

Propofol이 내독소로 전 처치한 말초혈액의 단핵세포와 림프구의 Apoptosis에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 마취과학교실, *소아과학교실

송 호 경 · 정 대 철*

Effect of Propofol on the Apoptosis of Lipopolysaccharide-Treated Mononuclear Cells and Lymphocytes

Ho-Kyung Song, M.D., and Dae Chul Jeong, M.D.*

Departments of Anesthesiology and *Pediatrics, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: Sepsis, surgical stress, and anesthesia are often associated with postoperative immune suppression and an increased susceptibility to infection. Apoptosis is an important mechanism of cell death in sepsis and Endotoxemia, and the apoptosis-induced loss of lymphocytes may be responsible for immune depression. To access the possible role of propofol on human immune function in sepsis, we investigated the apoptosis of mononuclear cells (MNCs) and lymphocyte from peripheral blood.

Methods: Healthy human mononuclear cells were isolated and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for 5 hrs. And, activated MNCs were cultured in the presence of varying concentrations of propofol (1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml and 50µg/ml) for 20 hrs. The apoptotic indices of LPS-treated MNCs, monocytes and lymphocytes were calculated by flow cytometry using an Annexin-V-FLUOS staining kit.

Results: Propofol exposure at 1, 5 and 10µg/ml did not significantly affect apoptosis of the LPS-treated MNCs, monocytes or lymphocytes, but a concentration of 50µg/ml increased the apoptosis of MNCs and lymphocytes significantly ($P < 0.01$).

Conclusions: Since the concentrations of propofol used were in the clinically acceptable range for sedation and anesthesia, this result suggests that propofol does not significantly alter the apoptosis of MNCs, monocytes or lymphocytes in septic conditions for up to 20 hrs. (Korean J Anesthesiol 2003; 45: 768~773)

Key Words: apoptosis, immune response, lymphocyte, mononuclear cell, propofol, sepsis.

서 론

면역체계가 정상인 사람에서도 외상이나 수술로 인한 스트레스, 마취 등은 수술 후의 면역기능에 영향을 준다.^{1,2)} 만일 감염에 의한 패혈증 상태로 수술을 받게 된다면 활성화된 면역계가 여러 형태로 반응을 일으키고^{3,5)} 환자의 예후에 영향을 주게 될 것이다.

최근 염증반응을 항진시키는 사이토카인이나 혹은 보상적으로 염증을 억제하는 사이토카인의 균형을 이루는 조절력이 떨어져 어느 한쪽 방향으로만 염증의 반응이 치우쳐 버

린다는 것이 패혈증의 기전 중의 하나라고 제시되면서 이러한 면역계의 불균형은 동시에 우리 몸의 방어에 필수적인 림프구의 수적 감소와 동반된다는 것도 알게 되었다.⁶⁾ 왜냐하면 패혈증 상태에서는 정상적 면역체계를 유지하기 위한 림프구의 계획적 세포사인 아포토시스(apoptosis)가 증가되어 전체적으로 림프구의 수를 감소시키기 때문인데^{7,9)} 이렇게 조절되지 않은 상태로 증가된 아포토시스가 세포면역에 이상을 만들고 결국 수술 직후에는 면역억제 상태가 되어 여러 기관의 기능부전과 또 다른 병원감염을 초래한다는 것이다.^{10,11)} 이미 일반적인 흡입마취제와 ketamine, midazolam 등은 염증세포에서 유리되는 사이토카인에 영향을 주어 술 후 감염을 증가시키는 등 회복에 나쁜 영향을 준다고 보고 되어 있고,¹²⁾ 수술자체도 호중구의 아포토시스를 감소시키므로 염증을 심하게 만들고 또한 지속시킨다고 한다.¹³⁾ 최근 정맥마취제로서 혹은 중환자실에서 진정제로서 관심을 받고 있는 propofol의 면역기능에 미치는 영향에 대해서는 논란이 여지가 많으나 실험적으로 nitric oxide

논문접수일 : 2003년 5월 6일

책임저자 : 송호경, 인천광역시 부평구 부평동 665

성모자애병원 마취과, 우편번호: 403-016

Tel: 032-510-5518, 5665, Fax: 032-510-2718

E-mail: song@olmh.cuk.ac.kr

본 논문은 가톨릭중앙의료원 학술연구조성비로 이루어졌음.

