. *Frontiers in oncology*. 2019;9:348.

9. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(14):3738-50.
10. Legitimo A, Consolini R, Failli A, Orsini G, Spisni R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(11):3224-35.
11. Karanika S, Karantanos T, Theodoropoulos GE. Immune response after laparoscopic colectomy for cancer: a review. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2013;1(2):85-94.
12. Tougeron D, Fauquembergue E, Latouche JB. [Immunotherapy for colorectal cancer]. *Bulletin du cancer*. 2013;100(9):871-85.
13. Green JS, Tsui BC. Impact of anesthesia for cancer surgery: Continuing professional development. *Can J Anaesth*. 2013;60(12):1248-69.
14. Heaney A, Buggy DJ. Can anaesthetic and analgesic techniques affect cancer recurrence or metastasis? *British journal of anaesthesia*. 2012;109 Suppl 1:i17-i28.
15. Byrne K, Levins KJ, Buggy DJ. Can anesthetic-analgesic technique during primary cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Can J Anaesth*. 2016;63(2):184-92.
16. Tedore T. Regional anaesthesia and analgesia: relationship to cancer recurrence and survival. *British journal of anaesthesia*. 2015;115 Suppl 2:ii34-45.
17. Isvoranu G, Surcel M, Huica RI, Munteanu AN, Pirvu IR, Ciotaru D, et al. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma - new dynamic biomarker. *Oncology letters*. 2019;17(5):4197-206.
18. Albulescu R, Codrici E, Popescu ID, Mihai S, Necula LG, Petrescu D, et al. Cytokine patterns in brain tumour progression. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:979748.
19. Tai LH, Ananth AA, Seth R, Alkayyal A, Zhang J, de Souza CT, et al. Sepsis increases perioperative metastases in a murine model. *BMC cancer*. 2018;18(1):277.
20. Cata JP, Conrad C, Rezvani K. Potential Use of Natural Killer Cell Transfer Therapy in the Perioperative Period to Improve Oncologic Outcomes. *Scientifica*. 2015;2015:732438.
21. Angka L, Martel AB, Kilgour M, Jeong A, Sadiq M, de Souza CT, et al. Natural Killer Cell IFNgamma Secretion is Profoundly Suppressed Following Colorectal Cancer Surgery. *Annals of surgical oncology*. 2018;25(12):3747-54.
22. Sconocchia G, Eppenberger S, Spagnoli GC, Tornillo L, Drosner R, Caratelli S, et al. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2014;3(8):e952197.
23. Donadon M, Hudspeth K, Cimino M, Di Tommaso L, Preti M, Tentorio P, et al. Increased Infiltration of Natural Killer and T Cells in Colorectal Liver Metastases Improves

Patient Overall Survival. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2017;21(8):1226-36.

24. Qiu H, Xiao-Jun W, Zhi-Wei Z, Gong C, Guo-Qiang W, Li-Yi Z, et al. The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(94-95):1310-5.
25. Xiong Y, Wang K, Zhou H, Peng L, You W, Fu Z. Profiles of immune infiltration in colorectal cancer and their clinical significant: A gene expression-based study. *Cancer medicine*. 2018;7(9):4496-508.
26. Hsing CH, Wang JJ. Clinical implication of perioperative inflammatory cytokine alteration. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2015;53(1):23-8.
27. Neagu S, Lerescu L, Costea R, Tucureanu C, Caras I, Gangura G, et al. [Perioperative immunologic changes in colorectal cancer patients]. *Chirurgia (Bucur)*. 2012;107(1):59-65.
28. Longbottom ER, Torrance HD, Owen HC, Fragkou PC, Hinds CJ, Pearse RM, et al. Features of Postoperative Immune Suppression Are Reversible With Interferon Gamma and Independent of Interleukin-6 Pathways. *Ann Surg*. 2016;264(2):370-7.
29. Divatia JV, Ambulkar R. Anesthesia and cancer recurrence: What is the evidence? *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. 2014;30(2):147-50.
30. Torrance HD, Pearse RM, O'Dwyer MJ. Does major surgery induce immune suppression and increase the risk of postoperative infection? *Curr Opin Anaesthesiol*. 2016;29(3):376-83.
31. Guo JR, Xu F, Jin XJ, Shen HC, Liu Y, Zhang YW, et al. Impact of allogenic and autologous transfusion on immune function in patients with tumors. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(1):467-74.
32. Qiu L, Wang DR, Zhang XY, Gao S, Li XX, Sun GP, et al. Impact of perioperative blood transfusion on immune function and prognosis in colorectal cancer patients. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2016;54(2):235-41.
33. Tai YH, Wu HL, Mandell MS, Tsou MY, Chang KY. The association of allogeneic blood transfusion and the recurrence of hepatic cancer after surgical resection. *Anaesthesia*. 2019.
34. Sorski L, Melamed R, Matzner P, Lavon H, Shaashua L, Rosenne E, et al. Reducing liver metastases of colon cancer in the context of extensive and minor surgeries through beta-adrenoceptors blockade and COX2 inhibition. *Brain, behavior, and immunity*. 2016;58:91-8.

