

mgr inż. Katarzyna Czerniak

**Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu  
i azotu w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej  
w warunkach hipoksji-reoksygenacji *in vitro***

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie biologia medyczna**

Promotor: dr hab. n. med. Hanna Billert

Katedra Anestezjologii i Intensywnej Terapii

Zakład Anestezjologii Doświadczalnej



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2019



**Słowa kluczowe:** anestetyki lokalne, hipoksja, reoksygenacja, reaktywne formy tlenu, tlenek azotu, granulocyty obojętnochłonne, krew pępowinowa

**Keywords:** local anaesthetics, hypoxia, reoxygenation, reactive oxygen species, nitric oxide, neutrophils, umbilical cord blood

Badania współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz ze środków grantu Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu nr 502-14-01101104-09850

*Składam najszczerze podziękowania*

*Pani dr hab. n. med. **Hannie Billert** za udzieloną pomoc, cenne wskazówki naukowe,  
wsparcie i życzliwość.*

*Panu dr. hab. n. biol. **Marianowi Giertychowi** za statystyczne opracowanie wyników,  
życzliwość i cierpliwość.*

*Paniom **Stefanii Burkowskiej** i **Małgorzacie Kłobus**, położnym koordynującym Oddziału  
Porodowego Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu za współpracę  
podczas pozyskiwania materiału do badań.*



<b>SPIS TREŚCI</b> .....	1
Spis rycin i tabel.....	5
Wykaz stosowanych skrótów .....	7
1. WSTĘP .....	11
1.1. Hipoksja-reoksygenacja .....	11
1.1.1. Pojęcie normoksji, hipoksji, rodzaje hipoksji .....	11
1.1.2. Hipoksja/niedokrwienie i reoksygenacja/reperfuzja jako patomechanizm patologii u noworodków i dorosłych.....	13
1.1.3. Związek hipoksji z procesami zapalenia, adaptacja do hipoksji.....	14
1.1.4. Uszkodzenie hipoksyczne (niedokrwienne) i reoksygenacyjne (reperfuzyjne).....	15
1.1.5. Rola RFTiA w uszkodzeniu reoksygenacyjnym i reperfuzyjnym .....	17
1.2. Hipoksja-reoksygenacja a granulocyty obojętnochłonne .....	21
1.2.1. Charakterystyka granulocytów obojętnochłonnych.....	21
<i>Produkcja RFTiA</i> .....	22
<i>Odrębności czynnościowe między granulocytami noworodków i dorosłych</i> .....	23
1.2.2. Wpływ hipoksji/reoksygenacji na granulocyty obojętnochłonne .....	24
1.3. Anestetyki lokalne i ich wpływ na granulocyty obojętnochłonne w aspekcie hipoksji-reoksygenacji.....	25
1.3.1. Charakterystyka anestetyków lokalnych.....	25
<i>Mechanizm działania anestetyków lokalnych</i> .....	26
1.3.2. Efekty przeciwzapalne anestetyków lokalnych .....	27
<i>Wpływ na granulocyty obojętnochłonne</i> .....	28
<i>Wpływ na granulocyty obojętnochłonne płodu i noworodka</i> .....	28
1.3.3. Efekty anestetyków lokalnych w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym .....	29
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	31
3. MATERIAŁ I METODY .....	33
3.1. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	33
3.2. Wykaz odczynników. ....	33
3.3. Pobieranie krwi do badań .....	33
3.4. Inkubacja krwi z anestetykami lokalnymi .....	34

3.5.	Model hipoksji-reoksygenacji <i>in vitro</i> .....	35
3.5.1.	Komora hipoksyczna .....	36
3.6.	Stymulacja 12-myristynianem-13-octanem forbolu (PMA) .....	37
3.7.	Cytometryczna ocena wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnych form tlenu i azotu (RFTiA) w granulocytach obojętnochłonnych .....	37
3.7.1.	Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji RFT .....	37
3.7.2.	Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji RFA.....	38
3.7.3.	Identyfikacja granulocytów .....	39
3.8.	Współczynnik stymulacji.....	40
3.9.	Oznaczenie równowagi kwasowo-zasadowej.....	40
3.10.	Analiza statystyczna.....	40
4.	WYNIKI.....	43
4.1.	Charakterystyka położnicza i dane noworodków .....	43
4.2.	Ocena porównawcza wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) i tlenku azotu (NO) w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników w warunkach hipoksji-reoksygenacji .....	44
4.3.	Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję RFT i NO w granulocytach krwi pępowinowej oraz dorosłych ochotników .....	50
4.3.1.	Bupiwakaina .....	59
<i>Produkcja RFT</i> .....	59	
<i>Produkcja NO</i> .....	60	
4.3.2.	Lidokaina.....	61
<i>Produkcja RFT</i> .....	61	
<i>Produkcja NO</i> .....	61	
4.3.3.	Ropiwakaina .....	63
<i>Produkcja RFT</i> .....	63	
<i>Produkcja NO</i> .....	63	
4.3.4.	Porównanie wpływu bupiwakainy, lidokainy i ropiwakainy na produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji <i>in vitro</i> z wykorzystaniem wieloczynnikowej analizy wariancji.....	65
<i>Produkcja RFT</i> .....	65	



<i>Produkcja NO</i> .....	68
4.4. Równowaga kwasowo-zasadowa .....	71
5. DYSKUSJA .....	73
5.1. Produkcja RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji <i>in vitro</i> .....	73
5.1.1. Wpływ hipoksji-reoksygenacji .....	73
<i>RFT</i> .....	73
<i>NO</i> .....	76
5.1.2. Wpływ czasu inkubacji .....	77
5.1.3. Różnice między granulocytami krwi pępowinowej i dorosłych .....	79
5.2. Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję RFTi A w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji .....	80
5.2.1. Rodzaj anestetyku, stężenie .....	81
5.2.2. Czas reoksygenacji .....	84
5.2.3. Różnice między grupami .....	84
5.3. Ograniczenia pracy .....	86
6. WNIOSKI .....	87
7. STRESZCZENIE .....	89
8. ABSTRACT .....	91
9. Piśmiennictwo .....	93



## Spis rycin i tabel

### Ryciny

<b>Ryc. 1-1.</b> Reaktywne formy tlenu i azotu w układach biologicznych i zależności między nimi. ....	18
<b>Ryc. 1-2.</b> Aktywacja kompleksu oksydazy NADPH. ....	20
<b>Ryc. 1-3.</b> Struktura wybranych aminoamidowych anestetyków lokalnych. ....	26
<b>Ryc. 3-1.</b> Schematyczne przedstawienie doświadczenia. ....	35
<b>Ryc. 3-2.</b> Komora hipoksyjna własnej konstrukcji. ....	36
<b>Ryc. 3-3.</b> Reprezentatywne wykresy kropkowe („dot-plot”) pełnej krwi pępowinowej po liczeniu erytrocytów do analizy granulocytów. ....	39
<b>Ryc. 4-1.</b> Wewnątrzkomórkowa produkcja RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej oraz dorosłych ochotników niestymulowanych oraz stymulowanych PMA inkubowanych w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji. ....	46
<b>Ryc. 4-2.</b> Istotne interakcje między efektami czynników uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach inkubowanych w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji. ....	49
<b>Ryc. 4-3.</b> Wpływ bupiwakainy, lidokainy i ropiwakainy na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej, poddanych 60 min hipoksji i 15 lub 240 min reoksygenacji. ....	53
<b>Ryc. 4-4.</b> Wpływ bupiwakainy, lidokainy i ropiwakainy na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej, poddanych 60 min hipoksji i 15 lub 240 min reoksygenacji. ....	54
<b>Ryc. 4-5.</b> Istotny efekt stężenia bupiwakainy i ropiwakainy oraz istotne interakcje między efektami czynników uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksję/reoksygenację. ....	57
<b>Ryc. 4-6.</b> Istotne interakcje między efektami czynników uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksję/reoksygenację. ....	58
<b>Ryc. 4-7.</b> Istotny efekt rodzaju anestetyku, stężenia anestetyków oraz istotne interakcje między efektami czynników uwzględnionych w modelu porównawczym wieloczynnikowej analizy wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksję/reoksygenację. ....	67
<b>Ryc. 4-8.</b> Istotny efekt rodzaju anestetyku oraz istotne interakcje między efektami czynników uwzględnionych w modelu porównawczym wieloczynnikowej analizy wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksję/reoksygenację. ....	70
<b>Ryc. 4-9.</b> Wybrane parametry analizy równowagi kwasowo-zasadowej krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej poddanej 75 i 300 min normoksji lub 60 min hipoksji oraz 15 i 240 min reoksygenacji. ....	71

## Tabele

<b>Tab. 1-1.</b> Podział hipoksji z przyczyn zewnętrznych wg Wiggersa. ....	12
<b>Tab.1-2.</b> Wpływ czynnika HIF na funkcje komórek układu odpornościowego. ....	15
<b>Tab. 1-3.</b> Niektóre właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne wybranych aminoamidowych anestetyków lokalnych. ....	26
<b>Tab. 3-1.</b> Wykaz odczynników i buforów. ....	33
<b>Tab. 3-2.</b> Stężenia anestetyków lokalnych (mM) z którymi inkubowano krew pełną. ....	34
<b>Tab. 4-1.</b> Charakterystyka położnicza i dane noworodków. ....	43
<b>Tab. 4-2.</b> Wartości bezwzględne fluorescencji Rho123 i DAF-2T oraz współczynnik stymulacji granulocytów krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników inkubowanej w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji. ....	47
<b>Tab. 4-3.</b> Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję RFT i NO przez granulocyty obojętnochłonne inkubowane w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji i interakcji między tymi czynnikami. ....	48
<b>Tab. 4-4.</b> Bezwzględne wartości fluorescencji Rho123 granulocytów krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników inkubowanych z anestetykami lokalnymi przez 75 i 300 minut. ....	51
<b>Tab. 4-5.</b> Bezwzględne wartości fluorescencji DAF-2T granulocytów krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników inkubowanych z anestetykami lokalnymi przez 75 i 300 minut. ....	52
<b>Tab. 4-6.</b> Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję RFT przez granulocyty obojętnochłonne poddane ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi. ....	55
<b>Tab. 4-7.</b> Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję NO przez granulocyty obojętnochłonne poddane ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi. ....	56
<b>Tab. 4-8.</b> Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję RFT przez granulocyty obojętnochłonne poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę i ropiwakainę oraz hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi - model porównawczy. ....	66
<b>Tab. 4-9.</b> Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję NO przez granulocyty obojętnochłonne poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę i ropiwakainę oraz hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi - model porównawczy. ....	69

## Wykaz stosowanych skrótów

ADP	- adenozyjno-5`-difosforan (ang. adenosine 5'-diphosphate)
ALI	- ostre uszkodzenie płuc (ang. acute lung injury)
AMP	- adenozyjno-5`-monofosforan (ang. adenosine 5'-monophosphate)
AMPK	- kinaza aktywowana AMP (ang. AMP-activated protein kinase)
AMPK $\alpha$ 2	- podjednostka $\alpha$ drugiej kinazy aktywowanej AMP
AscH <sup>-</sup>	- anion kwasu L-askorbinowego
ATP	- adenozyjno-5`-trifosforan (ang. adenosine 5'-triphosphate)
BE	- niedobór lub nadmiar zasad (ang. base excess)
BH4	- tetrahydrobiopteryna (ang. tetrahydrobiopterin)
CD11b	- integryna 11b (ang. CD11b integrin )
CD18	- integryna 18 (ang. CD18 integrin )
CD62L	- L-selektyna
cGMP	- cykliczny guanozyno 5`-monofosforan (ang. cyclic guanosine 5`-monophosphate)
Cl	- klirens (ang. clearance)
CREB	- czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (ang. cyclic AMP responding-element binding)
DAF-2DA	- dwuoctan 4,5-diaminofluoresceiny (ang. 4,5-Diaminofluorescein diacetate solution)
DAF-2T	- triazolofluoresceina (ang. diaminofluoresceine-2 triazole)
DAMP	- struktury molekularne związane z uszkodzeniem (ang. damage associated molecular pattern)
DHR123	- dihyrorodamina 123(ang. dihydrorhodamine 123)
DMSO	- dimetylosulfotlenek (ang. dimethylsulfoxide)
FACS	- sortowanie oparte o właściwości fluorescencyjne komórek (ang. fluorescence-activated cell sorting)
FAD	- dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. flavin adenine dinucleotide)
FIH	- czynnik hamujący HIF (ang. factor-inhibiting HIF)
FITC	- izotiocyanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate)
FL1	- detektor fluorescencji 1 (ang. fluorescence 1)
FL2	- detektor fluorescencji 2 (ang. fluorescence 2)
FL3	- detektor fluorescencji 3 (ang. fluorescence 3)
fMLP	- N-formylo-metionilo-leucylo-fenyloalanina (ang. N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)
FMN	- mononukleotyd flawinowy (ang. flavin mononucleotide)
FSC	- rozproszenie na wprost (ang. forward scatter)

GPCR	- receptory sprzężone z białkami G (ang. G protein-coupled receptors)
Gq	- białko Gq (ang. Gq protein)
Gαq	- podjednostka α białka Gq
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- nadtlenek wodoru (ang. hydrogen peroxide)
H60/R15	- hipoksja 60 min, reoksygenacja 15 min
H60/R240	- hipoksja 60 min reoksygenacja 240 min
HIF [HIF-1, HIF-2]	- czynnik indukowany hipoksją [1,2] (ang. hypoxia-inducible factor [1,2])
HIFα	- podjednostka α czynnika indukowanego hipoksją (ang. hypoxia-inducible factor alpha subunit)
HR	- inkubacja w warunkach hipoksji-reoksygenacji.
HRE	- elementy odpowiedzi na hipoksję (ang. hypoxia-responsive elements)
HSP	- białka szoku termicznego (ang. heat shock proteins)
ICAM	- międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. intercellular adhesion molecule)
IL-1	- interleukina 1 (ang. interleukin 1)
IL-10	- interleukina 10 (ang. interleukin 10)
IL-1β	- interleukina 1β (ang. interleukin 1β)
IL-6	- interleukina 6 (ang. interleukin 6)
IL-8	- interleukina 8 (ang. interleukin 8, CXCL8)
K/O	- stosunek stężenia leku we krwi do stężenia w osoczu
L-Arg	- L-arginina (ang. L-arginine)
L-NAME	- ester metylowy Nω-nitro-L-argininy (ang. N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester)
LPA	- kwas lizofosfatydowy (ang. lysophosphatidic acid)
LPS	- lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)
LTB <sub>4</sub>	- leukotrien B <sub>4</sub> (ang. leukotriene B <sub>4</sub> )
MDA	- dialdehyd malonowy (ang. malondialdehyde)
MFI	- średnia intensywność fluorescencji (ang. mean channel intensity)
MIP-1β	- białko zapalne makrofagów 1β (ang. macrophage inflammatory protein 1β)
M <sub>mol</sub>	- masa molowa
MPO	- mieloperoksydaza (ang. myeloperoxidase)
mPTP	- megakanał mitochondrialny (ang. mitochondrial permeability transition pore)
mtRFT	- RFT pochodzenia mitochondrialnego
N	- inkubacja w warunkach normoksji
N300	- normoksja 300 min
N75	- normoksja 75 min

NAD(P)H	- (fosforan) dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)) NAD(P) <sup>+</sup> – forma utleniona (fosforanu) dinukleotydu
NET	- neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe (ang. neutrophil extracellular traps)
NF-κB	- jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. nuclear factor kappa B)
NHE	- wymiennik Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> (ang. Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger)
NO	- tlenek azotu (ang. nitric oxide)
NOS1, nNOS	- syntaza tlenku azotu, izoforma 1, neuronalna (ang. nitric oxide synthase, izoform 1, neuronal)
NOS2, iNOS	- syntaza tlenku azotu, izoforma 2, indukowalna (ang. nitric oxide synthase, izoform 2, induced)
NOS3, eNOS	- syntaza tlenku azotu, izoforma 3, endotelialna (ang. nitric oxide synthase, izoform 3, endothelial)
NOX2	- oksydaza NADPH, izoforma 2 (NADPH oxidase, izoform 2)
ns	- komórki niestymulowane
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	- anionorodnik ponadtlenkowy
ONOO <sup>-</sup>	- nadtlenoazotyn
PAF	- czynnik aktywujący płytki krwi (ang. platelet activating factor)
PAMPs	- stałe fragmenty strukturalne patogenów (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	- bufor fosforanowy (ang. phosphate-buffered saline)
pCO <sub>2</sub>	- ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla
PE	- fikoerytryna (ang. phycoerythrin)
PerCP	- peridininochlorofil (ang. peridinin chlorophyll)
pH	- ujemny logarytm dziesiętny ze stężenia jonów wodorowych
PHD	- hydroksylazy prolinowe (ang. prolyl hydroxylases,)
pHi	- pH śródkomórkowe (ang. intracellular pH)
PI	- jodek propidyny (ang. propidium iodide)
pKa	- stała dysocjacji
PKC	- kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
PLD	- fosfolipaza D (ang. phospholipase D)
PMA	- 12-myristynian-13-octan forbolu (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate)
pO <sub>2</sub>	- ciśnienie parcjalne tlenu/prężność tlenu
PRR	- receptor rozpoznający wzorce (ang. pattern recognition receptor)
RFA	- reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species)

RFT	- reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
RFTiA	- reaktywne formy tlenu i azotu
Rho123	- rodamina 123 (ang. rhodamine 123)
SCN <sup>-</sup>	- anion tiocyjanianowy
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase)
SSC	- rozproszenie boczne (ang. side scatter)
TENS	- przezskórna stymulacja elektryczna nerwów (ang. transcutaneous electrical nerve stimulation)
THAM	- trometaamina (ang. tromethamine)
TLR4	- receptor toll-podobny 4 (ang. toll-like receptor 4)
TNF- $\alpha$	- czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor $\alpha$ )
TXA2	- tromboksan 2A (ang. thromboxane A2)
UCP	- białka rozprzegające (ang. uncoupling proteins)
V <sub>ds</sub>	- objętość dysocjacji
XD	- dehydrogenaza ksantynowa (ang. xanthine dehydrogenase)
XO	- oksydaza ksantynowa (ang. xanthine oxidase,)
$\Delta\psi$	- elektrochemiczny gradient protonów



## 1. WSTĘP

Tlen jest trzecim najczęściej występującym pierwiastkiem na ziemi, kluczowym dla życia organizmów aerobowych. Redukcja tlenu stanowi jeden z najwydajniejszych możliwych sposobów transferu energii. Zdolność wykorzystania tlenu w metabolizmie energetycznym wpłynęła na rozwój organizmów wielokomórkowych, doprowadziła do powstania łańcucha transportu elektronów i licznych enzymów, m.in. regulujących syntezę lipidów błonowych i białek strukturalnych<sup>1</sup>.

Niedotlenienie w różnych postaciach, a także zespół zmian występujących po przywróceniu utleniania tkanek ściśle powiązane z procesami zapalenia są zjawiskami występującymi powszechnie w patologii<sup>2</sup>. Mimo szerokiej dyskusji dotyczącej przyczyn i możliwości postępowania leczniczego wiele zagadnień czeka na wyjaśnienie. W patofizjologii hipoksji/niedokrwienia i reoksygenacji/reperfuzji podkreśla się rolę reaktywnych form tlenu i azotu (RFTiA), które są integralną częścią kompleksowej reakcji ustroju na uszkodzenia i inicjują dalsze procesy zapalenia zarówno na poziomie lokalnym, jak i ogólnoustrojowym. Granulocyty obojętnochłonne, najliczniej reprezentowana w ustroju populacja leukocytów, należą do komórek zapalenia czynnie zaangażowanych w procesy hipoksji/niedokrwienia i reoksygenacji/reperfuzji. Aktywność tych komórek może podlegać modulacji w wyniku stosowania szeregu leków i procedur, między innymi technik znieczulenia regionalnego. Anestetyki lokalne stosowane w blokadach centralnych w okresie porodu mogą modulować produkcję RFTiA w granulocytach płodu i noworodka. Nie badany jak dotychczas wpływ tych środków na granulocyty noworodka w warunkach hipoksji-reoksygenacji w porównaniu z granulocytami dorosłych domaga się wyjaśnienia.

### 1.1. Hipoksja-reoksygenacja

#### 1.1.1. Pojęcie normoksji, hipoksji, rodzaje hipoksji

Zawartość tlenu w powietrzu atmosferycznym jest definiowana jako normoksja. Pojęcie to jest też odnoszone potocznie do prawidłowej zawartości tlenu w tkankach, niższej niż w powietrzu atmosferycznym i charakterystycznej dla rodzaju tkanki. Ostatnio pojawił się postulat wprowadzenia bardziej precyzyjnego terminu „fizjoksja”, określającego fizjologicznie prawidłowe stężenia tlenu w tkankach, które wynosi przeciętnie ok. 6% (zależnie od rodzaju tkanki od ok. 4-7,5%); w badaniach doświadczalnych przyjmuje się kompromisowo wartość 5%<sup>3</sup>. Stopień utlenowania zapewniający normoksję (fizjoksję) tkanki jest wypadkową jego dostarczenia, m.in. wydajności perfuzji oraz zapotrzebowania na tlen wynikającego z aktywności metabolicznej.

Hipoksja jest stanem, w którym zawartość tlenu w tkance spada poniżej progu normoksji (fizjoksji). Może mieć charakter ostry lub przewlekły, uogólniony lub występować lokalnie. Natężenie hipoksji jest klasyfikowane jako łagodne, średnie i ciężkie<sup>4</sup>. Głębokość hipoksji determinuje jej następstwa tkankowe i ogólnoustrojowe; ostatnio postuluje się potencjalne wykorzystanie kontrolowanej łagodnej hipoksji w leczeniu zespołów chorobowych związanych z zaburzeniami czynnościowymi mitochondriów<sup>5,6</sup>. Do hipoksji może dochodzić z przyczyn zewnętrznych, w wyniku obniżonej podaży tlenu, oraz wewnętrznych, związanych z czasowym lub stałym zwiększeniem zużycia tlenu. Ze względu na przyczynę zewnętrzną, zgodnie z tradycyjnym podziałem Wiggersa wyróżnia się hipoksję anoksyyczną, anemiczną, ischemiczną i cytotoksyczną (Tab. 1-1).

Tabela 1-1. Podział hipoksji z przyczyn zewnętrznych wg Wiggersa.

Rodzaj hipoksji	Mechanizm
Anoksyyczna (hipoksyyczna)	Zaburzenia dyfuzji tlenu w płucach (obniżona pO <sub>2</sub> w pęcherzykach w związku z zaburzeniami oddychania lub zmniejszoną pO <sub>2</sub> w powietrzu wdychowym (h. środowiskowa, wysokościowa, geograficzna)
Anemiczna	Obniżenie transportu O <sub>2</sub> , spadek poziomu hemoglobiny
Ischemiczna (niedokrwienność, zastoinowa)	Upośledzenie przepływu; niewydolność krążenia, zator
Cytotoksyczna	Brak możliwości wykorzystania O <sub>2</sub> - zahamowanie aktywności enzymów, zatrucia

pO<sub>2</sub> – prężność tlenu

Hipoksja z przyczyn wewnętrznych może być fizjologiczna lub patologiczna. Tkanki, zależnie od rodzaju, reagują już na ok. 1% spadek stężenia tlenu. Hipoksja fizjologiczna występuje m.in. w tkankach niszczących immunologicznych, w których jest utrzymywany stały gradient prężności tlenu (pO<sub>2</sub>): błonie śluzowej jelita (funkcja bariery), macicy (tolerancja immunologiczna trofoblastu), szpiku kostnym (homeostaza hematopoetycznych komórek macierzystych), rdzeniu nerki (produkcja erytropoetyny) i centrach namnażania w węzłach chłonnych (jakość przeciwciał, fenotyp limfocytów typu B<sup>7</sup>). Do hipoksji patologicznej, zazwyczaj głębszej niż fizjologiczna ( $\leq 5\%$ )<sup>3</sup>, dochodzi m.in. w mikrośrodowisku nowotworu, w tkankach niedokrwionych i/lub zakażonych oraz stanach zapalenia przewlekłego<sup>7</sup>. Na zmniejszenie stężenia O<sub>2</sub> w tkance patologicznej wpływa dodatkowo obecność komórek zapalenia, przede wszystkim granulocytów obojętnochłonnych, które w stanie pobudzenia zużywają O<sub>2</sub>. Określenie „hipoksja infekcyjna” odnosi się do obniżenia stężenia O<sub>2</sub> w tkance objętej zakażeniem w następstwie aktywności metabolicznej bakterii i komórek zapalenia<sup>8</sup>.

Wyróżnia się hipoksję ciągłą lub przerywaną, kiedy okresy niedotlenienia występują naprzemiennie z okresami normoksji. Stan ten występuje w warunkach patologicznych (obturacyjny bezdech senny), a jego niekorzystne następstwa są związane m.in. z aktywacją ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, pobudzeniem współczulnym, rozwojem nadciśnienia układowego i płucnego, zaburzeniami metabolicznymi i neurologicznymi. Jednak przy odpowiednim dobraniu parametrów stężenia O<sub>2</sub> i częstotliwości okresów hipoksji ten wzorzec hipoksji może być wykorzystywany w leczeniu zaburzeń układu krążenia, metabolicznych i neurologicznych<sup>9</sup>. Powtarzane krótkie epizody ekspozycji na hipoksję o nieuszkodzającym natężeniu, tzw. hartowanie hipoksyczne, zastosowane przed lub krótko po urazie o większym natężeniu, może wpływać na zwiększoną tolerancję hipoksji/niedokrwienia tkanek w mechanizmie uruchomienia molekularnych mechanizmów adaptacyjnych. Reakcja ta może dotyczyć także odległych narządów (odległe hartowanie, ang. remote conditioning).

Reoksygenacja jest wynikiem przywrócenia dostępności tlenu. Jeżeli do niedotlenienia doszło w wyniku niedokrwienia, przywrócenie krążenia nosi nazwę reperfuzji. Reoksygenacja i reperfuzja mogą nasilać hipoksyczne/niedokrwienne uszkodzenie tkanek w mechanizmie przede wszystkim nadmiernej produkcji czynników oksydacyjnych, czyli stresu oksydacyjnego.

#### 1.1.2. Hipoksja/niedokrwienie i reoksygenacja/reperfuzja jako patomechanizm patologii u noworodków i dorosłych

W okresie życia wewnątrzmacicznego przewlekła hipoksja płodu występuje w patologii ciąży, m.in. w cukrzycy, zespołach nadciśnienia i otyłości matki. Do ostrego niedotlenienia i zagrożenia życia płodu i noworodka dochodzi w ostrej niewydolności krążenia łożyskowego, np. w zaburzeniach placentacji, przedwczesnym oddzieleniu się łożyska i krwotoku, a także w wyniku innych powikłań okołoporodowych. Asfiksja (hipoksja, hiperkarbia i kwasica) w okresie perinatalnym, obok zakażenia i wcześniactwa, należy do trzech najczęstszych przyczyn śmiertelności noworodków i jest następstwem niedotlenienia wewnątrzmacicznego, powikłań okołoporodowych i w zespole aspiracji smółki. Reoksygenacja po okresie niedotlenienia u noworodka powoduje zwłaszcza uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego i encefalopatię oraz martwicze zapalenie jelit<sup>10</sup>.

U dorosłych zespół hipoksji/niedokrwienia i reoksygenacji/reperfuzji leży u podstaw patofizjologicznych ostrych i przewlekłych zespołów chorobowych jedno- i wielonarządowych. Występuje on w patologii ośrodkowego układu nerwowego (udar, choroba Alzheimer), serca (ostre zespoły wieńcowe), stawów i kości (zapalenie stawów), przewodu pokarmowego (choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy, niedrożność jelit) i nerek (ostra niewydolność nerek). Patologia wielonarządowa dotyczy m.in. zespołu po nagłym zatrzymaniu krążenia, wstrząsu, obturacyjnego

bezdechu sennego i kryzysów w przebiegu niedokrwistości sierpowatokrwinkowej. Do reoksygenacji/reperfuzji może też dochodzić z przyczyn jatrogennych, w wyniku zastosowanych procedur medycznych, w tym terapii trombolitycznej, w przeszczepianych narządach, w kardiochirurgii i chirurgii naczyniowej po zwolnieniu zaciśnięcia tętnicy, po dekompresji zespołów ciasnoty (wewnątrzbrzuszej czy przedziałów międzypowięziowych), po uwolnieniu skrętu jajnika lub jądra<sup>2</sup>.

### 1.1.3. Związek hipoksji z procesami zapalenia, adaptacja do hipoksji

Hipoksja jako bodziec uszkadzający uruchamia procesy zapalenia, reakcję obronną organizmu na uszkodzenie, której celem jest przywrócenie homeostazy. W warunkach niedoboru O<sub>2</sub> może dojść do rozwoju stanu zapalnego (np. w obrzęku płuc, zmianie nowotworowej, tkankach przeszczepu, tkance tłuszczowej). W obszarze zapalenia (np. w ostrym uszkodzeniu płuca, zapaleniu jelita grubego, zakażeniu) hipoksja jest związana m.in. z obecnością komórek odpornościowych, zwłaszcza granulocytów, które zużywają O<sub>2</sub> w procesie aktywacji i wybuchu oddechowego<sup>11,12</sup>. W procesie przewlekłego zapalenia do hipoksji dochodzi w następstwie zaburzenia transportu tlenu w wyniku waskulopatii spowodowanej zakrzepicą i procesami włóknienia<sup>13</sup>.

U podłoża współzależności procesów hipoksji i zapalenia leżą wzajemne powiązania między mechanizmami regulacyjnymi obu procesów na poziomie molekularnym. Dotyczą one jądrowych czynników transkrypcyjnych kappa B (nuclear factor kappa B, NF-κB) i czynników transkrypcyjnych indukowanych hipoksją (hypoxia inducible factors, HIF). Klasyczna droga aktywacji NF-κB, regulującego szeroki wachlarz genów kodujących mediatory zapalenia, jest uruchamiana przez cytokiny prozapalne oraz hipoksję. Charakter przeciw- czy prozapalny odpowiedzi zależy od rodzaju komórki, czasu aktywności czynnika oraz rodzaju patologii<sup>14</sup>. Zaburzenia regulacji zasadniczo korzystnej reakcji zapalnej mogą prowadzić do przewlekłego uszkodzenia tkanki i w rozwoju przewlekłych chorób zapalnych<sup>15</sup>.

Niedotlenienie wyzwała szereg mechanizmów adaptacyjnych na poziomie ogólnoustrojowym, tkankowym i komórkowym zależnych od charakterystyki bodźca hipoksycznego. Tolerancja hipoksji jest osobniczo zmienna; u osobników wykazujących lepszą adaptację do hipoksji przebieg ogólnoustrojowej reakcji zapalnej wywołanej podaniem lipopolisacharydu jest łagodniejszy<sup>16</sup>. Ponieważ mitochondria zużywają 80-95% O<sub>2</sub> w procesach fosforylacji oksydacyjnej, będącym głównym źródłem energii w większości komórek, niedobór O<sub>2</sub> upośledza te procesy i powoduje deficyt energii. Przeżycie wymaga zatem uruchomienia alternatywnych źródeł energii w postaci glikolizy. Skądinąd kwasica związana z produkcją kwasu mlekowego w procesie glikolizy wpływa na zmiany strukturalne w mitochondriach, które zapobiegają ich fragmentacji i sprzyjają

utrzymaniu czynności tych struktur<sup>17</sup>. W procesie adaptacji w pierwszej kolejności dochodzi do aktywacji kinaz białkowych aktywowanych przez AMP (AMPK), a za ich pośrednictwem zwiększenia aktywności katalitycznej enzymów kluczowych dla glikolizy<sup>18</sup>. Efekt ten jest jednak krótkotrwały; przedłużona adaptacja do hipoksji odbywa się za pośrednictwem HIF, które wiążą się z elementami odpowiedzi na hipoksję (hypoxia-responsive elements, HRE) wywołując zmiany w transkrypcji komórek i inicjując procesy adaptacyjne. HIF są podlegającymi konstytutywnej ekspresji heterodimerami złożonymi z zależnej od stężenia tlenu podjednostki  $\alpha$  (krótki czas półtrwania w warunkach normoksji, degradacja blokowana w hipoksji) oraz niewrażliwej na stężenie tlenu podjednostki  $\beta$ . HIF mogą regulować ekspresję ponad 100 genów zaangażowanych m.in. w procesy transportu  $O_2$  i glukozy do komórki, glikolizę, produkcję mediatorów zapalenia (m.in. cytokin i białek szoku termicznego (heat shock proteins, HSP), zwłaszcza rodziny HSP70), angiogenezę, erytropoezę, autofagię i apoptozę<sup>19,20</sup>. Rolę czujników  $O_2$  w komórce pełnią enzymy odpowiedzialne za stabilność podjednostki HIF $\alpha$ , hydroksylazy prolinowe (prolyl hydroxylases, PHD1-3) oraz czynnik hamujący HIF (factor-inhibiting HIF, FIH). PHD hydroksylują reszty proliny w zależnej od tlenu domenie degradacyjnej HIF $\alpha$ , co z kolei umożliwia jego degradację. FIH i PHD regulują też aktywację NF- $\kappa$ B<sup>21,22</sup>.

HIF regulują różne funkcje komórek układu odpornościowego (Tab.1-2)<sup>14</sup>. W granulocytach obojętnochłonnych pełnią kluczową rolę w regulacji czasu życia komórki, procesów metabolicznych oraz aktywności bakterioobójczej<sup>23</sup>.

Tabela1-2. Wpływ czynnika HIF na funkcje komórek układu odpornościowego wg<sup>14</sup>.