로 처리된 쥐의 대식세포를 아포토시스로부터 보호한다는 등¹⁴⁾ 다른 마취제들과 비교하면 면역기능에 미치는 영향이 적다고 한다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 그러나 사람에서 패혈증으로 아포토시스가 증가되어 있는 경우 장시간의 propofol 처치에 의해 일차적인 면역반응을 담당하는 단핵세포나 림프구가 어떤 영향을 받는지에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자들은 실험적으로 lipopolysaccharide (LPS)를 이용, 패혈증 상태와 유사한 환경에서 단핵세포를 배양한 다음 단핵세포의 아포토시스가 propofol에 의해서 영향을 받는지를 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 측정하고 아포토시스지수와 생존지수 등 전체 세포사와의 관계를 알아본 다음, 이 단핵세포를 단구와 림프구로 구분하여 어느 세포가 더 영향을 받는지를 알아보고 propofol농도에 따른 관련성도 평가하여 보았다.

대상 및 방법

세포분리

가톨릭 중앙의료원 임상연구 관리규정을 준수하여 미국 마취과학회 신체등급 분류 1, 2에 속하는 건강한 성인 남녀 10명으로부터 25 ml의 정맥혈을 헤파린 튜브에 채취하여 동량의 phosphate buffered saline (PBS)을 혼합한 후 다시 동량의 histopaque를 혼합, Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation 방법으로 단핵세포만을 분리하였다. 분리된 단핵세포 들은 PBS로 2번 세척한 후, 다시 조직배양액으로 한번 더 세척하여 trypan blue dye exclusion test로 viability와 함께 세포 수를 세어서 약 $3-4 \times 10^7$ cells/ml 정도의 단핵세포를 준비할 수 있었다. 조직배양액은 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, USA) 2 mL-glutamine, 100 U/ml streptomycin이 포함된 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배양액(RPMI 1640, GibcoBRL)으로 phenol red와 sodium bicarbonate가 들어 있지 않은 것을 선택하여 이용하였다.

단핵세포에 대한 LPS와 propofol 처리

준비된 단핵세포는 실험적인 패혈증 상태 하에서 활성화시키기 위해 LPS (lipopolysaccharide, serotype: E. coli 055 : B5, Sigma Co., St. Louis, USA)을 1 μ g/ml의 농도로 혼합한 배양액에서 5시간 동안 온도 37°C, 습도 90%, 5% CO₂의 배양기에서 배양되었다. 이후 이를 원심 분리하여 단핵세포만을 분리, 세척한 후 다시 배양하였는데 이때 propofol이 단핵세포의 아포토시스를 변화시키는지 볼 수 있도록 대조군은 배양액만으로, 실험군은 배양액에 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml와 50 μ g/ml의 농도로 propofol을 혼합하여 다시 20시간동안 배양하였다.

아포토시스의 측정

아포토시스의 측정은 유세포분석으로 아포토시스를 측정하는 방법인 Annexin-V-FLUOS Staining Ki (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 사용하였다.

LPS에 처리된 후 각각 다른 농도의 propofol이 혼합된 배양액에서 20시간 배양된 단핵세포는 인산완충식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 1,500 rpm으로 10분간 원심분리 후, 약 1×10^6 개의 세포를 취하였다. 단핵세포의 아포토시스의 정도는 propidium iodide와 annexin V-FITC을 이용한 염색 후 유세포 분석기로 정량 분석하였다. 염색액은 분석이 필요한 10개의 샘플 당 1000 μ l의 Hepes buffer에 20 μ l의 annexin V-Fluorescein을 미리 희석한 후 20 μ l의 propidium iodide를 첨가하여 만들었다. 이 염색액에 단핵세포들을 부유시킨 후 빛을 차단한 15-25°C의 상온에서 10-15분 동안 작용시켰다. 이후 세포의 밀도에 따라 0.4-0.8 ml의 binding buffer를 첨가하고 유세포 분석기(flow cytometry, EPICS XL-MCL, Beckman coulter, USA)로 annexin V-FITC에 염색된 세포들은 아포토시스 된 세포로 측정된 다음 다시 세포의 granularity와 크기에 따라 단구와 림프구로 나누어 분석하였다. Fluorescein 탐색은 515 nm의 bandpass filter로, PI 탐색은 600 nm 이상의 filter를 이용하였다.