35. Kim R. Anesthetic technique for cancer surgery: Harm or benefit for cancer recurrence? *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2018;44(5):557-8.
36. Liang X, Liu R, Chen C, Ji F, Li T. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Translational perioperative and pain medicine*. 2016;1(1):5-13.
37. Levins KJ, Prendeville S, Conlon S, Buggy DJ. The effect of anesthetic technique on micro-opioid receptor expression and immune cell infiltration in breast cancer. *Journal of anesthesia*. 2018.
38. Cui JH, Jiang WW, Liao YJ, Wang QH, Xu M, Li Y. Effects of oxycodone on immune function in patients undergoing radical resection of rectal cancer under general anesthesia. *Medicine*. 2017;96(31):e7519.
39. Kim SY, Kim NK, Baik SH, Min BS, Hur H, Lee J, et al. Effects of Postoperative Pain Management on Immune Function After Laparoscopic Resection of Colorectal Cancer: A Randomized Study. *Medicine*. 2016;95(19):e3602.
40. Stollings LM, Jia LJ, Tang P, Dou H, Lu B, Xu Y. Immune Modulation by Volatile Anesthetics. *Anesthesiology*. 2016;125(2):399-411.
41. Yuki K, Eckenhoff RG. Mechanisms of the Immunological Effects of Volatile Anesthetics: A Review. *Anesthesia and analgesia*. 2016;123(2):326-35.
42. Chen Y, Liang M, Zhu Y, Zhou D. [The effect of propofol and sevoflurane on the perioperative immunity in patients under laparoscopic radical resection of colorectal cancer]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2015;95(42):3440-4.
43. Lim JA, Oh CS, Yoon TG, Lee JY, Lee SH, Yoo YB, et al. The effect of propofol and sevoflurane on cancer cell, natural killer cell, and cytotoxic T lymphocyte function in patients undergoing breast cancer surgery: an in vitro analysis. *BMC cancer*. 2018;18(1):159.
44. Oh CS, Lee J, Yoon TG, Seo EH, Park HJ, Piao L, et al. Effect of Equipotent Doses of Propofol versus Sevoflurane Anesthesia on Regulatory T Cells after Breast Cancer Surgery. *Anesthesiology*. 2018;129(5):921-31.
45. Iwasaki M, Edmondson M, Sakamoto A, Ma D. Anesthesia, surgical stress, and "long-term" outcomes. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2015;53(3):99-104.
46. Liu M, Yi Y, Zhao M. Effect of dexmedetomidine anesthesia on perioperative levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with ovarian cancer. *Oncology letters*. 2019;17(6):5517-22.
47. Chamaraux-Tran TN, Piegeler T. The Amide Local Anesthetic Lidocaine in Cancer Surgery-Potential Antimetastatic Effects and Preservation of Immune Cell Function? A Narrative Review. *Frontiers in medicine*. 2017;4:235.