Rodzaje komórek	Rodzaj czynnika	Efekty czynnościowe
Komórki dendrytyczne	HIF-1	Przeżycie, synteza interferonu, migracja, różnicowanie, prezentacja antygenów
Komórki NK	HIF-2	Cytotoksyczność
Limfocyty T	HIF-1	Różnicowanie, przeżycie, proliferacja, migracja, promowanie Treg
Limfocyty B	HIF-1	Różnicowanie, przeżycie, transport jonów, autoimmunizacja
Makrofagi	HIF-1/2	Polaryzacja, ruch, aktywność biobójcza, potencjał rakotwórczy
Granulocyty obojętnochłonne	HIF-1/2	Apoptoza

HIF – czynnik indukowany hipoksją

#### 1.1.4. Uszkodzenie hipoksyczne (niedokrwienne) i reoksygenacyjne (reperfuzyjne)

Jeżeli mimo uruchomienia mechanizmów adaptacyjnych zapasy energetyczne komórki spadają poniżej poziomu krytycznego, dochodzi do uszkodzenia hipoksycznego (niedokrwienne, jeżeli hipoksja jest następstwem upośledzenia przepływu naczyniowego) będącego funkcją nasilenia bodźca i czasu jego trwania. Metabolizm beztlenowy wiąże się ze spadkiem pH i produkcji ATP. Wymiennik  $Na^+/H^+$  (NHE), powoduje napływ jonów  $Na^+$ , a upośledzona funkcja

adenozynotrifosfataz powoduje m.in. dalsze zaburzenia homeostazy jonowej i akumulacji jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , m.in. aktywujących proteazy. Hiperosmolarność środowiska wewnątrzkomórkowego powoduje pęcznienie komórek. Zużywanie ATP wiąże się ze wzrostem stężeń ADP, AMP, adenozyne, inozyne i hipoksantyny. Hipoksja zmienia potencjał błonowy, zmniejsza płynność błony komórkowej oraz uszkadza cytoszkielet komórek. Dochodzi do upośledzenia aktywności enzymów, zbrylania się chromatyny, uszkodzenia i lizy organelli i błon. Śmierć komórki może następować w wielu mechanizmach. Do przedziału pozakomórkowego uwalnianie są czynniki odpowiadające molekularnym wzorcom związanym z uszkodzeniem (damage-associated molecular patterns, DAMPs), m.in. ATP, HSP, białka S100. Są one rozpoznawane przez receptory rozpoznające wzorce (pattern recognition receptors (PRRs)) co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych uczestniczących w procesach zapalenia i wpływa na infiltrację komórek zapalenia, m.in. granulocytów obojętnochłonnych, w niedotlenionych tkankach<sup>18</sup>. Podczas reoksygenacji wzrasta ilość  $\text{O}_2$  dostarczana do komórek, jednak może paradoksalnie dochodzić do dalszego uszkodzenia tkanek. Zjawisko to zostało opisane przez Jenningsa i wsp. w roku 1960 w oparciu o badania nad niedokrwieniem mięśnia sercowego u psów<sup>24</sup>. W patomechanizmie tego uszkodzenia zasadniczą rolę odgrywa dalszy wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce oraz zjawiska związane ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), głównie pochodzenia mitochondrialnego (mtRFT) określane mianem „paradoksu tlenowego”. Dochodzi do zwiększonej przepuszczalności błon mitochondrialnych i otwarcia porów przejściowych o wysokiej przewodności, tzw. megakanałów (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), uwalnianie cytochromu c i śmierć komórki. Kluczową rolę w uszkodzeniu reoksygenacyjnym/reperfuzyjnym odgrywa zapoczątkowana w okresie hipoksji /niedokrwienia reakcja naczyniowa, kompleks zjawisk obejmujący wzajemne oddziaływania między śródbłonkiem i komórkami układu odpornościowego. W procesie tym uczestniczą czynnie komórki śródbłonka. Dochodzi w nich kolejno do aktywacji kanałów potasowych ATP zależnych, hiperpolaryzacji błony komórkowej, zwiększonej produkcji RFT i ekspresji cząstek adhezyjnych<sup>25</sup>. Zmiany strukturalne i czynnościowe połączeń między tymi komórkami, prowadzą do zwiększonej przepuszczalności i ułatwienia przechodzenia leukocytów, w pierwszej kolejności granulocytów obojętnochłonnych, do tkanek. Pod wpływem czynników uwalnianych przez komórki śródbłonka dochodzi do zmian czynnościowych w granulocytach obojętnochłonnych, zwiększonej produkcji RFT i ekspresji odpowiedzialnych za adhezję molekuł powierzchniowych. Sekwestracja tkankowa granulocytów zapoczątkowana w okresie niedokrwienia ulega podczas reperfuzyjki znacznemu nasileniu. Po przejściu z naczyń włosowatych do wenuli postkapilarnych komórki te ulegają marginacji w kierunku ściany naczyniowej przez siły hydrodynamiczne, a następnie przywierają do komórek śródbłonka i ulegają kolejno toczeniu, adhezji i przesuwaniu się wzdłuż ściany naczyniowej. Migracja transendotelialna jest

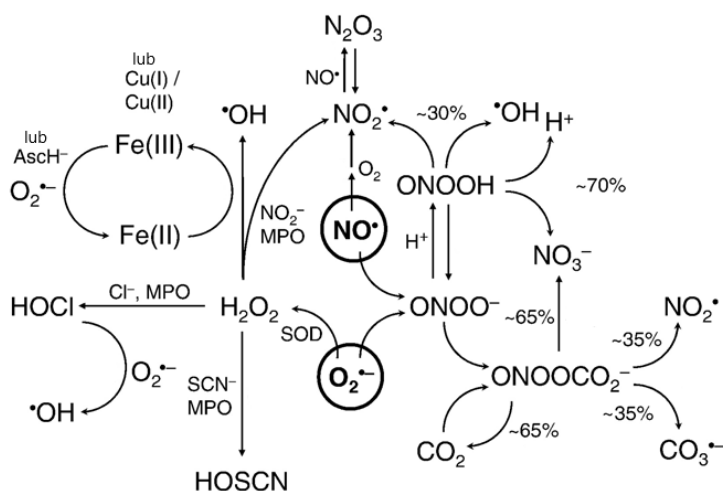
kilkuetapowym skomplikowanym procesem. Dochodzi do niej w miejscu połączeń między komórkami śródbłonna, a granulocyty wykorzystują wolne przestrzenie między pericytami i obszary o obniżonej ekspresji białek w błonie podstawnej. W końcu następuje oderwanie się od zewnętrznej strony ściany naczyniowej i migracja w przestrzeni śródmiąższowej<sup>18</sup>. Dzięki ekspresji PRR granulocyty docierają do miejsca uszkodzenia w ciągu kilku minut<sup>26</sup>, rekrutując kolejne komórki. W następnej kolejności przechodzą monocyty regulujące migrację i funkcje efektorowe granulocytów<sup>27</sup>. Granulocyty wchodzi też w interakcje z limfocytami T i B, komórkami dendrytycznymi, tucznyimi i NK oraz makrofagami biorąc udział w regulacji dalszej odpowiedzi immunologicznej<sup>27,28</sup>. W warunkach niedokrwienia i reperfuzji może też dochodzić do tzw. odwrotnej transmigracji – przechodzenia granulocytów z tkanek do krążenia układowego. Komórki te tracą jednak zdolność do ponownego przechodzenia do tkanek, charakteryzują się odrębnym fenotypem, zwiększoną aktywnością oksydacyjną i angiogenną. W procesie wygaszania reakcji zapalnej (rezolucji) granulocyty uczestniczą w usuwaniu martwiczych tkanek, m.in. uszkodzonych fragmentów naczyń i wytwarzaniu kanałów dla nowej sieci naczyniowej o dodatkowym znaczeniu dla angiogenezy a do ogniska rekrutowana jest (subpopulacja wykazująca ekspresję receptora dla naczyniowego śródbłonowego czynnika wzrostu)<sup>29</sup>. Efekty prorezolucyjne obejmują też blokowanie i wymiatanie chemokin, zmianę szlaków biosyntezy prozapalnych eikozanoidów w kierunku przeciwzapalnych lipoksyn, obniżających zdolność granulocytów do infiltracji tkanek<sup>30</sup>. Apoptoza granulocytów stymuluje makrofagi do usuwania apoptotycznych komórek z miejsca zakażenia i przyczynia się do wygaszania stanu zapalnego oraz wpływa na procesy gojenia. Fagocytoza neutrofilii indukuje w makrofagach produkcję mediatorów wygaszania, rezolwin, protektyn i marezyn<sup>27,31</sup>. Lokalne procesy hipoksji/niedokrwienia i reoksygenacji/reperfuzji mogą też uruchamiać ogólnoustrojową reakcję zapalną i powodować uszkodzenie wielonarządowe.

#### 1.1.5. Rola RFTiA w uszkodzeniu reoksygenacyjnym i reperfuzyjnym

Pełniące kluczową rolę w patomechanizmie hipoksji/niedokrwienia i reoksygenacji/reperfuzji RFTiA o charakterze rodnikowym i nie rodnikowym powstają jako produkty uboczne w procesach metabolicznych, przede wszystkim w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, oraz w procesach enzymatycznych z udziałem m.in. oksydoreduktaz i syntazy NO (NOS). Mogą też powstawać przy udziale grup hemowych białek oddechowych (hemoglobiny i mioglobiny) wydzielanych do przestrzeni międzykomórkowych po uszkodzeniu. Modułując przekazywanie sygnału, RFTiA za pośrednictwem oksydoredukcyjnych modyfikacji posttranslacyjnych, uczestniczą w kompleksowej reakcji komórek na hipoksję, m.in. za pośrednictwem HIF. Produkowane w dużych ilościach, powodują nieodwracalne modyfikacje oksydacyjne i nitracyjne cząstek biologicznie aktywnych oraz nasilają procesy zapalenia (m.in. przez aktywację inflamasomu NLRP3), które prowadzą do

zaburzeń czynnościowych i śmierci komórek<sup>32</sup>. W procesie hipoksji/niedokrwienia i reoksygenacji/reperfuzji rola przekaźnictwa sygnału związana z tlenkiem azotu (NO) jest zróżnicowana. W wielu komórkach dochodzi do aktywacji NOS2 za pośrednictwem HIF i zwiększenia produkcji NO. NO jest potencjalnie cytotoksyczny, hamuje fosforylację oksydacyjną, a nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>) powoduje uszkodzenia nitracyjne enzymów, w tym inaktywację antyoksydantów. NO działa też protekcyjnie, ma właściwości antyoksydacyjne, a jego działanie ochronne potwierdzono w modelach hipoksji reoksygenacji. Pełni też rolę w mechanizmach hartowania hipoksycznego<sup>33</sup>.

Punktem wyjścia dla tworzenia RFT jest anionorodnik ponadtlenkowy O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, powstający w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki O<sub>2</sub>. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> jest słabym utleniaczem posiadającym jednocześnie umiarkowane własności redukcyjne i słabe zdolności przenikania przez błony. Szybko reaguje z NO i innymi rodnikami oraz centrami żelazowo-siarkowymi, wolno zaś z tiolami, jego forma protonowana (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) jest silniejszym utleniaczem<sup>34</sup>. Wewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase, SOD) dysproporcjonuje O<sub>2</sub><sup>•-</sup> z wytworzeniem nadtlenku wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), który łatwo dyfunduje przez błony i utlenia grupy tiolowe oraz jony metali przejściowych, prowadząc do powstawania rodnika hydroksylowego OH<sup>•</sup> o bardzo silnych właściwościach utleniających. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> może być także przekształcany w inne rodniki. Mieloperoksydaza (MPO) w granulocytach przekształca O<sub>2</sub><sup>•-</sup> bezpośrednio w tlen singletowy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w kwas podchlorawy (HClO), mający silne właściwości bakteriobójcze<sup>35</sup>.



Rycina 1-1. Reaktywne formy tlenu i azotu w układach biologicznych i zależności między nimi wg<sup>37</sup>.

AscH<sup>-</sup> - anion kwasu L-askorbinowego, SCN<sup>-</sup> - anion tiocyjanianowy, MPO – mieloperoksydaza, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa.

Produkcji RFT towarzyszy powstawanie reaktywnych form azotu (RFA), przede wszystkim NO i ONOO<sup>-</sup>, oraz reaktywnych form siarczkowych (RFS) pochodnych odpowiednio NO i siarkowodoru (H<sub>2</sub>S). NO posiada jeden niesparowany elektron między atomami tlenu i azotu.



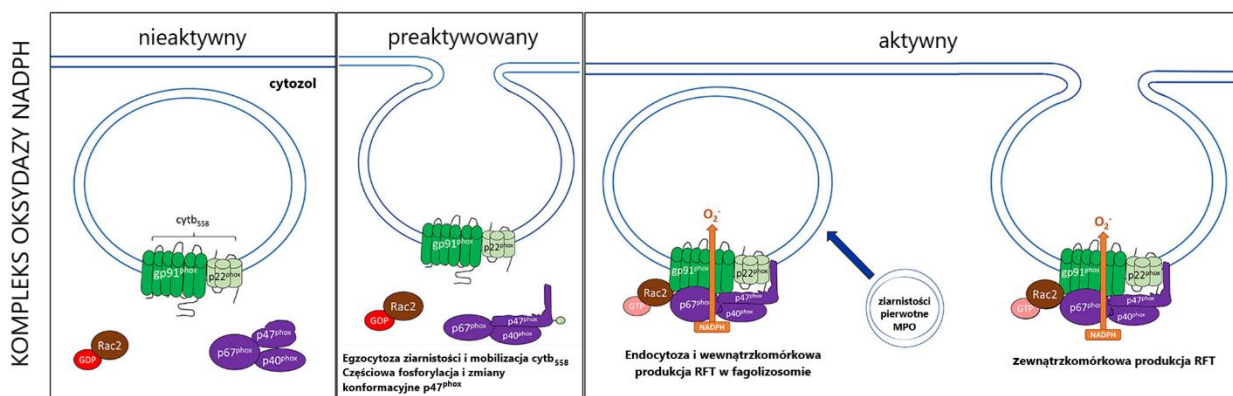
Związek ten uczestniczy w przekaznictwie sygnału oraz pełni rolę w zwalczaniu patogenów. W reakcji NO z  $O_2^{\bullet-}$  powstaje nie będący wolnym rodnikiem ONOO<sup>-</sup>, który jest prekursorem silnych utleniaczy NO<sub>2</sub>/HO<sup>•</sup><sup>36</sup>.

Wiele badań sugeruje, że pierwotnym źródłem powstawania RFT w hipoksji/niedokrwieniu i reoksygenacji/reperfuzji jest *łańcuch transportu elektronów*. Do uwalniania mtRFT, w pierwszej kolejności  $O_2^{\bullet-}$ , dochodzi w wyniku ucieczki elektronów głównie w obrębie kompleksu I i III. Wysoki stosunek NADH/NAD<sup>+</sup> w macierzy mitochondrialnej i/lub rosnący elektrochemiczny gradient protonów ( $\Delta\psi$ ) zwiększają ucieczkę elektronów i produkcję  $O_2^{\bullet-}$ , powodując aktywację białek rozprzegających (uncoupling proteins, UCP) i obniżenie  $\Delta\psi$ . W badaniu kinetycznym z użyciem różnych rodzajów komórek (śródbłonna, kardiomiocytów i komórek nowotworowych) wykazano, że  $O_2^{\bullet-}$  powstaje w mitochondriach w pierwszych minutach hipoksji, po czym jego stężenie stopniowo spada, osiągając po upływie godziny poziom wyjściowy. Z pewnym opóźnieniem powstaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który następnie dyfunduje do cytoplazmy i organelli. Ilość tego związku w komórce istotnie wzrasta w okresie reperfuzji<sup>38,39</sup>. Do modyfikacji oksydacyjnej grup tiolowych białek dochodzi już po 30 minutach hipoksji<sup>38</sup>.

Innym ważnym enzymatycznym źródłem RFT jest *oksydoreduktaza ksantynowa*, występująca w dwóch ulegających wzajemnemu przekształcaniu formach, oksydazy (xanthine oxidase, XO) i dominującej w zdrowych tkankach dehydrogenazy ksantynowej (xanthine dehydrogenase, XD). W warunkach hipoksji ATP jest katabolizowany do hipoksantyny, a XD przekształcana w XO. Podczas reoksygenacji hipoksantyna reaguje z O<sub>2</sub> w procesie katalizowanym przez XO z wytworzeniem  $O_2^{\bullet-}$  oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, które dają początek kolejnym RFT. W warunkach niedokrwienia, przy zmianie potencjału redoks komórek z oksydacyjnego (NAD<sup>+</sup>>NADPH) na redukcyjny (NADPH>NAD<sup>+</sup>), także XD może w obecności ksantyny produkować zwiększone ilości  $O_2^{\bullet-}$ . Ponadto XO katalizuje jednoelektronową redukcję azotynów do NO, szczególnie w warunkach anoksji/hipoksji oraz kwasicy.

*Izofomy oksydazy NADPH* (NOX), obecna w komórkach mieloidalnych i komórkach ściany naczyniowej izoforma NOX2, a także izofomy obecne w innych komórkach, stanowią kolejny układ enzymatyczny odpowiedzialny za produkcję RFT w warunkach niedokrwienia i reperfuzji. Preaktywacja (priming) pod wpływem szeregu czynników, m.in. lipidów prozapalnych, cytokin, chemokin, czynników mitochondrialnych i uwalnianych przez patogeny, uruchamiających różne szlaki przekazywania, umożliwia, po kolejnym zadziałaniu czynnika aktywującego, wyzwolenie szybkiej, skutecznej reakcji efektorowej<sup>40</sup>. NOX2 przenosi elektron z cytozolowego NADPH na tlen znajdujący się po zewnętrznej stronie błony komórkowej, dzięki czemu  $O_2^{\bullet-}$  jest uwalniany zewnątrzkomórkowo lub do wnętrza pęcherzyka fagocytarnego (Ryc. 1-2)<sup>34</sup>. Kompleks NOX2

składa się z siedmiu komponentów: trzech podjednostek błonowych, gp91<sup>phox</sup>/NOX2, p22<sup>phox</sup> (tworzące razem stabilny heterodimer – cytochrom b558) i Rap1A, oraz czterech cytozolowych, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> i Rac2. Podczas aktywacji (Ryc.1-2) komponenty cytozolowe ulegają fosforylacji i przemieszczają się do błony komórkowej. Znaczenie ma zwłaszcza podjednostka p47<sup>phox</sup>, cząsteczka adaptorowa przyłączająca się do gp91<sup>phox</sup> i łącząca p22<sup>phox</sup> z p67<sup>phox</sup>, stabilizująca kompleks NOX<sup>40,41</sup>.



Rycina 1-2. Aktywacja kompleksu oksydazy NADPH<sup>wg35</sup>.

NO wewnątrzkomórkowo jest produkowany głównie w katalizowanej przez izoformy syntaz NO (NOS1-3) reakcji utleniania L-argininy (L-Arg) do L-cytruliny w obecności O<sub>2</sub>, NADPH i tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>). NO powstaje też w wyniku nieenzymatycznej redukcji azotynów. NOS w formie aktywnej są homodimerami o podjednostkach zawierających domenę oksygenazową (N-końcową, wiążącą BH<sub>4</sub>, L-Arg, hem), środkową domenę wiążącą kalmodulinę i domenę reduktazową (C-końcową, wiążącą NADPH, FAD, FMN). Przyłączanie BH<sub>4</sub> i hemu jest niezbędne do prawidłowej dimeryzacji NOS, a przyłączanie kalmoduliny do reakcji O<sub>2</sub> do L-Arg i produkcji NO w mechanizmie transferu elektronów z części reduktazowej do oksygenazowej enzymu<sup>42</sup>. NOS może ulegać rozprzęganiu i produkować O<sub>2</sub><sup>-</sup> przy obniżeniu stężenia BH<sub>4</sub>, np. pod wpływem utleniania związku do BH<sub>2</sub> oraz przy niedoborze L-Arg, wywoływanym zwiększoną w warunkach niedokrwienia aktywnością arginazy.

Produkcja RFTiA znajduje się pod kontrolą mechanizmów antyoksydacyjnych, enzymatycznych i nieenzymatycznych, a głębokość i czas trwania hipoksji mają znaczenie w ich regulacji. W ostrej hipoksji w różnych rodzajach komórek może dochodzić do obniżenia aktywności m.in. SOD, peroksydazy glutationowej i katalazy, a tym samym do zwiększenia uszkodzenia reoksygenacyjnego<sup>33</sup>. W przewlekłej hipoksji może mieć miejsce regulacyjne zwiększenie aktywności antyoksydacyjnej<sup>43</sup>. RFT produkowane przez jeden z układów enzymatycznych mogą

aktywować i zwiększać produkcję RFT przez pozostałe układy, np. mtRFT w warunkach hipoksji zwiększają aktywność NOX. Wiele uwagi poświęcono wzajemnym oddziaływaniom między mtRFT a aktywnością oksydacyjną NOX; np. NOS moduluje aktywację XO, a RFT pochodne XO mogą hamować enzymy łańcucha transportu elektronów<sup>2</sup>.

## 1.2. Hipoksja-reoksygenacja a granulocyty obojętnochłonne

### 1.2.1. Charakterystyka granulocytów obojętnochłonnych

Granulocyty obojętnochłonne, komórki pierwszej linii obrony w reakcji zapalnej są najliczniejszą frakcją leukocytów we krwi krążącej (u ludzi 50-70%). Pochodzą z mieloblastów, są produkowane ( $5-10 \times 10^{10}$ /dziennie) i przechodzą proces dojrzewania w szpiku kostnym, skąd są uwalniane do krążenia układowego. Pula marginalna w naczyniach płuc, śledziony, wątroby i szpiku stanowi fizjologiczny rezerwuar dojrzałych granulocytów<sup>44</sup>. Np. mikrokrażenie płucne stanowi czynnościową niszę immunologiczną, w której dochodzi do wybiórczej natychmiastowej neutralizacji patogenów<sup>45</sup>. Granulocyty przechodzą też w warunkach fizjologicznych do innych tkanek, m.in. jelita, co ma istotne znaczenie dla odporności ustroju. Wbrew wcześniejszym poglądom, granulocyty żyją do kilku dni (izolowane komórki w hodowli – ok. 8godzin), a ich czas przeżycia ulega wydłużeniu w procesach zapalenia<sup>46</sup>. Głównym źródłem pozyskiwania energii są procesy glikolizy wobec stosunkowo niewielkiej liczby mitochondriów.

Granulocyty stanowią wysoce heterogenną populację komórek. Mają też zdolność do plastycznego dostosowywania fenotypu, obejmującego m.in. charakterystyczną ekspresję markerów powierzchniowych, do aktualnego stanu fizjologicznego lub patologicznego a także w procesach starzenia komórek oraz zgodnie z rytmem dobowym. Zidentyfikowano 17 różnych odmian fenotypu granulocytów w różnych stanach czynnościowych i patologii, m.in. w nowotworach<sup>44,47</sup>.

Granulocyty w krążeniu układowym znajdują się w stanie nieaktywnym; ograniczona zdolność reakcji na bodźce stanowi ochronę przed uszkodzeniem tkanek. Granulocyty rozpoznają zagrożenie dzięki obecności swoistych receptorów PRR, których ligandami są stałe fragmenty strukturalne patogenów (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) i czynniki endogenne (DAMP). Preaktywacja (priming) następuje pod wpływem m.in. lipidów prozapalnych, cytokin, chemokin, czynników obecnych w mitochondriach i uwalnianych przez patogeny, które uruchamiają różne szlaki przekazywania, umożliwia wyzwalenie szybkiej, skutecznej (10-20 krotnie większej) reakcji efektorowej po zadziałaniu bodźca uszkodzającego. Dochodzi też do wzrostu adhezji, reorganizacji cytoszkieletu, ekspresji i translokacji receptorów, przyspieszenia metabolizmu oraz opóźnienia apoptozy<sup>40</sup>. W procesie adhezji i interakcji z innymi komórkami zapalenia, zwłaszcza z komórkami

śródbłonka kluczowe znaczenie ma wzrost ekspresji integryn. Czynności efektorowe związane z obronną rolą granulocytów obejmują fagocytozę, degranulację i formowanie tzw. neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych (neutrophil extracellular traps, NET). Granulocyty produkują też i uwalniają szereg mediatorów pro- i przeciwzapalnych kluczowych w początkowej fazie i na etapie wygaszania reakcji zapalnej, RFTiA, cytokin, chemokin i mediatorów lipidowych.

Granulocyty charakteryzuje bardzo niska aktywność transkrypcyjna i translacyjna. Większość białek jest zmagazynowana w czterech typach ziarnistości powstających w procesie dojrzewania: azurofilnych, specyficznych, zawierających żelatynazę i wydzielniczych, których zawartość jest uwalniana w sekwencyjnym procesie degranulacji. Uruchamiane w pierwszej kolejności ziarnistości wydzielnicze i zawierające żelatynazę, a następnie specyficzne, zawierają białka błonowe o kluczowym znaczeniu dla wczesnej odpowiedzi komórek; ziarnistości specyficzne i azurofilne są źródłem proteaz, białek przeciwbakteryjnych, a także arginazy, ułatwiają migrację i degradację patogenów. W procesie fagocytozy granulocyty pochłaniają opsonizowane struktury, m.in. patogeny, po ich rozpoznaniu przez receptory dla opsonin (np. Fcγ, dla lecytyn typu C i składników dopełniacza). Procesowi temu towarzyszy degranulacja ziarnistości do pęcherzyka fagocytarnego i uwalnianie RFT, pochodnych NOX2 i MPO oraz RFA.

Mechanizmem zewnątrzkomórkowym eliminacji patogenów jest tworzenie NET. Zjawisko to wiąże się z dekondensacją DNA i formowaniem struktur będących siecią włókien chromatyny, do której przyłączone są histony, białka cytoszkieletu, MPO i proteazy zawarte w ziarnistościach. Do powstawania NET dochodzi w mechanizmie zależnym lub niezależnym od RFTiA; wiąże się ono ze śmiercią komórki, ale może też przebiegać przyżyciowo. Tworzenie NET jest istotne w zwalczaniu patogenów, ale może też mieć znaczenie w uszkodzeniu tkanek oraz interakcjach między granulocytami i układem krzepnięcia<sup>44</sup>.

Niezależnie od roli obronnej i potencjału uszkodzania tkanek, granulocyty pełnią wspomnianą wyżej kluczową rolę w procesach gojenia i wygaszania reakcji zapalnej. Komórki te mają też istotne znaczenie w regulacji odpowiedzi swoistej, wpływają modulująco na czynność limfocytów T i B na różnych poziomach. Mogą ułatwiać różnicowanie odpowiedzi w kierunku T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>17, mogą też pełnić rolę komórek prezentujących antygen. W procesach rozrostowych granulocyty mogą ułatwiać lub hamować rozwój nowotworów<sup>44,47</sup>.

### *Produkcja RFTiA*

Aktywacja granulocytów prowadzi do szybkiego, dużego wzrostu produkcji RFT w procesie wybuchu oddechowego związanego z aktywacją oksydazy NOX2 a następnie MPO. Aktywacja NOX wiąże się z przestrojeniem energetycznym z glikolizy w kierunku cyklu

pentozofosforanowego, który dostarcza donora elektronów, NADPH. RFT w granulocytach mogą być też uwalniane, głównie w celach regulacyjnych, przez mitochondria i stymulować NOX. Zjawisko to może mieć znaczenie w procesach hipoksji-reoksygenacji<sup>48</sup>. Produkcja RFT jest kluczowa dla aktywności bakteriobójczej granulocytów, jednak czynniki te mogą też uczestniczyć w uszkodzeniu tkanek i innych procesach, np. związanych z regulacją odpowiedzi swoistej<sup>44</sup>.

Granulocyty produkują też NO i RFA w procesie enzymatycznym i pozaenzymatycznym (w wyniku wewnątrzkomórkowej redukcji azotynów). W granulocytach obserwuje się ekspresję wszystkich trzech izoform NOS. NOS2 występuje konstytutywnie w cytoplazmie i ziarnistościach wydzielniczych i zawierających żelatynazę. Podczas aktywacji w procesie fagocytozy, w wyniku interakcji z podjednostką NOX2 Rac2, NOS2 przemieszcza się do błony komórkowej i ulega aktywacji<sup>49</sup>. NOS w granulocytach, podobnie jak NOX2 może też ulegać aktywacji pod wpływem stymulacji czynnikami pochodzenia bakteryjnego, cytokinami i związkami syntetycznymi (PMA i jonofor Ca A23178), jednak wydajność tej stymulacji jest znacząco niższa niż w przypadku NOX2. Wzajemne oddziaływania między aktywnością układów enzymatycznych NOX2 i NOS pełnią istotną rolę funkcjonalną. Z jednej strony może dochodzić do hamowania oksydacyjnego NOS i zmniejszenia produkcji NO<sup>50</sup>. NO produkowany przez NOS2 może hamować NOX w mechanizmie fosforylacji p47<sup>phox</sup> za pośrednictwem izoform kinazy białkowej C (PKC)<sup>51</sup>. NO jest produkowany przez granulocyty wprawdzie w stosunkowo niewielkich ilościach, ale ma kluczowe znaczenie dla chemotaksji, adhezji, agregacji, apoptozy i, będąc źródłem RFA, neutralizacji patogenów w procesie fagocytozy i tworzenia NET<sup>52</sup>.

#### *Odrębności czynnościowe między granulocytami noworodków i dorosłych*

W krążeniu płodowym i noworodkowym liczniej występują formy niedojrzałe granulocytów obojętnochłonnych; ich liczba spada i osiąga proporcje zbliżone do występujących u dorosłych po około 72 godzinach życia. Czynność granulocytów noworodka jest związana z wiekiem urodzeniowym i stanem dziecka, wykazując szczególną niedojrzałość czynnościową u dzieci przedwcześnie urodzonych. Istnieją też różnice między granulocytami noworodków w porównaniu do osób dorosłych.

Proces degranulacji granulocytów donoszonego noworodka przebiega podobnie jak u dorosłych, ale niektóre składniki ziarnistości występują w mniejszych ilościach. Upośledzona reakcja granulocytów noworodka na czynniki chemotaktyczne wynika z zaburzeń uruchamiania wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia i opóźnionej reakcji ze strony cytoszkieletu. W związku z niższą ekspresją L-selektyny upośledzone są także procesy toczenia, adhezji do śródbłonna oraz transmigracji. Mniejsza ilość receptorów CR3 oraz zaburzenia wydzielania chemokin i cytokin przyczyniają się dodatkowo do obniżonej dynamiki naczyniowej reakcji

zapalnej. Procesy fagocytozy granulocytów noworodka są porównywalne do dorosłych natomiast tworzenie NET przebiega tylko w mechanizmie niezależnym od RFT<sup>53</sup>.

Opinie na temat produkcji RFT przez granulocyty noworodka były zróżnicowane, wskazując na możliwą niższą, porównywalną lub wyższą dynamikę wybuchu oddechowego w porównaniu z granulocytami dorosłych. Przedstawiono jednak przekonujące dowody na różnice czynnościowe wybuchu oddechowego niezależnie od ewentualnych różnic ilościowych. W granulocytach krwi pępowinowej obserwowano niewielkie obniżenie ilości komponentów cytoplazmatycznych kompleksu oksydazy NOX2, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> i p67<sup>phox</sup> przy dwukrotnie większej ilości błonowego cytochromu b558 w porównaniu do dorosłych. Stan ten może się wiązać z możliwym upośledzeniem produkcji RFT w sytuacji ciężkiego zagrożenia infekcyjnego<sup>54</sup>. W aspekcie produkcji NO przez granulocyty noworodka, w badaniach prowadzonych w Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej wykazano niższą produkcję enzymatyczną NO w stymulowanych izolowanych granulocytach krwi pępowinowej w porównaniu z granulocytami dorosłych<sup>52</sup>.

### 1.2.2. Wpływ hipoksji/reoksygenacji na granulocyty obojętnochłonne

Granulocyty są komórkami wykazującymi znaczną tolerancję na niedobór tlenu w związku z ich fizjologiczną rolą w procesach zapalenia. Ostatnio wykazano, że *in vitro* można znacznie wydłużyć czas przeżycia granulocytów, inkubując je w warunkach anoksji, pod warunkiem zapewnienia dostępności glukozy i aktywności HIF-1 $\alpha$ <sup>46</sup>. W procesie hipoksji-reoksygenacji granulocyty pełnią istotną rolę w procesach angiogenezy i wygaszania zapalenia, mogą też działać uszkodzająco<sup>29</sup>. Kluczowe znaczenie RFTiA uwalnianych przez granulocyty obojętnochłonne w patofizjologii uszkodzenia reperfuzyjnego zostało potwierdzone w pojedynczych narządach a także w uszkodzeniach wielonarządowych<sup>2</sup>. Jednak, mimo że aktywowane granulocyty są ważnym źródłem RFT, do uszkodzenia reoksygenacyjnego może dochodzić niezależnie od obecności tych komórek, co potwierdzono *in vitro* m.in. w komórkach śródbłonna, mięśnia sercowego i hepatocytach<sup>2</sup>. Uważa się, że do aktywacji granulocytów i produkcji RFTiA dochodzi wtórnie, pod wpływem interakcji tych komórek ze śródbłonkiem. Badania z użyciem antyoksydantów lub eliminacji granulocytów nie zawsze przyniosły spodziewane efekty w leczeniu niedokrwienia reperfuzyjnego w różnych narządach<sup>55</sup>. Stopień uszkodzenia reperfuzyjnego wynika raczej z fenotypu granulocytów; polaryzacja w kierunku fenotypu przeciwzapalnego N2 wiąże się z ułatwieniem ich fagocytozy przez makrofagi i optymalizacji procesów rezolucji zapalenia<sup>56</sup>.

Hipoksja wpływa na ekspresję integryn i powoduje zwiększoną adhezję granulocytów do śródbłonna (reoksygenacja odwraca ten efekt). Dochodzi do intensyfikacji procesów fagocytozy zymosanu i bakterii, degranulacji (wydzielania MPO i proteaz: elastazy, laktoferyny oraz

metaloproteinazy 9 macierzy pozakomórkowej) oraz uwalniania mediatorów zapalenia (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MIP-1 $\beta$ ) niezależnie od stymulacji lipopolisacharydem (LPS)<sup>57,58,59,60,61</sup>. Hipoksja opóźnia konstytutywną apoptozę<sup>57</sup>. Upośledzeniu ulega tworzenie NET stymulowane PMA jednocześnie nie wpływając na indukcję tego zjawiska pod wpływem inkubacji z żywymi bakteriami gronkowca złocistego<sup>62</sup>.

W warunkach hipoksji dochodzi do zmniejszenia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej produkcji RFT przy zachowanej ekspresji komponentów NOX2, co prowadzi do upośledzenia tlenozależnej aktywności bakteriobójczej (w odniesieniu do gronkowca złocistego)<sup>57,60</sup>. W warunkach reoksygenacji przywrócenie dostępności O<sub>2</sub> powoduje odwrócenie zhamowania wybuchu oddechowego i wzrost produkcji RFT. Natężenie tego zjawiska opisanego w warunkach *in vitro* w granulocytach izolowanych oraz we krwi pełnej, a także w modelach *in vivo*, różniło się w zależności od modelu doświadczalnego; zależało od stopnia hipoksji, dynamiki procesu narastania hipoksji-reoksygenacji i rodzaju stymulacji komórek<sup>42,57,58,63,64</sup>. W mechanizmie tego zjawiska podkreślano znaczenie procesów związanych z aktywacją PKC i gospodarką wapniową<sup>63,65</sup>.

Poglądy na produkcję NO w granulocytach w warunkach hipoksji i reoksygenacji są zróżnicowane. Obserwowano zarówno wzrost stężenia azotynów w granulocytach, jak i brak wpływu na produkcję NO przy jednoczesnym wzroście aktywności arginazy w tych komórkach, a także spadek produkcji NO<sup>66,67</sup>.

Hipoksja-reoksygenacja *in vivo* powoduje zwiększenie ilości krążących neutrofilów oraz wzrost aktywności mechanizmów oksydacyjnych, m.in. MPO<sup>67</sup>.

### 1.3. Anestetyki lokalne i ich wpływ na granulocyty obojętnochłonne w aspekcie hipoksji-reoksygenacji

#### 1.3.1. Charakterystyka anestetyków lokalnych

Anestetyki lokalne są środkami farmakologicznymi czasowo blokującymi przewodnictwo impulsów elektrycznych przez błony komórkowe komórek pobudliwych. Środki te hamują przewodnictwo bodźców nocyceptywnych i czucie bólu bez wpływu na świadomość i są szeroko stosowane w znieczuleniu i analgezji regionalnej.

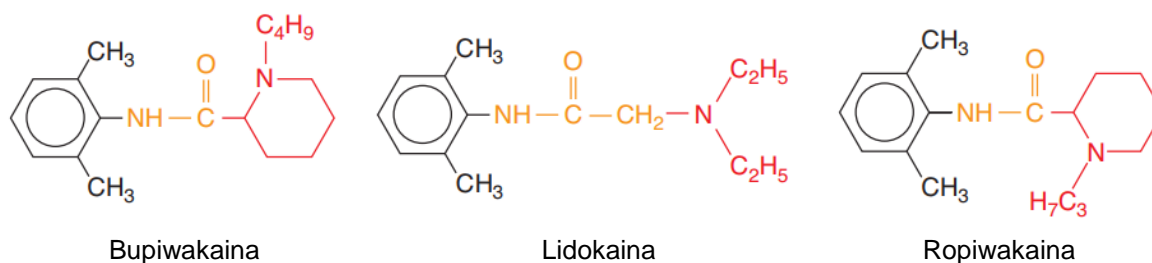
Anestetyki lokalne są słabymi zasadami trudno rozpuszczalnymi w wodzie. Są zbudowane z lipofilowego pierścienia aromatycznego, połączonego wiązaniem estrowym lub amidowym z hydrofilową aminą trzeciorzędową (lub drugorzędową). Część hydrofilowa cząsteczki anestetyku może przyjmować formę niezjonizowaną lub zjonizowaną; stosunek formy zjonizowanej do

niezjonizowanej wyznacza stała dysocjacji (pKa) środka – wartość pH, przy której obie formy występują w równych ilościach. Im bardziej pKa środka jest zbliżona do fizjologicznego pH, tym szybszy początek jego działania<sup>68</sup>. Forma niezjonizowana łatwiej przechodzi przez błony, co przyspiesza wystąpienie efektu farmakologicznego. Siła działania jest wprost proporcjonalna do zależnej od ilości podstawników alkilowych rozpuszczalności w tłuszczach, która również decyduje o przechodzeniu przez błonę komórkową. Masa cząsteczkowa anestetyków lokalnych wpływa na szybkość ich dysocjacji od miejsca receptorowego; środki o mniejszej cząsteczce oddysocjują szybciej<sup>69</sup>. Czas działania anestetyków lokalnych zależy od ich wiązania z białkami. W Tab. 1-3. zestawiono właściwości, a na Ryc.1-3. przedstawiono strukturę wybranych, badanych w niniejszej pracy anestetyków lokalnych.