각각의 propofol 농도에 따른 아포토시스의 정도는 측정된 전체세포 수에 대해 아포토시스에 있는 세포 수의 비율로 표시하고 생존하는 세포 수의 비율 역시 대조 군을 100%로 하였을 때를 기준으로 하여 표시하고, 또한 전체 세포 사를 고려하기 위해 대조군의 수치를 기준으로 삼아 계산하였다. Apoptosis (%) = annexin positive cells of experimental group (%) - annexin positive cells of control group (%)

통계처리

모든 측정치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고 통계처리는 Sigma-Stat (Version 2.03, SPSS, USA)을 사용하였다. 통계 방법으로 단구와 림프구의 아포토시스의 차이는 One Way repeated measures analysis of Variance on Ranks로 하였고 배양액만이 혼합된 대조 군과 각 propofol군들과의 다중비교는 Dunnett 방법으로 하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

단핵세포의 전체 세포사는 배양액에 propofol을 혼합하지 않은 대조 군의 수치를 기준으로 하였을 때 50 μ g/ml의 propofol 농도에서는 $11.1 \pm 5.9\%$ 로 다른 농도의 propofol에 비해, 즉 5 μ g/ml의 $0.07 \pm 0.5\%$ 와 10 μ g/ml의 $1.6 \pm 3.0\%$ 에

비해 의미있는 세포사의 증가를 보였다($P = 0.001$). 단핵세포의 생존비율 역시 propofol 농도 차이에 따라 의미 있는 변화를 보였는데($P = 0.001$), 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조 군의 생존비율과 차이를 보이지 않았으나 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 유의한 감소를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 1). 또한 이를 림프구와 단구로 나누어 비교 확인한 결과, 두 종류의 세포는 생존 양상에 유의한 차이를 보였는데($P = 0.006$), 단구의 경우는 propofol의 농도가 증가하여도 생존에

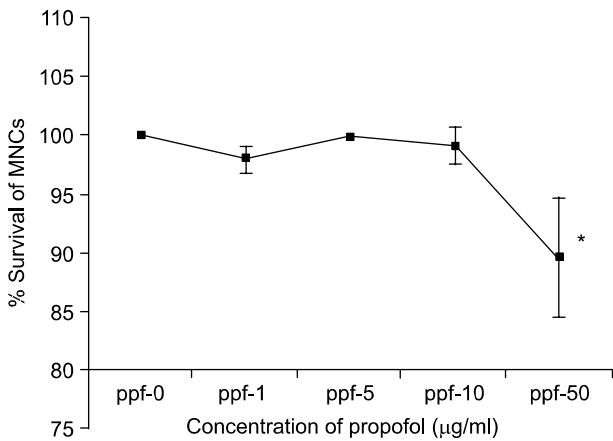


Fig. 1. Effect of propofol on lipopolysaccharide-treated MNCs survival at different concentrations. Percent survival was significantly decreased by the addition of propofol 50 $\mu\text{g/ml}$ in the culture media. MNCs: mononuclear cells, ppf-0, no drug added. Data is expressed as mean SD. *: $P < 0.05$ vs. ppf-0, ppf-5 and ppf-10.

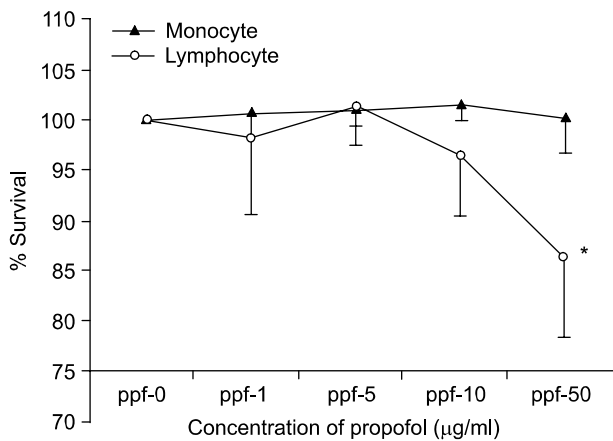


Fig. 2. Effect of propofol on lipopolysaccharide-treated monocyte and lymphocyte survival at different concentrations. There was significant difference between groups ($P < 0.001$) and percent survival of lymphocyte was significantly decreased by the addition of propofol 50 $\mu\text{g/ml}$ in the culture media. ppf-0, no drug added. Data is expressed as mean SD. *: $P < 0.05$ vs. ppf-0 of lymphocyte group.