48. Jakobsson J, Johnson MZ. Perioperative regional anaesthesia and postoperative longer-term outcomes. *F1000Research*. 2016;5.
49. Weng M, Chen W, Hou W, Li L, Ding M, Miao C. The effect of neuraxial anesthesia on cancer recurrence and survival after cancer surgery: an updated meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(12):15262-73.
50. Jobin G, Rodriguez-Suarez R, Betito K. Association Between Natural Killer Cell Activity and Colorectal Cancer in High-Risk Subjects Undergoing Colonoscopy. *Gastroenterology*. 2017;153(4):980-7.
51. Chen WK, Ren L, Wei Y, Zhu DX, Miao CH, Xu JM. General anesthesia combined with epidural anesthesia ameliorates the effect of fast-track surgery by mitigating immunosuppression and facilitating intestinal functional recovery in colon cancer patients. *International journal of colorectal disease*. 2015;30(4):475-81.
52. Yang M, Yu Y, Liu Q. Analgesic Effects of Sevoflurane and Isoflurane on Elderly Patients with Colon Cancer and Their Influences on Immunity and Postoperative Cognitive Function. *Iranian journal of public health*. 2019;48(3):444-50.
53. Desmond F, McCormack J, Mulligan N, Stokes M, Buggy DJ. Effect of anaesthetic technique on immune cell infiltration in breast cancer: a follow-up pilot analysis of a prospective, randomised, investigator-masked study. *Anticancer research*. 2015;35(3):1311-9.
54. Buckley A, McQuaid S, Johnson P, Buggy DJ. Effect of anaesthetic technique on the natural killer cell anti-tumour activity of serum from women undergoing breast cancer surgery: a pilot study. *British journal of anaesthesia*. 2014;113 Suppl 1:i56-62.
55. Cho JS, Lee MH, Kim SI, Park S, Park HS, Oh E, et al. The Effects of Perioperative Anesthesia and Analgesia on Immune Function in Patients Undergoing Breast Cancer Resection: A Prospective Randomized Study. *International journal of medical sciences*. 2017;14(10):970-6.
56. Soltanizadeh S, Degett TH, Gogenur I. Outcomes of cancer surgery after inhalational and intravenous anesthesia: A systematic review. *Journal of clinical anesthesia*. 2017;42:19-25.
57. Li JM, Shao JL, Zeng WJ, Liang RB. General/epidural anesthesia in combination preserves NK cell activity and affects cytokine response in cervical carcinoma patients undergoing radical resection: a cohort prospective study. *European journal of gynaecological oncology*. 2015;36(6):703-7.

58. Kun L, Tang L, Wang J, Yang H, Ren J. Effect of Combined General/Epidural Anesthesia on Postoperative NK Cell Activity and Cytokine Response in Gastric Cancer Patients Undergoing Radical Resection. *Hepato-gastroenterology*. 2014;61(132):1142-7.
59. Sun HZ, Song YL, Wang XY. Effects of Different Anesthetic Methods on Cellular Immune and Neuroendocrine Functions in Patients With Hepatocellular Carcinoma Before and After Surgery. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2016;30(6):1175-82.
60. Cata JP, Bauer M, Sokari T, Ramirez MF, Mason D, Plautz G, et al. Effects of surgery, general anesthesia, and perioperative epidural analgesia on the immune function of patients with non-small cell lung cancer. *Journal of clinical anesthesia*. 2013;25(4):255-62.
61. Zhao J, Mo H. The Impact of Different Anesthesia Methods on Stress Reaction and Immune Function of the Patients with Gastric Cancer during Peri-Operative Period. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2015;98(6):568-73.
62. Yang C, Chang H, Zhang T, Liang C, Li E. Pre-emptive epidural analgesia improves post-operative pain and immune function in patients undergoing thoracotomy. *ANZ journal of surgery*. 2015;85(6):472-7.
63. Chen J, Luo F, Lei M, Chen Z. A study on cellular immune function of patients treated with radical resection of pulmonary carcinoma with two different methods of anesthesia and analgesia. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2017;22(6):1416-21.
64. Xu Q, Shi NJ, Zhang H, Zhu YM. Effects of combined general-epidural anesthesia and total intravenous anesthesia on cellular immunity and prognosis in patients with nonsmall cell lung cancer: A comparative study. *Molecular medicine reports*. 2017;16(4):4445-54.
65. Zhu J, Zhang XR, Yang H. Effects of combined epidural and general anesthesia on intraoperative hemodynamic responses, postoperative cellular immunity, and prognosis in patients with gallbladder cancer: A randomized controlled trial. *Medicine*. 2017;96(10):e6137.
66. Amodeo G, Bugada D, Franchi S, Moschetti G, Grimaldi S, Panerai A, et al. Immune function after major surgical interventions: the effect of postoperative pain treatment. *Journal of pain research*. 2018;11:1297-305.
67. Wang L, Liang S, Chen H, Xu Y, Wang Y. The effects of epidural anaesthesia and analgesia on T lymphocytes differentiation markers and cytokines in patients after gastric cancer resection. *BMC anesthesiology*. 2019;19(1):102.
68. Lusty AJ, Hosier GW, Koti M, Chenard S, Mizubuti GB, Jaeger M, et al. Anesthetic technique and oncological outcomes in urology: A clinical practice review. *Urologic oncology*. 2019.