Tabela 1-3. Niektóre właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne wybranych aminoamidowych anestetyków lokalnych<sup>wg 70</sup>

Nazwa	M <sub>mol</sub> (g/mol)	pKa	V <sub>ds</sub> (l)	Cl (l/min)	T <sub>1/2</sub> (godz)	Ekstrakcja wątrobową	Współczynnik olej/bufor	Wiązanie z białkami	K/O
Bupiwakaina	288,43	8,1	59	0,73	1,8	0,40	346	94%	0,69
Lidokaina	234,38	7,7	73	0,58	2,7	0,51	2,4	96%	0,73
Ropiwakaina	274,40	8,1	91	0,95	1,6	0,72	115	60%	0,84

Dane farmakokinetyczne dotyczą osób dorosłych M<sub>mol</sub> - masa molowa; pKa - stała dysocjacji; V<sub>ds</sub> - objętość dysocjacji; Cl - klirens; T<sub>1/2</sub> - czas półtrwania; K/O - stosunek stężenia leku we krwi do stężenia w osoczu



Rycina 1-3. Struktura wybranych aminoamidowych anestetyków lokalnych<sup>wg 69</sup>.

kolor czarny - hydrofobowy pierścień aromatyczny; kolor pomarańczowy - pośredni łańcuch amidowy; kolor czerwony - amina, region hydrofilowy

### Mechanizm działania anestetyków lokalnych

Anestetyki lokalne działają głównie przez hamowanie napięciowo zależnych kanałów sodowych w nerwach czuciowych i kardiomiocytach – stabilizując ich formę nieaktywną (zamkniętą). Cząsteczki anestetyków wykazują powinowactwo do regionu D4-S6 α podjednostki kanału sodowego; dochodzi do zmian konformacji kanału i wytworzenia dodatniego ładunku w jego



światle<sup>71</sup>. Niezależnie od interakcji z białkiem kanału, anestetyki lokalne działają też pośrednio, w wyniku interakcji z lipidami błony komórkowej. Mechanizm ten stanowi wspólny punkt uchwytu dla wszystkich anestetyków lokalnych, niezależnie od różnic w ich strukturze. Interakcje tych środków z lipidami błon komórkowych prowadzą do zmian strukturalnych i czynnościowych: zwiększa się upłynnienie błon, dochodzi do zaburzeń ich uporządkowania, mikrolepkości i przepuszczalności, a także przezbłonowego potencjału elektrostatycznego. Zmiany potencjału mogą też mieć znaczenie dla efektu hamującego kanały napięciowo zależne. Niezależnie od wpływu na kanały sodowe, dochodzi do hamowania innych kanałów jonowych – potasowych, wapniowych i protonowych, a także modulacji innych struktur związanych z błonami: receptorów (cholinergicznymi, adrenergicznymi, GABA-ergicznymi, glicynowymi, N-metylo-D-asparaginianowymi), enzymów (cyklazy adenylicznej, fosfolipazy A2, Na,K-ATP-azy) i innych białek błonowych uczestniczących w przekaźnictwie sygnału, np. Gαq<sup>71,72,73</sup>. Anestetyki lokalne wykazują szczególne powinowactwo do błonowych platform lipidowych. Oddziaływanie błonowe zależy też od składu lipidowego błon, m.in. zawartości cholesterolu i kardiolipiny. Komponenty chiralne błon, przede wszystkim cholesterol, decydują o efekcie stereoselektywności w przypadku enancjomerów lewoskrętnych. Skład błon ma też znaczenie dla błonowych efektów anestetyków lokalnych w warunkach patologicznych. Np. w warunkach kwasicy ugrupowanie kationowe cząsteczki anestetyku oddziałuje elektrostatycznie z grupami anionowymi kwaśnych fosfolipidów, a ONOO<sup>-</sup> produkowany w warunkach zapalenia nasila efekt anestetyku w błonach zawierających kardiolipinę (mitochondrialnych)<sup>73</sup>. Anestetyki lokalne mogą wpływać na przekaźnictwo sygnału, m.in. za pośrednictwem modulacji aktywności szeregu kinaz (np. kinaz białkowych A, C, p38 MAPK<sup>25,74,75</sup>). Pod wpływem anestetyków lokalnych dochodzi do rozprężenia łańcucha oddechowego w mitochondriach<sup>25,76</sup>.

### 1.3.2. Efekty przeciwzapalne anestetyków lokalnych

Niezależnie od działania znieczulającego anestetyki lokalne wywierają szereg innych efektów farmakologicznych m.in. związanych z hamowaniem reakcji zapalnej i proliferacji komórek nowotworowych<sup>72,75</sup>. Związki te wpływają na procesy hemostazy i zapalenia za pośrednictwem hamowania białek Gαq i wpływu na receptory, m.in. dla kwasu lizofosfatydowego (lysophosphatidic acid, LPA), tromboksanu A2 (thromboxane, TXA2) i czynnika aktywującego płytki (platelet-activating factor, PAF)<sup>71</sup>. Potwierdzono hamujący wpływ lidokainy na przekaźnictwo sygnału związane z NFκB<sup>77</sup>. Modulacja reakcji zapalnej obejmuje wpływ na komórki śródbłonna i układu odpornościowego (granulocyty, monocyty, limfocyty, makrofagi, komórki tuczne). Anestetyki nie opóźniają procesów gojenia i nie zwiększają ryzyka występowania zakażeń<sup>71</sup>, mogą jednak opóźnić procesy wygaszania odpowiedzi zapalnej<sup>78</sup>.

### *Wpływ na granulocyty obojętnochłonne*

Wpływ anestetyków lokalnych na granulocyty obejmuje hamowanie procesów adhezji do komórek śródbłonka, migracji, fagocytozy i produkcji mediatorów zapalenia, m.in. cytokin i RFTiA. Zależnie od rodzaju i stężenia środka te modulują preaktywację, aktywację i aktywność granulocytów obojętnochłonnych<sup>72</sup>. Efekty te udokumentowano *in vitro* w granulocytach stymulowanych receptorowo (peptyd bakteryjny fMLP, LTB<sub>4</sub>, PAF, LPS) i pozareceptorowo (estry forbolu, jonofor A).

Anestetyki mogą wpływać na preaktywację neutrofilii przez hamowanie szlaku PKC i receptorów związanych z białkami G (GPCR)<sup>74,79,80</sup>. Hamując uwalnianie czynników chemotaktycznych i wpływając na cytoszkielet powodują odwracalny i zależny od dawki spadek chemotaksji, ruchliwości i migracji granulocytów<sup>72,81</sup>. Zjawisko to potwierdzono w modelach doświadczalnych *in vivo*, m.in. w zapaleniu otrzewnej i zapaleniu stawów<sup>72</sup>. Do hamowania adhezji leukocytów do komórek śródbłonka dochodzi w mechanizmie uwalniania prostacykliny i hamowania ekspresji integrzyn przez komórki śródbłonka<sup>72,82</sup>. W komórkach śródbłonka dochodzi też do upośledzonego wydzielania mediatorów zapalenia (IL-8 i IL-1 $\beta$ )<sup>83</sup>. Hamowanie fosfolipazy D (PLD) przez anestetyki lokalne wiąże się z upośledzeniem procesów fagocytozy i degranulacji<sup>84</sup>.

Istnieją liczne doniesienia dotyczące wpływu anestetyków lokalnych na produkcję RFT przez granulocyty obojętnochłonne, zależnie od stężenia i rodzaju środka oraz stężenia i czasu działania stymulatora. Większość danych, zwłaszcza odnośnie bupiwakainy oraz lidokainy, wskazuje na efekty hamujące produkcję RFT<sup>85,86,87,88</sup>. Wykazano też, że lidokaina hamuje kompleks oksydazy NADPH<sup>89</sup>. Ropiwakaina podobnie do lidokainy hamowała produkcję O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz OH<sup>-</sup><sup>80</sup>. Badania własne *in vitro* sugerują hamowanie produkcji RFT pod wpływem klinicznie istotnych stężeń bupiwakainy<sup>90</sup>. Istnieją jednak doniesienia, że bupiwakaina ani ropiwakaina nie wpływają istotnie na wybuch oddechowy granulocytów<sup>89</sup>. Anestetyki lokalne zależnie od stężenia i rodzaju środka zwiększają enzymatyczną produkcję NO w granulocytach<sup>52</sup>.

### *Wpływ na granulocyty obojętnochłonne płodu i noworodka*

W warunkach klinicznych wykazano hamujący wpływ lidokainy podanej matce zewnątrzoponowo na chemotaksję granulocytów obojętnochłonnych krwi pępowinowej<sup>91</sup>. Zaobserwowano też jednak, że granulocyty noworodków urodzonych siłami natury lub w wyniku cięcia cesarskiego w znieczuleniu ogólnym wykazywały niższe wartości wybuchu oddechowego niż granulocyty dzieci urodzonych cięciem cesarskim w znieczuleniu zewnątrzoponowym z użyciem lidokainy<sup>92</sup>. Wartości chemotaksji granulocytów noworodków, których matki znieczulono podpajęczynówkowo (mepiwakainą z sufentanylem) były wyższe niż w przypadku znieczulenia zewnątrzoponowego (ropiwakainą lub bupiwakainą z sufentanylem)<sup>93</sup>. Granulocyty obojętnochłonne noworodków

urodzonych cięciem cesarskim planowym (bez czynności skurczowej) w znieczuleniu zewnątrzoponowym (ropiwakainą lub bupiwakainą z sufentanylem) wykazywały niższą chemotaksję niż komórki dzieci urodzonych siłami natury. Zastosowanie blokady centralnej w analgezji porodu w porównaniu z analgezą układową wiązało się z niższą produkcją RFT przez granulocyty noworodka<sup>90</sup>.

Badania *in vitro* przeprowadzone w Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej wskazują na znaczący wpływ anestetyków lokalnych w niskich stężeniach istotnych klinicznie na produkcję RFT w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej: hamujący wpływ bupiwakainy w komórkach stymulowanych PMA i stymulujący wpływ lidokainy w granulocytach niestymulowanych<sup>90</sup>. Wykazaliśmy też, że anestetyki lokalne, bupiwakaina, lidokaina i ropiwakaina w stężeniach klinicznie istotnych nie wpływają na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach krwi pępowinowej<sup>52</sup>.

### 1.3.3. Efekty anestetyków lokalnych w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym

W modelach doświadczalnych i klinicznych wykazano, że anestetyki lokalne stabilizują procesy zapalenia w uszkodzeniu reperfuzyjnym serca, płuca i mózgu. Najwięcej spostrzeżeń opublikowano odnośnie lidokainy, która jest jedynym anestetykiem lokalnym podawanym układowo. W warunkach uszkodzenia reperfuzyjnego lidokaina hamowała akumulację granulocytów, modulowała czynność limfocytów i makrofagów, hamowała produkcję mediatorów zapalenia, m.in. cytokin, wolnych rodników, metabolitów cyklooksygenazy i zmniejszała nasilenie stresu oksydacyjnego<sup>72,79,81,94</sup>.

W warunkach *in vitro* lidokaina w stężeniach wyższych niż terapeutyczne hamowała efekt wzrostu ekspresji integryn CD11b w granulocytach oraz ICAM-1 w komórkach śródbłonna w okresie reoksygenacji. Hamowanie wzrostu integryny CD18 następowało już w stężeniach terapeutycznych. Efekt ten obserwowano bezpośrednio w komórkach poddanych hipoksji/reoksygenacji, jak i w granulocytach inkubowanych z osoczem krwi pobranej z reperfundowanej kończyny w warunkach zabiegowych ale tylko we wczesnym okresie (po 15 min) reperfuzji<sup>95,96</sup>.

Bezpośrednie efekty anestetyków lokalnych na produkcję RFTiA w granulocytach w warunkach hipoksji-reoksygenacji nie były jak dotychczas badane. Kliniczne znaczenie tego zjawiska jest istotne zarówno dla płodu i noworodka, jak i dla dorosłych. Powszechne stosowanie blokad centralnych w położnictwie w celu uśmierzenia bólu porodowego i znieczulenia do zabiegów położniczych wiąże się z potencjalnym wpływem anestetyków lokalnych na granulocyty płodu i noworodka, które z fizjologicznych warunków hipoksji w życiu wewnątrzmacicznym po porodzie są ekspozowane na warunki normoksji. W okresie okołoporodowym może też dochodzić do

patologicznego niedotlenienia płodu i noworodka. U dorosłych metody znieczulenia regionalnego są często stosowane w zespołach reperfuzyjnych<sup>97</sup>. Niniejsza praca stanowi próbę zbadania wpływu anestetyków lokalnych na produkcję RFTiA przez granulocyty obojętnochłonne krwi pępowinowej i dorosłych poddane reoksygenacji po poprzedzającej hipoksji.

## 2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

W niniejszej pracy postawiono następujące hipotezy:

1. Hipoksja-reoksygenacja *in vitro* wpływa na wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej i krwi dorosłych ochotników;
2. Efekt ten zależy od czasu trwania reoksygenacji i jest słabiej nasilony w granulocytach krwi pępowinowej w porównaniu z granulocytami dorosłych;
3. Anestetyki lokalne, bupiwakaina, lidokaina i ropiwakaina, modulują wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach reoksygenowanej pełnej krwi pępowinowej;
4. Produkcja RFT i NO w granulocytach poddanych preekspozycji na anestetyki lokalne i inkubowanych w warunkach hipoksji-reoksygenacji *in vitro* różni się zależnie od rodzaju i stężenia zastosowanego anestetyku oraz zależy od czasu trwania reoksygenacji.

Cele ogólne pracy obejmowały:

1. Ocena wpływu hipoksji-reoksygenacji *in vitro* na wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej w porównaniu z granulocytami obwodowej krwi pełnej dorosłych ochotników;
2. Porównanie wewnątrzkomórkowej produkcji RFT i NO w warunkach wczesnej i późnej reoksygenacji;
3. Ocena efektów anestetyków lokalnych, bupiwakainy, lidokainy oraz ropiwakainy, na produkcję RFT i NO w granulocytach pełnej krwi pępowinowej w porównaniu z granulocytami obwodowej krwi pełnej dorosłych ochotników w warunkach hipoksji-reoksygenacji.

Do realizacji celów ogólnych wyodrębniono następujące cele szczegółowe:

- skonstruowanie komory hipoksycznej do inkubacji krwi pełnej;
- cytometryczną ocenę wewnątrzkomórkowej produkcji RFT w niestymulowanych i stymulowanych PMA granulocytach pełnej krwi pępowinowej oraz osób dorosłych w warunkach 75- i 300-min normoksji oraz 60-min hipoksji z następową 15- i 240-min reoksygenacją;
- cytometryczną ocenę wewnątrzkomórkowej produkcji NO w niestymulowanych i stymulowanych PMA granulocytach pełnej krwi pępowinowej oraz osób dorosłych w warunkach 75- i 300-min normoksji oraz 60-min hipoksji z następową 15- i 240-min reoksygenacją;

- cytometryczną ocenę wewnątrzkomórkowej produkcji RFT w inkubowanych z bupiwakainą, lidokainą oraz ropiwakainą niestymulowanych i stymulowanych PMA granulocytach pełnej krwi pępowinowej oraz osób dorosłych w warunkach 60-min hipoksji z następową 15- i 240-min reoksygenacją;
- cytometryczną ocenę wewnątrzkomórkowej produkcji NO w inkubowanych z bupiwakainą, lidokainą oraz ropiwakainą niestymulowanych i stymulowanych PMA granulocytach pełnej krwi pępowinowej oraz osób dorosłych w warunkach 60-min hipoksji z następową 15- i 240-min reoksygenacją.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Zgoda Komisji Bioetycznej

Doświadczenia prowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński) nr 602/11 z dnia 16.06.2011 oraz jej przedłużeń nr 1153/12 z dnia 06.12.2012; 525/15 z dnia 11.06.2015; 1216/16 z dnia 01.12.2016.

#### 3.2. Wykaz odczynników.

Zestawienie odczynników i buforów stosowanych w pracy przedstawiono w Tabeli 3-1.

Tabela 3-1. Wykaz odczynników i buforów.

Nazwa	Stężenie/skład		Producent
Roztwór soli fizjologicznej (PBS)	0,138 M	NaCl;	Sigma-Aldrich
	0,0027 M	KCl	
	pH 7,4		
Dihydrorodamina 123 (DHR123)	10 mg		Sigma-Aldrich
Roztwór dioctanu 4,5-diaminofluoresceiny (DAF-2DA) w dimetylosulfotlenku (DMSO)	5 mM	DAF-2DA	Sigma-Aldrich
BD Pharm Lyse™ lysing solution		NH <sub>4</sub> Cl	BD Biosciences
Roztwór lizujący		KHCO <sub>3</sub>	
		H <sub>2</sub> O	
Roztwór jodku propidyny (PI) w wodzie	1 mg/ml		Bioshop Canada
12-myristynian, 13-octan forbolu (PMA)	1 mg		Sigma-Aldrich
Jednowodny chlorowodorek bupiwakainy	5 g	Bupiwakaina	Sigma-Aldrich
Jednowodny chlorowodorek lidokainy	100 g	Lidokaina	Sigma-Aldrich
Jednowodny chlorowodorek ropiwakainy	50 mg	Ropiwakaina	Sigma-Aldrich
Mieszanka gazowa – mieszanka specjalna	1%	O <sub>2</sub>	Air Products
	94%	N <sub>2</sub>	
	5%	CO <sub>2</sub>	Sp. z o.o.

#### 3.3. Pobieranie krwi do badań

Krew do badań w objętości 20 ml była pobierana z żyły pępowinowej bezpośrednio po zaciśnięciu pępowiny (n=16) oraz od dorosłych ochotników (n=16) z żyły przedramienia do probówek w systemie zamkniętym S-Monovette (Sarstedt) zawierających heparynę. Rodzące i ochotnicy

wyrażali na pobranie krwi pisemną zgodę, poprzedzoną zapoznaniem się z pisemną informacją o celu badania.

Krew pępowinowa była pobierana przez położną na Oddziale Porodowym Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu od noworodków w dobrym stanie ogólnym (>8 punktów w skali Apgar) urodzonych o czasie drogami natury. Ponadto kryteria włączenia obejmowały: dobry stan zdrowia matki (II° w skali ryzyka ASA - American Society of Anesthesiologists), niepodwyższoną ciepłotę ciała matki i zastosowanie w analgezji porodu wyłącznie metod układowych. Materiał transportowano do Zakładu Anestezjologii Doświadczalnej UMP, gdzie w ciągu najdalej godziny od momentu pobrania rozpoczynano inkubację z anestetykami lokalnymi.

Obwodową krew żylną pobierano w Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej w godzinach rannych od ochotników - zdrowych, niepalących mężczyzn w wieku 20-38 lat, którzy nie przyjmowali alkoholu w dniu poprzedzającym badanie i byli na czczo.

#### 3.4. Inkubacja krwi z anestetykami lokalnymi

Pełną krew pępowinową oraz obwodową krew żylną inkubowano z roztworami anestetyków lokalnych: bupiwakainy, lidokainy oraz ropiwakainy w czterech kategoriach stężeń w warunkach hipoksji-reoksygenacji lub normoksji przez 75 i 300 min. Najniższe użyte stężenia bupiwakainy i ropiwakainy odpowiadały stężeniom tych środków obserwowanych we krwi pępowinowej u noworodków matek u których wykonano blokady centralne<sup>98</sup>. Użyto także stężeń 10, 100 i 200 razy wyższych. Najwyższe użyte stężenia o charakterze referencyjnym mogą występować lokalnie w tkankach objętych znieczuleniem regionalnym u dorosłych. Zastosowane stężenia anestetyków zostały dostosowane do różnic między nimi w sile działania analgetycznego, umożliwiając interpretację wyników z punktu widzenia klinicznego. Lidokaina wykazuje 0,25-0,3 siły działania bupiwakainy, natomiast ropiwakaina - 0,5-0,7.

Tabela 3-2. Stężenia anestetyków lokalnych (mM) z którymi inkubowano krew pełną.

	Stężenie (mM)
Bupiwakaina	0,0005; 0,005; 0,05; 1
Lidokaina	0,002; 0,02; 0,2; 4
Ropiwakaina	0,0007; 0,007; 0,07; 1,4

Roztwory (robocze) anestetyków przygotowywano poprzez rozpuszczenie odważek w wodzie dejonizowanej o objętości pomniejszonej o objętość dziesięciokrotnie stężonego PBS. Bezpośrednio przed doświadczeniem do roztworów wodnych środków dodawano dziesięciokrotnie



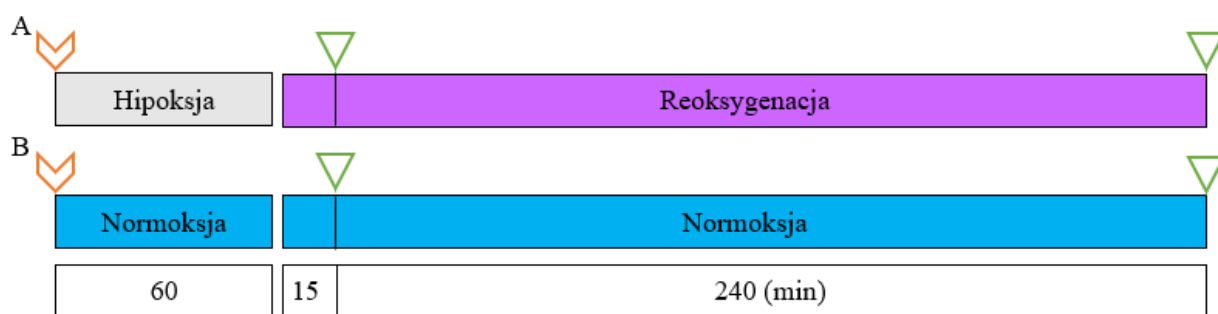
stężony PBS, otrzymując wyjściowe stężenia 5 mM bupiwakainy, 20 mM lidokainy oraz 7 mM ropiwakainy w 1x PBS.

Roztwory anestetyków w PBS lub roztwór PBS bez dodatku anestetyku (próby kontrolne) mieszano z krwią pełną poprzez delikatne pipetowanie, uzyskując zamierzone stężenia środków (Tab. 3-2).

### 3.5. Model hipoksji-reoksygenacji *in vitro*

Zastosowano model hipoksji-reoksygenacji *in vitro* wg McCourtie i wsp. z zastosowaniem nierozcieńczonej krwi pełnej<sup>99</sup>. Proces izolacji komórek z krwi pełnej, w tym granulocytów obojętnochłonnych, może prowadzić do niezamierzonej ich aktywacji, jest czasochłonny i, w przypadku krwi pępowinowej, technicznie skomplikowany<sup>52</sup>. Detekcja RFTiA we krwi pełnej jest uwarunkowana interakcjami wszystkich składników krwi i odzwierciedla w sposób zbliżony do optymalnego warunki fizjologiczne *in vivo*<sup>100</sup>.

Krew pełną inkubowano w komorze hipoksycznej płukanej gazem w składzie 1% O<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, a następnie szczelnie zamkniętej i umieszczonej w inkubatorze CO<sub>2</sub>. Reoksygenacja następowała po przeniesieniu prób z komory hipoksycznej bezpośrednio do inkubatora CO<sub>2</sub>. Inkubację kontynuowano w atmosferze o składzie 21% O<sub>2</sub>/74% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> przez dalszych 15 lub 240 min. Czasy inkubacji odpowiadają reakcji dwufazowego wzrostu adhezji granulocytów do komórek śródbłónka w okresie wczesnej i późnej reoksygenacji<sup>2</sup>. Kontrolę normoksyczną stanowiły próby umieszczane bezpośrednio w inkubatorze i inkubowane odpowiednio przez 75 i 300 min (Ryc.3-1).

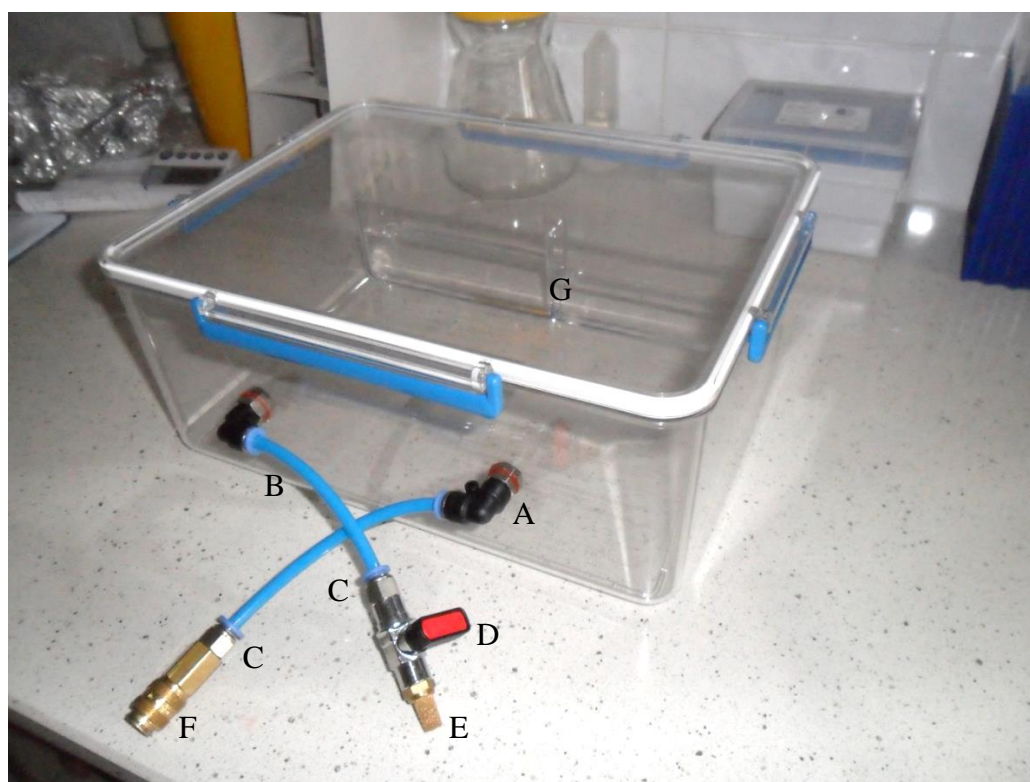


Rycina 3-1. Schematyczne przedstawienie doświadczenia.

- ▽ - pobranie prób do analiz
- ∩ - dodanie anestetyku lokalnego

### 3.5.1. Komora hipoksyczna

Inkubacja komórek w warunkach hipoksji-reoksygenacji prowadzona była w samodzielnie skonstruowanej komorze hipoksycznej (Ryc. 3-2). Komorę wykonano wg metody Wright i Shay z licznymi własnymi modyfikacjami<sup>101</sup>. Dotyczyły one zastosowania innego pojemnika (gazoszczelnego pojemnika GENbox 71 (bioMérieux), przewodów do wprowadzania i wyprowadzania gazu z gazoszczelnymi zaworami umożliwiającymi w pełni gazoszczelne połączenia przewodów z komorą. Na długim boku nawiercono dwa otwory ( $\varnothing 6$  mm), które zaopatrzono w obrotowe złącza kątowe wtykowe z gwintem zewnętrznym. Na gwint z obu stron pojemnika nałożono uszczelki typu o-ring, a nakrętkę przykręcono z użyciem kleju anaerobowego. Przyłączono przewody polietylenowe ( $\varnothing 4$  mm). Na końcu lewego przewodu zamontowano złącze, gazoszczelny zawór kulowy oraz mosiężny tłumik. Na końcu prawego przewodu zamontowano złącze przewodu i mosiężne szybkozłącze jednostronnie odcinające. Króciec mosiężny udroźniający szybkozłącze zamontowano na przewodzie wyprowadzonym z butli z mieszaniną gazową. Wszystkie gwinty zabezpieczono klejem anaerobowym. Szczelność komory potwierdzono poprzez próbę zanurzeniową.



Rycina 3-2. Komora hipoksyczna własnej konstrukcji.

A - złącze kątowe wtykowe z gwintem zewnętrznym; B - przewód polietylenowy; C - złącze wtykowe; D - gazoszczelny zawór kulowy; E - mosiężny tłumik; F - mosiężne szybkozłącze jednostronnie odcinające; G - kieszenie pojemnika wypełnione wodą do wstrzykiwań.

Przed doświadczeniami do kieszeni komory wlewano 100 ml wody do wstrzykiwań (Fresenius) w celu utrzymania wysokiej wilgotności. Wilgotność w komorze w czasie inkubacji wynosiła 89% (Termohigrometr -50+70 / 20-99% DT-2, Chemland, Polska). Próby umieszczano w komorze, a następnie płukano ją mieszaniną gazową o składzie 1% O<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, przy przepływie 3 l/min przez 7 min. Przepływ nastawiono za pomocą reduktora zamocowanego na butli zawierającej zakupioną mieszaninę gazową i zmierzono przepływomierzem. Po przepłukaniu mieszaniną hipoksyczną, zamknięciu zaworów oraz odłączeniu przewodu doprowadzającego gaz, komorę umieszczano w inkubatorze zapewniającym temperaturę 37°C.

### 3.6. Stymulacja 12-myrystynianem-13-octanem forbolu (PMA)

Po zakończeniu inkubacji z anestetykami lokalnymi w warunkach hipoksji-reoksygenacji lub normoksji część prób krwi pełnej poddawano stymulacji 12-myrystynianem-13-octanem forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, Sigma-Aldrich, USA) w stężeniu 600 ng/ml (0,97 μM) przez 30 min. PMA stymuluje NOX2 i NOS w mechanizmie pozareceptorowym przez bezpośrednią aktywację PKC. Roztwór PMA o stężeniu 1mg/ml przygotowywano w DMSO, a następnie rozcieńczano w PBS, otrzymując stężenie robocze 3 μg/ml. Do 100 μl krwi z roztworem anestetyku lub analogiczną objętością PBS dodawano 25 μl roztworu PMA lub (PBS).

### 3.7. Cytometryczna ocena wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnych form tlenu i azotu (RFTiA) w granulocytach obojętnochłonnych

#### 3.7.1. Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji RFT

Wewnątrzkomórkową produkcję RFT mierzono metodą cytometryczną z wykorzystaniem dihydrorodaminy123 (2-(3,6-Diamino-9H-xanthene-9-yl)-benzoic acid methyl ester, DHR123, Sigma-Aldrich) w stężeniu 6,4 μM. DHR123 jest niespecyficznym ogólnym markerem wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, pod wpływem których w obecności katalizatora (np. peroksydazy) ulega dwuelektronowej redukcji do fluorescencyjnego barwnika kationowego, rodaminy123 (Rho123), wykazującej, po wzbudzeniu niebieskim laserem, zieloną fluorescencję. Przekształcanie DHR123 do Rho123 może odbywać się także poprzez reakcję z nadtlenoazotynem ONOO<sup>-</sup>, jednak inkubacja neutrofilów z L-NAME - inhibitorem NOS nie wpływała na zmiany w intensywności fluorescencji Rho123<sup>102</sup>. Mimo to DHR123 bywa też uważana za niespecyficzny detektor nadtlenoazotynu i jego tlenowych pochodnych<sup>103</sup>. Zalety DHR123 obejmują swobodną dyfuzję przez błonę komórkową w formie zredukowanej i nieprzenikanie przez błony komórkowe w formie utlenionej (Rho123), odporność na zmiany pH i wysoką czułość<sup>104</sup>.

DHR123 dodawano do prób po 15 min stymulacji PMA podając jednocześnie jodek propidyny (propidium iodide, PI, Bioshop Canada) i inkubowano je w 37°C, w ciemności przez kolejne 15 min.

W celu wyłączenia z analizy martwych komórek wykorzystano PI (Ryc.3-3B,C). Do 100 µl krwi dodawano 2,5 µl PI o stężeniu 1 mg/ml i inkubowano w 37°C, w ciemności przez 15 min. PI przechodzi do komórek nekrotycznych oraz późnoapoptotycznych dzięki zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej, wnika do jądra komórkowego i interkaluje DNA. Komórki te można zidentyfikować na fotopowielaczu 630/22. PI nie przechodzi natomiast do komórek o prawidłowej błonie komórkowej, żywych oraz wczesnoapoptotycznych, które nie wykazują fluorescencji w zakresie charakterystycznym dla tego barwnika.

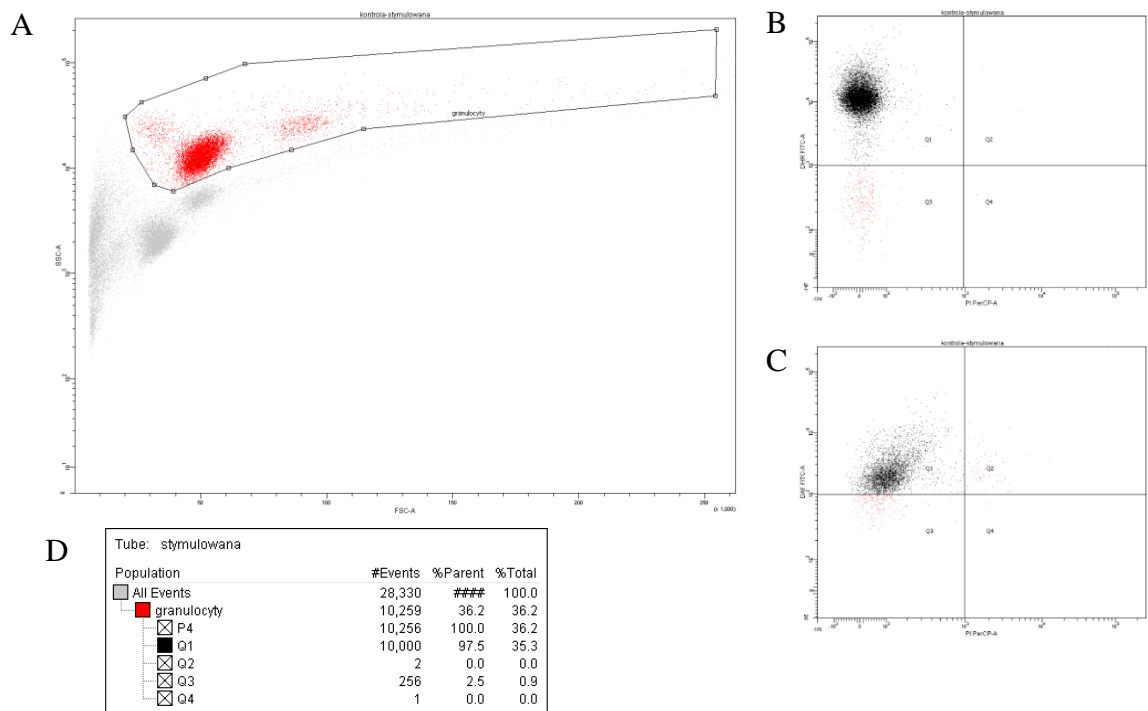
### 3.7.2. Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji RFA

Produkcję RFA oceniano z wykorzystaniem dwuoctanu 4,5-diaminofluoresceiny (DAF-2DA, Sigma-Aldrich) w stężeniu 7,69 µM. Barwnik ten wnika do komórek, gdzie pod wpływem wewnątrzkomórkowych esteraz jest przekształcany do 4,5-diaminofluoresceiny a następnie pod wpływem RFA, głównie NO, do wykazującego po wzbudzeniu niebieskim laserem silną fluorescencję triazolu – triazolofluoresceina (DAF-2T) o emisji w zakresie 505-550 nm. Intensywność fluorescencji jest wykładnikiem wewnątrzkomórkowej produkcji NO<sup>102</sup>.

DAF-2DA dodawano do prób jednocześnie z PMA i inkubowano w 37°C w ciemności przez 15 minut. Następnie podawano PI i inkubowano kolejne 15 min w tych samych warunkach.

Do próbek cytometrycznych, zawierających krew poddaną inkubacji i barwieniu, dodawano 2 ml rozcieńzonego buforu do lizy (BD Pharm Lyse™ lysing solution). Komórki z buforem inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut, następnie wirowano (500g, temperatura pokojowa, 5 min), zlewano supernatant i płukano przez zawieszenie w 1 ml PBS. Wirowanie i zawieszanie powtarzano. Po trzecim wirowaniu osad zawierający komórki zawieszano w 0,5 ml PBS. Tak przygotowany materiał poddawano analizie cytometrycznej.

Fluorescencję mierzono za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto II (BD, San Jose, CA, USA). Wyniki przedstawiono jako średnią intensywność fluorescencji (MFI, mean fluorescence intensity) bramkowanej populacji (Ryc.3-3B,3-3C).



Rycina 3-3. Reprezentatywne wykresy kropkowe („dot-plot”) pełnej krwi pępowinowej po lizie erytrocytów do analizy granulocytów.

- A. Wykres kropkowy parametrów FSC-A vs SSC-A. Bramka „granulocyty” pokazuje populację zdarzeń identyfikowanych jako granulocyty.
- B. Wykres kropkowy z bramką krzyżową obrazujący strategię bramkowania granulocytów żywych, wykazujących fluorescencję Rho123 (bramka Q1), na podstawie parametrów PerCP<sup>-</sup> (PI) oraz FITC<sup>+</sup> (Rho123<sup>+</sup>).
- C. Wykres kropkowy z bramką krzyżową obrazujący strategię bramkowania granulocytów żywych, wykazujących fluorescencję DAF-2T (bramka Q1), na podstawie parametrów PerCP<sup>-</sup> (PI) oraz FITC<sup>+</sup> (DAF-2T<sup>+</sup>).
- D. Strategia bramkowania.

### 3.7.3. Identyfikacja granulocytów

Do cytometrycznej identyfikacji granulocytów obojętnochłonnych we krwi pełnej wykorzystano charakterystykę rozproszeń - parametry Forward oraz Side Scatter (FSC i SSC).

Parametry te pozwalają na ocenę wielkości (FSC) oraz ziarnistości (SSC) zdarzeń ocenianych w analizie cytometrycznej. Granulocyty identyfikowano jako zdarzenia duże, zawierające ziarnistości (Ryc.3-3A). Uważa się, że taka strategia bramkowania jest wystarczająca dla oceny RFT zwłaszcza przy użyciu DHR123 w granulocytach; barwnik ten nie przechodzi do limfocytów (Peluso2012).

Do dalszych analiz wyodrębniano zdarzenia niewykazujące świecenia w kanale fluorescencji FL3 – komórki żywe, PI oraz wykazujące świecenie w kanale FL1 – Rho123<sup>+</sup> lub DAF-2T<sup>+</sup> zależnie od zastosowanego barwnika (Ryc.3-3B,C). Wszystkie oznaczenia z podziałem na grupy barwione DHR123 lub DAF-2DA prowadzono przy jednakowych ustawieniach cytometru: napięcia

fotopowielaczy, kompensacja. Przed każdym pomiarem dokonywano testu kalibracji urządzenia zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta, wykorzystując CS&T beads (Cytometer Setup & Tracking Beads Kit, BD).

### 3.8. Współczynnik stymulacji

Współczynnik stymulacji granulocytów przedstawiono jako wartość odsetkową stosunku MFI komórek stymulowanych i niestymulowanych.