는 변화가 없었으나 림프구는 고농도의 propofol 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조 군에 비해 의미있게 생존비율이 감소하였다($P < 0.05$) (Fig. 2).

단핵세포의 아포토시스의 정도는 propidium iodide와 annexin V-FITC을 이용한 염색 후 유세포 분석기로 정량 분석

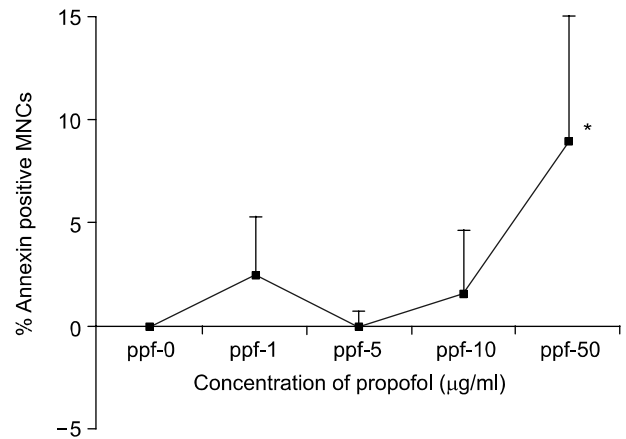


Fig. 3. Effect of propofol on lipopolysaccharide-treated MNCs apoptosis at different concentrations. Percent Annexin positive MNCs was significantly increased by the addition of propofol 50 $\mu\text{g/ml}$ in the culture media. MNCs: mononuclear cells, ppf-0, no drug added. Data is expressed as mean SD. *: $P < 0.05$ vs. ppf-0, ppf-5.

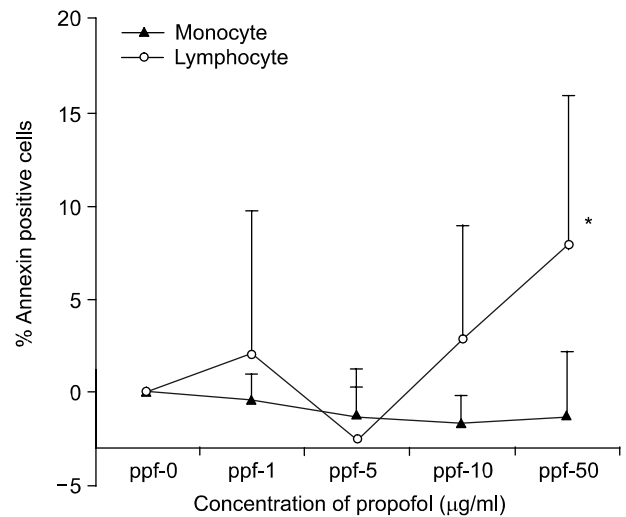


Fig. 4. Effect of propofol on Lipopolysaccharide-treated monocyte and lymphocyte apoptosis at different concentrations. There was no difference between groups but percent annexin positive lymphocyte was significantly increased by the addition of propofol 50 $\mu\text{g/ml}$ in the culture media. ppf-0, no drug added. Data is expressed as mean SD. *: $P < 0.05$ vs. ppf-0, ppf-5 of lymphocyte group.