69. Siekmann W, Tina E, Von Sydow AK, Gupta A. Effect of lidocaine and ropivacaine on primary (SW480) and metastatic (SW620) colon cancer cell lines. *Oncology letters*. 2019;18(1):395-401.
70. Wodehouse T, Demopolous M, Petty R, Miraki-Moud F, Belhaj A, Husband M, et al. A randomized pilot study to investigate the effect of opioids on immunomarkers using gene expression profiling during surgery. *Pain*. 2019.
71. Wang J, Yin Y, Zhu Y, Xu P, Sun Z, Miao C, et al. Thoracic epidural anaesthesia and analgesia ameliorates surgery-induced stress response and postoperative pain in patients undergoing radical oesophagectomy. *The Journal of international medical research*. 2019;300060519866943.
72. FitzGerald S, Odor PM, Barron A, Pawa A. Breast surgery and regional anaesthesia. *Best practice & research Clinical anaesthesiology*. 2019;33(1):95-110.
73. Zhong S, Zhong X, Zhong X, Liu Y. Comparison between the effect of epidural anesthesia combined with epidural analgesia and general anesthesia combined with intravenous analgesia on prognosis of ovarian cancer patients. *Oncology letters*. 2019;17(6):5662-8.
74. Gao H, Meng XY, Wang HQ, Zhu FF, Guo AL, Zhu M, et al. Association between Anaesthetic Technique and Oncological Outcomes after Colorectal Carcinoma Liver Metastasis Resection. *International journal of medical sciences*. 2019;16(2):337-42.
75. A MM, A RP, J DC, J JE, J CM, J LG. Opioid Free Anaesthesia and Cancer. *Current pharmaceutical design*. 2019.
76. Tanase C, Albulescu R, Neagu M. Updates in immune-based multiplex assays. *Journal of immunoassay & immunochemistry*. 2019;40(1):1-2.
77. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019.
78. Cuthbert CA, Hemmelgarn BR, Xu Y, Cheung WY. The effect of comorbidities on outcomes in colorectal cancer survivors: a population-based cohort study. *Journal of cancer survivorship : research and practice*. 2018;12(6):733-43.
79. Peng F, Hu D, Lin X, Liang B, Chen Y, Zhang H, et al. Impact of long-term antihypertensive and antidiabetic medications on the prognosis of post-surgical colorectal cancer: the Fujian prospective investigation of cancer (FIESTA) study. *Aging*. 2018;10(5):1166-81.
80. Sud S, O'Callaghan C, Jonker C, Karapetis C, Price T, Tebbutt N, et al. Hypertension as a predictor of advanced colorectal cancer outcome and cetuximab treatment response. *Current oncology*. 2018;25(6):e516-e26.

81. Wu HL, Tai YH, Lin SP, Chan MY, Chen HH, Chang KY. The Impact of Blood Transfusion on Recurrence and Mortality Following Colorectal Cancer Resection: A Propensity Score Analysis of 4,030 Patients. *Scientific reports*. 2018;8(1):13345.
82. Peng T, Zhao G, Wang L, Wu J, Cui H, Liang Y, et al. No impact of perioperative blood transfusion on prognosis after curative resection for hepatocellular carcinoma: a propensity score matching analysis. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2018;20(6):719-28.
83. Faria SS, Fernandes PC, Jr., Silva MJ, Lima VC, Fontes W, Freitas-Junior R, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio: a narrative review. *Ecancermedicalscience*. 2016;10:702.
84. Haram A, Boland MR, Kelly ME, Bolger JC, Waldron RM, Kerin MJ. The prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: A systematic review. *Journal of surgical oncology*. 2017;115(4):470-9.
85. Neagu M, Zipeto D, Popescu ID. Inflammation in Cancer: Part of the Problem or Part of the Solution? *Journal of immunology research*. 2019;2019:5403910.
86. Shibuya N, Ishizuka M, Takagi K, Iwasaki Y, Hachiya H, Aoki T, et al. Relationship Between Preoperative Erythrocyte Sedimentation Rate and Survival After Surgery in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer research*. 2018;38(12):6783-8.
87. Seong MK. Prognostic Inflammation Score in Surgical Patients with Colorectal Cancer. *Journal of Korean medical science*. 2015;30(12):1793-9.
88. Zhou ZQ, Pang S, Yu XC, Xue Q, Jiang HY, Liang XJ, et al. Predictive Values of Postoperative and Dynamic Changes of Inflammation Indexes in Survival of Patients with Resected Colorectal Cancer. *Current medical science*. 2018;38(5):798-808.
89. Santonocito C, De Loecker I, Donadello K, Moussa MD, Markowicz S, Gullo A, et al. C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesthesia and analgesia*. 2014;119(3):624-9.
90. Kolomachenko VI. C-reactive protein level in plasma and drainage blood depends on the method of anaesthesia and post-operative analgesia after hip surgery. *Anaesthesiology intensive therapy*. 2018;50(2):117-21.
91. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(9):11553-72.
92. Berkovich L, Ghinea R, Gremland I, Majdop S, Shpitz B, Mishaeli M, et al. Inhibition of TNFalpha in peritoneal fluids of patients following colorectal resection attenuates the

postoperative stress-related increase in colon cancer cell migration: A prospective, in vitro study. *Surgical oncology*. 2018;27(3):479-84.