### 3.9. Oznaczenie równowagi kwasowo-zasadowej

W celu oznaczenia równowagi kwasowo-zasadowej nierozcieńczoną krew pełną inkubowano w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji. Przed wykonaniem pomiaru krew delikatnie mieszano przez pipetowanie. Analizy wykonywano w 75 i 300 minucie inkubacji za pomocą analizatora parametrów krytycznych ABL80 FLEX (Radiometer, Dania).

### 3.10. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano programy JumpPro (jmp-11.0) 32 bit 11.0.0. (SAS Institute Inc.) oraz GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Wykresy wykonano w programie GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Jako poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ .

Opracowanie statystyczne danych obejmowało metody jedno- i wielowymiarowe.

Normalność rozkładu weryfikowano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Ze względu na występowanie wśród analizowanych zmiennych danych niespełniających założeń rozkładu normalnego zastosowano testy nieparametryczne. Do porównania zmiennych zależnych stosowano test Wilcoxa oraz test kolejności par Wilcoxa. Do porównania zmiennych niezależnych użyto testu U-Manna Whitneya. Wyniki przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartkowym.

Dla grup danych wykazujących rozkład normalny zastosowano test parametryczny – test t-studenta dla zmiennych zależnych. Wyniki przedstawiono jako średnią z odchyleniem standardowym.

W celu analizy jednoczesnego wpływu kilku czynników na badaną zmienną zastosowano wieloczynnikowy hierarchiczny model ANOVA. Poza wpływem czynników głównych uwzględniono także interakcje pomiędzy nimi oraz czynnik losowy związany ze zmiennością osobniczą zagnieżdżony w grupie. Ze względu na obecność efektów stałych (czynniki główne) oraz

efektu losowego układ doświadczalny był modelem mieszanym. Wyniki przedstawiono jako średnią i odchylenie standardowe.

Przeanalizowano wpływ następujących sześciu czynników głównych na produkcję RFT i A:

- ‘Grupa’ - granulocyty krwi pępowinowej, granulocyty krwi dorosłych ochotników;
- ‘Stymulacja’ - granulocyty niestymulowane, granulocyty stymulowane PMA;
- ‘Czas inkubacji’ - granulocyty inkubowane przez 75 min, granulocyty inkubowane 300 min lub ‘Czas reoksygenacji’ - reoksygenacja 15 minut, reoksygenacja 240 minut;
- ‘Stężenie-kategoria’ - stężenia anestetyków zaszeregowane do czterech kategorii ze względu na siłę działania: 1-najniższe, 2-średnie, 3-wysokie, 4-najwyższe (stężenia mM por. Tab.3-]2);
- ‘Atmosfera’ -granulocyty inkubowane w warunkach normoksji, granulocyty inkubowane w warunkach hipoksji-reoksygenacji; czynnik uwzględniony w analizie kontroli oraz najniższych stężeń badanych środków;
- ‘Anestetyk’ - bupiwakaina, lidokaina i ropiwakaina.

W przypadku uzyskania  $p < 0,05$  dla interakcji między czynnikami głównymi odrzucono hipotezę zerową o braku współoddziaływania czynników, co wskazuje na ich wspólne oddziaływanie na badaną cechę.





## 4. WYNIKI

### 4.1. Charakterystyka położnicza i dane noworodków

Dane położnicze i charakterystykę noworodków, od których pobrano krew pępowinową zestawiono w Tabeli 4-1.

Tabela 4-1. Charakterystyka położnicza i dane noworodków.

Matka	
Pierwiastka/wieloródka (n)	6/10
Wiek ciążowy (tyg.)	39 (1,2)
Czas (min)	
Pęknięcia błon płodowych	160 (399)
I okresu porodu	251 (138)
II okresu porodu	28 (29)
Analgezja porodu (n)	
Brak	8
TENS	1
Paracetamol	2
Entonox	3
Paracetamol/Entonox	2
Temperatura ciała matki w II okresie porodu (°C)	36,5 (0,3)
Noworodek	
Płeć (męska/żeńska) (n)	9/7
Masa ciała (g)	3454 (429)
Masa łożyska (g)	570 (110)
Apgar 1-sza min	10 (10; 10)*
Apgar 5-ta min	10 (10; 10)*
Gazometria krwi tętnicy pępowinowej	
pHa	7,3 (0,1)
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	25,6 (12,5)
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	48,0 (11,3)
BEa	-4,8 (2,6)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21,9 (2,6)
Gazometria krwi żyły pępowinowej	
pHv	7,4 (0,1)
pvO <sub>2</sub> (mmHg)	26,8 (9,1)
pvCO <sub>2</sub> (mmHg)	35,9 (6,9)
BEv	-4,5 (2,6)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20,0 (3,0)

Dane skategoryzowane przedstawiono jako liczby; dane liczbowe o rozkładzie normalnym - jako średnią (odchylenie standardowe); zmienne o rozkładzie odbiegającym od normalnego - jako medianę (rozstęp ćwiartkowy)\*.

TENS - przeskórna stymulacja elektryczna nerwów; pH - ujemny logarytm dziesiętny ze stężenia jonów wodorowych; PO<sub>2</sub> - ciśnienie parcjale tlenu; PCO<sub>2</sub> - ciśnienie parcjale dwutlenku węgla; BE-niedobór zasad; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - stężenie wodorowęglanów.

4.2. Ocena porównawcza wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) i tlenku azotu (NO) w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników w warunkach hipoksji-reoksygenacji

#### 4.2.1. Produkcja RFT

W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej nie zaobserwowano różnic w produkcji RFT w warunkach hipoksji-reoksygenacji w porównaniu z warunkami normoksji w żadnym z zastosowanych czasów inkubacji (Ryc.4-1A, 4-2A).

Produkcja RFT w granulocytach krwi dorosłych ochotników w warunkach hipoksji-reoksygenacji oraz normoksji była porównywalna. Po 300 min inkubacji w warunkach normoksji oraz 60 min hipoksji-240 min reoksygenacji wartości MFI Rho123 były niższe niż po 75 min (odpowiednio  $P=0,047$ ,  $P=0,036$ ; Ryc. 4-1A).

Między niestymulowanymi granulocytami krwi pępowinowej a dorosłych ochotników nie stwierdzono różnic fluorescencji Rho123 zarówno w analizie jednowymiarowej (Ryc.4-1A), jak i w wieloczynnikowej analizie wariancji (brak istotnego wpływu czynnika 'Grupa',  $p=0,9540$ , Tab.4-3).

Stymulacji PMA odpowiadał wzrost fluorescencji Rho123, zarówno w granulocytach krwi pępowinowej jak i dorosłych ochotników (Tab.4-2), co potwierdzono w analizie wieloczynnikowej (czynnik 'Stymulacja'  $p<0,0001$ , Tab.4-3).

Stymulowane PMA granulocyty krwi pępowinowej oraz dorosłych ochotników poddane ekspozycji na 60 min hipoksję z 15- i 240 min reoksygenacją wykazywały niższe wartości MFI Rho123 niż komórki kontrolne inkubowane w warunkach normoksji (Ryc. 4-1B, 4-2A). W stymulowanych PMA granulocytach krwi pępowinowej niższa produkcja RFT towarzyszyła dłuższej inkubacji w warunkach normoksji (75 vs 300 min,  $P=0,009$ ) oraz dłuższemu czasowi reoksygenacji następującemu po 60 min hipoksji (15 vs 240 min,  $P=0,032$ , Ryc.4-1B).

W wielowymiarowej analizie wariancji wykazano spadek fluorescencji Rho123 w stymulowanych granulocytach obojętnochłonnych po inkubacji przez 300 minut (Ryc. 4-2B).

Produkcja RFT po 300 min inkubacji była niższa niż po 75 min – normoksji ( $P=0,009$ ); hipoksji-reoksygenacji ( $P=0,032$ ) (Ryc.4-1B).

#### 4.2.2. Produkcja NO

W niestymulowanych granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej oraz dorosłych ochotników hipoksja-reoksygenacja nie powodowały zmian wewnątrzkomórkowej produkcji NO

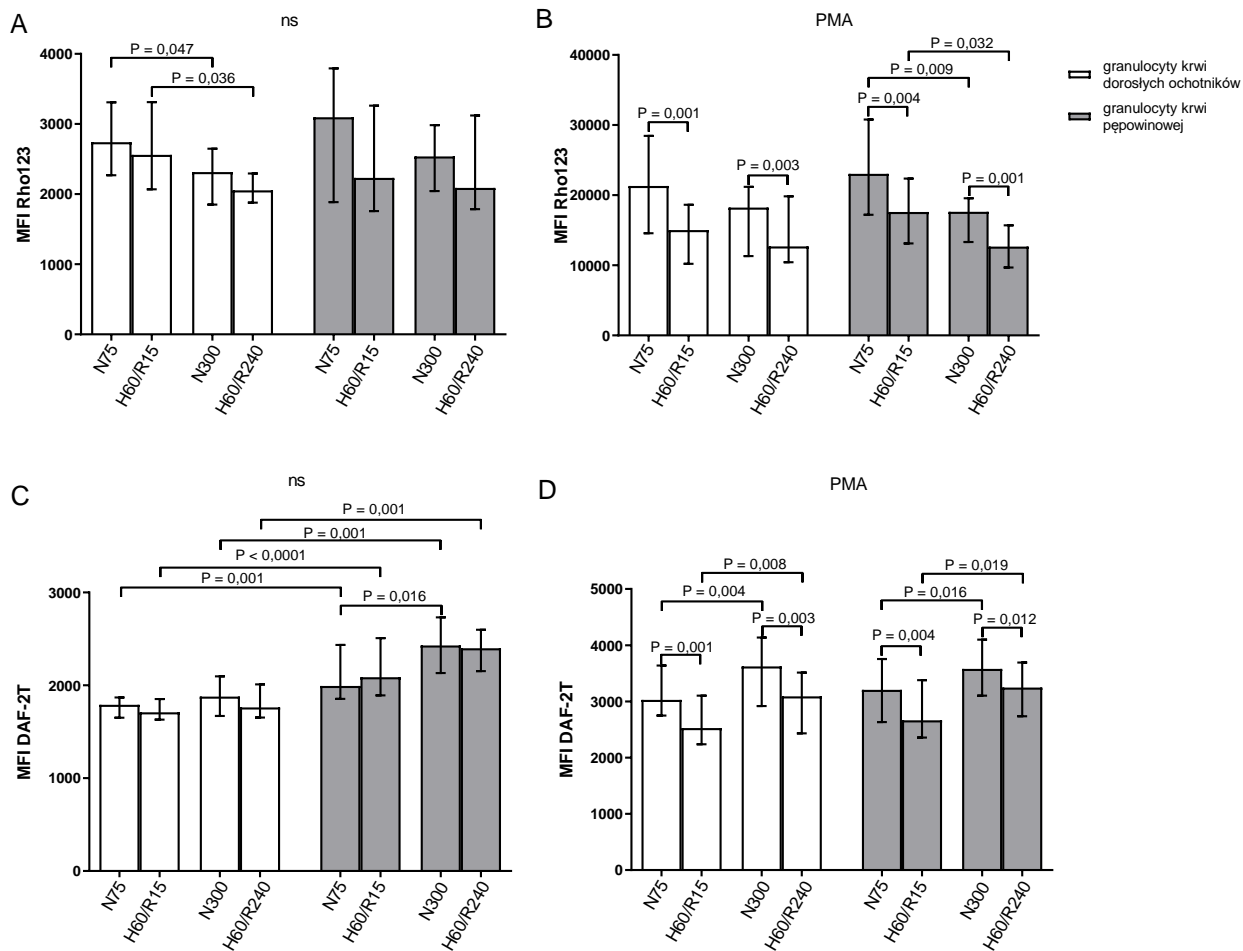
(Ryc.4-1C, 4-2C). Dłuższa inkubacja w warunkach normoksji wiązała się z wyższą produkcją NO (75 vs 300 min,  $P=0,016$ ; Ryc.4-1C).

Wartości MFI DAF-2T były wyższe w niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej w porównaniu z granulocytami krwi dorosłych ochotników po inkubacji zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji-reoksygenacji w obu analizowanych czasach (Ryc.4-1C, 4-2E), w komórkach stymulowanych produkcja ta była porównywalna między grupami (Ryc. 4-1D, 4-2E).

Stymulacji PMA odpowiadał wzrost fluorescencji DAF-2T, zarówno w granulocytach krwi pępowinowej, jak i dorosłych ochotników (Tab.4-2; czynnik 'Stymulacja'  $p<0,0001$ , Tab.4-3).

Pod wpływem inkubacji w warunkach hipoksji-reoksygenacji obserwowano niższe wartości fluorescencji DAF-2T w stymulowanych granulocytach krwi osób dorosłych i krwi pępowinowej w porównaniu z granulocytami inkubowanymi w warunkach normoksji (Ryc.4-1D, 4-2C).

Stymulowane granulocyty krwi dorosłych ochotników jak i krwi pępowinowej wykazywały wyższą fluorescencję DAF-2T po 300 min w porównaniu do 75 min inkubacji zarówno w warunkach normoksji ( $P=0,004$ ;  $P=0,016$ ; Ryc.4-1D) jak i hipoksji-reoksygenacji ( $P=0,008$ ;  $P=0,019$ ; Ryc.4-1D, wielowymiarowa analiza wariancji Ryc. 4-2D).



Rycina 4-1. Wewnątrzkomórkowa produkcja RFT (A,B) i NO (C,D) w granulocytach obojętnochnych krwi pępowinowej (n= 16) oraz dorosłych ochotników (n=16) niestymulowanych (A,C) oraz stymulowanych PMA (B,D) inkubowanych w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji.

Mediana (rozstęp ćwiartkowy). Różnice między czasami inkubacji: test Wilcoxon; różnice między warunkami tlenowymi inkubacji: test Wilcoxon; różnice między granulocytami krwi pępowinowej a dorosłych ochotników: test U-Manna-Whitneya.

MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodaminy 123; MFI DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny; ns – niestymulowane; PMA – 12-myristylian-13-octan forbolu; N75 – normoksja 75 min; N300 – normoksja 300 min; H60/R15 – hipoksja 60 min, reoksygenacja 15 min; H60/R240 – hipoksja 60 min, reoksygenacja 240 min.

Tabela 4-2. Wartości bezwzględne fluorescencji Rho123 i DAF-2T oraz współczynnik stymulacji granulocytów krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników inkubowanej w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji.

Populacja granulocytów	Warunki inkubacji	MFI Rho123		Współczynnik stymulacji [%]	P
		ns	PMA		
Krew dorosłych	N75	2828 (788)	23634 (13761)	836,31	0,0005
	H60/R15	2650 (783)	15628 (6242)	609,96	0,0005
	N300	2327 (597)	19378 (11128)	827,43	0,0005
	H60/R240	2117 (438)	15596 (8169)	772,37	0,0005
Krew pępowinowa	N75	3391 (2021)	23369 (8922)	821,87	0,0005
	H60/R15	3270 (2937)	17573 (5439)	741,19	0,0005
	N300	2979 (1933)	17700 (6789)	713,45	0,0005
	H60/R240	3217 (3665)	13260 (5805)	543,70	0,0006
MFI DAF-2T					
		ns	PMA		
Krew dorosłych	N75	1778 (167)	3218 (681)	184,18	0,0005
	H60/R15	1737 (133)	2677 (570)	155,84	0,0005
	N300	1908 (282)	3785 (989)	201,84	0,0005
	H60/R240	1824 (205)	3166 (838)	176,97	0,0005
Krew pępowinowa	N75	2102 (318)	3405 (953)	163,58	0,0005
	H60/R15	2204 (366)	2802 (513)	123,52	0,0006
	N300	2452 (495)	3653 (756)	151,49	0,0006
	H60/R240	2364 (382)	3262 (537)	139,00	0,0005

Średnia (odchylenie standardowe). Różnice między granulocytami niestymulowanymi i stymulowanymi: test Wilcoxon.

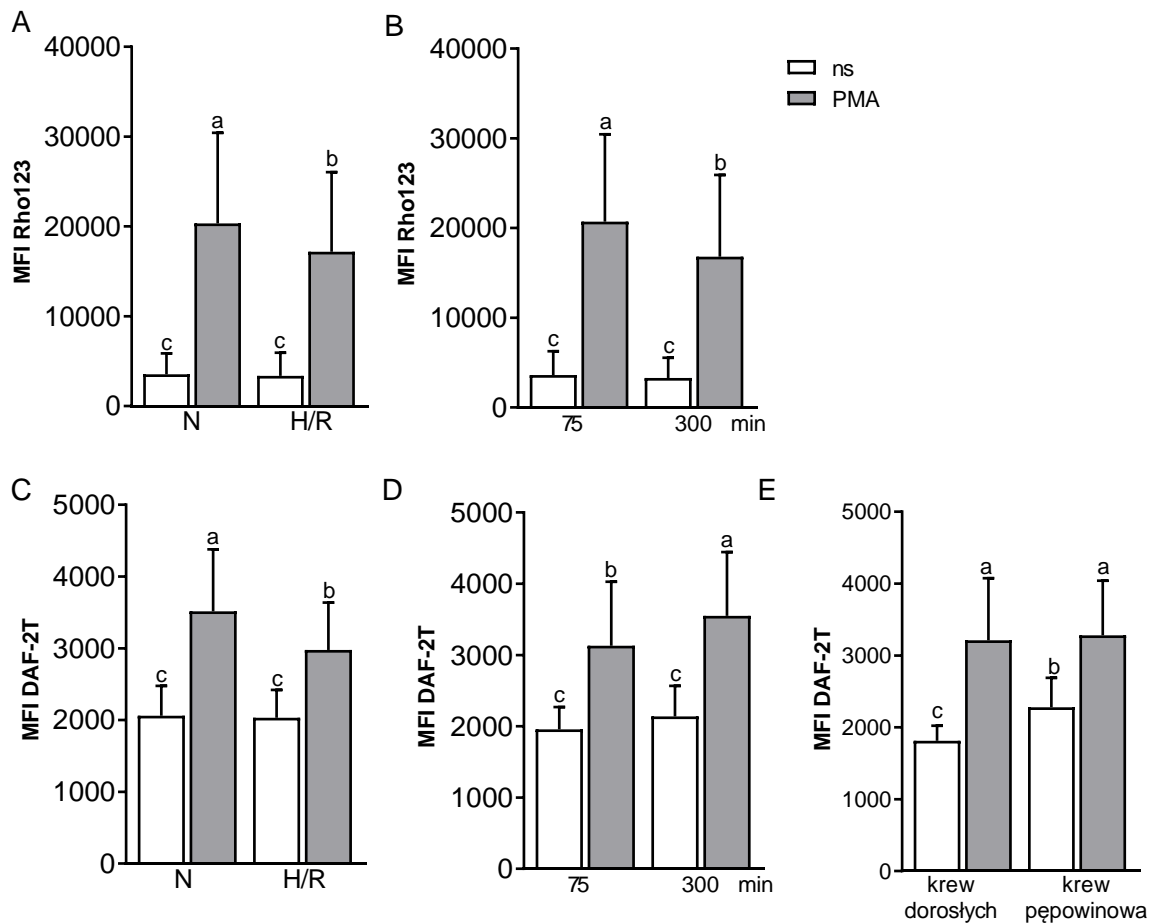
MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodaminy 123; MFI DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny; ns – komórki niestymulowane; PMA – 12-myristynian-13-octan forbolu; N75 – normoksja 75 min; N300 – normoksja 300 min; H60/R15 – hipoksja 60 min, reoksygenacja 15 min; H60/R240 – hipoksja 60 min reoksygenacja 240 min.

Tabela 4-3. Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję RFT i NO przez granulocyty obojętnochłonne inkubowane w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji i interakcji między tymi czynnikami.

RFT		DF	DF dla błędu	F	p
<i>Czynniki</i>	Grupa	1	30	0,0034	0,9540
	<b>Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>499,3965</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Atmosfera</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>16,3121</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Czas inkubacji</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>8,1596</b>	<b>0,0047</b>
<i>Interakcje</i>	Grupa*Stymulacja	1	210	0,9112	0,3409
	Grupa*Atmosfera	1	210	0,1388	0,7098
	<b>Stymulacja*Atmosfera</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>15,5274</b>	<b>0,0001</b>
	Grupa*Stymulacja*Atmosfera	1	210	0,0358	0,8500
	Grupa*Czas inkubacji	1	210	0,8622	0,3542
	<b>Stymulacja*Czas inkubacji</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>5,3513</b>	<b>0,0217</b>
	Grupa*Stymulacja*Czas inkubacji	1	210	1,2866	0,2580
	Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	1,1446	0,2859
	Grupa*Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,2015	0,6540
	Stymulacja*Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,9059	0,3423
	Grupa*Stymulacja*Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,3487	0,5555
	NO		DF	DF dla błędu	F
<i>Czynniki</i>	<b>Grupa</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>4,3387</b>	<b>0,0459</b>
	<b>Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>408,1288</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Atmosfera</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>22,7567</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Czas inkubacji</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>27,4687</b>	<b>&lt;,0001</b>
<i>Interakcje</i>	<b>Grupa*Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>11,3427</b>	<b>0,0009</b>
	Grupa*Atmosfera	1	210	0,4136	0,5209
	<b>Stymulacja*Atmosfera</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>18,4696</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Stymulacja*Atmosfera	1	210	0,0034	0,9536
	Grupa*Czas inkubacji	1	210	0,0132	0,9085
	<b>Stymulacja*Czas inkubacji</b>	<b>1</b>	<b>210</b>	<b>4,7389</b>	<b>0,0306</b>
	Grupa*Stymulacja*Czas inkubacji	1	210	1,8204	0,1787
	Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,0427	0,8365
	Grupa*Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,0892	0,7654
	Stymulacja*Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,5859	0,4449
	Grupa*Stymulacja*Atmosfera*Czas inkubacji	1	210	0,8452	0,3590

*Czynniki:* ‘Grupa’ - granulocyty krwi pępowinowej, granulocyty krwi dorosłych ochotników; ‘Stymulacja’ - granulocyty niestymulowane, stymulowane PMA; ‘Atmosfera’ - granulocyty inkubowane w warunkach normoksji, granulocyty inkubowane w warunkach hipoksji-reoksygenacji; ‘Czas inkubacji’ - 75, 300 min. Czynniki i interakcje istotnie wpływające na produkcję RFT lub NO w granulocytach zaznaczono pogrubioną czcionką.

DF - liczba stopni swobody, DF dla błędu - liczba stopni swobody dla mianownika, F - stosunek wariancji czynnika do wariancji błędu, p - poziom istotności.



Rycina 4-2. Istotne interakcje między efektami czynników: ‘Stymulacja’ i ‘Atmosfera’ (A), ‘Stymulacja’ i ‘Czas inkubacji’ (B) uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach (por. Tab.4-3) oraz ‘Stymulacja’ i ‘Atmosfera’ (C), ‘Stymulacja’ i ‘Czas inkubacji’ (D), ‘Grupa’ i ‘Stymulacja’ (E) uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach inkubowanych w warunkach normoksji oraz hipoksji-reoksygenacji (por. Tab.4-3).

Średnia (odchylenie standardowe) wszystkich obserwacji na poziomie poszczególnych wymienionych czynników. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie między sobą;  $p > 0,05$ ; test *post hoc* Tukeya.

MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodaminy 123; MFI DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny; ns – niestymulowane; PMA – 12-myrystynian-13-octan forbolu; N – normoksja; H/R – hipoksja-reoksygenacja.

#### 4.3. Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję RFT i NO w granulocytach krwi pępowinowej oraz dorosłych ochotników

Bezwzględne wartości fluorescencji Rho123 granulocytów krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej inkubowanych z anestetykami lokalnymi przedstawiono w Tabeli 4-4.

Bezwzględne wartości fluorescencji DAF-2T granulocytów krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej inkubowanych z anestetykami lokalnymi przedstawiono w Tabeli 4-5 .

Wpływ anestetyków lokalnych na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej przedstawiono na rycinie 4-3.

Wpływ anestetyków lokalnych na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach krwi dorosłych ochotników oraz krwi pępowinowej przedstawiono na rycinie 4-4.



Tabela 4-4. Bezwzględne wartości fluorescencji Rho123 granulocytów krwi pępowinowej (n=16) oraz krwi dorosłych ochotników (n=16) inkubowanych z anestetykami lokalnymi przez 75 i 300 minut.

<b>Bupiwakaina (mM)</b>									
		0,0005		0,005		0,05		1	
Populacja granulocytów	Inkubacja [min]	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR
Dorośli	75	3729 (1927)	18120 (10427)	3518 (1811)	18921 (13041)	3986 (2148)	17314 (9464)	4388 (4375)	22559 (16274)
	300	2586 (659)	17178 (11230)	3176 (1823)	14986 (8884)	3410 (2019)	17400 (12578)	3177 (2029)	18860 (12542)
Krew pępowinowa	75	3697 (2029)	18315 (6804)	3433 (1395)	16895 (5651)	2946 (1205)	17233 (7858)	4598 (4517)	20158 (6640)
	300	2968 (1427)	14406 (5650)	3010 (1107)	11658 (5861)	2404 (704)	12573 (6026)	4799 (4823)	15242 (5881)
<b>Lidokaina (mM)</b>									
		0,002		0,02		0,2		4	
Populacja granulocytów	Inkubacja [min]	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR
Dorośli	75	3625 (1306)	19008 (12352)	4295 (1786)	16480 (8749)	4550 (3857)	14716 (6087)	4894 (3628)	15660 (7883)
	300	4019 (2044)	1675 (9115)	2960 (1349)	14848 (8415)	2625 (1206)	12442 (3847)	3331 (1734)	13503 (4033)
Krew pępowinowa	75	3388 (2595)	16353 (4797)	4137 (2518)	16034 (4974)	3529 (1764)	17953 (6177)	4238 (2502)	19622 (5717)
	300	4027 (3020)	12756 (4116)	3487 (1970)	12814 (4467)	2681 (769)	13846 (4808)	2672 (923)	15525 (5575)
<b>Ropiwakaina (mM)</b>									
		0,0007		0,007		0,07		1,4	
Populacja granulocytów	Inkubacja [min]	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR
Dorośli	75	3438 (1403)	21861 (14510)	3312 (1965)	20276 (12960)	3868 (2806)	19539 (11747)	5404 (6906)	21504 (8090)
	300	2952 (1165)	19254 (12146)	4488 (2344)	18470 (12743)	2381 (720)	19431 (11479)	3098 (1291)	22204 (12045)
Krew pępowinowa	75	4561 (6774)	22058 (7748)	3338 (1592)	21327 (8352)	3147 (2848)	20124 (6962)	4308 (2564)	20485 (5243)
	300	3619 (1975)	17403 (7121)	3367 (2038)	14614 (5795)	2484 (822)	15318 (4634)	3558 (1478)	15892 (5416)

Średnia (odchylenie standardowe).

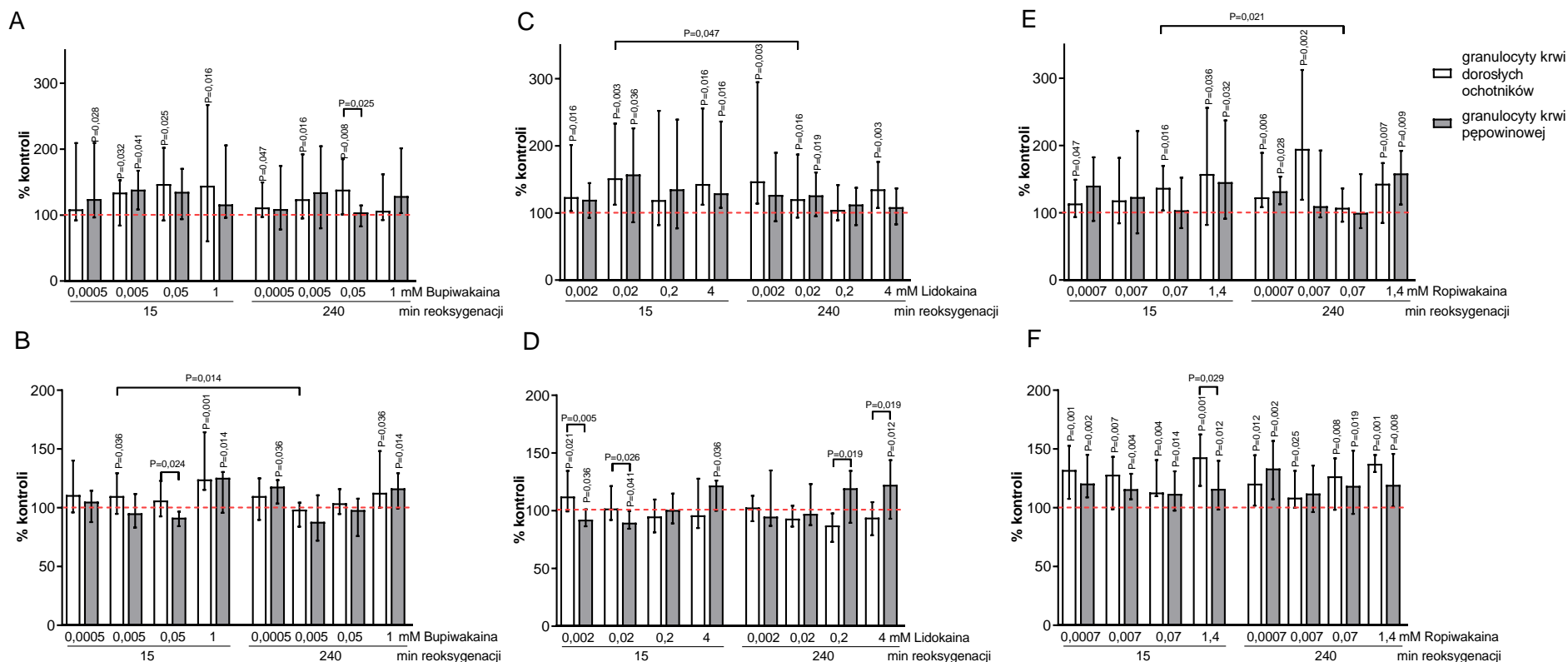
MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodamin 123, ns – komórki niestymulowane, PMA – 12-myrystynian-13-octan forbolu, HR – inkubacja w warunkach hipoksji-reoksygenacji.

Tabela 4-5. Bezwzględne wartości fluorescencji DAF-2T granulocytów krwi pępowinowej (n=16) oraz krwi dorosłych ochotników (n=16) inkubowanych z anestetykami lokalnymi przez 75 i 300 minut.

<b>Bupiwakaina (mM)</b>									
		0,0005		0,005		0,05		1	
Populacja granulocytów	Inkubacja [min]	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR
Dorośli	75	1687 (120)	2635 (541)	1766 (175)	2742 (582)	1731 (169)	2946 (597)	1793 (153)	3013 (721)
	300	1788 (110)	3177 (949)	1818 (171)	3149 (841)	1896 (166)	3605 (1017)	2077 (347)	3777 (1130)
Krew pępowinowa	75	2102 (309)	2925 (575)	2159 (306)	3095 (465)	2222 (335)	3103 (633)	2200 (398)	3213 (745)
	300	2348 (399)	3359 (859)	2402 (423)	3319 (572)	2415 (407)	3378 (610)	2362 (391)	3495 (592)
<b>Lidokaina (mM)</b>									
		0,002		0,02		0,2		4	
Populacja granulocytów	Inkubacja [min]	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR
Dorośli	75	1779 (172)	2726 (571)	1749 (139)	2831 (510)	1978 (206)	3044 (610)	2046 (226)	3085 (570)
	300	1911 (227)	3092 (690)	1916 (235)	3221 (835)	2074 (404)	3484 (834)	2131 (311)	3627 (1077)
Krew pępowinowa	75	2247 (339)	3155 (606)	2214 (319)	3048 (549)	2247 (345)	3180 (583)	2177 (376)	3246 (652)
	300	2452 (412)	3545 (577)	2456 (424)	3563 (646)	2316 (393)	3482 (629)	2355 (414)	3887 (811)
<b>Ropiwakaina (mM)</b>									
		0,0007		0,007		0,07		1,4	
Populacja granulocytów	Inkubacja [min]	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR	ns/HR	PMA/HR
Dorośli	75	1733 (166)	2954 (564)	1800 (210)	3124 (568)	1818 (156)	3252 (709)	1749 (126)	3576 (1222)
	300	1835 (196)	3550 (1078)	1823 (188)	3545 (853)	1881 (251)	3906 (1107)	1979 (272)	4214 (1523)
Krew pępowinowa	75	2095 (288)	3122 (634)	2223 (338)	3311 (653)	2207 (411)	3354 (634)	2137 (356)	3443 (665)
	300	2391 (413)	3703 (749)	2441 (495)	3755 (581)	2420 (469)	3651 (812)	2350 (443)	3595 (617)

Średnia (odchylenie standardowe).

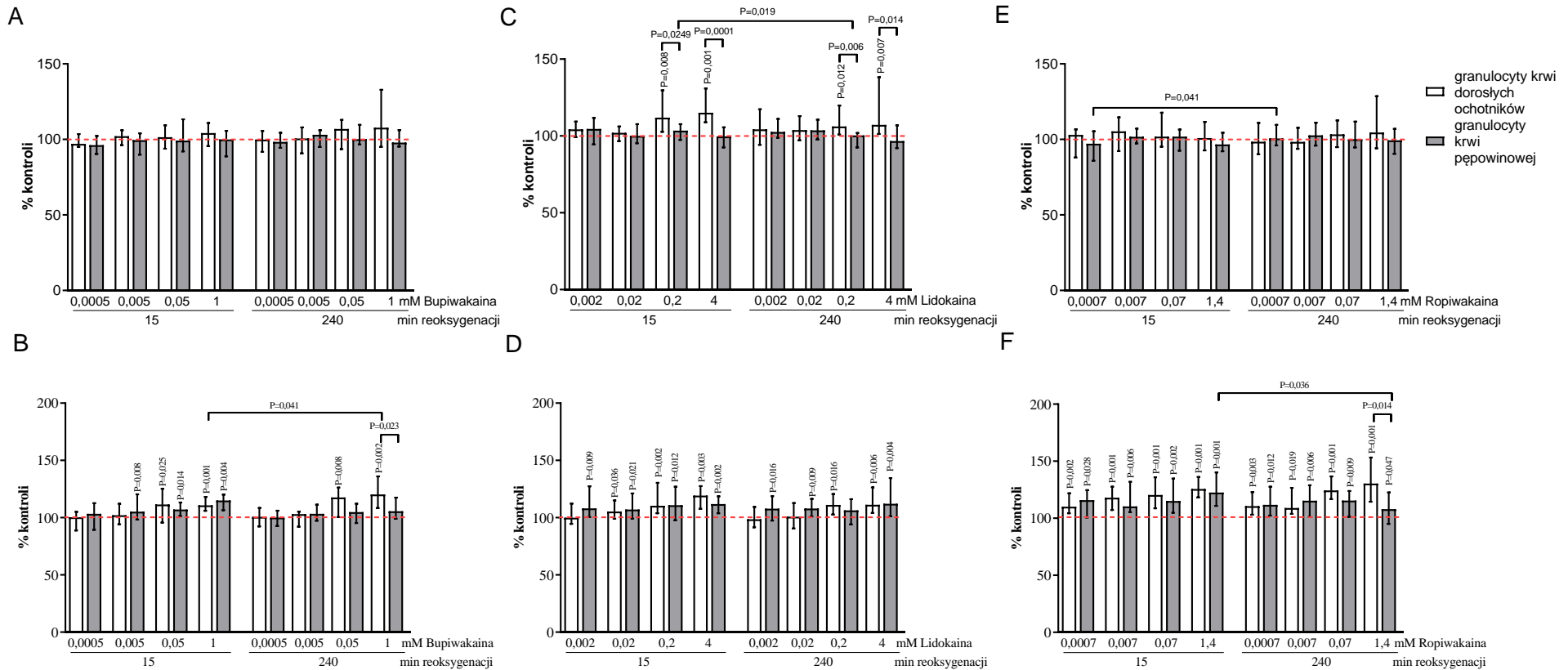
DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny, ns – komórki niestymulowane, PMA – 12-myristynian-13-octan forbolu, HR – inkubacja w warunkach hipoksji-reoksygenacji.



Rycina 4-3. Wpływ bupiwakainy (A,B), lidokainy (C,D) i ropiwakainy (E,F) na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach krwi dorosłych ochotników (n=16) oraz krwi pępowinowej (n=16) niestymulowanych (A,C,E) oraz stymulowanych PMA (B,D,F), poddanych 60 min hipoksji i 15 lub 240 min reoksygenacji.

Mediana (rozstęp ćwiartkowy) stosunku procentowego MFI Rho123 granulocytów inkubowanych z bupiwakainą do MFI Rho123 granulocytów kontrolnych inkubowanych bez anestetyku. Różnice w porównaniu do wartości kontrolnych (bez środka): test kolejności par Wilcozona; różnice między czasami reoksygenacji: test Wilcozona; różnice między granulocytami krwi pępowinowej a dorosłych ochotników: test U-Manna-Whitneya.

MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodamin 123; PMA – 12-myristynian-13-octan forbolu.



Rycina 4-4. Wpływ bupiwakainy (A,B), lidokainy (C,D) i ropiwakainy (E,F) na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach krwi dorosłych ochotników (n=16) oraz krwi pępowinowej (n=16) niestymulowanych (A,C,E) oraz stymulowanych PMA (B,D,F), poddanych 60 min hipoksji i 15 lub 240 min reoksygenacji.