한 결과는 배양액만을 혼합한 대조 군에 비해 propofol을 혼합한 실험군에서 농도가 증가 함에 따라 아포토시스가 증가하는 것을 알 수 있었다. 즉, annexin V-FITC에 의해 염색되어 아포토시스가 됐음을 의미하는 단핵세포의 비율은 propofol 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml에 비해 50 μ g/ml에서 유의한 증가를 보였다(P = 0.002) (Fig. 3). 이 단핵세포를 단구와 림프구로 나누어 비교 확인한 결과, 단구는 배양액내의 propofol의 농도가 증가되어도 아포토시스의 증가가 동반되지 않았으나 림프구의 경우는 propofol의 농도에 따른 아포토시스의 정도에 차이를 보였다(P = 0.02). 즉, propofol 50 μ g/ml의 고농도에서는 아포토시스가 크게 증가하여 대조군, 5 μ g/ml에서의 아포토시스 정도와 유의한 차이를 보였다(P < 0.05) (Fig. 4).

고 찰

패혈증은 중환자실 사망률의 주된 부분을 차지하고 있지만 아직 패혈증의 병리기전에 대해서는 확실히 밝혀지지 않고 있다. 최근 제시되는 면역학적인 병리기전 중의 하나는 패혈증이나 내독소증의 동물 실험 모델에서 밝혀진 림프구의 아포토시스의 증가이다.⁷⁻⁹⁾ 본 연구에서는 LPS를 이용한 실험적인 패혈증상태에서 propofol이 면역세포들의 아포토시스 정도에 영향을 주는지를 알아보았는데 임상적인 허용 농도인 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml에서 면역세포 들은 아포토시스나 생존에 영향을 받지 않았으나 50 μ g/ml의 독성 농도에서는 단핵세포의 세포사나 아포토시스가 증가하여 생존율이 감소하였고 이를 단구와 림프구로 분리해 비교 하였을 때 단구에 비해 림프구가 더 많이 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

아포토시스 또는 세포예정사는 유전학적으로 질서 정연하게 조절되는 세포사의 한 형태로서 Kerr 등이¹⁸⁾ 처음 기술하였다. 이것은 다세포 생물에서 필요하지 않거나 아치사 손상을 받은 세포를 제거하는 정상적인 생리적 세포사를 의미한다. 감염에 의해 면역체계가 활성화 되면 사이토카인의 출현과 함께 림프구의 아포토시스가 증가하면서 결국 그 수가 감소하게 되는데^{7,8)} 이는 면역학적으로 두 가지의 의미로 해석할 수 있다. 즉, 해롭기도하고 이롭기도한 양면성을 가지고 있어서¹⁹⁾ 만약 신체가 과염증반응 상태(hyperinflammatory state)라면 아포토시스는 과도한 염증 사이토카인을 분비하는 림프구를 줄일 수 있어 염증의 확산을 막고 조직과 각 기관의 기능을 유지하게 하는 방어적인 기전으로 작용 하는 이점이 있지만^{6,20)} 반대로 신체를 방어하는데 필수적인 림프구가 아포토시스로 수가 줄어든다는 것은 침입한 미생물에 대한 반응이 떨어지고(nergy)²¹⁾ 감염에 대한 조절력을 잃게 되는 불리한 조건이 되기도 한다.^{21,22)} 패혈증