93. Hou BJ, Du Y, Gu SX, Fan J, Wang R, Deng H, et al. General anesthesia combined with epidural anesthesia maintaining appropriate anesthesia depth may protect excessive production of inflammatory cytokines and stress hormones in colon cancer patients during and after surgery. *Medicine*. 2019;98(30):e16610.

94. Tanase C, Albuлесcu R, Neagu M. Proteomic Approaches for Biomarker Panels in Cancer. *Journal of immunoassay & immunochemistry*. 2016;37(1):1-15.

95. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer letters*. 2015;367(2):103-7.

96. Abbas AK, Trotta E, D RS, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science immunology*. 2018;3(25).

97. Tanase C, Albuлесcu R, Codrici E, Popescu ID, Mihai S, Enciu AM, et al. Circulating biomarker panels for targeted therapy in brain tumors. *Future oncology*. 2015;11(3):511-24.

98. Angka L, Khan ST, Kilgour MK, Xu R, Kennedy MA, Auer RC. Dysfunctional Natural Killer Cells in the Aftermath of Cancer Surgery. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8).

99. Wang RD, Zhu JY, Zhu Y, Ge YS, Xu GL, Jia WD. Perioperative analgesia with parecoxib sodium improves postoperative pain and immune function in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Journal of evaluation in clinical practice*. 2019.

100. Boland JW, Pockley AG. Influence of opioids on immune function in patients with cancer pain: from bench to bedside. *British journal of pharmacology*. 2018;175(14):2726-36.

101. Ellethy AT. Potential antitumor activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs against Ehrlich ascites carcinoma in experimental animals. *International journal of health sciences*. 2019;13(5):11-7.

102. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature immunology*. 2016;17(3):230-40.

103. Liu S, Gu X, Zhu L, Wu G, Zhou H, Song Y, et al. Effects of propofol and sevoflurane on perioperative immune response in patients undergoing laparoscopic radical hysterectomy for cervical cancer. *Medicine*. 2016;95(49):e5479.

104. Grandhi RK, Perona B. Mechanisms of Action by Which Local Anesthetics Reduce Cancer Recurrence: A Systematic Review. *Pain medicine*. 2019.

105. Castelli V, Piroli A, Marinangeli F, d'Angelo M, Benedetti E, Ippoliti R, et al. Local anesthetics counteract cell proliferation and migration of human triple-negative breast cancer and melanoma cells. *Journal of cellular physiology*. 2019.
106. Wang W, Zhu M, Xu Z, Li W, Dong X, Chen Y, et al. Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity. *Biological research*. 2019;52(1):36.
107. Ye L, Zhang Y, Chen YJ, Liu Q. Anti-tumor effects of lidocaine on human gastric cancer cells in vitro. *Bratislavske lekarske listy*. 2019;120(3):212-7.
108. Tat T, Jurj A, Selicean C, Pasca S, Ionescu D. Antiproliferative effects of propofol and lidocaine on the colon adenocarcinoma microenvironment. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2019;24(1):106-15.
109. Boshier PR, Ziff C, Adam ME, Fehervari M, Markar SR, Hanna GB. Effect of perioperative blood transfusion on the long-term survival of patients undergoing esophagectomy for esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*. 2018;31(4).
110. Abdolmohammadi K, Mahmoudi T, Jafari-Koshki T, Hassan ZM, Pourfathollah AA. Immunomodulatory Effects of Blood Transfusion on Tumor Size, Metastasis, and Survival in Experimental Fibrosarcoma. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2018;34(4):697-702.
111. Suksompong S, Tassaneetrithep B, Ariyawatkul T, Sirivanasandha B, Wilartratsami S, Wongsas A, et al. Allogeneic red cell transfusion and its influence on relevant humoral and cellular immunological parameters: A prospective observational trial. *European journal of anaesthesiology*. 2019.