Mediana (rozstęp ćwiartkowy) stosunku procentowego MFI DAF-2T granulocytów inkubowanych z bupiwakainą do MFI DAF-2T granulocytów kontrolnych inkubowanych bez anestetyku. Różnice w porównaniu do wartości kontrolnych (bez środka): test kolejności par Wilcozona; różnice między czasami reoksygenacji: test Wilcozona; różnice między granulocytami krwi pępowinowej a dorosłych ochotników: test U-Manna-Whitneya.

MFI DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny; PMA – 12-myrystynian-13-octan forbolu.

Tabela 4-6. Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję RFT przez granulocyty obojętnochłonne poddane ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi.

		DF	DF dla błędu	Bupiwakaina		Lidokaina		Ropiwakaina	
				F	p	F	p	F	p
<i>Czynniki</i>	Grupa	1	30	0,4901	0,4893	0,0042	0,9486	0,2971	0,5897
	<b>Stężenie-kategoria</b>	<b>4</b>	<b>570</b>	<b>3,9676</b>	<b>0,0035</b>	1,2176	0,3021	<b>5,1024</b>	<b>0,0005</b>
	<b>Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>861,3232</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>1259,898</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>1095,642</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>16,4853</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>27,8606</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>14,5536</b>	<b>0,0002</b>
<i>Interakcje</i>	Grupa*Stężenie-kategoria	4	570	0,6318	0,6400	2,2113	0,0665	0,8243	0,5099
	<b>Grupa*Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>5,2632</b>	<b>0,0221</b>	0,0961	0,7567	3,3895	0,0661
	Stężenie-kategoria*Stymulacja	4	570	1,0646	0,3732	0,6548	0,6237	2,0674	0,0837
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja	4	570	0,3315	0,8568	3,5674	0,0069	0,2326	0,9200
	<b>Grupa*Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	1,8169	0,1782	1,3718	0,2420	<b>4,7536</b>	<b>0,0296</b>
	Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	4	570	0,3153	0,8678	0,4670	0,7600	0,1078	0,9798
	Grupa*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	4	570	0,2282	0,9226	0,2004	0,9381	0,0979	0,9831
	<b>Stymulacja*Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>8,3106</b>	<b>0,0041</b>	<b>9,4758</b>	<b>0,0022</b>	<b>6,2557</b>	<b>0,0127</b>
	Grupa*Stymulacja*Czas reoksygenacji	1	570	3,4045	0,0655	3,6313	0,0572	6,0231	0,0144
	Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	4	570	0,3950	0,8123	0,3856	0,8190	0,6856	0,6021
Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	4	570	0,1374	0,9684	0,2142	0,9305	0,2328	0,9199	

*Czynniki:* ‘Grupa’ - granulocyty krwi pępowinowej, granulocyty krwi dorosłych ochotników; ‘Stymulacja’ - granulocyty niestymulowane, stymulowane PMA; ‘Czas reoksygenacji’ – 15, 240 min; ‘Stężenie-kategoria’ - stężenie anestetyku najniższe, średnie, wysokie, najwyższe. Czynniki i interakcje istotnie wpływające na produkcję RFT w granulocytach zaznaczono pogrubioną czcionką.

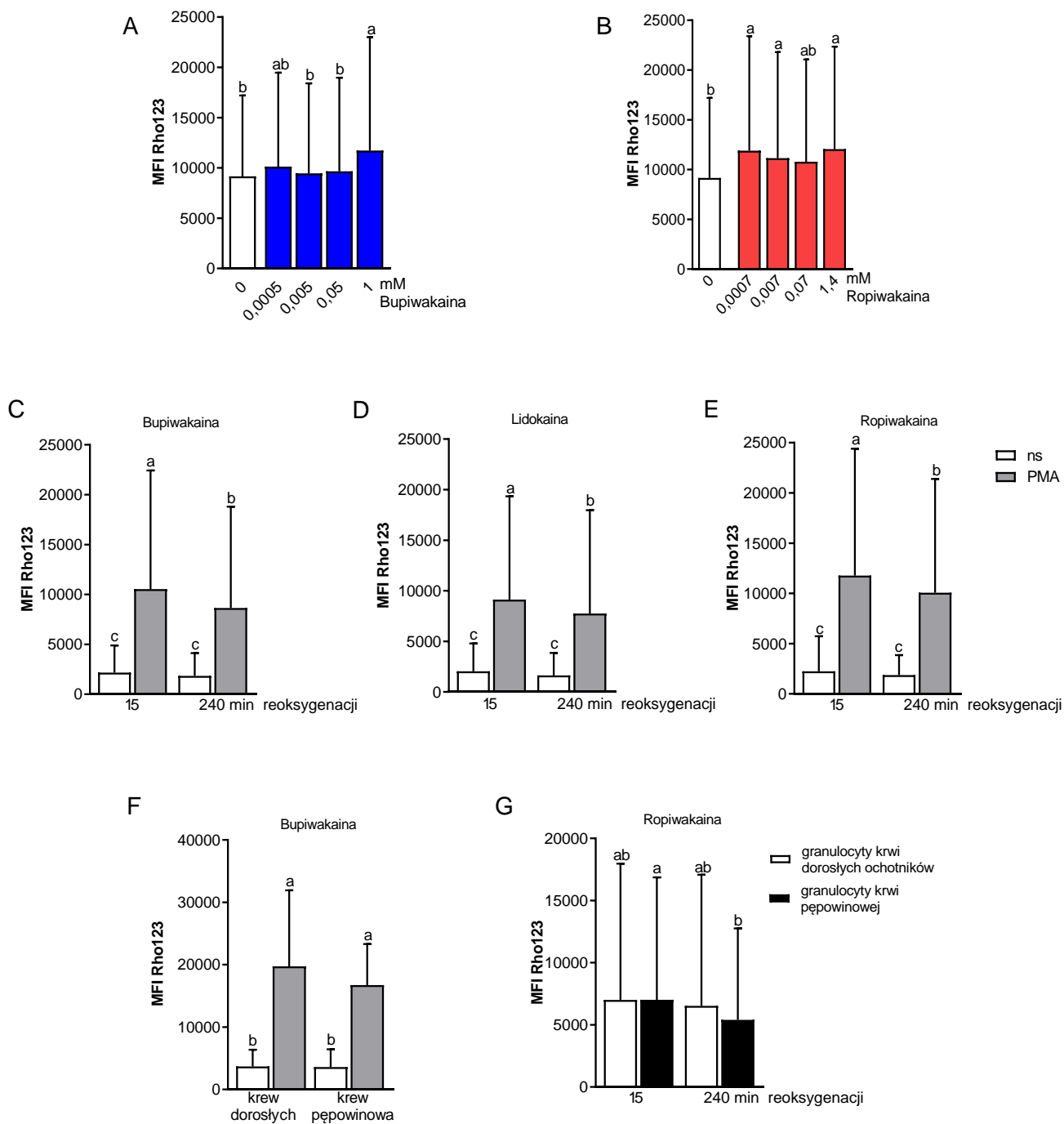
DF - liczba stopni swobody, DF dla błędu - liczba stopni swobody dla mianownika, F - stosunek wariancji czynnika do wariancji błędu, p - poziom istotności.

Tabela 4-7. Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję NO przez granulocyty obojętnochłonne poddane ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi.

		DF	DF dla błędu	Bupiwakaina		Lidokaina		Ropiwakaina	
				F	P	F	P	F	p
<i>Czynniki</i>	<b>Grupa</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>5,3432</b>	<b>0,0279</b>	<b>6,4698</b>	<b>0,0164</b>	3,0451	0,0912
	<b>Stężenie-kategoria</b>	<b>4</b>	<b>570</b>	<b>7,5258</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>10,6581</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>10,7181</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>1026,924</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>1122,058</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>1164,137</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>82,7174</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>82,5862</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>64,3681</b>	<b>&lt;,0001</b>
<i>Interakcje</i>	<b>Grupa*Stężenie-kategoria</b>	<b>4</b>	<b>570</b>	1,4678	0,2105	<b>3,1856</b>	<b>0,0133</b>	<b>2,6362</b>	<b>0,0333</b>
	<b>Grupa*Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>27,6019</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>6,5032</b>	<b>0,0110</b>	<b>34,1640</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Stężenie-kategoria*Stymulacja</b>	<b>4</b>	<b>570</b>	<b>2,8657</b>	<b>0,0227</b>	<b>3,0185</b>	<b>0,0176</b>	<b>8,6330</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja	4	570	0,6778	0,6076	1,2267	0,2983	1,1488	0,3326
	Grupa*Czas reoksygenacji	1	570	1,6288	0,2024	0,3128	0,5762	0,1168	0,7327
	Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	4	570	0,4642	0,7620	0,4928	0,7411	0,2569	0,9054
	Grupa*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	4	570	0,9178	0,4531	0,2585	0,9045	0,7286	0,5726
	<b>Stymulacja*Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>570</b>	<b>17,2028</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>22,5600</b>	<b>&lt;,0001</b>	<b>15,6110</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Stymulacja*Czas reoksygenacji	1	570	4,7945	0,0290	0,0993	0,7528	3,4120	0,0652
	Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	4	570	0,1999	0,9384	0,4484	0,7736	0,2194	0,9276
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	4	570	0,1674	0,9549	0,0561	0,9941	0,2709	0,8967

*Czynniki:* ‘Grupa’ - granulocyty krwi pępowinowej, granulocyty krwi dorosłych ochotników; ‘Stymulacja’ - granulocyty niestymulowane, stymulowane PMA; ‘Czas reoksygenacji’ - 15, 240 min; ‘Stężenie-kategoria’ - stężenie anestetyku: najniższe, średnie, wysokie, najwyższe. Czynniki i interakcje (maksymalnie dwóch czynników) istotnie wpływające na produkcję NO w granulocytach zaznaczono pogrubioną czcionką.

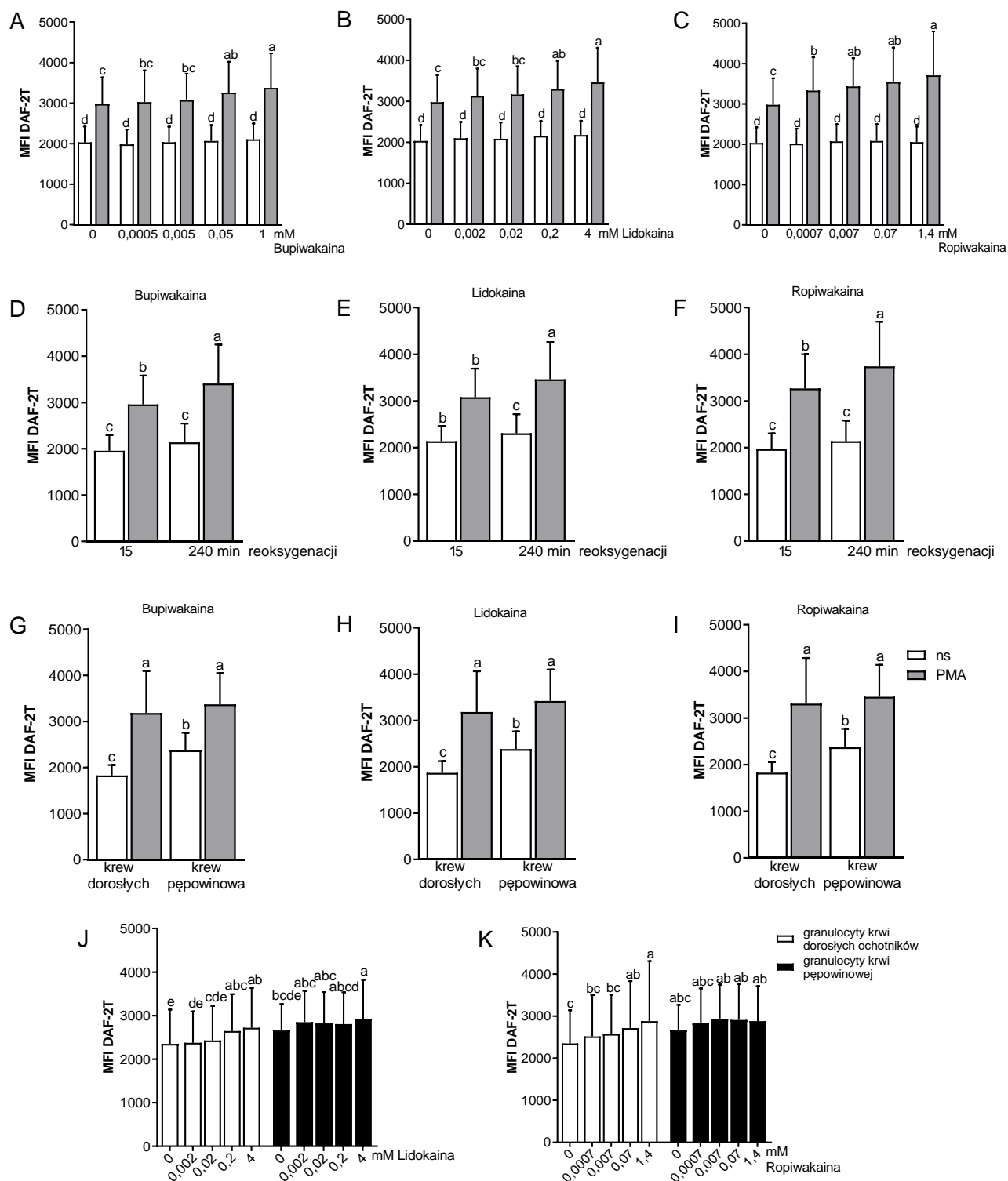
DF - liczba stopni swobody, DF dla błędu - liczba stopni swobody dla mianownika, F - stosunek wariancji czynnika do wariancji błędu, p - poziom istotności.



Rycina 4-5. Istotny efekt stężenia bupiwakainy (A) i ropiwakainy (B) oraz istotne interakcje między efektami czynników: ‘Stymulacja’ i ‘Czas reoksygenacji’ (C,D,E), ‘Grupa’ i ‘Stymulacja’ (F), ‘Grupa’ i ‘Czas reoksygenacji’ (G) uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę (A,C,F), lidokainę (D), ropiwakainę (B,E,G) i hipoksję/reoksygenację (por. Tab.4-6).

Średnia (odchylenie standardowe) wszystkich obserwacji na poziomie poszczególnych wymienionych czynników. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie między sobą;  $p > 0,05$ ; test *post hoc* Tukeya.

MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodaminy 123; ns – niestymulowane; PMA – 12-myrystynian-13-octan forbolu.



Rycina 4-6. Istotne interakcje między efektami czynników: ‘Stężenie-kategoria’ i ‘Stymulacja’ (A,B,C), ‘Stymulacja’ i ‘Czas reoksygenacji’ (D,E,F), ‘Grupa’ i ‘Stymulacja’ (G,H,I), ‘Grupa’ i ‘Stężenie-kategoria’ (J,K) uwzględnionych w wieloczynnikowej analizie wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę (A,D,G), lidokainę (B,E,H,J), ropiwakainę (C,F,I,K) i hipoksję/reoksygenację (por. Tab.4-7).

Średnia (odchylenie standardowe) wszystkich obserwacji na poziomie poszczególnych wymienionych czynników. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie między sobą;  $p > 0,05$ ; test *post hoc* Tukeya.

MFI DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny; ns – niestymulowane; PMA – 12-myristynian-13-octanforbolu.



### 4.3.1. Bupiwakaina

#### *Produkcja RFT*

W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej po 60 min hipoksji i 15 min reoksygenacji dochodziło do wzrostu MFI Rho123 pod wpływem bupiwakainy w stężeniach 0,0005 i 0,005 mM ( $P=0,028$ ;  $P=0,041$ ; Ryc.4-3A). Po 240 min reoksygenacji zmian nie obserwowano.

W niestymulowanych granulocytach krwi dorosłych po 60 min hipoksji i 15 min reoksygenacji dochodziło do wzrostu MFI Rho123 pod wpływem bupiwakainy w stężeniach 0,005; 0,05 oraz 1 mM (Ryc.4-3A). Po 240 min reoksygenacji wzrost ten obserwowano dla stężeń środka 0,0005; 0,005 oraz 0,05 mM (Ryc.4-3A). W tych warunkach doświadczenia bupiwakaina w stężeniu 0,05 mM powodowała wyższy wzrost produkcji RFT w niestymulowanych granulocytach dorosłych w porównaniu z komórkami krwi pępowinowej ( $P=0,025$ ; Ryc.4-3A).

W stymulowanych granulocytach krwi pępowinowej po 60 min inkubacji hipoksyicznej z następującą 15 min reoksygenacją dochodziło do wzrostu MFI Rho123 pod wpływem bupiwakainy w stężeniu 1 mM ( $P=0,014$ ; Ryc.4-3B), a po 240 min reoksygenacji pod wpływem stężeń 0,0005 i 1 mM (Ryc.4-3B).

W stymulowanych granulocytach dorosłych ochotników po 60 min hipoksji i 15 min reoksygenacji dochodziło do wzrostu MFI Rho123 pod wpływem bupiwakainy w stężeniach 0,005 oraz 1 mM (odpowiednio  $P=0,036$ ;  $P=0,001$ ; Ryc.4-3B). Po 240 min reoksygenacji wzrost ten był obserwowany jedynie pod wpływem najwyższego stężenia bupiwakainy (1 mM;  $P=0,036$ ; Ryc.4-3B). Bupiwakaina w stężeniu 0,005 mM powodowała wyższy wzrost produkcji RFT w granulocytach dorosłych w krótszym w porównaniu z dłuższym czasem reoksygenacji ( $P=0,014$ ; Ryc.4-3B).

W analizie wieloczynnikowej zaobserwowano wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji RFT przez granulocyty obojętnochłonne poddane hipoksji-reoksygenacji jedynie pod wpływem najwyższego badanego stężenia bupiwakainy. Wskazuje na to istotny efekt czynnika 'Stężenie' (przy łącznym uwzględnieniu obu czasów reoksygenacji i badanych populacji ( $p=0,0035$ , Tab.4-6; Ryc.4-5A). Dłuższy zastosowany czas reoksygenacji powodował obniżenie produkcji RFT w granulocytach stymulowanych, co odzwierciedla istotna interakcja czynników 'Stymulacja' i 'Czas reoksygenacji' (przy łącznym uwzględnieniu wszystkich zastosowanych stężeń bupiwakainy i obu populacji granulocytów;  $p=0,0041$ , Tab.4-6; Ryc.4-5C).

Różnice między badanymi populacjami granulocytów stwierdzono w analizie jednowymiarowej po 15 min reoksygenacji: pod wpływem 0,05 mM bupiwakainy fluorescencja Rho123 była niższa w stymulowanych granulocytach krwi pępowinowej niż w komórkach dorosłych ochotników

( $P=0,024$ , Ryc.4-3B). W analizie wieloczynnikowej różnic nie potwierdzono, na co wskazuje brak istotności czynnika ‘Grupa’ ( $p=0,4893$ ) i interakcji między czynnikami ‘Grupa’ i ‘Stężenie-kategoria’ ( $p=0,6400$ ; Tab.4-6). Istotna interakcja między czynnikami ‘Grupa’ i ‘Stymulacja’ potwierdza jedynie skuteczność stymulacji PMA w obu populacjach granulocytów poddanych ekspozycji na bupiwakainę, niezależnie od czasu reoksygenacji ( $p=0,0221$ , Tab.4-6; Ryc. 4-5F).

### *Produkcja NO*

W niestymulowanych granulocytach obojętnochłonnych w analizie jedno- i wielowymiarowej bupiwakaina nie wpływała istotnie na produkcję NO niezależnie od zastosowanego czasu reoksygenacji i rodzaju populacji (Ryc.4-4A, 4-6A).

W analizie jednowymiarowej w stymulowanych PMA granulocytach krwi pępowinowej dochodziło do wzrostu MFI DAF-2T po 15 min reoksygenacji w obecności 0,005; 0,05 oraz 1 mM bupiwakainy; po 240 min reoksygenacji różnic nie obserwowano (Ryc.4-4B).

W stymulowanych granulocytach krwi dorosłych ochotników bupiwakaina w stężeniach 0,05 i 1 mM powodowała wzrost fluorescencji DAF-2T w obu badanych czasach reoksygenacji (Ryc.4-4B). W stężeniu 1 mM środka produkcja NO była wyższa po 240 min niż po 15 min reoksygenacji ( $P=0,041$ ), a także w stosunku do wartości obserwowanych w granulocytach krwi pępowinowej ( $P=0,023$ ; Ryc.4-4B).

W wieloczynnikowej analizie wariancji bupiwakaina tylko w dwóch najwyższych zastosowanych stężeniach zwiększała wewnątrzkomórkową produkcję NO przez stymulowane granulocyty niezależnie od czasu reoksygenacji i badanej populacji komórek. Wskazuje na to istotna interakcja między efektami czynników ‘Stężenie-kategoria’ i ‘Stymulacja’ ( $p= 0,0227$ ; Tab.4-7, Ryc.4-6A). Interakcja między czynnikami ‘Stymulacja’ i ‘Czas reoksygenacji’ potwierdza wzrost produkcji NO przy 240- vs. 15-min reoksygenacji w granulocytach stymulowanych niezależnie od stężenia bupiwakainy i badanej populacji granulocytów ( $p<0,0001$ ; Tab.4-7, Ryc.4-6D).

W granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej, poddanych ekspozycji na bupiwakainę niezależnie od jej stężenia oraz hipoksji-reoksygenacji, produkcja NO była wyższa niż w granulocytach dorosłych (istotność czynnika ‘Grupa’;  $p=0,0279$ ; Tab.4-7). Interakcja czynników ‘Grupa’ i ‘Stymulacja’ ( $p<0,0001$ ) wskazuje jednak na ten efekt w niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej w przeciwieństwie do stymulowanych ( $p<0,0001$ ; Tab.4-7, Ryc.4-6G). Jednak dla poszczególnych stężeń bupiwakainy efektu różnic między populacjami nie potwierdzono, na co wskazuje brak interakcji pomiędzy czynnikami ‘Grupa’ i ‘Stężenie-kategoria’ ( $p=0,2105$ ; Tab.4-7).

### 4.3.2. Lidokaina

#### *Produkcja RFT*

W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej lidokaina wywoływała wzrost fluorescencji Rho123 w stężeniach 0,02 mM po 15- i 240 min reoksygenacji (odpowiednio  $P=0,036$  i  $P=0,019$ ; Ryc.4-3C) oraz w stężeniu 4 mM po 15 min reoksygenacji ( $P=0,016$ ; Ryc.4-3C).

Pod wpływem lidokainy w stężeniach 0,002; 0,02 i 4mM dochodziło do wzrostu produkcji RFT przez niestymulowane granulocyty krwi dorosłych w obu badanych czasach reoksygenacji (Ryc.4-3C). Wzrost MFI Rho123 pod wpływem 0,02 mM lidokainy był wyższy po 15 min niż po 240 min reoksygenacji ( $P=0,047$ ; Ryc.4-3C).

Stymulowane PMA granulocyty krwi pępowinowej wykazywały spadek produkcji RFT pod wpływem lidokainy w stężeniu 0,002 oraz 0,02 mM po 15 min reoksygenacji ( $P=0,036$ ;  $P=0,0411$ ; Ryc.4-3D). 4 mM lidokaina powodowała natomiast wzrost fluorescencji Rho123 w tych komórkach w obu czasach reoksygenacji (Ryc.4-3D).

Stymulowane granulocyty dorosłych wykazywały wzrost produkcji RFT pod wpływem 0,002 mM lidokainy po 15 min reoksygenacji ( $P=0,021$ ; Ryc.4-3D).

Różnice produkcji RFT między obu badanymi populacjami granulocytów obserwowano po 15 min reoksygenacji i ekspozycji na niskie stężenia lidokainy 0,002 i 0,02 mM – w granulocytach krwi pępowinowej wartości fluorescencji Rho123 były istotnie niższe ( $P=0,005$ ;  $P=0,026$ ; Ryc.4-3D), natomiast po 240 min reoksygenacji i zastosowaniu wyższych stężeń środka – 0,2 i 4 mM, produkcja RFT była wyższa w granulocytach krwi pępowinowej ( $P=0,019$  i  $P=0,019$ ; Ryc.4-3D).

W analizie wieloczynnikowej nie wykazano wpływu lidokainy na produkcję RFT w warunkach hipoksji-reoksygenacji, w poszczególnych zastosowanych stężeniach brak istotnego wpływu czynnika ‘Stężenie’ ( $p=0,3021$ , Tab.4-6). W stymulowanych granulocytach inkubowanych z lidokainą, niezależnie od jej stężenia i badanej populacji komórek, produkcja RFT w obecności lidokainy była wyższa po 15min niż po 240 min reoksygenacji (Ryc.4-5D).

#### *Produkcja NO*

W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej lidokaina nie powodowała zmian produkcji NO po obu zastosowanych czasach reoksygenacji. W obecności 0,2 mM lidokainy produkcja NO była wyższa po 15 min niż po 240 min reoksygenacji ( $P=0,019$ ; Ryc.4-4C).

W niestymulowanych granulocytach dorosłych lidokaina w stężeniach 0,2 i 4 mM powodowała wzrost produkcji NO w obu badanych czasach reoksygenacji, przy czym obserwowane wartości były wyższe w porównaniu z granulocytami krwi pępowinowej (Ryc.4-4C). W analizie

wieloczynnikowej nie wykazano wpływu lidokainy na produkcję NO przez niestymulowane granulocyty obojętnochłonne poddane hipoksji-reoksygenacji (Ryc.4-6B).

W stymulowanych granulocytach krwi pępowinowej po 15 min reoksygenacji obserwowano wzrost fluorescencji DAF-2T w obecności wszystkich badanych stężeń lidokainy, natomiast po 240 min reoksygenacji – po ekspozycji na 0,002; 0,02 i 4 mM lidokainę (Ryc.4-4D).

W stymulowanych granulocytach krwi dorosłych ochotników lidokaina w stężeniach 0,02; 0,2 i 4 mM powodowała wzrost produkcji NO po 15 min reoksygenacji, a w stężeniach 0,2 i 4 mM – po 240 min reoksygenacji (Ryc.4-4D).

W analizie wieloczynnikowej wykazano, że stymulowane granulocyty poddane ekspozycji na 0,2 i 4 mM lidokainę wykazują intensywniejszy wzrost produkcji NO w warunkach hipoksji-reoksygenacji (interakcja między czynnikami ‘Stymulacja’ oraz ‘Stężenie-kategoria’;  $p < 0,0001$ ; Tab.4-7; Ryc.4-6B). W stymulowanych granulocytach wyraźniej zarysował się też wzrost produkcji NO przy dłuższym czasie reoksygenacji (interakcja między czynnikami ‘Stymulacja’ oraz ‘Czas reoksygenacji’;  $p < 0,0001$ ; Tab.4-7; Ryc.4-6E).

Oдноśnie różnic między badanymi populacjami, potwierdzono je w analizie wieloczynnikowej (czynnik ‘Grupa’  $p = 0,0164$ ; Tab.4-7, Ryc.4-6H) i dotyczyły one, zgodnie z wynikami analizy jednowymiarowej, wyższej produkcji NO w granulocytach niestymulowanych krwi pępowinowej (interakcja między czynnikami ‘Stymulacja’ oraz ‘Grupa’ ;  $p = 0,0110$ ; Tab.4-7; Ryc.4-6H). Niezależnie od stymulacji, wyższa produkcja NO w granulocytach krwi pępowinowej istotnie zaznaczyła się pod wpływem najwyższego zastosowanego stężenia lidokainy (interakcja między czynnikami ‘Stężenie-kategoria’ oraz ‘Grupa’;  $p = 0,0133$ ; Tab.4-7; Ryc.4-6J), a w granulocytach dorosłych ochotników pod wpływem dwóch najwyższych badanych stężeń lidokainy (interakcja między czynnikami ‘Stężenie-kategoria’ oraz ‘Grupa’;  $p = 0,0133$ ; Tab.4-7; Ryc.4-6J).

### 4.3.3. Ropiwakaina

#### *Produkcja RFT*

W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej poddanych ekspozycji na 1,4 mM ropiwakainę dochodziło do wzrostu produkcji RFT po 15- i 240 min reoksygenacji (odpowiednio  $P=0,032$  i  $0,009$ ; Ryc.4-3E). Najniższe zastosowane stężenie środka ( $0,0007$  mM) powodowało wzrost fluorescencji Rho123 po 240 min reoksygenacji ( $P=0,028$ ; Ryc.4-3E).

W niestymulowanych granulocytach krwi dorosłych ochotników obserwowano wzrost fluorescencji MFI Rho123 po 15 min reoksygenacji pod wpływem  $0,0007$ ;  $0,07$  i  $1,4$  mM ropiwakainy ( $P=0,047$ ;  $0,016$  i  $0,036$ ; Ryc.4-3E). Po 240 min reoksygenacji wzrost ten zaobserwowano pod wpływem  $0,0007$ ;  $0,007$  i  $1,4$  mM ropiwakainy ( $P=0,006$ ;  $0,002$  i  $0,007$ ; Ryc.4-3E). Pod wpływem  $0,07$  mM ropiwakainy produkcja RFT była istotnie niższa po 240 w porównaniu z 15 min reoksygenacji ( $P=0,021$ ; Ryc.4-3E).

W granulocytach stymulowanych PMA ropiwakaina we wszystkich zastosowanych stężeniach wywoływała wzrost produkcji RFT po obu czasach reoksygenacji oraz w obu badanych populacjach granulocytów (Ryc.4-3F). Wzrost ten okazał się nieistotny jedynie w granulocytach krwi pępowinowej poddanych ekspozycji na  $0,007$  mM ropiwakainę 240 min reoksygenacji (Ryc.4-3F).

W obecności  $1,4$  mM ropiwakainy po 15 min reoksygenacji wzrost produkcji RFT był wyższy w granulocytach dorosłych niż w granulocytach krwi pępowinowej ( $P=0,029$ ; Ryc.4-3F).

W wieloczynnikowej analizie wariancji wykazano wzrost produkcji RFT w granulocytach obojętnochłonnych poddanych hipoksji-reoksygenacji pod wpływem ropiwakainy w stężeniach  $0,0007$ ;  $0,007$  oraz  $1,4$  mM, istotny czynnik 'Stężenie-kategoria' ( $p=0,0005$ , Tab.4-6; Ryc.4-5B).

Produkcja RFT w obecności ropiwakainy była wyższa w stymulowanych granulocytach po 15 min niż po 240 minutowej reoksygenacji (Ryc.4-5E).

Zjawisko to ujawniło się szczególnie w granulocytach krwi pępowinowej interakcja między czynnikami 'Grupa' i 'Czas reoksygenacji' ( $p=0,0296$ , Tab.4-6; Ryc.4-5G).

#### *Produkcja NO*

W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej poddanych ekspozycji na  $0,0007$  mM ropiwakainę wykazano wyższe wartości MFI DAF-2T po dłuższym czasie reoksygenacji ( $P=0,041$ ; Ryc.4-4E). W analizie wieloczynnikowej nie wykazano wpływu ropiwakainy na produkcję NO przez niestymulowane granulocyty obojętnochłonne poddane hipoksji-reoksygenacji (Ryc.4-6C).

W stymulowanych PMA granulocytach dorosłych i krwi pępowinowej ropiwakaina we wszystkich badanych stężeniach i po obu badanych czasach reoksygenacji powodowała wzrost produkcji NO, efekt obserwowano zarówno w analizie jednowymiarowej, jak i wielowymiarowej (Ryc.4-4F, 4-6C).

Wzrost fluorescencji DAF-2T pod wpływem 1,4 mM ropiwakainy w stymulowanych PMA granulocytach krwi pępowinowej był większy po 15 min niż po 240 min reoksygenacji ( $P=0,036$ ; Ryc.4-4F); wartości te były niższe w porównaniu z granulocytami krwi dorosłych ochotników ( $P=0,014$ ; Ryc.4-4F).

W analizie wielowymiarowej wykazano, że ropiwakaina w stężeniu 0,07 i 1,4 mM powodowała wzrost produkcji NO w granulocytach dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji. W granulocytach krwi pępowinowej efektu tego nie obserwowano (Ryc.4-6K).

Średnia fluorescencja DAF-2T granulocytów obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji PMA w obecności ropiwakainy była porównywalna w obu grupach (Ryc.4-6I).

W obecności ropiwakainy produkcja NO była niższa w granulocytach poddanych godzinnej hipoksji z 15 minutową reoksygenacją niż z 240 minutową reoksygenacją (Ryc.4-6F).

4.3.4. Porównanie wpływu bupiwakainy, lidokainy i ropiwakainy na produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji *in vitro* z wykorzystaniem wieloczynnikowej analizy wariancji

#### *Produkcja RFT*

W modelu porównawczym wieloczynnikowej analizy wariancji zaobserwowano, że produkcja RFT w granulocytach obojętnochłonnych poddanych ekspozycji na anestetyki lokalne, zależała od rodzaju i stężenia środka, stanu czynnościowego badanych komórek (stymulacja) i czasu reoksygenacji; rodzaj badanej populacji (grupa) okazał się nieistotny (Tab.4-8). Najwyższą wewnątrzkomórkową produkcję RFT obserwowano w granulocytach inkubowanych z ropiwakainą; ranking efektu dla wszystkich komórek łącznie: ropiwakaina > bupiwakaina = lidokaina (istotny czynnik 'Anestetyk',  $p < 0,0001$ ; Tab.4-8; Ryc.4-7A) dla komórek stymulowanych PMA: ropiwakaina > bupiwakaina = lidokaina (istotna interakcja 'Anestetyk\*Stymulacja';  $p < 0,0001$ ; Tab.4-8; Ryc.4-7B). Wzrost produkcji RFT był obserwowany w obecności najwyższych badanych stężeń (czynnik 'Stężenie-kategoria',  $p < 0,0001$ ; Tab.4-8; Ryc.4-7C). Efekt wpływu stężenia był niezależny od rodzaju stosowanego anestetyku, na co wskazuje brak interakcji pomiędzy czynnikami 'Anestetyk' oraz 'Stężenie-kategoria' ( $p = 0,9680$ , Tab.4-8). Niezależnie od rodzaju anestetyku produkcja RFT i przez stymulowane granulocyty obojętnochłonne była wyższa po 15 min niż po 240 min reoksygenacji (interakcja 'Stymulacja\*Czas reoksygenacji';  $p < 0,0001$ ; Tab.4-8; Ryc.4-7D), choć efekt ten nie był obserwowany w poszczególnych grupach osobno (Ryc.4-7F). MFI Rho123 była wyższa w granulocytach krwi dorosłych ochotników niż w krwi pępowinowej w obu badanych czasach reoksygenacji (interakcja 'Grupa\*Czas reoksygenacji';  $p = 0,0335$ ; Tab.4-8; Ryc.4-7F).

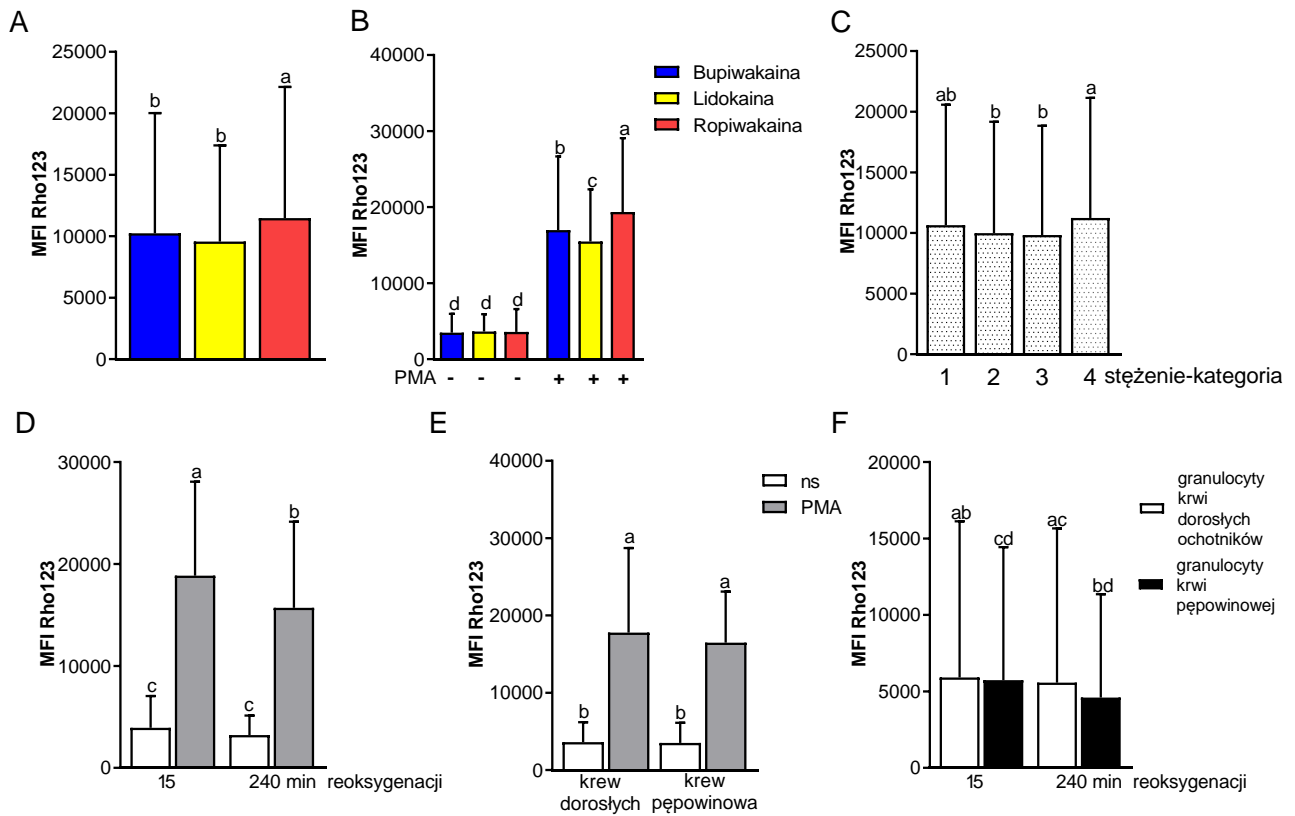
Tabela 4-8. Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję RFT przez granulocyty obojętnochnonne poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę i ropiwakainę oraz hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi - model porównawczy.