시는 항염증성 사이토카인과 염증성 사이토카인이 같이 존재하고 반응하여 이 발란스와 또 이를 조절하는 능력이 예후에 영향을 준다고 하는데²³⁾ 여기서 림프구의 아포토시스는 이 두 가지 반대되는 면역반응의 발란스를 유지하는 중요한 조절인자이다.⁶⁾ 왜냐하면 림프구는 심한 염증 상태를 완화시키는데 필수적인 역할을 하는 면역세포로 미생물의 침입에 대해 T 림프구, B 림프구, macrophage의 잘 조화된 상호 관계는 효과적인 방어기전에 도움이 된다. 예를 들어 림프구는 macrophage를 활성화시키는 사이토카인을 생성하고 macrophage와 B 림프구는 T 림프구에 항원을 표시하는 중요한 일을 하는데 패혈증에서는 이 B 세포와 T 세포 모두 아포토시스로 수적 감소가 일어난다.^{24,25)} 지금까지는 여러 조직과 기관의 기능부전을 초래하는 패혈증의 기전을 조절되지 않은 과염증 반응상태인 전신적 염증반응 증후군(SIRS, systemic inflammatory response syndrome)으로 생각하여 왔으나^{6,26)} 항염증작용이 있는 치료제들 즉, anti-endotoxin, anti-TNF, anti-IL-1, steroid, anti-platelet activating factor 등의 치료 효과에 의문을 가지게 되면서^{26,27)} 반대로 면역 억제 상태가 감염에 대한 조절력을 잃게 할 수도 있다는 것이 제시되었다.²⁸⁾ Lederer 등도²⁹⁾ 패혈증의 주 원인은 염증에 대한 T 세포의 반응성 감소 등 면역반응부전(CARS, compensatory anti-inflammatory response syndrome)때문이라고 하여 림프구의 수적 감소가 면역기능에 허점을 만들어 감염의 원인이 되는 미생물을 제거하는 기능을 떨어뜨리고 이차감염을 초래한다고 하며¹⁹⁾ 또한 림프구의 아포토시스에 따르는 심장, 폐, 간, 신장, 근육 등의 아포토시스는 결국 기관자체의 기능부전으로 이어진다고 하였다.^{30,31)} 현재 실험적으로 패혈증 시 증가된 아포토시스를 항 아포토시스 제제를 처치하여 림프구의 수가 줄어드는 것을 막아 보려는 시도를 하고있고 실제로 실험동물에서는 사망률을 줄일 수 있다고 하여 패혈증시 림프구 수의 감소로 인한 면역억제는 생존에 영향을 주는 중요한 인자로 인지되고 있다.²⁸⁾ 임상적으로도 중환자실의 환자의 경우 3일 동안 계속하여 림프구의 수가 감소되어 있으면 병원감염의 위험이 크게 증가한다고 한다고 하는데²¹⁾ 이처럼 사이토카인이나 아포토시스의 불균형이 건강한 사람에서는 회복에 별 영향이 없을 수도 있으나 고위험군의 환자들에게는 수술이나 마취제의 선택등으로 사이토카인의 분비나 아포토시스에 또 다른 변화를 주는 것은 예후에 영향을 줄 수 있다고 하겠다.^{32,33)}

일반적으로 수술이나 패혈증 시 중성구의 아포토시스는 감소되어 염증을 진행시키고 심화시키는 반면, 림프구의 아포토시스는 증가한다고 알려져 있고³⁴⁾ 또 경막외 마취의 경우는 중성구의 아포토시스는 변화가 없었지만 propofol, 흡입마취제를 사용한 마취 후에는 중성구의 아포토시스가 감소하여 마취제 자체도 아포토시스에 영향을 주는 것을 알

수 있다.¹³⁾ 특히 propofol은 호중구의 기능을 방해하고¹²⁾ 사이토카인 유리에도 영향을 주지만,³⁵⁾ 흡입 마취제에 비해 항 염증작용이 있는 IL-10에는 영향이 없다고도 하고, T 림프구의 기능에 영향을 주지않고¹⁶⁾ isoflurane에 비해 T helper 림프구의 감소가 없는 등³⁶⁾ 다른 마취제에 비해 염증에 대한 영향은 적다고 보고되어 왔다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 실지로 propofol은 구조적으로 phenol을 포함하는 alpha-tocopherol과 butylated hydroxytoluene을 닮아 있어서 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide 등에 대한 항 산화작용으로 조직이나 세포를 손상으로부터 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다.³⁷⁾ 실험적으로도 사람의 폐포의 대식세포에 대한 연구에서는 면역반응을 억제하고¹⁴⁾ 백혈구에 대한 연구에서도 이러한 산화 물질 등을 직접 제거하는 능력이 있다고 밝혀진 바 있다.³⁸⁾ Delogu는³⁹⁾ 마취제나 수술 자체로 인해 말초혈액 내 림프구의 아포토시스가 증가되는데 반해 실험적으로 propofol에 림프구를 배양했을 경우 임상 농도나 그 열 배의 농도에서도 아포토시스가 일어나지 않는다고 하였고, 사람의 대식세포에 대해서도 세포독성이 없는 농도에서(30 μ M) 즉, 임상 농도에서 nitric oxide에 의한 세포사를 차단한다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 그러나 이러한 보호 효과는 시간에 의존적으로 감소하여 24시간이 지나면 매우 감소한다는데 그 기전은 propofol이 빛과 공기에서 분해되고⁴⁰⁾ cytochrome P450-dependent monooxygenases에 의해 2, 6 diisopropyl-1, 4-quinol이나 uridine diphosphate glucuronosyltransferase-mediated glucuronidation되어 glucuronide complex로 변화되어 버리기 때문이라고 하였다.⁴¹⁾

Annexin은 칼슘의 존재 하에서 인지질과 결합을 하는 단백질이며, annexin V-FITC는 칼슘의 존재 하에서 포스파티딜세린과 결합하는 형광 표지물질이다. 살아있는 세포에서는 능동적 수송에 의해서 포스파티딜세린이 세포 내에 위치하지만 아포토시스가 진행되면서 세포막의 바깥쪽으로 위치를 바꾸게 되므로 이때 annexin V-FITC가 이 포스파티딜세린과 결합하게 되어 아포토시스가 된 세포를 표지하게 된다. 즉, 아포토시스에 있는 세포는 annexin V-FITC에만 염색되고, 살아있는 세포는 어느 것에도 염색되지 않으며, 죽은 세포는 propidium iodide와 annexin V-FITC 모두에 염색된다. 저자들은 이를 이용하여 실험적인 패혈증상태에서 활성화된 단핵세포의 아포토시스가 propofol의 농도에 영향을 받는지를 알아보고, 또한 세포의 크기와 세포 내의 granule의 정도에 따라 단구와 림프구로 분리해서 아포토시스 지수를 계산하였는데 패혈증으로 림프구의 아포토시스가 증가되어 있는 상태라 하여도 propofol의 임상허용 농도에서는 더 이상 림프구의 아포토시스에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서는 아직 아포토시스가 패혈증환자의 생존에 유리한 지, 불리한지는 확실히 밝혀져

있지 않으나 림프구의 아포토시스가 증가하여 림프구의 수가 준다는 것은 술 후 감염과 염증, 패혈증, 사망률의 증가와 관련이 있는 만큼 이러한 면역억제 상태를 피하기 위한 마취제의 선택에 있어 아포토시스에 영향이 적은 propofol의 사용은 다른 마취제에 비해 임상적으로 유리할 수 있다고 하겠다. 즉, propofol이 수술을 위한 마취나 중환자실에서의 진정을 목적으로 투여하는 용량에서는 말초 혈액 내 단핵세포와 림프구, 단구의 아포토시스에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Moudgil GC: Update on anaesthesia and the immune response. *Can Anaesth Soc J* 1986; 33: S54-60.
2. Stevenson GW, Hall SC, Rudnick S, Seleny FL, Stevenson HC: The effect of anesthetic agents on the human immune response. *Anesthesiology* 1990; 72: 542-52.
3. Mitsuhashi H, Shimizu R, Yokoyama MM: Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmac* 1995; 17: 529-34.
4. Atwell DM, Grichnik KP, Newman MF, Reves JG, McBride WT: Balance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines at thoracic cancer operation. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 1145-50.
5. Helmy SA, Wahby MA, El-Nawaway M: The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production. *Anaesthesia* 1999; 54: 733-8.
6. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24: 1125-9.
7. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY: Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-21.
8. Rogers HW, Callery MP, Deck B, Unanue ER: Listeria monocytogenes induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol* 1996; 156: 679-84.
9. Zhang XM, Morikawa A, Takahashi K, Jiang GZ, Kato Y, Sugiyama T, et al: Localization of apoptosis (programmed cell death) in mice by administration of lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* 1994; 38: 669-71.
10. Sasajima K, Inokuchi K, Onda M, Miyashita M, Okawa KI, Matsutani T, et al: Detection of T cell apoptosis after major operations. *Eur J Surg* 1999; 165: 1020-3.
11. Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, Iizuka N, Hazama S, Suzuki T, et al: Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann Surg* 1996; 223: 434-40.
12. O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Axbury AJ: Comparison of the inhibitory effects of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth* 1992; 69: 70-4.
13. Fanning NF, Poster J, Shorten GD, Kirwan WO, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, et al: Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery* 1999; 126: 527-34.