		DF	DF dla błędu	F	p
<i>Czynniki</i>	Grupa	1	30	0,3472	0,5601
	<b>Anestetyk</b>	<b>2</b>	<b>1410</b>	<b>15,6805</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Stężenie-kategoria</b>	<b>3</b>	<b>1410</b>	<b>5,2546</b>	<b>0,0013</b>
	<b>Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>2370,588</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>47,1604</b>	<b>&lt;,0001</b>
<i>Interakcje</i>	Grupa*Anestetyk	2	1410	1,6907	0,1848
	Grupa*Stężenie-kategoria	3	1410	0,0854	0,9680
	Anestetyk*Stężenie-kategoria	6	1410	0,7626	0,5994
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria	6	1410	1,3234	0,2433
	<b>Grupa*Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>4,7011</b>	<b>0,0303</b>
	<b>Anestetyk*Stymulacja</b>	<b>2</b>	<b>1410</b>	<b>16,5264</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Anestetyk*Stymulacja	2	1410	2,4725	0,0847
	Stężenie-kategoria*Stymulacja	3	1410	1,5847	0,1912
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja	3	1410	0,5894	0,6220
	Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja	6	1410	0,2395	0,9635
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja	6	1410	1,3801	0,2191
	<b>Grupa*Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>4,5280</b>	<b>0,0335</b>
	Anestetyk*Czas reoksygenacji	2	1410	0,0161	0,9840
	Grupa*Anestetyk*Czas reoksygenacji	2	1410	0,6127	0,5420
	Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	3	1410	0,1151	0,9513
	Grupa*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	3	1410	0,0838	0,9689
	Anestetyk*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	6	1410	0,2304	0,9668
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	6	1410	0,1830	0,9816
	<b>Stymulacja*Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>18,8621</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Stymulacja*Czas reoksygenacji	1	1410	7,8568	0,0051
	Anestetyk*Stymulacja*Czas reoksygenacji	2	1410	0,1212	0,8859
	Grupa*Anestetyk*Stymulacja*Czas reoksygenacji	2	1410	0,3829	0,6819
	Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	3	1410	0,5532	0,6460
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	3	1410	0,2546	0,8581
	Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	6	1410	0,6271	0,7088
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	6	1410	0,1362	0,9916

*Czynniki:* 'Grupa' - granulocyty krwi pępowinowej, granulocyty krwi dorosłych ochotników; 'Stymulacja' - granulocyty niestymulowane, stymulowane PMA; 'Czas reoksygenacji' - 15, 240 min; 'Stężenie-kategoria' - stężenia anestetyków zaszerogowane do czterech kategorii: najniższe, średnie, wysokie, najwyższe; 'Anestetyk' - bupiwakaina, lidokaina i ropiwakaina. Czynniki i interakcje (maksymalnie dwóch czynników) istotnie wpływające na produkcję RFT w granulocytach znacząco pogrubioną czcionką.

DF - liczba stopni swobody, DF dla błędu - liczba stopni swobody dla mianownika, F - stosunek wariancji czynnika do wariancji błędu, p - poziom istotności.





Rycina 4-7. Istotny efekt rodzaju anestetyku (A), stężenia anestetyków (C) oraz istotne interakcje między efektami czynników ‘Anestetyk’ i ‘Stymulacja’ (B), ‘Stymulacja’ i ‘Czas reoksygenacji’ (D) ‘Grupa’ i ‘Stymulacja’ (E), ‘Grupa’ i ‘Czas reoksygenacji’ (F) uwzględnionych w modelu porównawczym wieloczynnikowej analizy wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję RFT w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksję/reoksygenację (por. Tab.4-8).

Średnia (odchylenie standardowe) wszystkich obserwacji na poziomie poszczególnych wymienionych czynników. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie między sobą;  $p > 0,05$ ; test *post hoc* Tukeya.

MFI Rho123 – średnia intensywność fluorescencji rodaminy 123; ns – niestymulowane; PMA – 12-myristylian-13-octan forbolu.

## *Produkcja NO*

W modelu porównawczym wieloczynnikowej analizy wariancji istotny wpływ na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach obojętnochłonnych, poddanych ekspozycji na anestetyki lokalne, miały: rodzaj i stężenia środka, stan czynnościowy komórek (stymulacja), czas reoksygenacji i rodzaj badanej populacji granulocytów (Tab.4-9).

Najwyższą wewnątrzkomórkową produkcję NO obserwowano w granulocytach inkubowanych z ropiwakainą; ranking efektu dla wszystkich komórek łącznie: ropiwakaina > lidokaina > bupiwakaina (istotny czynnik 'Anestetyk',  $p < 0,0001$ ; Tab.4-9; Ryc.4-8A), dla komórek stymulowanych PMA: ropiwakaina > bupiwakaina=lidokaina (istotna interakcja 'Anestetyk\*Stymulacja';  $p < 0,0001$ ; Tab.4-9; Ryc.4-8B).

Stężenie anestetyku miało istotny wpływ na produkcję NO przez granulocyty stymulowane: efekt najniższego stężenia różnił się istotnie od efektów dwóch najwyższych stężeń, a efekt najwyższego stężenia – od pozostałych (interakcja 'Stężenie-kategoria\*Stymulacja'  $p < 0,0002$ ; Tab.4-9; Ryc.4-8D). Efekt wpływu stężenia był niezależny od rodzaju stosowanego anestetyku, na co wskazuje brak interakcji pomiędzy czynnikami 'Anestetyk' oraz 'Stężenie' ( $p = 0,9726$ , Tab.4-9).

Niezależnie od rodzaju anestetyku i badanej populacji, produkcja NO przez zarówno niestymulowane jak i stymulowane granulocyty obojętnochłonne była niższa po 15 min niż po 240 min reoksygenacji (interakcja 'Stymulacja\*Czas reoksygenacji';  $p < 0,0001$ ; Tab.4-9; Ryc.4-8E).

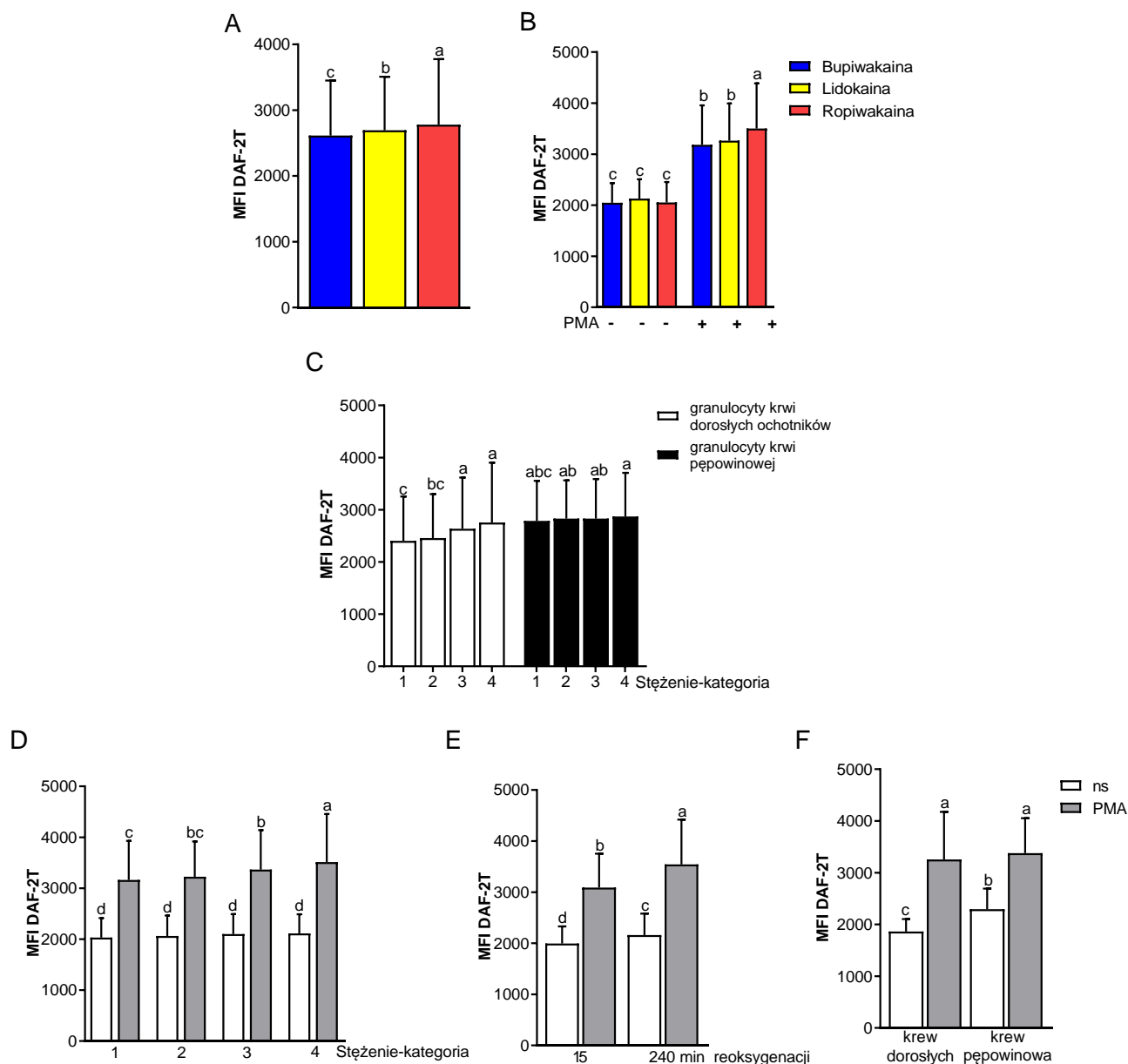
Różnice między granulocytami krwi pępowinowej i dorosłych zaznaczyły się w aspekcie odrębności wpływu kategorii stężenia – efekt był istotny tylko u dorosłych w zakresie dwóch najwyższych stężeń (interakcja 'Grupa\*Stężenie-kategoria';  $p < 0,0001$ ; Tab.4-9; Ryc.4-8C) oraz wpływu stymulacji – produkcja NO była wyższa w niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej niż krwi dorosłych, w komórkach stymulowanych poziom MFI DAF-2T był porównywalny w obu tych grupach (interakcja 'Grupa\*Stymulacja';  $p < 0,0001$ ; Tab.4-9; Ryc.4-8F).

Tabela 4-9. Tabela wieloczynnikowej analizy wariancji z uwzględnieniem czynników wpływających na produkcję NO przez granulocyty obojętnochłonne poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę i ropiwakainę oraz hipoksji-reoksygenacji oraz interakcji między nimi - model porównawczy.

		DF	DF dla błędu	F	p
<i>Czynniki</i>	<b>Grupa</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>4,2598</b>	<b>0,0478</b>
	<b>Anestetyk</b>	<b>2</b>	<b>1410</b>	<b>16,2810</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Stężenie-kategoria</b>	<b>3</b>	<b>1410</b>	<b>16,8900</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>2804,323</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>176,5648</b>	<b>&lt;,0001</b>
<i>Interakcje</i>	Grupa*Anestetyk	2	1410	1,2825	0,2777
	<b>Grupa*Stężenie-kategoria</b>	<b>3</b>	<b>1410</b>	<b>7,9689</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Anestetyk*Stężenie-kategoria	6	1410	0,2137	0,9726
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria	6	1410	0,5227	0,7914
	<b>Grupa*Stymulacja</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>44,8639</b>	<b>&lt;,0001</b>
	<b>Anestetyk*Stymulacja</b>	<b>2</b>	<b>1410</b>	<b>19,8272</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Anestetyk*Stymulacja	2	1410	5,3176	0,0050
	<b>Stężenie-kategoria*Stymulacja</b>	<b>3</b>	<b>1410</b>	<b>6,7837</b>	<b>0,0002</b>
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja	3	1410	1,1464	0,3291
	Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja	6	1410	0,1563	0,9878
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja	6	1410	0,9544	0,4550
	Grupa*Czas reoksygenacji	1	1410	0,6534	0,4190
	Anestetyk*Czas reoksygenacji	2	1410	0,0924	0,9118
	Grupa*Anestetyk*Czas reoksygenacji	2	1410	0,9140	0,4011
	Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	3	1410	0,5284	0,6628
	Grupa*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	3	1410	1,5314	0,2045
	Anestetyk*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	6	1410	0,4677	0,8326
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria*Czas reoksygenacji	6	1410	0,3812	0,8913
	<b>Stymulacja*Czas reoksygenacji</b>	<b>1</b>	<b>1410</b>	<b>38,5415</b>	<b>&lt;,0001</b>
	Grupa*Stymulacja*Czas reoksygenacji	1	1410	6,4709	0,0111
	Anestetyk*Stymulacja*Czas reoksygenacji	2	1410	0,0604	0,9413
	Grupa*Anestetyk*Stymulacja*Czas reoksygenacji	2	1410	1,2839	0,2773
	Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	3	1410	0,1179	0,9496
	Grupa*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	3	1410	0,2116	0,8884
	Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	6	1410	0,4206	0,8657
	Grupa*Anestetyk*Stężenie-kategoria*Stymulacja*Czas reoksygenacji	6	1410	0,0823	0,9979

*Czynniki:* 'Grupa' - granulocyty krwi pępowinowej, granulocyty krwi dorosłych ochotników; 'Stymulacja' - granulocyty niestymulowane, stymulowane PMA; 'Czas reoksygenacji' - 15 , 240 min; 'Stężenie-kategoria' - stężenia anestetyków zaszeregowane do czterech kategorii: najniższe, średnie, wysokie, najwyższe; 'Anestetyk' - bupiwakaina, lidokaina i ropiwakaina. Czynniki i interakcje (maksymalnie dwóch czynników) istotnie wpływające na produkcję NO w granulocytach zaznaczono pogrubioną czcionką.

DF - liczba stopni swobody, DF dla błędu - liczba stopni swobody dla mianownika, F - stosunek wariancji czynnika do wariancji błędu, p - poziom istotności.



Rycina 4-8. Istotny efekt rodzaju anestetyku (A) oraz istotne interakcje między efektami czynników ‘Anestetyk’ i ‘Stymulacja’ (B), ‘Grupa’ i ‘Stężenie-kategoria’ (C), ‘Stężenie-kategoria’ i ‘Stymulacja’ (D), ‘Stymulacja’ i ‘Czas reoksygenacji’ (E), ‘Grupa’ i ‘Czas reoksygenacji’ (F) uwzględnionych w modelu porównawczym wieloczynnikowej analizy wariancji i wpływających na wewnątrzkomórkową produkcję NO w granulocytach poddanych ekspozycji na bupiwakainę, lidokainę, ropiwakainę i hipoksję/reoksygenację (por. Tab.4-9).

Średnia (odchylenie standardowe) wszystkich obserwacji na poziomie poszczególnych wymienionych czynników. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie między sobą;  $p > 0,05$ ; test *post hoc* Tukeya.

MFI DAF-2T – średnia intensywność fluorescencji triazolofluoresceiny; ns – niestymulowane; PMA – 12-myristynian-13-octan forbolu.

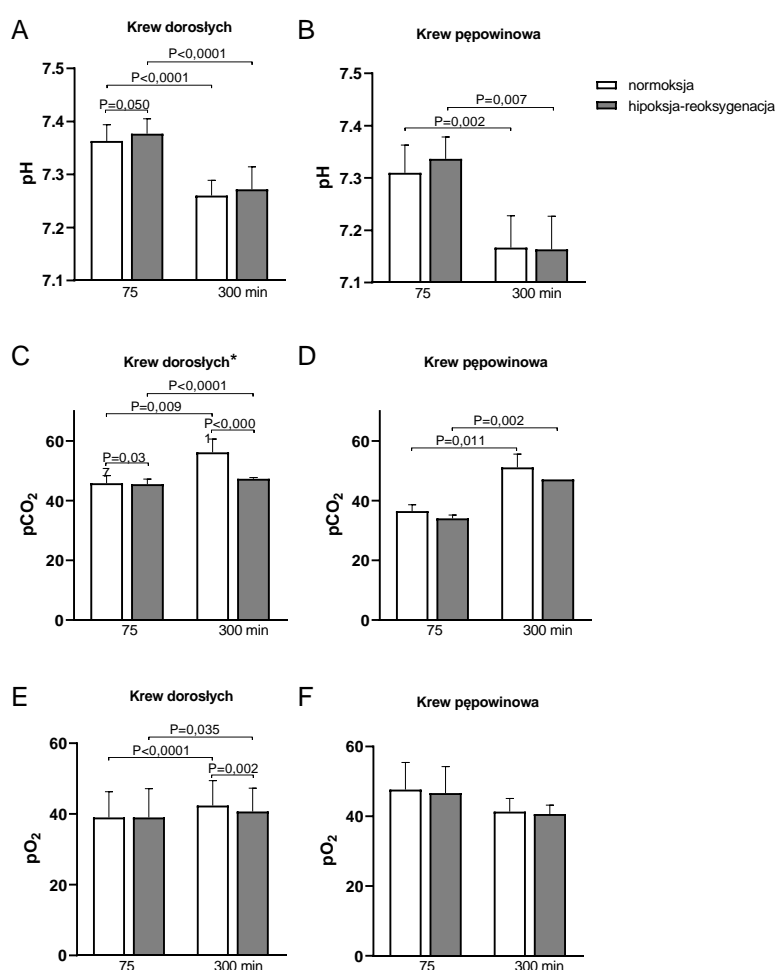
#### 4.4. Równowaga kwasowo-zasadowa

Dłuższy czas inkubacji wiązał się ze spadkiem pH oraz wzrostem ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla ( $p\text{CO}_2$ ) niezależnie od grupy oraz warunków inkubacji (Ryc.4-9A-D).

Wartości pH krwi dorosłych poddanej 60 min hipoksji i 15 min reoksygenacji były wyższe niż krwi poddanej 75 min normoksji. ( $P=0,050$ ; Ryc.4-9A).

W obu badanych czasach inkubacji  $p\text{CO}_2$  krwi dorosłych było niższe po ekspozycji na hipoksję-reoksygenację (Ryc.4-9C). Jednocześnie parametr ten wzrastał we krwi dorosłych oraz pępowinowej po dłuższej inkubacji (Ryc.4-9C,D).

Ciśnienie parcjalne tlenu ( $p\text{O}_2$ ) krwi dorosłych było wyższe w próbach poddanych dłuższej inkubacji bez względu na początkową hipoksję, jednak w grupie poddanej hipoksji-reoksygenacji było niższe niż w grupie normoksycznej po 300 minutach inkubacji (Ryc.4-9E).



Rycina 4-9. Wybrane parametry analizy równowagi kwasowo-zasadowej krwi dorosłych ochotników (A,C,E) ( $n=16$ ) oraz krwi pępowinowej (B,D,F) ( $n=3$ ) poddanej 75 i 300 min normoksji lub 60 min hipoksji oraz 15 i 240 min reoksygenacji.

Zmienne o rozkładzie normalnym - średnia (odchylenie standardowe)\*, test t-studenta dla prób zależnych; zmienne o rozkładzie odbiegającym od normalnego - mediana (rozstęp ćwiartkowy), test Wilcoxon.

pH - ujemny logarytm dziesiętny ze stężenia jonów wodorowych;  $p\text{CO}_2$  - ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla,  $p\text{O}_2$  - ciśnienie parcjalne tlenu.



## 5. DYSKUSJA

Udział granulocytów obojętnochłonnych i stresu oksydacyjnego w patofizjologii uszkodzenia reoksygenacyjnego i reperfuzyjnego został wielokrotnie potwierdzony. Mimo, że dobrze udokumentowano uszkadzający wpływ RFT produkowanych przez granulocyty w reperfuzji i reoksygenacji, jednak ich źródłem są też inne komórki uczestniczące w reakcji zapalnej, w pierwszej kolejności komórki śródbłonna, a granulocyty stanowią dopiero kolejne ogniwo w tym procesie<sup>18</sup>. Stosunkowo niewiele doniesień odnosi się do bezpośredniego wpływu hipoksji-reoksygenacji na czynność granulocytów obojętnochłonnych w aspekcie produkcji RFTiA przez te komórki, zwłaszcza w aspekcie ontogenetycznym. W oparciu o dostępne piśmiennictwo wydaje się, że reakcja na hipoksję może być porównywalna między granulocytami krwi pępowinowej i osób dorosłych<sup>105</sup>. Anestetyki lokalne w warunkach normoksji hamują produkcję RFT przez granulocyty obojętnochłonne, stymulując jednocześnie wewnątrzkomórkową produkcję NO; z naszych badań wynika, że efekty te są słabiej zaznaczone w komórkach krwi pępowinowej<sup>52,90</sup>. Dotychczas badano wpływ lidokainy na migrację i adhezję granulocytów w reperfundowanych tkankach<sup>72,95,96,106</sup>, oceniano też wpływ tego środka na wzajemne oddziaływanie granulocytów i śródbłonna *in vitro*<sup>95,96</sup>, istotne z punktu widzenia patofizjologii hipoksji-reoksygenacji. Efekt anestetyków na produkcję RFTiA w tych warunkach nie został wyjaśniony, mimo klinicznego znaczenia tego zjawiska zarówno u noworodków, jak i u dorosłych. Niniejsza praca stanowi próbę zbadania wpływu anestetyków lokalnych na produkcję RFTiA przez granulocyty obojętnochłonne krwi pępowinowej i dorosłych poddane reoksygenacji po poprzedzającej hipoksji.

Główne obserwacje poczynione w tej pracy dotyczą: (1) niższej produkcji RFT i NO przez stymulowane PMA granulocyty obojętnochłonne krwi pępowinowej i krwi dorosłych w warunkach reoksygenacji w mikrośrodowisku krwi pełnej oraz (2) stymulującego wpływu anestetyków lokalnych na te procesy.

### 5.1. Produkcja RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji *in vitro*

#### 5.1.1. Wpływ hipoksji-reoksygenacji

##### *RFT*

W tej pracy w stymulowanych PMA granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej, jak również pełnej krwi dorosłych ochotników, stwierdzono istotnie niższą produkcję RFT po ekspozycji zarówno na 15- jak i 240-min reoksygenację po 60-min hipoksji w porównaniu

z inkubacją w tym samym czasie w warunkach normoksji. Dane uzyskane w tej pracy nawiązują do obserwacji dotyczących granulocytów obojętnochłonnych świńskich noworodków poddanych hipoksji-reoksygenacji, u których reoskygenacja z użyciem powietrza atmosferycznego powodowała spadek ilości  $H_2O_2$  w granulocytach krwi pobranej z żyłnej zatoki strzałkowej<sup>107</sup>. W mikrokrażeniu mózgowym u szczura, również *in vivo*, reoksygenacja wpływała na obniżenie, wzrastającej pod wpływem hipoksji, aktywacji PKC<sup>108</sup>.

Badania *in vitro*, przeprowadzane na izolowanych stymulowanych granulocytach, dokumentują wzrost produkcji RFT w warunkach reoksygenacji, natomiast wyniki badań *in vivo* są zróżnicowane. *In vitro*, pod wpływem reoksygenacji izolowanych granulocytów stymulowanych PMA, McGovern i wsp. stwierdzili powrót produkcji RFT obniżonej w warunkach hipoksji do wartości wyjściowych, ale nie wyższych, dopiero po czasie 3 godzin. Skądinąd autorzy ci przedstawili po raz pierwszy przekonujące dowody na hipoksyczne zahamowanie produkcji zarówno wewnątrzkomórkowych RFT, jak i zewnątrzkomórkowego  $O_2^-$  w granulocytach; wcześniejsze doniesienia na ten temat były niejednoznaczne<sup>57</sup>. Zaobserwowane w niniejszej pracy zjawisko niższej produkcji RFT w granulocytach inkubowanych w warunkach hipoksji-reoksygenacji, a zatem występowanie fenotypu hipoksycznego, w przypadku wczesnej reoksygenacji mogło wynikać z krótkiego, 15 min czasu obserwacji. Jednak w izolowanych granulocytach szczura już po 30 min reoksygenacji (po 30 min hipoksji) Sethi i wsp. obserwowali ponad dwukrotny wzrost stymulowanej PMA chemiluminescencji zależnej od luminolu, wskazującej jednak na wzrost wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej produkcji RFT<sup>66</sup>.

Wydaje się, że w warunkach krwi pełnej nieekwilibrowanej znaczenie dla obserwowanego zjawiska niższej produkcji RFT w reoksygenowanych granulocytach mogło mieć rzeczywiste wolne tempo narastania bodźca hipoksycznego i reoksygenacji, także przypuszczalnie niewielki spadek  $pO_2$ . Inkubacja izolowanych komórek w standardowym inkubatorze  $CO_2$  odbywa się standardowo w warunkach ekspozycji na stężenie  $O_2$  w powietrzu atmosferycznym,  $pO_2$  jest zatem 2-5 razy wyższe niż fizjologicznie w tkankach i wynosi ok. 160 mmHg<sup>62</sup>. Inkubacja hipoksyczna (1%  $O_2$ ) izolowanych komórek pozwala na osiągnięcie  $pO_2$  poniżej 40 mmHg (ok. 5%) w ciągu 45 min, a ekwilibracja po 5 godz powoduje dopiero spadek  $pO_2$  poniżej 13 mmHg (ok. 1,8 %  $O_2$ )<sup>62</sup>. W medium pozbawionym  $O_2$ , w którym przez 30 min inkubowano izolowane granulocyty szczura wartość  $pO_2$  wynosiła ok. 70 mmHg, a po 30 min reoksygenacji wracała do wartości wyjściowych ok. 120 mm Hg<sup>66</sup>. Prawidłowe  $pO_2$  we krwi żyłnej wynosi 25-40 mmHg, co odpowiada 3-5%  $O_2$ . We krwi pełnej pępowinowej po 30 min płukania prób (ekwilibracji) 100%  $N_2$  Hoehn i wsp. uzyskali  $pO_2$  ok. 20 mmHg oraz ok. 30 mmHg we krwi dorosłych czyli spadek o ok. 1/3. W modelu tym dochodzi też jednak do wypłukania  $CO_2$ , co stwarza konieczność buforowania prób<sup>105</sup>. Czas



i natężenie bodźca hipoksycznego wpływają na typ reakcji, która, zależnie od stanu czynnościowego mitochondriów, może być zróżnicowana w zależności od rodzaju tkanki i modelu doświadczalnego<sup>109</sup>. Niewielki wzrost produkcji ROS w mitochondriach, w przeciwieństwie do dużego, prowadził do zmniejszenia uszkodzenia reoksygenacyjnego i reperfuzyjnego<sup>110</sup>. Zależność efektów reoksygenacji od tempa jej narastania wykazano w makrofagach. W poddanych 20-godzinnej hipoksji makrofagach RAW 264.7 wolna reoksygenacja- stopniowy wzrost narastania prężności tlenu (0.8% co 15 min) w przeciwieństwie do szybkiej (natychmiastowa zmiana atmosfery na normoksję) wiązała się ze znacząco niższą cytotoxycznością i odsetkiem apoptozy. Odnotowano też niższą produkcję RFT, IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz NO. Obserwowane zmiany zależały od aktywności NOX<sup>111</sup>.

W oparciu o badania *in vivo*, bardziej odpowiadające warunkom mikrośrodowiska krwi pełnej, część autorów sugerowała znaczący wzrost aktywności oksydacyjnej granulocytów w okresie reoksygenacji<sup>64,112</sup>, podczas gdy inni nie potwierdzali tych obserwacji. Częściowo w nawiązaniu do uzyskanych w tej pracy wyników, Tamura i wsp. nie obserwowali zmian produkcji RFT przez granulocyty stymulowane PMA, mimo tendencji spadkowej, u osób poddanych narastającej przez 45 min desaturacji, które następnie przez 30 min oddychały powietrzem atmosferycznym<sup>58</sup>. Podobnie Grabska-Kobylecka i wsp. nie odnotowali zmian w zakresie produkcji chemiluminescencji krwi pełnej stymulowanej fMLP (odzwierciedlającej produkcję RFT przez granulocyty) oraz produkcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u chorych z obturacyjnym bezdechem<sup>113</sup>.

W niniejszej pracy w analizie wieloczynnikowej wykazano istotną interakcję między czynnikami 'atmosfera' oraz 'stymulacja', co wskazuje na ich wzajemne oddziaływanie. Izoformy PKC są wrażliwe na regulację oksydo-redukcyjną, która w warunkach hipoksji-reoksygenacji może powodować ich modulację czynnościową<sup>114</sup>.

Wartości pO<sub>2</sub> po 15 min reoksygenacji były porównywalne z wartościami wyjściowymi, nie obserwowano też kwasicy, co może wynikać z właściwości buforujących krwi pełnej (aktywność erytrocytów i osocza). Nie do pominięcia jest trudny do zdefiniowania wpływ czynników humoralnych, do uwalniania których może dochodzić w mikrośrodowisku krwi pełnej oraz ewentualnych interakcji między granulocytami i innymi komórkami. Natomiast po dłuższym czasie reoksygenacji (240 min) znaczenie mogły mieć dodatkowe czynniki, takie jak zaobserwowana w tej pracy w tym punkcie czasowym kwasica czy hipoglikemia<sup>115</sup>.

W tej pracy, niestymulowane granulocyty, zarówno krwi pępowinowej, jak i dorosłych, nie wykazywały różnic w zakresie produkcji RFT w odpowiedzi na hipoksję-reoksygenację, niezależnie od czasu reoksygenacji. Podobną obserwację poczynili Cho i wsp. w badaniu wpływu hipoksji-reoksygenacji na izolowane z krwi obwodowej granulocyty dorosłych. Autorzy ci po

dwugodzinnej hipoksji i czterogodzinnej reoksygenacji nie stwierdzili zmian w zakresie produkcji  $H_2O_2$ , skądinąd dochodziło jednak do wzrostu ekspresji receptora TLR4. Wzrost produkcji RFT i dalsze zwiększenie ekspresji TLR4 następowało dopiero pod wpływem stymulacji LPS<sup>116</sup>.

Potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za obniżenie produkcji RFT w warunkach hipoksji-reoksygenacji w granulocytach mogą obejmować aktywność układów antyoksydacyjnych oraz wpływ czynników humoralnych. Podczas hipoksji dochodzi do układowego wzrostu adenozy, której ochronny wpływ jest szeroko dyskutowany w piśmiennictwie. Normalizacja następuje podczas reoksygenacji, a w warunkach układowej reakcji zapalnej proces ten ulega wydłużeniu<sup>117</sup>. Adenozyna hamuje aktywność prozapalną granulocytów za pośrednictwem receptora purynergicznego A2AR, jest jednak nieskuteczna w hamowaniu wybuchu oddechowego stymulowanego przez PMA<sup>118</sup>. Nie hamuje też produkcji RFT w granulocytach noworodka<sup>119</sup>. Z drugiej strony erytrocyty wydzielają enzym deaminazę adenozy, która może zmniejszać lub hamować ewentualny wzrost stężenia adenozy w warunkach hipoksji<sup>120</sup>. Ostatnio w niedokrwieniu-reperfuzji podkreśla się ochronną rolę białek opiekuńczych (chaperonowych) hamujących mechanizmy oksydacyjne. Udokumentowano uwalnianie HSP 70 z nieuszkodzonych komórek krwi pełnej i z izolowanej frakcji monocytów; początkowo szybkie, następnie wolniejsze utrzymujące się przez 24 godz.<sup>121</sup>.

## *NO*

W tej pracy obserwowano niższą produkcję NO w warunkach hipoksji-reoksygenacji w obu badanych populacjach granulocytów. W izolowanych granulocytach szczura Sethi i wsp. odnotowali wzrost stężenia azotynów pod wpływem hipoksji, który w następstwie reoksygenacji uległ obniżeniu, nie osiągając jednak wartości kontrolnych<sup>66</sup>. W warunkach hipoksji wysokościowej obserwowano jednak spadek stosunku układowych stężeń cytruliny do argininy i niższą produkcję NO<sup>122</sup>. W modelu reoksygenacji u nurków Sureda i wsp. zaobserwowali istotnie podwyższoną aktywność arginazy w granulocytach, co mogłoby sugerować obniżenie dostępności substratu; badacze ci nie stwierdzili jednak jednocześnie istotnych różnic w stężeniu wewnątrzkomórkowym metabolitów NO, azotynów, a także aktywności NOS<sup>243</sup>. Wydaje się zatem, że zwiększona aktywność arginazy mogła mieć znaczenie dla obserwowanego w tej pracy zjawiska. Opisano też zwiększoną aktywność arginazy w innych komórkach w warunkach hipoksji, reoksygenacji i niedokrwienia-reperfuzji. Efekt końcowy tego zjawiska zależy od rodzaju narządu; poza ośrodkowym układem nerwowym zwiększona aktywność arginazy nasila uszkodzenie tkanek<sup>123</sup>. W sepsie zaobserwowano związek między liczbą granulocytów we krwi krążącej i osoczową aktywnością arginazy<sup>124</sup>.

Zaobserwowany w tej pracy spadek produkcji NO w granulocytach krwi reoksygenowanej pośrednio nawiązuje do pracy Lan i wsp., którzy stwierdzili wzrost ekspresji integryn CD11b i CD18 w izolowanych granulocytach poddanych hipoksji-reoksygeancji *in vitro*<sup>96</sup>. Skądinąd udokumentowano ujemną korelację między ekspresją CD11b i CD18 a produkcją NO w granulocytach, jednak zjawisko to jest skomplikowane i zależy też od produkcji RFT<sup>125</sup>. Odnosnie aktywności NOS w tych warunkach w fagocytarnych komórkach jednojądrzastych autorzy nie do końca są zgodni. Do normalizacji obniżonej pod wpływem hipoksji aktywności NOS2 (przy stabilnej dostępności substratu, argininy) w makrofagach dochodziło wprawdzie w okresie reoksygenacji, ale dopiero po dłuższym czasie<sup>126,127</sup>. Większość prac wskazuje na zwiększenie ekspresji NOS2 pod wpływem hipoksji, jednak z towarzyszącym spadkiem ilości wewnątrzkomórkowego NO<sup>128</sup>.

### 5.1.2. Wpływ czasu inkubacji

Postępujący spadek produkcji RFT w miarę trwania czasu inkubacji nawiązuje do obserwacji McGovern i wsp., którzy w izolowanych granulocytach inkubowanych w warunkach hipoksji odnotowali znacząco niższy spadek fluorescencji dihydrofluoresceiny po dłuższym czasie inkubacji<sup>57</sup>. Wśród prawdopodobnych przyczyn obserwowanego w tej pracy obniżenia produkcji RFTiA w obu badanych populacjach granulocytów po dłuższym czasie reoksygenacji należy wymienić czynniki związane z równowagą kwasowo-zasadową i metabolizmem komórek. 300-min czas inkubacji wiązał się z występowaniem kwasicy krwi pełnej pępowinowej i dorosłych ochotników w porównywaniu do krótszego, 75-min czasu inkubacji. Wykazano, że równowaga kwasowo-zasadowa ma istotne znaczenie dla czynności komórek w modelu *in vitro* hipoksji reoksygenacji, a efekt reoksygenacji zależy od pH medium; zjawisko to obserwowano w odniesieniu do ekspresji ICAM-1 w komórkach śródbłonna (maksymalny efekt przy pH 7,0)<sup>129</sup>. Tzw. kwaśna reoksygenacja wiąże się z poprawą czynności śródbłonna i zmniejszeniem rozległości martwicy w preparatach mięśnia sercowego, w komórkach nerwowych natomiast działa uszkadzająco<sup>130,131</sup>.

Kwasica zewnątrzkomórkowa wpływa na obniżenie pH śródkomórkowego (pHi) w granulocytach obojętnochłonnych. Istnieje zależność między pH a odpowiedzią granulocytów na stymulację PMA. W badaniu Suzuki i wsp. w warunkach obniżonego pod wpływem stymulacji PMA pHi, dystrybucja błonowa izoform PKC ( $\beta$  i  $\delta$ ) była upośledzona<sup>132</sup>. Z kolei dochodziło do obniżenia aktywności NOX2, a wewnątrzkomórkowa akumulacja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w granulocytach obojętnochłonnych stymulowanych PMA była niższa w związku z nieprawidłową translokacją p47<sup>phox</sup> (fosforylacja następuje pod wpływem PMA) do błony komórkowej, nie wpływała natomiast na wewnątrzkomórkową dystrybucję p22<sup>phox</sup><sup>133</sup>. W granulocytach opisano ostatnio związek kwasicy

zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej z upośledzeniem formowania zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych NET, zależnej od produkcji RFT i NO<sup>134,135</sup>. Khan i wsp. obserwowali wzrost produkcji RFT (oceniany, podobnie jak w tej pracy, metodą cytometryczną z zastosowaniem DHR) i NET w granulocytach niestymulowanych i stymulowanych PMA po zwiększeniu pH przy użyciu roztworu wodorowęglanu sodu i THAM<sup>134</sup>. U chorych septycznych odnotowano ścisły związek kwasicy z hamowaniem tworzenia NET, które z kolei rzutowało na pogorszenie rokowania<sup>135</sup>. U szczurów z doświadczalnym uszkodzeniem płuca (ALI) również obserwowano ścisłą korelację między kwasicą a produkcją RFT przez granulocyty krwi obwodowej<sup>136</sup>.

W zastosowanym w tej pracy modelu krwi pełnej hamujący wpływ kwasicy na produkcję RFT przez granulocyty może być kompensowany przez efekt prozapalny na inne komórki – może np. dochodzić do zwiększenia wydzielania IL-1 przez monocyty<sup>137</sup>. We krwi heparynizowanej obserwowano też aktywację układu dopełniacza<sup>138</sup>.

Wydaje się, że w tej pracy do obserwowanej niższej wewnątrzkomórkowej produkcji RFT i NO mógł się przyczynić narastający w miarę czasu trwania inkubacji niedobór glukozy, który jest silnym bodźcem hamującym wybuch oddechowy w granulocytach<sup>115</sup>. W wyniku zmniejszenia dostępności glukozy może dochodzić do obniżenia jej stężenia wewnątrzkomórkowego i produktu jej przemiany przez heksokinazę-glukozo-6-fosforanu. Ponieważ związek ten jest substratem cyklu pentozofosforanowego, może dochodzić do zmniejszenia stężenia NADPH. Wykazano, że produkcja RFT (której miarą była fluorescencja DHR) w granulocytach stymulowanych PMA zależy od dostępności glukozy: przy braku glukozy wybuch oddechowy był znacząco obniżony<sup>139</sup>. W warunkach narastającego obniżenia dostępności glukozy – substratu energetycznego w zastosowanym modelu obniżenie produkcji RFT, narastające w miarę trwania czasu inkubacji, może odzwierciedlać niewydolność energetyczną komórki.

Wzrost produkcji śródkomórkowego NO w miarę trwania inkubacji (niezależny od faktu hamowania w wyniku hipoksji-reoksygenacji) obserwowano w granulocytach stymulowanych PMA porównywalnie w obu badanych populacjach. Wzrost stężenia metabolitów NO, azotynów, w miarę trwania inkubacji powyżej 60 min został zaobserwowany w granulocytach stymulowanych LPS<sup>140</sup>. W tej pracy wzrastająca produkcja wewnątrzkomórkowego NO w miarę trwania inkubacji mogła przyczynić się do narastającego spadku RFT. NO hamuje NOX w mechanizmie interakcji z podjednostką p47<sup>phox</sup><sup>141</sup>. Jednak spadek produkcji RFT w miarę trwania czasu inkubacji został odnotowany tylko w populacji granulocytów krwi pępowinowej. Może to wynikać z różnic czynnościowych dotyczących NOX2 w granulocytach krwi pępowinowej<sup>54</sup>. Wydaje się, że u podłoża tego zjawiska mógł leżeć spadek stężenia glukozy i kwasica. Z kolei kwasica, powodując

zwiększenie nieenzymatycznej produkcji NO w wyniku redukcji azotynów, mogła być przyczyną wzrastającej w miarę trwania czasu inkubacji wzrostu wewnątrzkomórkowej produkcji NO.

### 5.1.3. Różnice między granulocytami krwi pępowinowej i dorosłych

Zasadniczo granulocyty krwi pępowinowej i krwi dorosłych wykazywały zarówno jakościowo, jak i ilościowo, podobną reakcję na reoksygenację w aspekcie produkcji RFT i NO. W niestymulowanych granulocytach krwi pępowinowej obserwowano jednak wyższe wartości wewnątrzkomórkowej produkcji NO. W poprzednim badaniu przeprowadzonym w Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej, w granulocytach izolowanych z krwi pępowinowej nie stwierdzono różnic w zakresie spoczynkowej wewnątrzkomórkowej produkcji NO w porównaniu z granulocytami osób dorosłych, zaobserwowano przy tym niższą aktywność enzymatyczną izoform NOS w komórkach noworodka potwierdzoną na poziomie transkrypcyjnym<sup>52</sup>. Obserwacja poczyniona w tej pracy wynika zatem najprawdopodobniej z wpływu warunków mikrośrodowiska krwi pełnej, albo jest związana z procedurą izolacji granulocytów. We krwi pępowinowej w warunkach porodu naturalnego obserwuje się zwiększone stężenia czynników prozapalnych i hormonów, które mogą stymulować produkcję NO<sup>52</sup>. Jednak, w warunkach krwi pełnej NO produkowany wewnątrzkomórkowo szybko dyfunduje przez błonę komórkową i może przechodzić do erytrocytów, gdzie reaguje z oksyhemoglobina i zostaje utlenowany do azotynu<sup>142</sup>. Erytrocyty płodowe mają większą zdolność wychwytywania NO w związku z większym powinowactwem hemoglobiny płodowej do NO<sup>143</sup>. Wydaje się, że jednym z możliwych czynników wpływających na wyższe wewnątrzkomórkowe stężenie NO w niestymulowanych granulocytach w mikrośrodowisku krwi pełnej pępowinowej może być bilirubina, której stężenie jest fizjologicznie we krwi pępowinowej wyższe, niż u dorosłych. U chorych z marskością wątroby obserwowano wyższe stężenia azotynów w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej<sup>144</sup>; późniejsze doniesienia udokumentowały stymulujący wpływ bilirubiny na NOS2 i NOS3 w komórkach śródbłonna<sup>145,146</sup>. Porównywalne wartości stymulowanej PMA wewnątrzkomórkowej produkcji NO między granulocytami krwi pępowinowej i dorosłych, w zestawieniu z wyższymi wartościami w niestymulowanych komórkach noworodka, świadczą o niższym potencjale stymulacyjnym granulocytów noworodka. Zjawisko to jest zgodne z zaobserwowaną w poprzednim badaniu niższą aktywnością enzymatyczną NOS w granulocytach krwi pępowinowej<sup>52</sup>.

Jedynie opublikowane badanie porównawcze na temat wpływu hipoksji na granulocyty obojętnochłonne krwi pępowinowej i dorosłych dotyczyło aktywności L-selektyny (CD62L); zahamowanie jej ekspresji następuje w wyniku stymulacji zapalnej tych komórek. Pod wpływem 6-godzinnej hipoksji zaobserwowano znacząco niższą ekspresję CD62L w granulocytach dorosłych, sugerując względną odporność granulocytów krwi pępowinowej na warunki obniżonej dostępności

tlenu<sup>105</sup>. W tej pracy, mimo braku zasadniczych różnic ilościowych w reakcji na hipoksję-reoksygenację między granulocytami noworodków i dorosłych, dotyczących badanej produkcji RFT i NO, niewykluczone, że mechanizm tych reakcji może być odrębny. We krwi pępowinowej znajduje się zwiększony odsetek form mniej dojrzałych; w niedojrzałych, posiadających większą ilość mitochondriów granulocytach (c-kit+) w porównaniu z formami dojrzałymi (c-kit-) w mikrośrodowisku nowotworowym stwierdzono zwiększone zużycie tlenu w warunkach kwasicy, a także zależność między aktywnością mitochondriów a wybuchem oddechowym w stanie niedoboru glukozy<sup>147</sup>.

## 5.2. Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję RFT i A w granulocytach obojętnochłonnych pełnej krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach hipoksji-reoksygenacji

W tej pracy zaobserwowano stymulujący wpływ anestetyków lokalnych na wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych inkubowanych w warunkach hipoksji-reoksygenacji. Zjawisko to występowało zarówno w granulocytach krwi pępowinowej i dorosłych.

W warunkach normoksji anestetyki lokalne wywierają efekty przeciwzapalne i hamują wybuch oddechowy, co udokumentowano zarówno w granulocytach izolowanych, jak i we krwi pełnej<sup>85,89,90</sup>, działają natomiast stymulująco na produkcję NO w granulocytach izolowanych<sup>52,148</sup>. Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że hipoksja-reoksygenacja odwraca wpływ anestetyków na produkcję RFT, natomiast w przypadku produkcji NO dochodzi do jej nasilenia, podobnie, jak w przypadku normoksji.

Częściowe wyrównanie wpływu hipoksji-reoksygenacji pod wpływem lidokainy w aspekcie ekspresji integrzyn (zależnej od produkcji RFT i NO) w izolowanych granulocytach dorosłych opisali Lan i wsp. Lidokaina powodowała względny spadek ekspresji CD11b i CD18 ulegającej podwyższeniu w warunkach hipoksji-reoksygenacji już w stężeniu istotnym klinicznie u osób dorosłych (odpowiadającym zastosowanej w tej pracy kategorii 2)<sup>96</sup>. W innej pracy badacze ci zaobserwowali, że do zmniejszenia ekspresji integrzyn CD11b, CD18 dochodziło pod wpływem preekspozycji na lidokainę zależnie od stężenia i inkubacji z osoczem krwi pobranej 15 min po zwolnieniu uciśnięcia mankieta zaciskającego kończynę, wskazując na istotny udział czynników pochodzenia osoczowego<sup>95</sup>.

W mechanizmie obserwowanych zmian przekąźnictwo sygnału związane z HIF1 $\alpha$ , przynajmniej dla lidokainy i bupiwakainy, przypuszczalnie nie ma znaczenia<sup>149</sup>. Poza tym hipoksyczna aktywacja HIF w granulocytach była obserwowana po 6 godzinach<sup>150</sup>.

### 5.2.1. Rodzaj anestetyku, stężenie

W modelu porównawczym analizy wieloczynnikowej wykazano, że w odniesieniu do produkcji zarówno RFT jak i NO najistotniejszy efekt globalnie we wszystkich granulocytach i granulocytach stymulowanych PMA wywierała ropiwakaina. Ranking wzrostu RFT ogólnie w reoksygenowanych granulocytach poddanych preekspozycji na anestetyki lokalne w odniesieniu do efektu środków był następujący: ropiwakaina>lidokaina=bupiwakaina, a w granulocytach stymulowanych: ropiwakaina>bupiwakaina>lidokaina. Odnośnie wzrostu produkcji NO ranking przedstawiał się następująco: ropiwakaina>lidokaina>bupiwakaina, a w komórkach stymulowanych: ropiwakaina>lidokaina=bupiwakaina.

Ropiwakaina, anestetyk powszechnie stosowany w blokadach regionalnych zarówno w położnictwie, jak i chirurgii z uwagi na korzystny profil toksykologiczny, okazuje się być związkiem potencjalnie przydatnym w leczeniu zmian związanych z hipoksją. Pod wpływem blokady zewnątrzoponowej w odcinku piersiowym z użyciem ropiwakainy Yu i wsp. zaobserwowali odwrócenie efektu przewlekłej hipoksji w postaci nadciśnienia płucnego i przebudowy ściany naczyniowej (remodeling), a także wzrostu stężeń w surowicy cGMP i TNF- $\alpha$ , które ulegały normalizacji. Blokada powodowała też odwrócenie podwyższonej w następstwie hipoksji zwiększonej ekspresji związanego z odpowiedzią na hipoksję czynnika transkrypcyjnego CREB (Cyclic AMP responding-element binding protein) na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym<sup>151</sup>. Wyniki tych badań wskazują wprawdzie w pierwszym rzędzie korzystny wpływ blokady współczulnej w niwelowaniu patofizjologicznych następstw hipoksji spowodowanych zwieszoną aktywacją współczulną, ale bezpośredni wpływ ropiwakainy jest niewykluczony. Tym bardziej, że środek ten, w przeciwieństwie do lidokainy i bupiwakainy wykazuje zdolność modulacji przekąźnictwa sygnału związanego z THXA2, który uczestniczy w patogenezie nadciśnienia płucnego<sup>152</sup>. Skądinąd niewykluczone, że preferencyjny wpływ ropiwakainy na granulocyty, zaobserwowany w tej pracy, może też być związany z tym zjawiskiem; granulocyty produkują prostanoidy, w tym TXA2, do stymulacji produkcji dochodzi pod wpływem PMA; TXA2 pełni też szczególną rolę we wzajemnych oddziaływaniach granulocytów i limfocytów T<sup>153</sup>. W krwinkach płytkowych analogi TXA2 powodowały wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji ROS w mechanizmie aktywacji NOX2<sup>154</sup>. W odniesieniu do produkcji NO preferencyjny efekt ropiwakainy może mieć związek z chiralnością związku; zjawisko to jest jednak skomplikowane, dotyczy zwłaszcza izoformy NOS1 i jest związane z dostępnością substratu i kofaktorów<sup>73,155</sup>. W warunkach normoksji preekspozycja granulocytów stymulowanych PMA z anestetykami lokalnymi prowadziła do zwiększenia ekspresji izoform na poziomie transkrypcyjnym, przy czym ropiwakaina nie wpływała na granulocyty krwi pępowinowej. Anestetyk ten wywierał istotny

wpływ na NOS2 w granulocytach dorosłych, bez istotnego efektu na pozostałe dwie izoformy pełniące przede wszystkim rolę regulacyjną w odniesieniu do NOS2. Wpływ lidokainy był porównywalny, jednak związek ten stymulował także dwie pozostałe izoformy, a zwłaszcza hamującą NOS3, stąd w efekcie końcowym wpływ ropiwakainy na wewnątrzkomórkową produkcję NO okazał się najistotniejszy<sup>52</sup>. Wyniki te nawiązują zatem do uzyskanych w niniejszej pracy.

W tej pracy ropiwakaina globalnie wywoływała efekt farmakologiczny w odniesieniu do produkcji RFT we wszystkich zastosowanych stężeniach z wyjątkiem przedostatniego (kategoria (3), w przeciwieństwie do bupiwakainy, która stymulowała produkcję RFT w granulocytach krwi reoksygenowanej tylko w najwyższym stężeniu. Znaczenie stężenia lidokainy dla tego zjawiska okazało się nieistotne. W poprzedniej pracy oceniającej wpływ anestetyków lokalnych na granulocyty krwi pępowinowej i dorosłych w warunkach normoksji obserwowaliśmy efekt hamowania produkcji RFT w przypadku lidokainy w najwyższym stężeniu, natomiast bupiwakaina w tym stężeniu, w przeciwieństwie do stężeń niższych, RFT nie hamowała<sup>90</sup>. Zjawisko to mogło wynikać z kompensującego wpływu mtRFT, ponieważ bupiwakaina w wysokich stężeniach może powodować rozprężenie łańcucha oddechowego w mitochondriach<sup>76</sup>. Obserwacja poczyniona w tej pracy może potwierdzać tę koncepcję; bupiwakaina w najwyższym stężeniu w granulocytach reoksygenowanych mogła potencjalizować efekt stymulacji mtRFT. Ostatnio wykazano potencjalizujący efekt ropiwakainy na produkcję mtRFT w komórkach raka piersi<sup>156</sup>. Preekspozycja na ropiwakainę we wszystkich użytych stężeniach potencjalizowała efekt wzrostu wewnątrzkomórkowej produkcji NO w reoksygenowanych granulocytach stymulowanych PMA. Dla porównania, w przypadku bupiwakainy i lidokainy powyższa interakcja między kategorią stężenia i stymulacją występowała tylko w dwóch najwyższych stężeniach (kategoria (3) i (4). Zatem jedynie wpływ ropiwakainy mógłby mieć znaczenie kliniczne w odniesieniu do granulocytów płodu i noworodka (najniższe stężenia); wpływ pozostałych anestetyków może mieć znaczenie w warunkach znieczulenia regionalnego u dorosłych. Jednak odnośnie reoksygenowanych granulocytów krwi pępowinowej w analizie wieloczynnikowej zaobserwowano jedynie stymulację produkcji NO pod wpływem lidokainy w najwyższym stężeniu, klinicznie nieistotnym.

Globalnie we wszystkich reoksygenowanych granulocytach stymulowanych PMA lidokaina charakteryzowała się najsłabiej wyrażonym efektem stymulacji RFT. Wprawdzie lipofilność lidokainy jest porównywalna z lipofilnością ropiwakainy i niższa od bupiwakainy, jednak lidokaina najsłabiej wpływa na fluidyzację błon biomimetycznych, co koresponduje też z najniższą kardiotoxycnością spośród badanych anestetyków<sup>73</sup>. Skądinąd lidokainie poświęcono wiele zainteresowania w aspekcie jej ewentualnej przydatności w zespołach reperfuzyjnych. Na przykład



pod wpływem lidokainy udokumentowano poprawę żywotności płyta tkankowego poddanego niedokrwieniu-reperfuzji, zmniejszając ilość produktów peroksydacji lipidów (MDA), jednak nie modyfikując nacieku granulocytów i zawartości MPO (wskaźnika aktywności granulocytów w tkance<sup>106</sup>.

Upośledzenie procesów hamowania produkcji RFT w granulocytach pod wpływem hipoksji-reoksygenacji zaobserwowane w tej pracy (wyższa wewnątrzkomórkowa produkcja RFT w porównaniu do analogicznych warunków doświadczenia bez inkubacji z anestetykiem) może wynikać z modulacji molekularnych struktur błonowych zaangażowanych w efekty anestetyków, w tym białek Gαq i kanałów jonowych, a także zmian strukturalno-czynnościowych błony komórkowej. Hipoksja może prowadzić do modulacji białek Gαq; w tętnicy płucnej wykazano zwiększenie ich palmitoylacji<sup>157</sup>. W odpowiedzi adaptacyjnej na hipoksemię może dochodzić do obniżenia ekspresji kanałów sodowych napięciowozależnych, których obecność wykazano ostatnio w granulocytach<sup>158,159</sup>.

Domena lipidowa w chemicznej strukturze anestetyków lokalnych jest odpowiedzialna za interakcje tych związków z błonami komórkowymi. Hipoksja i reoksygenacja wywierają znaczący wpływ na dynamikę ruchu błon (trafficking): hipoksja działa przyspieszająco, podczas gdy reoksygenacja powoduje stabilizację<sup>160</sup>. Preekspozycja komórek na anestetyki lokalne może przypuszczalnie wpływać na te reakcje. Reorganizacja błon w wyniku wzajemnych oddziaływań ze związkami hydrofobowymi prowadzi do zwiększonej ekspozycji fosfolipidów błonowych na czynniki zewnętrzne, a tym samym może nasilać degradację tych związków. Jednym z produktów reakcji jest kwas arachidonowy, który może zwiększać produkcję RFT w granulocytach przez bezpośrednią aktywację kompleksu NOX2 oraz hamowanie I i III kompleksu mitochondrialnego<sup>161</sup>.

Zarówno hipoksja-reoksygenacja, jak i anestetyki lokalne mogą wywierać wpływ na czynność mitochondriów, które wprawdzie w granulocytach są mniej liczne, jednak pełnią ważną rolę w przekaźnictwie sygnału<sup>162,163</sup>. W warunkach hipoksji, zwiększonej ekspresji HIF-1 i zahamowania czynności mitochondriów obserwowano zmniejszenie efektu toksycznego lidokainy, śmierci komórki i produkcji RFT<sup>164</sup>. Niedokrwienie (hipoksja) wpływa modulująco na czynność kompleksu I i jego przechodzenie ze stanu aktywnego (A, active) do nieaktywnego (D, dormant) zależnie od warunków i dynamiki tego procesu<sup>162</sup>. W mysich granulocytach zahamowanie mitochondrialnego kompleksu I (przy użyciu metforminy) wiązało się ze wzrostem wewnątrzkomórkowej produkcji RFT<sup>165</sup>. Bupiwakaina może też działać w tym mechanizmie<sup>163</sup>, wpływ na aktywność mitochondriów wykazano też w przypadku lidokainy i ropiwakainy<sup>166,167</sup>. W granulocytach ludzkich mtRFT aktywowały NOX2 i procesy degranulacji, mogły też zatem prowadzić do uwolnienia zmagazynowanej w ziarnistościach NOS2 i wzrostu produkcji RFT

i NO<sup>48,49</sup>. Zjawiskiem sprzyjającym zwiększonej przepuszczalności megakanałów i produkcji RFT może być wzrost pH<sup>168</sup>, do którego dochodzi w wyniku ekspozycji na anestetyki lokalne<sup>169</sup>.

Inny ewentualny mechanizm wzrostu RFT pod wpływem anestetyków lokalnych w warunkach hipoksji-reoksygenacji może się wiązać ze zwiększeniem aktywności AMPK. Wykazano, że nadekspresja AMPK $\alpha$ 2 zwiększa produkcję RFT i apoptozę w komórkach neuroblastoma inkubowanych z bupiwakainą<sup>25</sup>.

### 5.2.2. Czas reoksygenacji

Uzyskane wyniki wskazują, że ekspozycja na anestetyki nie wpływała na zaobserwowane w warunkach kontrolnych (bez anestetyków) różnice produkcji RFT i NO w zależności od długości czasu trwania reoksygenacji. Wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji RFT w stymulowanych granulocytach krwi reoksygenowanej inkubowanej z wszystkimi zastosowanymi anestetykami lokalnymi był, podobnie jak w przypadku krwi z dodatkiem buforu bez anestetyku, wyższy po krótkim 15-minutowym w porównaniu z 240-minutowym czasem reoksygenacji. Istotna interakcja między czynnikami 'stymulacja' i 'atmosfera', podobnie jak w przypadku komórek nie poddanych preekspozycji na anestetyk, wskazuje na potencjalizację wpływu stymulacji PMA przez warunki hipoksji-reoksygenacji w zależności od czasu ich trwania. Wydaje się, że za efekt ten może być m.in. odpowiedzialna współistniejąca kwasica, w mechanizmie omówionym wyżej. Wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji NO pod wpływem anestetyków, wyższy w przypadku dłuższego czasu reoksygenacji, może odzwierciedlać wzajemne oddziaływania między układem NOX2 i NOS. Przy dłuższej reoksygenacji względny spadek produkcji oksydantów może odblokowywać zależne od nich mechanizmy enzymatyczne, a współistniejąca kwasica prowadzić do zwiększonej redukcji wewnątrzkomórkowych metabolitów NO (azotynów) do NO.

### 5.2.3. Różnice między grupami

Globalnie, niezależnie od rodzaju anestetyku, produkcja RFT w granulocytach reoksygenowanej krwi pępowinowej poddanej preekspozycji na anestetyki była niższa niż u dorosłych w obu czasach reoksygenacji; nie odnotowano różnic między długością trwania reoksygenacji w żadnej z badanych populacji. Stężenie anestetyku nie miało istotnego wpływu na efekt stymulacji produkcji NO w granulocytach krwi pępowinowej (w przeciwieństwie do komórek osób dorosłych). Efekt ten był bardziej istotny w niestymulowanych granulocytach noworodka.

Zjawisko to można odnieść do różnic w budowie błon komórek krwi pępowinowej w porównaniu z dorosłymi. Błony komórek krwi pępowinowej charakteryzują się niższą płynnością, niższym stężeniem cholesterolu i niższym stosunkiem nienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych,

co daje w efekcie niższą przepuszczalność i wyższą lepkość<sup>170,171</sup>. Ostatnio wykazano bezpośredni związek między zawartością cholesterolu w błonach i efektem anestetyków lokalnych: im niższa zawartość cholesterolu w błonie, tym większy efekt destabilizacji<sup>172</sup>. Skądinąd granulocyty krwi pępowinowej o sztywniejszych błonach komórkowych wykazują obniżenie funkcji efektorowych związanych z aktywnością oksydacyjną, np. chemotaksji oraz odrębnościami czynnościowymi struktur błonowych, m.in. receptorów<sup>173</sup>.

W tej pracy w wieloczynnikowej analizie różnic pomiędzy badanymi populacjami w odniesieniu do poszczególnych badanych anestetyków zarysowują się jednak pewne odrębności. Odnosnie granulocytów krwi pępowinowej poddanych preekspozycji na ropiwakainę różnice dotyczyły produkcji RFT: była ona wyższa niż u dorosłych po krótszym czasie reoksygenacji. Możliwe, że wpływająca na efekt farmakologiczny enancjomerów lewoskrętnych niższa zawartość cholesterolu w błonie granulocytów krwi pępowinowej implikuje mniejsze nasilenie efektu ropiwakainy przeciwnego do hamowania RFT w warunkach reoksygenacji bez dodatku anestetyku<sup>73</sup>. Granulocyty noworodka inkubowane z bupiwakainą i lidokainą różniły się od dorosłych w zakresie wyższej wewnątrzkomórkowej niestymulowanej produkcji NO. W przypadku istotnego klinicznie najniższego zastosowanego stężenia lidokainy, zaobserwowano dodatkowo wyższą produkcję NO. Różnice te wskazują na zasadniczo odrębny mechanizm wpływu ropiwakainy oraz lidokainy i bupiwakainy. Jednak wspomniany już wyżej jedynie stymulujący efekt lidokainy w najwyższym, 4mM stężeniu na produkcję NO w reoksygenowanych granulocytach krwi pępowinowej wykazany w analizie wieloczynnikowej przemawia za brakiem istotnego znaczenia klinicznego ekspozycji na anestetyki lokalne w aspekcie modulacji produkcji RFT i NO przez reoksygenowane granulocyty noworodka.

### 5.3. Ograniczenia pracy

Ograniczenia pracy są związane przede wszystkim z zastosowanym modelem doświadczalnym nierozcieńczonej pełnej krwi żyłnej. Badanie granulocytów we krwi pełnej ma niewątpliwe zalety związane z oceną komórek w mikrośrodku bardziej zbliżonym do fizjologicznego, a przede wszystkim z uniknięciem procedury izolowania komórek, nieobojętnej dla ich stanu czynnościowego. Granulocyty w środowisku krwi pełnej wykazują istotnie niższą zdolność adhezji do komórek śródbłonna niż granulocyty izolowane. Procedura izolacji wpływa w większym stopniu na granulocyty niż na inne frakcje leukocytów<sup>174</sup>. Wpływ hipoksji-reoksygenacji na czynność granulocytów w modelu krwi pełnej był poprzednio opisywany<sup>63,105</sup>. Ograniczenia tego modelu obejmują wolne obniżanie prężności tlenu, która we krwi pełnej jest kompensowana przez deoksygenację hemoglobiny, zwłaszcza jeżeli krwi nie poddano uprzednio ekwilibracji<sup>175</sup>. Z kolei ten proces wymaga dodania buforu w związku z zasadowicą spowodowaną wypłukaniem CO<sub>2</sub> i intensywnego mieszania, co może wpływać na czynność komórek<sup>105,176</sup>. Model nie pozwalał na określenie rzeczywistego stopnia hipoksji – otwarcie komory hipoksycznej wiązało się z reekspozycją na warunki normoksji.

Badania *in vitro* nie odzwierciedlają wprost warunków klinicznych i występuje w nich szereg odrębności w porównaniu do warunków *in vivo*. Zjawisko hipoksji-reoksygenacji w środowisku naczyń jest modyfikowane przez wpływ komórek ściany naczyniowej, zwłaszcza komórek śródbłonna, dochodzi też do wymiany między naczyniem i otaczającą tkanką. Zastosowany model miał charakter statyczny i kumulacja mediatorów uwalnianych w przebiegu hipoksji-reoksygenacji w osoczu oraz wzajemne oddziaływania między komórkami, zwłaszcza pod wpływem aktywacji PMA, mogły niewątpliwie wpływać na uzyskane wyniki. To samo dotyczy narastającej kwasicy i ograniczonego dostępu do substratów energetycznych, przede wszystkim glukozy, w związku z hipoglikemią narastającą we krwi pełnej *in vitro*<sup>115</sup>. Wpływ anestetyków lokalnych na czynność granulocytów obojętnochłonnych badano w komórkach izolowanych oraz we krwi pełnej<sup>85,90</sup>. Model krwi pełnej, mimo opisanych wyżej zalet, nie pozwala na dokładne określenie stężenia środków, m.in. w związku z wiązaniem z białkami osocza. Kolejne ograniczenie stanowi niepełna specyficzność zastosowanych fluorochromów, zwłaszcza DHR123. Mimo szerokiego zastosowania DHR123 w ocenie wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, fluorescencja Rho123 może być efektem reakcji DHR123 z RFT i z ONOO<sup>-103</sup>.

## 6. WNIOSKI

1. Hipoksja-reoksygenacja *in vitro* hamuje wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych w mikrośrodkowisku pełnej krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników.
2. Zjawisko to występuje z różnym nasileniem w warunkach wczesnej i późnej reoksygenacji i jest porównywalne w obu badanych populacjach granulocytów.
3. Ekspozycja na bupiwakainę, lidokainę i ropiwakainę może modulować wpływ hipoksji-reoksygenacji podwyższając produkcję RFT i NO w granulocytach. W granulocytach krwi pępowinowej efekty te nie mają znaczenia klinicznego.



## 7. STRESZCZENIE

**Założenia:** Procesy hipoksji-reoksygenacji leżą u podłoża chorób obarczonych dużą śmiertelnością u noworodków i u osób dorosłych. Granulocyty obojętnochłonne biorą czynny udział w reakcji zapalnej w przebiegu hipoksji-reoksygenacji, a produkowane przez nie mediatory, m.in. reaktywne formy tlenu i azotu (RFTiA), w tym tlenek azotu (NO), uczestniczą w uszkodzeniu reoksygenacyjnym. Anestetyki lokalne modulują produkcję RFT i NO w granulocytach noworodka w stopniu porównywalnym lub niższym niż u osób dorosłych. Efekty te mogą występować już w stężeniach istotnych klinicznie, tj. obserwowanych w krążeniu noworodka po podaniu zewnątrzoponowo anestetyków matce podczas blokad centralnych w okresie porodu. W literaturze wskazano, że granulocyty noworodkowe mogą charakteryzować się większą odpornością na warunki hipoksji (zmieniony profil ekspresji cząstek adhezyjnych), z drugiej jednak strony anestetyki lokalne mogą odwrócić efekt reoksygenacji poprzez oddziaływanie na integryny granulocytarne. Nie wiadomo, czy anestetyki lokalne mogą wpływać na produkcję RFT i NO w granulocytach noworodka w warunkach hipoksji-reoksygenacji.

**Cel:** Celem pracy była ocena (1) wpływu hipoksji reoksygenacji *in vitro* na produkcję RFT i NO przez granulocyty obojętnochłonne krwi pełnej pępowinowej w porównaniu z granulocytami dorosłych ochotników; (2) efektów bupiwakainy, lidokainy i ropiwakainy na te procesy.

**Materiał i metody:** Pełną krew pępowinową (n=16) lub obwodową krew żylną (n=16) poddawano ekspozycji na atmosferę hipoksyczna 1% O<sub>2</sub> przez 60 min, a następnie inkubowano w atmosferze 21% O<sub>2</sub> przez 15 i 240 min. Część prób inkubowano z anestetykami lokalnymi w 4 równopotencjalnych stężeniach: 0,0005; 0,005; 0,05; 1 mM bupiwakainą, 0,002; 0,02; 0,2; 4 mM lidokainą oraz 0,0007; 0,007; 0,07; 1,4 mM ropiwakainą. Najniższe zastosowane stężenia były istotne klinicznie dla granulocytów noworodka. Wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach niestymulowanych i stymulowanych PMA mierzono metodą cytometryczną z wykorzystaniem odpowiednio dihydrorodaminy 123 (DHR123) i dwuocianu 4,5-diaminofluoresceiny (DAF-2DA). W opracowaniu statystycznym zastosowano metodę wieloczynnikowej analizy wariancji.

**Wyniki:** Reoksygenowane granulocyty krwi pełnej wykazywały niższą produkcję RFT i NO niż inkubowane w warunkach kontrolnych (normoksycznych), porównywalną w obu badanych populacjach komórek. W miarę trwania czasu inkubacji produkcja RFT zmniejszała się, a produkcja NO wzrastała. Inkubacja z anestetykami lokalnymi wpływała na wzrost produkcji RFT i NO w reoksygenowanych granulocytach krwi pępowinowej i krwi dorosłych. W analizie wieloczynnikowej zaobserwowano następujące efekty globalne: (1) bupiwakaina, i w większym stopniu ropiwakaina, podwyższały produkcję RFT w granulocytach, (2) wszystkie badane

anestetyki powodowały wzrost produkcji NO w stymulowanych granulocytach, efekt ropiwakainy dotyczył wszystkich badanych stężeń, (3) ekspozycja na anestetyki lokalne nie wpływała na obserwowane trendy produkcji RFT i NO w dwóch zastosowanych czasach reoksygenacji, (4) w granulocytach inkubowanych z ropiwakainą produkcja RFT i NO była wyższa niż w przypadku bupiwakainy i lidokainy. W granulocytach krwi pępowinowej istotny efekt stymulacji zaobserwowano tylko odnośnie produkcji NO pod wpływem 4 mM lidokainy.

**Wnioski:** (1) Hipoksja-reoksygenacja *in vitro* hamuje wewnątrzkomórkową produkcję RFT i NO w granulocytach obojętnochłonnych w mikrośrodkowisku pełnej krwi pępowinowej oraz krwi dorosłych ochotników. (2) Zjawisko to występuje z różnym nasileniem w warunkach wczesnej i późnej reoksygenacji i jest porównywalne w obu badanych populacjach granulocytów. (3) Ekspozycja na bupiwakainę, lidokainę oraz ropiwakainę może modulować wpływ hipoksji-reoksygenacji, podwyższając produkcję RFT i NO w granulocytach krwi pępowinowej i krwi dorosłych. W granulocytach krwi pępowinowej efekty te nie mają znaczenia klinicznego.



## 8. ABSTRACT

### **Title: Effects of local anaesthetics on reactive oxygen and nitrogen species in umbilical cord blood neutrophils in hypoxia-reoxygenation *in vitro***

**Background:** Hypoxia and reoxygenation underlie the pathophysiology of neonatal and adult diseases with high mortality rates. Neutrophils are important players in inflammatory phenomena during hypoxia- reoxygenation, and by secreted mediators, i.e., reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS), including nitric oxide (NO), may contribute to reoxygenation injury. Local anaesthetics are able to modulate ROS and (NO) production in neonatal neutrophils comparatively or to a lower degree than in adult blood neutrophils. These effects are detected already at clinically relevant concentrations, observed in neonatal circulation after maternal epidural blockade for labour anaesthesia/analgesia. It has been suggested that neonatal neutrophils may be more resistant to hypoxia regarding the expression of adhesion molecules; on the other hand, local anaesthetics are potentially able to revert reoxygenation effects on neutrophil integrins. Whether local anaesthetics may impact ROS and NO production in neonatal neutrophils under hypoxia-reoxygenation is not known.

**Objective:** The aims of the study were to evaluate: (1) the influence of *in vitro* hypoxia-reoxygenation on ROS and NO production in whole umbilical cord blood neutrophils as compared to adult whole blood neutrophils, (2) effects of bupivacaine, lidocaine and ropivacaine on these phenomena.

**Methods:** Umbilical cord blood (n=16) and adult whole blood (n=16) samples were exposed to hypoxic atmosphere (1% O<sub>2</sub>) for 60 min, and then incubated in 21% O<sub>2</sub> for 15 and 240 min. Some samples were exposed to local anaesthetics at four equipotential concentration: 0,0005; 0,005; 0,05; 1 mM bupivacaine, 0,002; 0,02; 0,2; 4 mM lidocaine, and 0,0007; 0,007; 0,07; 1,4 mM ropivacaine. The lowest concentrations used were clinically relevant for neonatal neutrophils. Intracellular neutrophil ROS and NO generation were measured cytometrically in unstimulated and PMA-stimulated cells using dihydrorhodamine 123 and 4,5-diaminofluorescein diacetate, respectively. Statistical analysis included multifactorial analysis of variance (ANOVA).

**Results:** In reoxygenated whole blood neutrophils ROS and NO production were lower than in control (normoxic) neutrophils, and these effects were comparable between the age groups. Following longer as compared to shorter reoxygenation period, ROS production was decreased whereas NO generation was higher. Incubation with local anaesthetics increased ROS and NO production in reoxygenated adult and umbilical cord blood neutrophils. Performing multifactorial ANOVA, the following overall effects were identified: (1) bupivacaine, and to a greater extend ropivacaine, enhanced neutrophil intracellular ROS production, (2) all studied local anaesthetics

increased stimulated neutrophil intracellular NO production; ropivacaine effect was considerable at all studied concentrations, (3) exposure to local anaesthetics did not modulate the observed trends in ROS and NO generation depending on length of reoxygenation, (4) incubation with ropivacaine resulted in higher ROS and NO intracellular neutrophil generation than bupivacaine and lidocaine. In umbilical cord blood neutrophils, a significant stimulatory effect referred to NO generation only at the highest 4 mM lidocaine concentration.

**Conclusions:** (1) Hypoxia-reoxygenation *in vitro* decreases whole umbilical cord and adult blood neutrophil intracellular ROS and NO production. (2) These phenomena quantitatively differ between early and late reoxygenation but are comparable in both investigated neutrophil populations. (3) Exposure to bupivacaine, lidocaine and ropivacaine may enhance whole umbilical cord and adult blood neutrophil intracellular ROS and NO production. In umbilical cord blood neutrophils these effects are clinically insignificant.