14. Chang H, Tsai S, Chang Y, Chen T, Chen R: Therapeutic concentration of propofol protects mouse macrophages from nitric oxide-induced cell death and apoptosis. *Can J Anesth* 2002; 49: 477-80.
15. Delvin EG, Clarke RSJ, Mirakhur K, McNeill TA: Effect of four iv induction agents on T-lymphocyte proliferations to PHA in vitro. *Br J Anaesth* 1994; 73: 315-7.
16. Salo M, Pirttikangas CO, Pulkki K: Effects of propofol emulsion and thiopentone on T helper cell type-1/type-2 balance in vitro. *Anaesthesia* 1997; 52: 341-4.
17. Richardson PSR, Cooke K, Gerrish P, Rees KC, Rennie IG: Natural killer and lymphokine activated cytotoxicity following anaesthesia in patients with uveal malignant mealnoma. *Melanoma Res* 1997; 7: 129-37.
18. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
19. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27: 1230-7.
20. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE: Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997; 25: 1298-307.
21. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenik O, Kelly R, Rode H, Gordon J, et al: Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1977; 186: 241-50.
22. Finney SJ, Evans TW: Induction of apoptosis in sepsis; Cell suicide may be beneficial. *Crit Care Med* 2002; 30: 261-2.
23. Miller LC, Lynch EA, Isa S, Logan JW, Dinarello CA, Steere AC: Balance of synovial fluid IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist and recovery from Lyme arthritis. *Lancet* 1993 16; 341: 146-8.
24. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y: A cautionary note on the use of the tunnel stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995; 7: 61-4.
25. Wolvekamp MCJ, Carby IA, Fuller PJ: Cautionary note on the use of end-labelling DNA fragments for detection of apoptosis. *Pathology* 1998; 30: 267-71.
26. Nasraway SA: Sepsis research: we must change course. *Crit Care Med* 1999; 27: 427-30.
27. Remick DG, Garg SJ, Newcomb DE, Wollenberg G, Huie TK, Bolgos GL: Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26: 895-904.
28. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, et al: Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 14541-6.
29. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA: The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11: 153-9.
30. Xu YX, Ayala A, Monfils B, Cioffi WG, Chaudry IH: Mechanism of intestinal mucosal immune dysfunction following trauma-hemorrhage: increased apoptosis associated with elevated Fas expression in Peyer's patches. *J Surg Res* 1997; 70: 55-60.
31. Coutinho HB, Robalinho TI, Coutinho VB, Amorim AM, Furtado AF, Ferraz A, et al: Intra-abdominal sepsis: an immunocytochemical study of the small intestine mucosa. *J Clin Pathol* 1997; 50: 294-8.
32. Gilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, McMurray TJ: The choice of anesthetic maintenance technique influences the anti-inflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anesth Analg* 1997; 85: 1394-8.
33. Salo M: Effect of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992; 36: 201-20.
34. Mahidhara R, Billiar TR: Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 105-13.
35. Galley HF, Dubbels AM, Webster NR: The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg* 1998; 86: 1289-93.
36. Pirttikangas CO, Salo M, Mansikka M, Gronroos J, Pulkki K, Peltola O: The influence of anaesthetic technique upon the immune response to hysterectomy. A comparison of propofol infusion and isoflurane. *Anaesthesia* 1995; 50: 1056-61.
37. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG: The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth* 1992; 68: 613-8.
38. Demiryurek AT, Cinel I, Kahraman S, Tecder-Unal M, Gogus N, Aypar U, et al: Propofol and intralipid interact with reactive oxygen species: a chemiluminescence study. *Br J Anaesth* 1998; 80: 649-54.
39. Delogu G, Famularo G, Moretti S, De Luca A, Tellan G, Antonucci A, et al: Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical/anaesthesia trauma. *J Trauma* 2001; 51: 92-7.
40. Sebel PS, Lowdon JD: Propofol; a new intravenous anaesthetic. *Anesthesiology* 1989; 71: 260-77.
41. Simons PJ, Cockshott ID, Douglas EJ, Gordon EA, Hopkins K, Rowland M: Disposition in male volunteers of a subanaesthetic intravenous dose of an oil in water emulsion of ¹⁴C-propofol. *Xenobiotica* 1988; 18: 429-40.