## 9. Piśmiennictwo

1. Reinhard CT, Planavsky NJ, Olson SL, Lyons TW, Erwin DH. Earth's oxygen cycle and the evolution of animal life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(32):8933-8.
2. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015;6:524-51.
3. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol*. 2014;87(1035):20130676.
4. Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6:132.
5. Allwood MA, Edgett BA, Eadie AL, Huber JS, Romanova N, Millar PJ, Brunt KR, Simpson JA. Moderate and severe hypoxia elicit divergent effects on cardiovascular function and physiological rhythms. *J Physiol*. 2018;596(15):3391-410.
6. Stone J, Mitrofanis J, Johnstone DM, Falsini B, Bisti S, Adam P, Nuevo AB, George-Weinstein M, Mason R, Eells J. Acquired Resilience: An Evolved System of Tissue Protection in Mammals. *Dose Response*. 2018;16(4):1559325818803428.
7. Taylor CT, Colgan SP. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(12):774-85.
8. Arena ET, Tinevez JY, Nigro G, Sansonetti PJ, Marteyn BS. The infectious hypoxia: occurrence and causes during *Shigella* infection. *Microbes Infect*. 2017;19(3):157-65.
9. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(10):R1181-97.
10. Albrecht M, Zitta K, Groenendaal F, van Bel F, Peeters-Scholte C. Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. *Free Radic Biol Med*. 2019.
11. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364(7):656-65.
12. Cummins EP, Keogh CE, Crean D, Taylor CT. The role of HIF in immunity and inflammation. *Mol Aspects Med*. 2016;47-48:24-34.
13. Flück K, Fandrey J. Oxygen sensing in intestinal mucosal inflammation. *Pflugers Arch*. 2016;468(1):77-84.
14. Taylor CT, Doherty G, Fallon PG, Cummins EP. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3716-24.
15. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
16. Dzhililova DS, Kosyreva AM, Diatropov ME, Ponomarenko EA, Tsvetkov IS, Zolotova NA, Mkhitarov VA, Khochanskiy DN, Makarova OV. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats. *J Inflamm Res*. 2019;12:73-86.
17. Khacho M, Tarabay M, Patten D, Khacho P, MacLaurin JG, Guadagno J, Bergeron R, Cregan SP, Harper ME, Park DS, Slack RS. Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nat Commun*. 2014;5:3550.
18. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016;7(1):113-70.
19. Biddlestone J, Bandarra D, Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease (review). *Int J Mol Med*. 2015;35(4):859-69.
20. Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, Baillieul S. Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality. *Front Pediatr*. 2015;3:58.
21. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- $\kappa$ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*. 2016;283(3):413-24.
22. Bartels K, Grenz A, Eltzschig HK. Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(46):18351-2.

23. Lin N, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. *J Clin Invest.* 2016;126(10):3661-71.
24. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
25. Lu J, Xu SY, Zhang QG, Lei HY. Bupivacaine induces reactive oxygen species production via activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway. *Pharmacology.* 2011;87(3-4):121-9.
26. Ng LG, Qin JS, Roediger B, Wang Y, Jain R, Cavanagh LL, Smith AL, Jones CA, de Veer M, Grimbaldston MA, Meeusen EN, Weninger W. Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol.* 2011;131(10):2058-68.
27. Tan SY, Weninger W. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. *Curr Opin Immunol.* 2017;44:34-42.
28. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210(7):1283-99.
29. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol.* 2018;9:113.
30. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001;2(7):612-9.
31. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1191-7.
32. Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, Bitto A, Crea G, Pisani A, Squadrito F, Trichilo V, Bruschetta D, Micali A, Altavilla D. ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2183026.
33. Li Y, Liu K, Kang ZM, Sun XJ, Liu WW, Mao YF. Helium preconditioning protects against neonatal hypoxia-ischemia via nitric oxide mediated up-regulation of antioxidants in a rat model. *Behav Brain Res.* 2016;300:31-7.
34. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:765-92.
35. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:373.
36. Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol.* 2013;169(7):1417-29.
37. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(7):995-1022.
38. Hernansanz-Agustín P, Izquierdo-Álvarez A, Sánchez-Gómez FJ, Ramos E, Villa-Piña T, Lamas S, Bogdanova A, Martínez-Ruiz A. Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;71:146-56.
39. Zhu Y, Zhou T, Yang L, Yuan L, Liang L, Xu P. Revelation of the dynamic progression of hypoxia-reoxygenation injury by visualization of the lysosomal hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(4):904-8.
40. Miralda I, Uriarte SM, McLeish KR. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:217.
41. Thomas DC. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett.* 2017;192:88-96.
42. Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res.* 2000;100(3):223-47.
43. Sureda A, Batle JM, Tauler P, Cases N, Aguiló A, Tur JA, Pons A. Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Res.* 2004;38(9):1003-9.

44. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1223-48.
45. Granton E, Kim JH, Podstawka J, Yipp BG. The Lung Microvasculature Is a Functional Immune Niche. *Trends Immunol.* 2018;39(11):890-99.
46. Monceaux V, Chiche-Lapierre C, Chaput C, Witko-Sarsat V, Prevost MC, Taylor CT, Ungeheuer MN, Sansonetti PJ, Marteyn BS. Anoxia and glucose supplementation preserve neutrophil viability and function. *Blood.* 2016;128(7):993-1002.
47. Nicolás-Ávila JÁ, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity.* 2017;46(1):15-28.
48. Vorobjeva N, Prikhodko A, Galkin I, Pletjushkina O, Zinovkin R, Sud'ina G, Chernyak B, Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2017;96(3):254-65.
49. Jyoti A, Singh AK, Dubey M, Kumar S, Saluja R, Keshari RS, Verma A, Chandra T, Kumar A, Bajpai VK, Barthwal MK, Dikshit M. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):417-31.
50. Singh AK, Awasthi D, Dubey M, Nagarkoti S, Kumar A, Chandra T, i in. High oxidative stress adversely affects NFκB mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic myeloid leukemia. *Nitric Oxide.* 2016;58:28-41.
51. Zhao K, Huang Z, Lu H, Zhou J, Wei T. Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Biosci Rep.* 2010;30(4):233-41.
52. Kulinska KI, Billert M, Sawinski K, Czerniak K, Gaca M, Kusza K, Nowak KW, Siemionow M, Billert H. Local anaesthetics upregulate nitric oxide generation in cord blood and adult human neutrophils. *Sci Rep.* 2019;9(1):569.
53. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. Age-Appropriate Functions and Dysfunctions of the Neonatal Neutrophil. *Front Pediatr.* 2017;5:23.
54. Chudgar UH, Thurman GW, Ambruso DR. Oxidase activity in cord blood neutrophils: a balance between increased membrane associated cytochrome b558 and deficient cytosolic components. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;45(3):311-7.
55. Lu YZ, Wu CC, Huang YC, Huang CY, Yang CY, Lee TC, Chen CF, Yu LC. Neutrophil priming by hypoxic preconditioning protects against epithelial barrier damage and enteric bacterial translocation in intestinal ischemia/reperfusion. *Lab Invest.* 2012;92(5):783-96.
56. Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, Corbí ÁL, Lizasoain I, Moro MA. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPARγ agonist rosiglitazone. *Stroke.* 2013;44(12):3498-508.
57. McGovern NN, Cowburn AS, Porter L, Walmsley SR, Summers C, Thompson AAR, Anwar S, Willcocks LC, Whyte MKB, Condliffe AM, Chilvers ER. Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *J Immunol.* 2011;186(1):453-63.
58. Tamura DY, Moore EE, Partrick DA, Johnson JL, Offner PJ, Silliman CC. Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response. *Shock.* 2002;17(4):269-73.
59. Schmitz K, Jennewein M, Pohlemann T, Seekamp A, Oberringer M. Reoxygenation attenuates the adhesion of neutrophils to microvascular endothelial cells. *Angiology.* 2011;62(2):155-62.
60. Lodge KM, Thompson AA, Chilvers ER, Condliffe AM. Hypoxic regulation of neutrophil function and consequences for *Staphylococcus aureus* infection. *Microbes Infect.* 2017;19(3):166-76.
61. Hoenderdos K, Lodge KM, Hirst RA, Chen C, Palazzo SG, Emerenciana A, Summers C, Angyal A, Porter L, Juss JK, O'Callaghan C, Chilvers ER, Condliffe AM. Hypoxia

- upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax*. 2016;71(11):1030-8.
62. Branitzki-Heinemann K, Möllerherm H, Völlger L, Husein DM, de Buhr N, Blodkamp S, Reuner F, Brogden G, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level. *Front Immunol*. 2016;7:518.
  63. Sanidas D, Garnham A, Mian R. Hypoxia-induced chemiluminescence in human leukocytes: the role of Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Pharmacol*. 2002;453(2-3):183-7.
  64. Klokke M, Kharazmi A, Galbo H, Bygbjerg I, Pedersen BK. Influence of in vivo hypobaric hypoxia on function of lymphocytes, neutrocytes, natural killer cells, and cytokines. *J Appl Physiol*. 1993;74(3):1100-6.
  65. Sethi S, Singh MP, Dikshit M. Mechanisms involved in the augmentation of arachidonic acid-induced free-radical generation from rat neutrophils following hypoxia-reoxygenation. *Thromb Res*. 2000;98(5):445-50.
  66. Sethi S, Singh MP, Dikshit M. Nitric oxide-mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation. *Blood*. 1999;93(1):333-40.
  67. Sureda A, Batle JM, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Tur JA, Pons A. Hypoxia/reoxygenation and vitamin C intake influence NO synthesis and antioxidant defenses of neutrophils. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(11):1744-55.
  68. Becker DE, Reed KL. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. *Anesth Prog*. 2012;59(2):90-102.
  69. Catterall WA, Mackie K. (2011). Local anesthetics. In *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (pp. 565-582). McGraw-Hill, New York (NY). Dostęp on line dnia 15.02.2019 <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/54130855/GoodmanGilmansThePharmacologicalBasisofTherapeutic12thEdition.pdf>
  70. Heavner JE. Local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2007;20(4):336-42.
  71. Lirk P, Picardi S, Hollmann MW. Local anaesthetics: 10 essentials. *Eur J Anaesthesiol*. 2014;31(11):575-85.
  72. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50(3):265-82.
  73. Tsuchiya H, Mizogami M. Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardiotoxic effects. *Anesthesiol Res Pract*. 2013;2013:297141.
  74. Strichartz GR. Novel ideas of local anaesthetic actions on various ion channels to ameliorate postoperative pain. *Br J Anaesth*. 2008;101(1):45-7.
  75. Zhang Y, Tao GJ, Hu L, Qu J, Han Y, Zhang G, Qian Y, Jiang CY, Liu WT. Lidocaine alleviates morphine tolerance via AMPK-SOCS3-dependent neuroinflammation suppression in the spinal cord. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):211.
  76. Kröller-Schön S, Steven S, Kossmann S, Scholz A, Daub S, Oelze M, Xia N, Hausding M, Mikhed Y, Zinssius E, Mader M, Stamm P, Treiber N, Scharffetter-Kochanek K, Li H, Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(2):247-66.
  77. Lahat A, Ben-Horin S, Lang A, Fudim E, Picard O, Chowers Y. Lidocaine down-regulates nuclear factor-kappaB signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(2):320-7.
  78. Chiang N, Schwab JM, Fredman G, Kasuga K, Gelman S, Serhan CN. Anesthetics impact the resolution of inflammation. *PLoS One*. 2008;3(4):e1879.
  79. Hollmann MW, Herroeder S, Kurz KS, et al. Time-dependent inhibition of G protein-coupled receptor signaling by local anesthetics. *Anesthesiology*. 2004;100:852-60.

80. Mikawa K, Akamarsu H, Nishina K, Shiga M, Obara H, Niwa Y. Effects of ropivacaine on human neutrophil function: comparison with bupivacaine and lidocaine. *Eur J Anaesthesiol.* 2003;20(2):104-10.
81. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000;93:858-75
82. Lan W, Harmon DC, Wang JH, Shorten GD, Redmond PH. Activated endothelial interleukin-1beta, -6, and -8 concentrations and intercellular adhesion molecule-1 expression are attenuated by lidocaine. *Anesth Analg.* 2005;100(2):409-12.
83. Lahav M, Levite M, Bassani L, Lang A, Fidler H, Tal R, Bar-Meir S, Mayer L, Chowers Y. Lidocaine inhibits secretion of IL-8 and IL-1beta and stimulates secretion of IL-1 receptor antagonist by epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(2):226-33.
84. Tan Z, Dohi S, Ohguchi K, Nakashima S, Banno Y, Ono Y, Nozawa Y. Effects of local anesthetics on phospholipase D activity in differentiated human promyelocytic leukemic HL60 cells. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(12):1881-9.
85. Ploppa A, Kiefer RT, Haverstick DM, Groves DS, Unertl KE, Durieux ME. Local anesthetic effects on human neutrophil priming and activation. *Reg Anesth Pain Med.* 2010;35(1):45-50.
86. Sasagawa S. Inhibitory effects of local anesthetics on migration, extracellular release of lysosomal enzyme, and superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1991;13(4):607-22.
87. Kiefer RT, Ploppa A, Krueger WA, Plank M, Nohé B, Haerberle HA, Unertl K, Dieterich HJ. Local anesthetics impair human granulocyte phagocytosis activity, oxidative burst, and CD11b expression in response to *Staphylococcus aureus*. *Anesthesiology.* 2003;98(4):842-8.
88. Welters ID, Menzebach A, Langefeld TW, Menzebach M, Hempelmann G. Inhibitory effects of S-(-) and R-(+) bupivacaine on neutrophil function. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001;45(5):570-5.
89. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, i in. Inhibitory effect of local anaesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1997;41(4):524-8.
90. Billert H, Czerniak K, Bednarek E, Kulińska K. Effects of local anesthetics on the respiratory burst of cord blood neutrophils in vitro. *Pediatr Res.* 2016;80(2):258-66.
91. Gasparoni A, De Amici D, Ciardelli L, Autelli M, Regazzi-Bonora M, Bartoli A, Chirico G, Rondini G. Effect of lidocaine on neutrophil chemotaxis in newborn infants. *J Clin Immunol.* 1998;18(3):210-3.
92. Gasparoni A, Ciardelli L, De Amici D, Castellazzi AM, Autelli M, Bottino R, Polito E, Bartoli A, Rondini G, Chirico G. Effect of general and epidural anaesthesia on thyroid hormones and immunity in neonates. *Paediatr Anaesth.* 2002;12(1):59-64.
93. Birle A, Nebe CT, Hill S, Hartmann K, Poeschl J, Koch L. Neutrophil chemotaxis in cord blood of term and preterm neonates is reduced in preterm neonates and influenced by the mode of delivery and anaesthesia. *PLoS One.* 2015;10(4):e0120341.
94. Hollmann MW, Strumper D, Durieux ME. The poor man's epidural: systemic local anesthetics for improving postoperative outcomes. *Med Hypotheses.* 2004;63:386-89.
95. Lan W, Harmon D, Wang JH, Ghori K, Shorten G, Redmond P. The effect of lidocaine on in vitro neutrophil and endothelial adhesion molecule expression induced by plasma obtained during tourniquet-induced ischaemia and reperfusion. *Eur J Anaesthesiol.* 2004;21(11):892-7.
96. Lan W, Harmon D, Wang JH, Shorten G, Redmond P. The effect of lidocaine on neutrophil CD11b/CD18 and endothelial ICAM-1 expression and IL-1beta concentrations induced by hypoxia-reoxygenation. *Eur J Anaesthesiol.* 2004;21(12):967-72.
97. Tuman KJ, Ivankovich AD. Regional anesthesia is better than general anesthesia for lower extremity revascularization. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1994;8(1):114-7.

98. Ala-Kokko TI, Alahuhta S, Arvela P, Vähäkangas K. Maternal, fetal and placental distribution of lidocaine-epinephrine and bupivacaine after epidural administration for cesarean section. *Int J Obstet Anesth.* 1998;7(2):82–7.
99. McCourtie AS, Farivar AS, Woolley SM, Merry HE, Wolf PS, Mackinnon-Patterson B, Keech JC, Fitzsullivan E, Mulligan MS. Alveolar macrophage secretory products effect type 2 pneumocytes undergoing hypoxia-reoxygenation. *Ann Thorac Surg.* 2008;86(6):1774-9.
100. Soares T, Rodrigues D, Sarraguça M, Rocha S, Lima JLFC, Ribeiro D, Fernandes E, Freitas M. Optimization of Experimental Settings for the Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Human Blood. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7198484.
101. Wright WE, Shay JW Inexpensive low-oxygen incubators. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2088-90.
102. Freitas M, Lima JL, Fernande, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta.* 2009;649(1):8-23.
103. Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ 2nd, Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):1-6.
104. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A.* 2009;75(6):475-81.
105. Hoehn T, Felderhoff U, Altstaedt J, Obladen M, Bühner C. Hyperoxia- and hypoxia-mediated activation of polymorphonuclear leukocytes: a comparison of cord and adult venous blood. *Resuscitation.* 2001;51(1):63-8.
106. Eskitascioglu T, Karaci S, Canoz O, Kılıc E, Gunay GK. The impact of lidocaine on flap survival following reperfusion injury. *J Surg Res.* 2011;167(2):323-8.
107. Kutzsche S, Ilves P, Kirkeby OJ, Saugstad OD. Hydrogen peroxide production in leukocytes during cerebral hypoxia and reoxygenation with 100% or 21% oxygen in newborn piglets. *Pediatr Res.* 2001;49(6):834-42.
108. Fleegeal MA, Hom S, Borg LK, Davis TP. Activation of PKC modulates blood-brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(5):H2012-9.
109. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):1171-7.
110. Antonucci S, Mulvey JF, Burger N, Di Sante M, Hall AR, Hinchey EC, Caldwell ST, Gruszczuk AV, Deshwal S, Hartley RC, Kaludercic N, Murphy MP, Di Lisa F, Krieg T. Selective mitochondrial superoxide generation in vivo is cardioprotective through hormesis. *Free Radic Biol Med.* 2019;134:678-87.
111. Lee JH, Kim K, Jo YH, Hwang JE, Chung HJ, Yang C. Reoxygenation speed and its implication for cellular injury responses in hypoxic RAW 264.7 cells. *J Surg Res.* 2018;227:88-94.
112. Wang JS, Chiu YT. Systemic hypoxia enhances exercise-mediated bactericidal and subsequent apoptotic responses in human neutrophils. *J Appl Physiol.* 2009;107(4):1213-22.
113. Grabska-Kobylecka I, Kobylecki A, Bialasiewicz P, Krol M, Ehteshamirad G, Kasielski M, Nowak D. No evidence of enhanced oxidant production in blood obtained from patients with obstructive sleep apnea. *J Negat Results Biomed.* 2008;7:10.
114. Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1349-61.
115. Beitland S, Opdahl H, Aspelin T, Torjesen PA, Lyberg T. Reduction of glucose and insulin concentrations during in vitro incubation of human whole blood at different temperatures. *J Diabetes Res Clin Metab.* 2013;2(1):11.
116. Cho YD, Park SJ, Choi SH, Yoon YH, Kim JY, Lee SW, Lim CS. The inflammatory response of neutrophils in an *in vitro* model that approximates the postcardiac arrest state. *Ann Surg Treat Res.* 2017;93(4):217-24.



117. Kiers D, Wielockx B, Peters E, van Eijk LT, Gerretsen J, John A, Janssen E, Groeneveld R, Peters M, Damen L, Meneses AM, Krüger A, Langereis JD, Zomer AL, Blackburn MR, Joosten LA, Netea MG, Riksen NP, van der Hoeven JG, Scheffer GJ, Eltzschig HK, Pickkers P, Kox M. Short-Term Hypoxia Dampens Inflammation *in vivo* via Enhanced Adenosine Release and Adenosine 2B Receptor Stimulation. *EBioMedicine*. 2018;33:144-56.
118. Burkey TH, Webster RO. Adenosine inhibits fMLP-stimulated adherence and superoxide anion generation by human neutrophils at an early step in signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1175(3):312-8.
119. Hou PC, Yu HR, Kuo HC, Wang L, Lin LY, Sheen JM, Hsu TY, Ou CY, Jheng YJ, Yang KD, Cheng WH. Different modulating effects of adenosine on neonatal and adult polymorphonuclear leukocytes. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:387923.
120. Pimentel VC, Gomes JL, Zanini D, Abdalla FH, da Costa P, Gonçalves JF, Duarte MM, Moretto MB, Morsch VM, Schetinger MR. Evaluation of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in brain and erythrocytes and proinflammatory cytokine levels in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia model. *Mol Cell Biochem*. 2013;378(1-2):247-55.
121. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):511-7.
122. Pichler Hefti J, Sonntag D, Hefti U, Risch L, Schoch OD, Turk AJ, Hess T, Bloch KE, Maggiorini M, Merz TM, Weinberger KM, Huber AR. Oxidative stress in hypobaric hypoxia and influence on vessel-tone modifying mediators. *High Alt Med Biol*. 2013;14(3):273-9.
123. Krystofova J, Pathipati P, Russ J, Sheldon A, Ferriero D. The Arginase Pathway in Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia. *Dev Neurosci*. 2019;17:1-14.
124. Darcy CJ, Woodberry T, Davis JS, Piera KA, McNeil YR, Chen Y, Yeo TW, Weinberg JB, Anstey NM. Increased plasma arginase activity in human sepsis: association with increased circulating neutrophils. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(4):573-81.
125. Bhopale VM, Yang M, Yu K, Thom SR. Factors Associated with Nitric Oxide-mediated  $\beta$ 2 Integrin Inhibition of Neutrophils. *J Biol Chem*. 2015;290(28):17474-84.
126. McCormick CC, Li WP, Calero M. Oxygen tension limits nitric oxide synthesis by activated macrophages. *Biochem J*. 2000;350(3):709-16.
127. Daniliuc S, Bitterman H, Rahat MA, Kinarty A, Rosenzweig D, Lahat N. Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin 4. *J Immunol*. 2003;171(6):3225-32.
128. Robinson MA, Baumgardner JE, Otto CM. Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(11):1952-65.
129. Antonova OA, Loktionova SA, Romanov YA, Shustova ON, Khachikian MV, Mazurov AV. Activation and damage of endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. Effect of extracellular pH. *Biochemistry (Mosc)*. 2009;74(6):605-12.
130. López D, Rodríguez-Sinovas A, Agulló L, Inserte J, Cabestrero A, García-Dorado D. Acidic reoxygenation protects against endothelial dysfunction in rat aortic rings submitted to simulated ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(6):H2409-16.
131. Almaas R, Pytte M, Lindstad JK, Wright M, Saugstad OD, Pleasure D, Rootwelt T. Acidosis has opposite effects on neuronal survival during hypoxia and reoxygenation. *J Neurochem*. 2003;84(5):1018-27.
132. Suzuki K, Namiki H. Cytoplasmic pH-dependent spreading of polymorphonuclear leukocytes: regulation by pH of PKC subcellular distribution and F-actin assembly. *Cell Biol Int*. 2007;31(3):279-88.
133. Suzuki K, Kosho I, Namiki H. Characterization of the unique regulatory mechanisms of phorbol ester-induced polymorphonuclear leukocyte spreading in an acidified environment. *Eur J Pharmacol*. 2008;588(2-3):301-8.

134. Khan MA, Philip LM, Cheung G, Vadakepeedika S, Grasemann H, Swezey N, Palaniyar N. Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase-Dependent NETosis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:19.
135. Patel JM, Sapey E, Parekh D, Scott A, Dosanjh D, Gao F, Thickett DR. Sepsis Induces a Dysregulated Neutrophil Phenotype That Is Associated with Increased Mortality. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:4065362.
136. Marushchak M, Krynytska I, Petrenko N, Klishch I. THE DETERMINATION OF CORRELATION LINKAGES BETWEEN LEVEL OF REACTIVE OXYGEN SPECIES, CONTENTS OF NEUTROPHILES AND BLOOD GAS COMPOSITION IN EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY. *Georgian Med News*. 2016;(253):98-103.
137. Jancic CC, Cabrini M, Gabelloni ML, Rodríguez Rodrigues C, Salamone G, Trevani AS, Geffner J. Low extracellular pH stimulates the production of IL-1 $\beta$  by human monocytes. *Cytokine*. 2012;57(2):258-68.
138. Emeis M, Sonntag J, Willam C, Strauss E, Walka MM, Obladen M. Acidosis activates complement system in vitro. *Mediators Inflamm*. 1998;7(6):417-20.
139. Azevedo EP, Rochaël NC, Guimarães-Costa AB, de Souza-Vieira TS, Ganilho J, Saraiva EM, Palhano FL, Foguel D. A Metabolic Shift toward Pentose Phosphate Pathway Is Necessary for Amyloid Fibril- and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *J Biol Chem*. 2015;290(36):22174-83.
140. Frasson AP, De Carli GA, Bonan CD, Tasca T. Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purinergic Signal*. 2012;8(1):1-9.
141. Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, Kemp-Harper BK, Drummond GR. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2007;75(2):349-58.
142. Joshi MS, Ferguson TB Jr, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR Jr. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10341-6.
143. Calatayud S, Beltrán B, Brines J, Moncada S, Esplugues JV. Foetal erythrocytes exhibit an increased ability to scavenge for nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1998;347(2-3):363-6.
144. Criado-Jiménez M, Rivas-Cabañero L, Martín-Oterino JA, López-Novoa JM, Sánchez-Rodríguez A. Nitric oxide production by mononuclear leukocytes in alcoholic cirrhosis. *J Mol Med (Berl)*. 1995;73(1):31-3.
145. Mazzone GL, Rigato I, Tiribelli C. Unconjugated bilirubin modulates nitric oxide production via iNOS regulation. *Biosci Trends*. 2010;4(5):244-8.
146. Ikeda Y, Hamano H, Satoh A, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Aihara K, Tsuchiya K, Tamaki T. Bilirubin exerts pro-angiogenic property through Akt-eNOS-dependent pathway. *Hypertens Res*. 2015;38(11):733-40.
147. Rice CM, Davies LC, Subleski JJ, Maio N, Gonzalez-Cotto M, Andrews C, Patel NL, Palmieri EM, Weiss JM, Lee JM, Annunziata CM, Rouault TA, Durum SK, McVicar DW. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression. *Nat Commun*. 2018;9(1):5099.
148. Mamiya K, Tomoda MK, Edashige K, Ueda W, Manabe M. Local anesthetics enhance nitric oxide production by human peripheral neutrophils. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1995;27(2):111-9.
149. Nishi H, Sasaki T, Nagamitsu Y, Terauchi F, Nagai T, Nagao T, Isaka K. Hypoxia inducible factor-1 mediates upregulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene transcription during hypoxia in cervical cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;35(2):992-8.
150. Abdel Malik R, Zippel N, Frömel T, Heidler J, Zukunft S, Walzog B, Ansari N, Pampaloni F, Wingert S, Rieger MA, Wittig I, Fisslthaler B, Fleming I. AMP-Activated Protein Kinase

- $\alpha 2$  in Neutrophils Regulates Vascular Repair via Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and a Network of Proteins Affecting Metabolism and Apoptosis. *Circ Res.* 2017;120(1):99-109.
151. Yu SH, Chen JY, Zhang YM, Jiao GW, Liu FQ, Kong LF. Effect of thoracic epidural blockade on hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(9):710-5.
  152. Fischer LG, Hönemann CW, Patrie JT, Durieux ME, Rich GF. Ropivacaine attenuates pulmonary vasoconstriction induced by thromboxane A2 analogue in the isolated perfused rat lung. *Reg Anesth Pain Med.* 2000;25(2):187-94.
  153. Yang CW, Unanue ER. Neutrophils control the magnitude and spread of the immune response in a thromboxane A2-mediated process. *J Exp Med.* 2013;210(2):375-87.
  154. Minuz P, Meneguzzi A, Fumagalli L, Degan M, Calabria S, Ferraro R, Ricci M, Veneri D, Berton G. Calcium-Dependent Src Phosphorylation and Reactive Oxygen Species Generation Are Implicated in the Activation of Human Platelet Induced by Thromboxane A2 Analogs. *Front Pharmacol.* 2018;9:1081.
  155. Fan Y, Pan X, Wang K, Wu S, Han H, Yang P, Luo R, Wang H, Huang N, Tan W, Weng Y. Influence of chirality on catalytic generation of nitric oxide and platelet behavior on selenocystine immobilized TiO<sub>2</sub> films. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;145:122-29.
  156. Gong X, Dan J, Li F, Wang L. Suppression of mitochondrial respiration with local anesthetic ropivacaine targets breast cancer cells. *J Thorac Dis.* 2018;10(5):2804-12.
  157. Sikarwar AS, Hinton M, Santhosh KT, Chelikani P, Dakshinamurti S. Palmitoylation of G $\alpha$ q determines its association with the thromboxane receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(1):135-43.
  158. Ebensperger G, Ebensperger R, Herrera EA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Lesage F, Marengo JJ, Tejo RI, Llanos AJ, Reyes RV. Fetal brain hypometabolism during prolonged hypoxaemia in the llama. *J Physiol.* 2005;567(3):963-75.
  159. Poffers M, Bühne N, Herzog C, Thorenz A, Chen R, Güler F, Hage A, Leffler A, Echtermeyer F. Sodium Channel Nav1.3 Is Expressed by Polymorphonuclear Neutrophils during Mouse Heart and Kidney Ischemia In Vivo and Regulates Adhesion, Transmigration, and Chemotaxis of Human and Mouse Neutrophils In Vitro. *Anesthesiology.* 2018;128(6):1151-66.
  160. Wottawa M, Naas S, Böttger J, van Belle GJ, Möbius W, Revelo NH, Heidenreich D, von Ahlen M, Zieseniss A, Kröhnert K, Lutz S, Lenz C, Urlaub H, Rizzoli SO, Katschinski DM. Hypoxia-stimulated membrane trafficking requires T-plastin. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;221(1):59-73.
  161. Reshetnikov V, Hahn J, Maueröder C, Czegley C, Munoz LE, Herrmann M, Hoffmann MH, Mokhir A. Chemical Tools for Targeted Amplification of Reactive Oxygen Species in Neutrophils. *Front Immunol.* 2018;9:1827.
  162. Dröse S, Stepanova A, Galkin A. Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1857(7):946-57.
  163. Cela O, Piccoli C, Scrima R, Quarato G, Marolla A, Cinnella G, Dambrosio M, Capitanio N. Bupivacaine uncouples the mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits respiratory chain complexes I and III and enhances ROS production: results of a study on cell cultures. *Mitochondrion.* 2010;10(5):487-96.
  164. Okamoto A, Sumi C, Tanaka H, Kusunoki M, Iwai T, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Takenaga K, Bono H, Hirota K. HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. *Sci Rep.* 2017 Jun 19;7(1):3816.
  165. Zmijewski JW, Lorne E, Zhao X, Tsuruta Y, Sha Y, Liu G, Siegal GP, Abraham E. Mitochondrial respiratory complex I regulates neutrophil activation and severity of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(2):168-79.

166. Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Sata T, Chaudry IH. Lidocaine enhances apoptosis and suppresses mitochondrial functions of human neutrophil in vitro. *J Trauma*. 2010;68(2):401-8.
167. Niu Z, Tang J, Ren Y, Feng W. Ropivacaine impairs mitochondrial biogenesis by reducing PGC-1 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(2):513-518.
168. Andrienko TN, Pasdois P, Pereira GC, Ovens MJ, Halestrap AP. The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;110:1-14.
169. Matsuura T, Mori T, Hasaka M, Kuno M, Kawawaki J, Nishikawa K, i in. Inhibition of voltage-gated proton channels by local anaesthetics in GMI-R1 rat microglia. *J Physiol*. 2012;590(4):827-44.
170. Lemery DJ, Beal V, Vanlieferinghen P, Motta C. Fetal blood cell membrane fluidity in small for gestational age fetuses. *Biol Neonate*. 1993;64(1):7-12.
171. Neufeld ND, Corbo LM. Membrane fluid properties of cord blood mononuclear leucocytes: association with increased insulin receptors. *Pediatr Res*. 1984;18(8):773-8.
172. Mildner J, Wnętrzak A, Dynarowicz-Latka P. Cholesterol and Cardiolipin Importance in Local Anesthetics-Membrane Interactions: The Langmuir Monolayer Study. *J Membr Biol*. 2019;252(1):31-9.
173. Yasui K, Masuda M, Tsuno T, Matsuoka T, Komiyama A, Akabane T, i in. An increase in polymorphonuclear leucocyte chemotaxis accompanied by a change in the membrane fluidity with age during childhood. *Clin Exp Immunol*. 1990;81(1):156-9.
174. Marino F, Schembri L, Rasini E, Pinoli M, Scanzano A, Luini A, Congiu T, Cosentino M. Characterization of human leukocyte-HUVEC adhesion: Effect of cell preparation methods. *J Immunol Methods*. 2017;443:55-63.
175. Simms HH, D'Amico R. Regulation of whole blood polymorphonuclear leukocyte phagocytosis following hypoxemia and hypoxemia/reoxygenation. *Shock*. 1994;1(1):10-8.
176. Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:35-43.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 602/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczególnych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

**Komisja, na posiedzeniu w dniu: 16 czerwca 2011 r.**

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:**

**mgr inż. Katarzyna Buda**

**w sprawie prowadzenia badań w**

**Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej**

**Katedry Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM w Poznaniu**

**Główny badacz: mgr inż. Katarzyna Buda**

**Członkowie zespołu**

**badawczego:**

**dr hab. n. med. Hanna Billert  
mgr Karolina Kulińska**

**Temat badań:**

**"Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu w granulocytach krwi pępowinowej w warunkach hipoksji-reoksygenacji in vitro".**

**Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań**

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 1153/12

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczenia opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi.

**Komisja, na posiedzeniu w dniu: 06 grudnia 2012 r.**

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:**

**mgr inż. Katarzyna Czerniak**

**w sprawie prowadzenia badań w**

**Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej**

**Katedry Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM w Poznaniu**

**Główny badacz: mgr inż. Katarzyna Czerniak**

**Członkowie zespołu**

**badawczego: dr hab. n. med. Hanna Billert  
mgr Karolina Kulińska**

**Temat badań:**

**"Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu w granulocytach krwi pępowinowej w warunkach hipoksji-reoksygenacji in vitro".**

**Dot. Uchwały Komisji Bioetycznej nr 602/11 z dnia 16.06.2011r.**

**Komisja wyraża zgodę na :**

- poddanie komórek krwi pępowinowej inkubacji z dodatkowym anestetykiem lokalnym – ropiwakainą w czterech stężeniach 1,4; 0,07; 0,007 i 0,0007 mM;**
- wydłużenie okresu prowadzenia ww. badań do końca 2013 roku.**

**Jednocześnie Komisja przyjęła do wiadomości zmianę danych osobowych głównego badacza – zmiana nazwiska z Katarzyna Buda na Katarzyna Czerniak.**

**Przewodniczący Komisji**

**prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński**



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 525/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespolizowanego ciężkiego niepożłanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi.

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:**

**mgr inż. Katarzyna Buda**

**w sprawie prowadzenia badań w**

**Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej**

**Katedry Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM w Poznaniu**

**Główny badacz:**

**mgr inż. Katarzyna Czerniak**

**Członkowie zespołu  
badawczego:**

**dr hab. n. med. Hanna Billert  
mgr Karolina Kulińska**

**Temat badań:**

**"Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu w granulocytach krwi pępowinowej w warunkach hipoksji-reoksygenacji in vitro".**

**Dot. Uchwały Komisji Bioetycznej nr 602/11 oraz 1153/12.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na wydłużeniu czasu trwania badania do końca 2016 roku.**

Przewodniczący Komisji

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 525/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespożywanego ciężkiego niepożywanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

**mgr inż. Katarzyna Buda**

w sprawie prowadzenia badań w

**Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej**

**Katedry Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM w Poznaniu**

Główny badacz:

**mgr inż. Katarzyna Czerniak**

Członkowie zespołu

badawczego:

**dr hab. n. med. Hanna Billert**

**mgr Karolina Kulińska**

Temat badań:

**"Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu w granulocytach krwi pępowinowej w warunkach hipoksji-reoksygenacji in vitro".**

Dot. Uchwały Komisji Bioetycznej nr 602/11 oraz 1153/12.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na wydłużeniu czasu trwania badania do końca 2016 roku.

Przewodniczący Komisji

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński





UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNAŃU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNAŃU

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 1219/16

*Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 490); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.*

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu**

**01 grudnia 2016 r.**

**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**mgr inż. Katarzyna Czerniak**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Zakład Anestezjologii Doświadczalnej Katedry Anestezjologii i Intensywnej  
Terapii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

**Główny badacz:**

**mgr inż. Katarzyna Czerniak**

**Członkowie zespołu**

**badawczego:**

**dr hab. n. med. Hanna Billert**

**mgr Karolina Kulińska**

**Temat badań:**

**"Wpływ anestetyków lokalnych na produkcję reaktywnych form tlenu i azotu w granulocytach krwi pępowinowej w warunkach hipoksji-reoksygenacji in vitro".**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na wydłużeniu czasu trwania badania do czerwca 2017 roku, zgodnie z Aneks nr 3 z dnia 01.12.2016r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 602/11 z dnia 16.06.2011r. (Aneks 1 – Uchwała 1153/12 z dnia 06.12.2012r.; Aneks 2 – Uchwała 525/15 z dnia 11.06.2015r.)**

**Metodyka pozostaje bez zmian.**

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński