

JAROSŁAW CWALIŃSKI

**OCENA BIOZGODNOŚCI 0,9% ROZTWORU NaCl
JAKO PŁYNU STOSOWANEGO DO PŁUKANIA
JAMY BRZUSZNEJ PODCZAS ZABIEGÓW
CHIRURGICZNYCH**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Z Katedry i Zakładu Patofizjologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: Prof. dr hab. Andrzej Bręborowicz**

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Bręborowicz

Poznań 2012

Spis treści

STRESZCZENIE	3
SUMMARY	5
WSTĘP	
1.Struktura i czynność otrzewnej. Funkcje mezotelium otrzewnowego.....	7
2.Patogeneza urazu otrzewnej. Mechanizmy regeneracji otrzewnej i mezotelium.....	8
3.Patomechanizm formowania zrostów otrzewnowych.....	12
4.Zrosty otrzewnowe jako źródło problemów klinicznych i społecznych.....	14
5.Współczesne strategie kontroli i przeciwdziałania zrostom otrzewnowym.....	17
6.Sól fizjologiczna – „niefizjologiczna”	21
CEL PRACY	22
MATERIAŁ I METODYKA	23
1.Ocena zmian składu i biogodności soli fizjologicznej na modelu zwierzęcym.....	23
1.1.Ocena zmian składu płynu wewnątrzotrzewnowego podczas 4. godzinnej inkubacji w jamie brzusznej szczura.....	23
1.2 Wpływ płynu inkubowanego w jamie otrzewnej na szczurze komórki mezotelialne w warunkach <i>in vitro</i>	25
1.2.1. Hodowla <i>in vitro</i> szczurzych komórek mezotelium otrzewnowego.....	25
1.2.2 Zdolność komórek mezotelialnych szczura do syntezy MCP-1 podczas ekspozycji na sól fizjologiczną lub jej pochodne powstałe podczas inkubacji <i>in vivo</i> roztworu 0.9% NaCl w jamie otrzewnowej szczurów.....	25
1.2.3. Ocena proliferacji szczurzych komórek mezotelialnych podczas ekspozycji na sól fizjologiczną lub jej pochodne powstałe podczas <i>in vivo</i> inkubacji roztworu 0.9% NaCl w jamie otrzewnowej szczurów.....	26
2. Ocena właściwości 0.9% roztworu NaCl drenowanego z jamy brzusznej po płukaniu tym roztworem pola operacyjnego w trakcie laparoskopowych zabiegów chirurgicznych u ludzi.....	27
2.1.Pobieranie płynu drenowanego z jamy brzusznej pacjentów podczas operacji laparoskopowych.....	27
2.2.Hodowla <i>in vitro</i> ludzkich komórek mezotelialnych.....	28
2.3.Efekt drenowanego z jamy otrzewnowej roztworu 0.9% NaCl na czynność ludzkich komórek mezotelialnych w hodowli <i>in vitro</i>	29
2.4. Efekt drenowanego z jamy otrzewnowej roztworu 0.9% NaCl na proliferację ludzkich komórek mezotelialnych w hodowli <i>in vitro</i>	30
3. Metodyka oznaczeń stosowanych w eksperymentach.....	31
3.1.Szczurzy transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ (TGF $\beta 1$).....	31
3.2.Szczurzy czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF).....	31

3.3. Szczurze białko chemotaktyczne dla monocytów-1 (MCP-1).....	31
3.4. Elastaza leukocytów.....	32
3.5. Ludzki tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA).....	32
3.6. Ludzki inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1).....	32
3.7. Ludzka interleukina 6 (IL-6).....	33
3.8. Białko całkowite w lizatach komórkowych.....	33
3.9. Ilościowa ocena komórek w płynie drenażowym.....	33
3.10. Jakościowa ocena komórek w dializacie.....	34
4. Analiza statystyczna.....	34
WYNIKI	35
1. Ocena zmian składu płynu wewnątrztrzewnowego podczas 4 godzinnej inkubacji w jamie brzusznej szczura.....	35
2. Wpływ płynu inkubowanego w jamie otrzewnej na szczurze komórki mezotelialne w warunkach hodowli <i>in vitro</i>	45
3. Ocena parametrów czynnościowych ludzkich komórek mezotelialnych eksponowanych w hodowli <i>in vitro</i> na roztwór 0.9% NaCl drenowany z jamy brzusznej podczas zabiegów laparoskopowych.....	46
4. Analiza badań laboratoryjnych w kontekście danych klinicznych.....	50
DYSKUSJA	53
WNIOSKI	64
TŁUMACZENIE STOSOWANYCH SKRÓTÓW OBCOJĘZYCZNYCH	65
PIŚMIENNICWO	66

Ocena biogodności 0,9% roztworu NaCl jako płynu stosowanego do płukania jamy brzusznej podczas zabiegów chirurgicznych.

Roztwór 0.9% NaCl nazywany solą fizjologiczną jest powszechnie stosowany do płukania jamy brzusznej podczas zabiegów chirurgicznych. Jednak skład tego płynu w znacznym stopniu różni się od charakterystyki płynów ustrojowych. Stężenie sodu i chloru pozostaje w stosunku równomolowym, odpowiednio 154 mmol [Na⁺] i 154 mmol [Cl⁻] w 1000 ml, z osmolalnością szacowaną na około 308 mOsm/l, wyższą niż osmolalność surowicy. Z kolei brak buforów powoduje, że pH tego roztworu ma odczyn kwaśny i waha się w zakresie 5.5 do 6.0. Biorąc pod uwagę że środowisko wewnątrztrzewnowe jest układem dynamicznym, a błona otrzewnowa posiada cechy błony półprzepuszczalnej sól fizjologiczna może poprzez swój hipertoniczny charakter wpływać na zmiany gradientu elektrochemicznego. Ponadto wewnątrztrzewnowa infuzja soli wiąże się z występowaniem niekorzystnych zmian biologicznych m.in. zaburzeniem aktywności fibrynolitycznej, nasileniem generacji wolnych rodników oraz wzrostem syntezy prozapalnych cytokin. Wyniki poprzednich badań *in vitro* sugerują, że ekspozycja mezotelium otrzewnowego na 0,9% NaCl może być jedną z przyczyn powstawania zrostów otrzewnowych.

Celem przeprowadzonych w niniejszej pracy badań była ocena zmian składu i biogodności soli fizjologicznej po wprowadzeniu tego roztworu do jamy brzusznej. Zakres prowadzonych prac zaprojektowano z uwzględnieniem detekcji kluczowych zmian zachodzących zarówno w środowisku *in vitro* jak i *in vivo* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego oraz ludzkiego mezotelium.

W pierwszym etapie badań opartym na modelu zwierzęcym, u szczurów rasy Wistar, oceniano zmiany składu i właściwości roztworu 0.9% NaCl podczas jego inkubacji *in vivo* w jamie otrzewnowej. W kolejnej części eksperymentu oceniano wpływ pobranych z jamy brzusznej szczurów próbek płynu na czynność szczurzych komórek mezotelialnych hodowanych w warunkach *in vitro*.

W etapie drugim oceniano wpływ 0.9% NaCl na czynność ludzkich komórek mezotelialnych w hodowli *in vitro*. Badano efekt pobranego *ex vivo* płynu z drenażu jamy brzusznej wykonanego podczas laparoskopowej cholecystectomii na ludzkie komórki mezotelialne.

Czterogodzinna inkubacja soli fizjologicznej w środowisku wewnątrztrzewnowym szczurów ujawniła zmianę pH od wartości średniej pH 6,81 do 7,56 pod koniec eksperymentu oraz postępujący wzrost stężenia białka całkowitego, elastazy oraz prozapalnych cytokin: MCP-1, TGFβ oraz VEGF. Stężenia wybranych elektrolitów w badanym płynie cechowała tendencja do wyrównywania poziomów w kierunku ich wyjściowych stężeń w surowicy. Zmianie uległ również profil komórkowy z wyraźnym odsetkowym wzrostem populacji makrofagów i granulocytów kwasochłonnych oraz regresem populacji limfocytów.

Następnie prowadzone *in vitro* hodowle szczurzych komórek mezotelialnych poddano ekspozycji na próbki pobranego *ex vivo* w kolejnych interwałach czasowych roztworu 0.9% NaCl. Stwierdzono postępujący wzrost stężenia MCP-1 oraz spadek natężenia

proliferaacji komórkowej proporcjonalny do czasu wewnątrztrzewnowej inkubacji płynu z danej próbki.

W drugim etapie badań ludzkie komórki mezotelialne eksponowano na płyn uzyskany podczas śródoperacyjnego płukania jamy otrzewnej. Pobrane próbki podzielono na: czyste - przezroczyste ($n_1=18$), z hemolizą małego stopnia ($n_2=9$), z hemolizą dużego stopnia ($n_3=9$) oraz próbki zawierające żółć ($n_4=4$). Po 24-godzinnej inkubacji odnotowano tendencję wzrostową produkcji interleukiny 6 we wszystkich grupach komórek mezotelialnych poddanych działaniu płynu drenażowego, przy czym dla mezotelium hodowanego w środowisku zawierającym płyn „czysty” produkcja IL6 była wyższa niż w grupie kontrolnej. Z kolei największe stężenie PAI-1 obserwowano w grupie eksponowanej na płyn zawierający żółć. Wzrost syntezy tPA obserwowano w mezotelium hodowanym w próbce ze śladową hemolizą oraz zawierającą żółć, jednakże zmiany te nie były statystycznie istotne. Natomiast proliferacja komórkowa była największa w obu grupach kontrolnych zawierających odpowiednio medium hodowlane oraz standardowy 0,9% roztwór NaCl. Najniższy poziom wzrostu mezotelium odnotowano w hodowli zawieszanej w płynie zawierającym żółć.

Obecność 0,9% NaCl w środowisku wewnątrztrzewnowym zmienia środowisko pod względem fizykochemicznym oraz biologicznym. W miarę wydłużania czasu ekspozycji dochodzi wyrównania gradientu stężeń jonów po obu stronach błony otrzewnej oraz normalizacji pH roztworu. Jednocześnie dochodzi do rozwoju stanu zapalnego, czego konsekwencją jest spadek lokalnej aktywności fibrynolitycznej, wzrost produkcji wolnych rodników i prozapalnych cytokin. Zmianie ilościowej i jakościowej ulega również populacja komórek obecna w środowisku wewnątrztrzewnowym. Podsumowując, w świetle powyższych rozważań soli fizjologicznej nie można uznać za roztwór całkowicie biogodny.

Słowa kluczowe: zrosty otrzewnowe, błona otrzewnowa, komórki mezotelialne, reakcja zapalna.

Biocompatibility of 0,9% NaCl solution as a liquid used to intraperitoneal dwell during surgical procedures.

Solution of 0,9% NaCl called normal saline is commonly used to wash out peritoneal cavity during surgical procedures. However the composition of this fluid differs essentially from body liquids. The osmolality of normal saline is slightly higher (308 mOsm/l) with concentration both sodium and chloride in equal molar relation, respectively $[Na^+]$ 154 mmol/l and $[Cl^-]$ 154 mmol/l.

Moreover 0,9%NaCl solution is deprived any buffers, therefore the pH remains acidic with average value 5,5 -6. Take into consider that intraperitoneal environment is characterized by many dynamic reactions and peritoneal membrane presents semipermeable properties 0,9% NaCl infusion may through its hypertonic composition change local electrochemical gradient. Normal saline induces also many biological disadvantages, such as depression of fibrinolytic activity, increase of free radicals generation and determine proinflammatory cytokines synthesis. The outcoms of previous researches suggest that the exposition of mesothelial cells to 0,9% NaCl solution may lead to peritoneal adhesions formation.

The aim of the present study was evaluation how biocompability and composition of the 0,9% NaCl solution is changing during its dwell within the abdominal cavity. Aera of interest included in vivo experiments on rat model and in vitro observations on primary cultures of human peritoneal mesothelial cells.

At the first stage of study based on rats model alterations of composition and properties 0,9% NaCl solution during its intraperitoneal incubation were evaluated. The next part of investigation examined the impact of fluid samples obtained after intraperitoneal infusion on primary cultures of rat's peritoneal mesothelium.

The second stage of research depended on observation the effects of 0,9% NaCl solution on primary human mesothelial cells. It was evaluated the impact of fluid samples obtained after peritoneal lavage during laparoscopic cholecystectomy on human mesothelium within in vitro environment.

Four hours observation revealed that value of the fluid's pH during incubation changed from 6,81 to 7,56 at the end of experiment. At the same time fluids protein concentration, proinflammatory cytokine level (MCP-1 , $TGF\beta$ and VEGF) and elastase activity were gradually elevated. Concentration of select electrolytes: sodium and chloride

tend to equalization towards their normal plasma level. There was also observed increase of cells count as well as their morphological differentiation: amount of macrophages and eosinophils were extended whereas percentage of lymphocytes was reduced. Subsequently rat's mesothelial cells maintained in *in vitro* culture were incubated with fluid samples obtained after various time of dwell in the peritoneal cavity. The outcomes revealed gradually increasing MCP-1 level and suppressing proliferation of the mesothelial cells with proportional effect to the dwell time.

In the second part of study primary human mesothelial cells were exposed on fluid samples obtained after intraperitoneal lavage during surgical procedure. Collected samples divided into four groups: clear – pellucid ($n_1=18$), low intensity of haemolysis ($n_2=9$), large intensity of haemolysis ($n_3=9$) and samples with bilirubin ($n_4=4$). After 24 hours examination level of interleukin 6 was increasing among each cultures of mesothelium incubated with fluid samples obtained after peritoneal dwell. In addition to synthesis of this cytokine within the cell population placed in “clear” fluid samples tended to be higher in comparison to control cells group. Simultaneously the highest concentration of PAI-1 characterized mesothelial cells exposed to the fluid with bile and furthermore intensity of tPA synthesis was extremely elevated within mesothelial cultures treated with fluid samples containing small amount of blood and bile, these alterations however did not differ statistically. Proliferation of mesothelial cells was exceedingly stimulated by conventional culture medium and standard 0,9% NaCl solution. Concurrently cells growth was definitely suppressed after incubation with fluid containing vestige of bile.

Normal saline introduced into abdominal cavity modify biological and physicochemical features of intraperitoneal environment. During intraperitoneal incubation 0,9%NaCl solution its composition approximated to body fluids properties: pH and electrolytes undergo gradual normalization, but simultaneously this fluid may initiate local inflammation and induce cytotoxic effect on mesothelial cells. In clinical routine influence of 0,9NaCl solution on mesothelial cells depends to a large degree on local contaminants such as hemoglobin or bile.

Key words: peritoneal adhesions, peritoneal membrane, mesothelial cells, immunological reaction

Wstęp

1. Struktura i czynność otrzewnej. Funkcje mezotelium otrzewnowego.

Pod względem anatomicznym otrzewna stanowi cienką, dwublaszkową, błonę surowiczą wyścielającą ściany jamy brzusznej i pokrywającą narządy wewnętrzne [1,2]. Błaszka zewnętrzna tj. otrzewna ścienna (*peritoneum parietale*) tworzy jednolitą, wewnętrzną warstwę ściany jamy brzusznej i miednicy mniejszej, rozciągając się aż na przeponę. Schodząc dośrodkowo z tylnej ściany brzucha oraz ze ścian miednicy tworzy otrzewną trzewną (*peritoneum viscerale*, blaszka wewnętrzna) obejmującą narządy jamy brzusznej [1,2,3]. W miejscu, w którym otrzewna ścienna przechodzi w otrzewną trzewną, powstaje dwublaszkowe pasmo łącznotkankowe nazywane krezką, stanowiące mechaniczne rusztowanie dla narządu. Krezka zapewnia ochronę poprzez wykształcenie błony surowiczej jak również tworzy podłoże dla szeregu naczyń i włókien nerwowych zaopatrujących jelito [2,3].

W kontekście rozwoju zrostów istotną rolę pełni stosunek przestrzenny między otrzewną trzewną, a narządami jamy brzusznej. Na bazie tego podziału wyróżnić można narządy położone wewnątrzotrzewnowo takie jak żołądek, opuszka dwunastnicy, jelito czcze i kręte, kątnica z wyrostkiem robaczkowym, poprzecznicą, esicą, górna część odbytnicy oraz macica. W grupie narządów położonych pozaotrzewnowo wyróżnia się nerki, nadnercza, trzustkę oraz pozostałe odcinki dwunastnicy. Wreszcie istnieje grupa organów położonych pierwotnie wewnątrzotrzewnowo, która w trakcie rozwoju osobniczego zyskała wtórne położenie pozaotrzewnowe, należą tu: pęcherz moczowy, środkowa część odbytnicy, wstępnica i okrężnica zstępująca. Lokalizacja danego narządu może mieć kluczowe znaczenie podczas ewentualnego leczenia operacyjnego, wpływając na późniejsze ryzyko powikłań. Decyduje ona o rodzaju dostępu operacyjnego, a tym samym o stopniu traumatyzacji tkanek. Pod tym względem najkorzystniejsze wydaje się być położenie pozaotrzewnowe [2,3].

Otrzewna pokryta jest nabłonkiem mezotelialnym o zmiennej grubości od 0,6 do 2 μm [4]. Komórki leżą na cienkiej błonie oddzielonej od błony podstawnej naczyń włosowatych warstwą tkanki śródmiąższowej o grubości około 2-3 mm [4,5]. Szacuje się że powierzchnia otrzewnej wynosi około 1,7 – 2,2 m^2 , jednak obecność mikrokosmków w warstwie luminalnej komórek mezotelialnych zwiększa potencjalną powierzchnię wymiany do 40 m^2 [4,6,7,8]. Taka budowa decyduje o dużych możliwościach resorbcyjno-

dyfuzyjnych, co wykorzystywane jest m.in. w dializie otrzewnowej [4,9]. Może jednak pogarszać rokowanie w sytuacjach toczących się patologii, zwłaszcza w zapaleniu, kiedy duża powierzchnia chłonna stanowi otwarte wrota dla inwazji bakteryjnej [10,11].

Ze względu na swoją budowę i właściwości otrzewna spełnia szereg kluczowych funkcji. Przede wszystkim zapewnia stabilny układ przestrzenny, stanowi podporę narządów jamy brzusznej, chroniąc je przed urazami mechanicznymi i co najistotniejsze umożliwia wzajemne, bezkolizyjne ruchy sąsiadujących ze sobą organów [1,2,3]. Jest to możliwe dzięki obecności w jamie otrzewnej niewielkiej (20 – 100 ml) ilości płynu przesiękowego przez co obie blaszki - zewnętrzna i wewnętrzna przesuwiają się względem siebie bez tarcia [3,8]. Ponadto otrzewna koordynuje prawidłowe funkcjonowanie narządów, tworzy dla nich optymalne środowisko, a w sytuacjach zagrożenia minimalizuje skutki powstałych patologii [1,12]. Dzięki dobremu unerwieniu każdy uraz otrzewnej, niezależnie od jego charakteru (mechaniczny, termiczny, biologiczny itp.) powoduje zespół objawów tzw. objawów otrzewnowych sugerujących poważną chorobę wewnątrzbrzuszną [10,11,13].

2. Patogeneza urazu otrzewnej. Mechanizmy regeneracji otrzewnej i mezotelium.

Lokalny stan zapalny jest wspólnym mianownikiem oddziaływania szeregu czynników bezpośrednio uszkadzających otrzewną. Zarówno uraz mechaniczny powstały w trakcie procedur inwazyjnych jak i biologiczny będący efektem infekcji drobnoustrojowej lub reakcji alergicznej indukuje miejscową odpowiedź zapalną [14,15,16]. Sekrecja mediatorów zapalnych m.in. czynnika martwicy nowotworów alfa (*ang. tumor necrosis factor alfa*, TNF α), interleukiny-1 (*ang. interleukin-1*, IL-1), interleukiny-6 (*ang. interleukin-6*, IL-6), interleukiny-8 (*ang. interleukin-8*, IL-8), eikozanoidów (prostacykliny, prostaglandyn, leukotrienów), tlenku azotu (*ang. nitric oxide*, NO) oraz wazoaktywnych peptydów (serotoniny i histaminy) zwiększa przepuszczalność naczyń i działa chemotaktycznie dla leukocytów, przede wszystkim makrofagów [16,17,18]. W obszarze zapalnym odnaleźć można także granulocyty objętochłonne, komórki tuczne oraz elementy układu dopełniacza [8, 14, 19]. Suma powyższych zjawisk prowadzi do fagocytozy komórek martwych i uszkodzonych, rozkładu macierzy międzykomórkowej z udziałem metaloproteinaz oraz generacji wolnych rodników [19,20,21]. Stan zapalny będący następstwem samego urazu

może zostać spotęgowany poprzez dodatkowe czynniki zewnętrzne takie jak obecność bakterii, żółci czy treści jelitowej.

Wraz z nasileniem procesu zapalnego i postępującym uszkodzeniem naczyń dochodzi do aktywacji układu hemostazy [20,22]. Formowaniu pierwotnego czopu płytkowego towarzyszy indukcja osocznego układu krzepnięcia, przede wszystkim jego zewnątrzpochodnego szlaku, związanego z bezpośrednim uszkodzeniem komórek i następczym wyzwaniem czynnika tkankowego (*ang. tissue factor*, TF) [23,24]. Poprzez czynnik VII czynnik tkankowy aktywuje czynnik X stanowiący wspólny element sprzęgający oba (zewnątrz- i wewnątrzpochodny) szlaki kaskady krzepnięcia. Dodatkowo kompleks TF/czynnik VIIa aktywuje czynnik IX układu wewnątrzpochodnego, nasilając tym samym działanie prozakrzepowe. Szlak wewnątrzpochodny poza działaniem prozakrzepowym, nasila lokalny stan zapalny (aktywacja bradykininy przez kalikreinę tkankową) oraz aktywuje fibrynolizę (kininogen, kalikreina) [23,24,25,26]. Końcowym etapem procesu krzepnięcia jest aktywacja czynnika X do Xa, a dalej protrombiny w trombinę. Jej aktywacja odbywa się przy współdziałaniu kompleksu protrombinazowego w skład którego wchodzi także czynnik Va, Xa, jony wapnia oraz fosfolipidy płytkowe. Finalnie protrombina hydrolizując cztery wiązania fibrynogenu odłącza fibrynopeptydy i pozostawia monomery fibryny zdolne do wytworzenia nierozpuszczalnego skrzepu fibrynowego stabilizowanego dodatkowo przez czynnik XIIIa [23, 24].

Aktywacja procesów hemostazy umożliwia zatrzymanie krwawienia oraz inicjuje powstanie sieci fibrynowej wypełniającej ubytki tkankowe powstałe w wyniku bezpośredniego zniszczenia komórek [19, 27]. Końcowym etapem jest gojenie stymulowane w głównej mierze przez infiltrujące sieć włókniaka makrofagi, stanowiące podstawowy element komórkowy okolicy rany. Produkowane cytokiny m.in. interleukina-4 (*ang. interleukin-4*, IL-4), interleukina-10 (*ang. interleukin-10*, IL-10) oraz transformujący czynnik wzrostu beta (*ang. transforming growth factor β* , TGF- β), wywołują reakcję zapalną oraz warunkują proliferację niezbędną do całkowitej regeneracji uszkodzenia [28,29].

Efektom opisanych procesów jest nasilone gojenie otrzewnej mogące prowadzić do rozwoju zrostów. Proces ten ulega nasileniu w sytuacji wystąpienia powikłań septycznych, na przykład wskutek perforacji przewodu pokarmowego i przedostania się skażonej treści jelitowej pomiędzy narządy jamy brzusznej [30,31]. Zaistnienie tego typu powikłań stanowi bezpośrednie zagrożenie życia związane z ryzykiem masywnej toksemii, a także może stać

się przyczyną późniejszych relaparotomii w wyniku intensywnego rozwoju zrostów otrzewnowych [22,32,33].

W odniesieniu do powyższych rozważań należy zdać sobie sprawę, że podczas każdego zabiegu chirurgicznego w obrębie jamy brzusznej lub miednicy mniejszej, poszczególnym etapom operacji towarzyszy różnego stopnia uszkodzenie tkanek i powstałe w jego następstwie krwawienie [34,35]. Inicjowana w ten sposób kaskada krzepnięcia prowadzi do odkładania włókien fibrynowych i organizowania nierozpuszczalnego skrzepu fibrynowego [19,36,37]. Hellebrekers i wsp.[38] stwierdzili wzrost stężenia monomerów fibryny już po 4. godzinach od zakończenia operacji z punktem maksymalnym po 16 – 24 h. Sieć utworzona przez włókna fibrynowe stanowi podłoże dla produkujących włókien makrofagów, fibroblastów oraz z proliferującego mezotelium kontynuując fizjologiczny proces gojenia tkanek po powstałym urazie [19,26,39].

Naturalną konsekwencją fibrynogenezy jest fibrynoliza, proces zdefiniowany już pod koniec XIX wieku przez Datre'a [1], polegający na rozpuszczaniu skrzepów fibrynowych. Podstawowym elementem tego układu jest plazmina, proteaza serynowa powstała w wyniku aktywacji plazminogenu. Stabilność układu hemostazy wymaga stałej kontroli aktywności plazminy poprzez jej naturalne inhibitory (α_2 antyplazmina i α_2 antytrypsyna, α_2 -makroglobulina, trombospodyna) oraz regulację aktywacji plazminogenu [14,24,40,41]. Odbywa się ona głównie z udziałem tkankowego aktywatora plazminogenu (*ang. tissue plasminogen activator*, tPA) stanowiącego 95% aktywności aktywatora plazminogenu (*ang. plasminogen activator activity*, PAA) [14,41,42] oraz innych, mniej istotnych czynników: aktywatora plazminogenu typu urokinazy (*ang. urokinase plasminogen activator*, uPA) oraz prekursorów wewnątrzpochoźnego układu krzepnięcia [42,43,44]. Z kolei działanie antagonistyczne wykazują inhibitory aktywatora plazminogenu: PAI-1, PAI-2 i PAI-3 (*ang. plasminogen activator inhibitor*) [14,45,46]. W świetle obecnych badań zmniejszenie aktywności plazminogenu przy wzroście aktywności jego inhibitorów ma decydujący wpływ na obniżenie potencjału fibrynolitycznego [45,47.]. Kluczową rolę w regulacji tego procesu odgrywa przede wszystkim równowaga tPA/PAI-1, pozostałe czynniki wpływają na równowagę hemostatyczną raczej marginalnie [47,48,49,50,51].

Jak już wcześniej wspomniano formowanie skrzepu fibrynowego jest podstawowym mechanizmem regeneracji uszkodzeń tkanek. Raftery i wsp. [19] badając kolejne etapy gojenia otrzewnej zauważyli że proces ten jest inicjowany przez leukocyty, przede wszystkim makrofagi, infiltrujące sieć fibrynową. Począwszy od drugiej doby w obszarze uszkodzenia

pojawiają się pojedyncze, wydłużone komórki, z relatywnie dużym jądrem i skąpą cytoplazmą uważane za pierwotne komórki mezenchymalne. Część z nich, charakteryzująca się rozbudowanym aparatem Golgiego oraz licznymi rybosomami tworzy łącznotkankową macierz stabilizującą gojącą się bliznę. W tym okresie zaobserwować można także nieliczne wysepki prekursorowych komórek mezotelialnych [19,52, 53]. W kolejnych dniach procesu regeneracji kolejno zmienia się nie tylko proporcjonalny udział poszczególnych komórek, ale także ich przestrzenne rozmieszczenie. Stopniowo maleje populacja makrofagów skupionych w powierzchniowych sektorach uszkodzenia, za to u podstawy wzrasta liczba komórek mezenchymalnych i mezotelialnych, a po około 4. dniach pojawiają się pierwsze fibroblasty. W 8. dobie komórki mezotelialne tworzą jednolitą, ciągłą warstwę spoczywającą na błonie podstawnej, a począwszy od 10. dnia od urazu rozpoczyna się intensywna produkcja kolagenu [19,54,55]. W tym okresie regeneracji sieć fibrynowa wraz z makrofagami niemal w całości zostaje zastąpiona jest przez łącznotkankową macierz. Podsumowując, kluczowe procesy gojenia uszkodzonej błony otrzewnowej zachodzą w pierwszych 10. dniach od razu [19,27]. Okres ten cechuje zarówno duża dynamika zmian komórkowych jak również fluktuacja układu przestrzennego. Dalsze etapy gojenia są w istocie ugruntowaniem procesów zainicjowanych w pierwszym tygodniu wspomaganych przez późniejszą waskularyzację.

Przedmiotem wielu analiz było wyjaśnienie sposobu rekrutacji komórek mezotelialnych w obszarze gojenia zranionej otrzewnej. Najbardziej wiarygodnym wydaje się założenie że źródłem komórek mezotelialnych jest tkanka łączna rejonu podotrzewnowego (*subperitoneum*). Inne teorie zakładały transformację makrofagów (kolejno w fibroblasty i dalej w komórki mezotelium) lub proliferację komórek mezotelialnych z brzegu rany do jej centrum [19,36,56]. Powyższe rozważania prowadzą do wniosku że gojenie otrzewnej jest nierozdzielnie związane z lokalną aktywnością hemostatyczną, a właściwa fibrynoliza kontroluje ten proces i zapobiega powstawaniu zrostów. Obserwacje kliniczne prowadzone w połowie lat 60-tych XX przez Ellisa i Harrisona [20], potwierdzone przez Glucksmana [57] dowiodły że otrzewna ścienna goi się w ciągu 5-6 dni. Dalsze obserwacje ujawniły że okres pierwszych 7-10 dni po operacji stanowi największe ryzyko wystąpienia powikłań indukowanych zrostami, przede wszystkim wczesnej niedrożności jelit [57,58]. Nasuwa to jednoznaczny wniosek że zrosty otrzewnowe są elementem procesu regeneracji otrzewnej po urazie, tym bardziej że są one odnajdywane u ponad 90% pacjentów poddanych interwencji chirurgicznej lub ginekologicznej [14,58,59]. Nadal jednak pozostaje pytanie dlaczego

w części przypadków zrosty są minimalne i klinicznie nieme, u innych zaś liczne, z dużą ilością naczyń i prowadzą do szeregu powikłań.

3.Patomechanizm formowania zrostów otrzewnowych.

Obecnie istnieje kilka hipotez opisujących powstawanie zrostów otrzewnowych. U podstawy tego procesu zawsze leży miejscowy uraz błony otrzewnowej, wymagający późniejszej regeneracji. Według Holmdahl i wsp.[14] do uszkodzenia mezotelium może prowadzić jeden z trzech głównych mechanizmów: lokalne niedokrwienie, rozwój stanu zapalnego lub obecność ciała obcego [14,60,61,62]. Pierwszy mechanizm ma znaczenie głównie w dyscyplinach zabiegowych: chirurgii i ginekologii, gdzie powstawanie zrostów jest efektem ubocznym prowadzonego leczenia [14,63]. Wykonywanie niektórych manewrów jak np. silna trakcja tkanek mająca na celu odsłonięcie pola operacyjnego lub zakładanie mocnych hemostatycznych szwów nasila lokalne niedokrwienie i prowadzi do generacji wolnych rodników [63]. Następstwem jest bezpośrednie uszkodzenie komórek, obniżenie lokalnej aktywności fibrynolitycznej oraz formowanie bogato unaczynionych zrostów mogących pełnić rolę graftów dla pierwotnie niedokrwionych w czasie operacji sektorów jamy brzusznej [14,36].

Część środowisk naukowych na podstawie prowadzonych badań przekonuje że to właśnie intensywny lokalny stres oksydacyjny jest kluczowy dla rozwoju zrostów [64,65]. O toksyczności reaktywnych form tlenu wiadomo już od lat, jednak dopiero teraz, poprzez szereg doświadczeń, udowodniono ich szkodliwy wpływ na procesy gojenia otrzewnej [64,66]. Bezpośrednią przyczyną tworzenia reaktywnych form tlenu jest naprzemienne niedokrwienie i późniejsza reperfuzja [14,67]. Efektem przejściowego niedotlenienia tkanek są zaburzenia funkcjonowania łańcucha oddechowego skutkujące powstaniem niezwykle agresywnych rodników tlenowych uszkadzających z dużą łatwością wszystkie struktury komórkowe, głównie błony lipidowe [67,68]. Powyższe zjawiska wywołują supresję komórek mezotelialnych, zmniejszenie zdolności proliferacji, a w konsekwencji unicestwienie w procesie apoptozy [68]. Oprócz samego mezotelium uszkodzone zostają okoliczne tkanki, pobudzając w ten sposób prozrostowy potencjał proliferacyjny [64,68,69].

Wśród możliwych przyczyn powstawania zrostów otrzewnowych najlepiej udokumentowaną i popartą największą liczbą badań jest teoria według której decydującą rolę odgrywa zaburzenie aktywności fibrynolitycznej [14,22,70,71]. Fibrynoliza jest naturalną

konsekwencją depozycji fibryny, kluczowego białka układu hemostazy, pozwalającego ograniczyć krwawienie zapewniając tym samym stabilność układu krążenia [24,45,72,73]. Pierwsze doniesienia potwierdzające aktywność fibrynolityczną komórek mezotelialnych pojawiły się już pół wieku temu (Todd i wsp.) w 1959 [48], a w 1969 Myhre-Jensen i wsp. [50] wysunęli hipotezę wedle której, komórki mezotelium są zdolne do aktywacji plazminogenu *in situ*. Jednak dopiero badania przełomu lat 80-tych i 90-tych ubiegłego stulecia potwierdziły upośledzenie fibrynolizy jako czynnika decydującego w rozwoju zrostów otrzewnowych [14,27,45]. Źródłem fibryny deponowanej w miejscu uszkodzenia otrzewnej może być krew pochodząca z uszkodzonego naczynia, płyn wysiękowy będący efektem wzrostu przepuszczalności naczyń w obszarze zapalnym, czy wreszcie płyn otrzewnowy zawierający niewielkie ilości fibrynogenu [14,15,19]. Część autorów sugeruje że także makrofagi, podstawowe komórki miejsca zranienia, mogą produkować fibrynę [8,19]. Ich obecność zarówno na powierzchni otrzewnej jak i w obrębie *subperitoneum* umożliwia, poprzez szereg produkowanych przez nie cytokin, kontrolę tak fibrynogenu jak i fibrynolizy [14,24,27].

Wykazano ponadto że wytworzenie odmy brzusznej, niezbędnej w operacjach laparoskopowych, przyczynia się do wzrostu ciśnienia wewnątrzbrzuszego powodując ucisk naczyń krwionośnych i ograniczenie perfuzji tkankowej. Dodatkowo może również blokować przeponę utrudniając właściwą wentylację. Istotne znaczenie ma również gaz używany do insuflacji. Obecnie stosuje się do tego celu dwutlenek węgla, który tłoczony pod ciśnieniem rozpuszcza się w wysięku tkankowym tworząc kwas węglowy zmniejszający pH w obrębie tkanek. Powstała w ten sposób lokalna kwasica zmniejsza witalność komórek i utrudnia późniejsze gojenie. Ponadto wzrost ciśnienia w jamie otrzewnej zmniejsza, wedle niektórych badań, skuteczność fibrynolizy. Powyższe obserwacje tłumaczą dlaczego zabiegi laparoskopowe, pomimo początkowego entuzjazmu, nie wyeliminowały problemu powstawania pooperacyjnych zrostów otrzewnowych [35, 74, 75, 76, 77].

Ponadto prowadzone obserwacje kliniczne udowodniły że proces wzmożonego gojenia po operacji laparoskopowej dotyczy przede wszystkim okolic wprowadzania troakarów, a powstające w tych miejscach pasma łącznotkankowe w większym stopniu łączą się z siecią niż z pętlami jelitowymi. W efekcie zrosty po laparoskopii znajdują się w głównie w przestrzeni między przednią ścianą jamy brzusznej, a otrzewną trzewną okrywającą narządy [77,78]. W większości są one słabo unaczynione i stosunkowo cienkie, stąd nawet w perspektywie długofalowej, biorąc pod uwagę ich późniejszą reorganizację nie powodują

ciężkich powikłań. Oceniając wpływ technik laparoskopowych na potencjał tworzenia zrostów należy zaznaczyć że w większości operacje tego typu są zastrzeżone dla tzw. trybu planowego, w którym pacjent jest stabilny i odpowiednio przygotowany.

Dla operacji „ostrodyżurowych”, ratujących życie, nierzadko z niepełną lub niedokończoną diagnostyką nadal stosuje się konwencjonalną laparotomię dającą znacznie szerszy zakres możliwości terapeutycznych. W większości zabiegów tego typu są punktem kulminacyjnym toczącej się od dłuższego czasu patologii, wykładnikiem długofalowego stanu zapalnego, co niewątpliwie znacznie obniża potencjał regeneracyjny. Dlatego też chcąc porównać obie techniki tj. laparoskopię i laparotomię, w kontekście rozwoju zrostów otrzewnowych należy ujednoczyć kryteria oceny, traktując ostro dyżurowe laparotomie jako osobne zagadnienie [79].

4.Zrosty otrzewnowe jako źródło problemów klinicznych i społecznych.

Wieloośrodkowe badania wskazują że zrosty mogą dotyczyć nawet 93% -100% chorych leczonych operacyjnie [14, 57,58]. Większość z nich powstaje już w pierwszych dniach po operacji, a ich gwałtowny rozwój może hamować pasaż jelitowy i w konsekwencji prowadzić do rozwoju wtórnych niedrożności przewodu pokarmowego [58,80,81,82]. Najczęściej są to tzw. niedrożności wczesne, rozwijające się w pierwszym miesiącu po operacji. W późniejszym okresie ryzyko spada, dochodząc do 20% w ciągu kolejnych 10 lat po zabiegu. Każdy przypadek pojawienia się wtórnej niedrożności stanowi bezpośrednie zagrożenie życia [80,81,82]. O ile to możliwe wdraża się wówczas leczenie zachowawcze, pozostawiając ewentualną operatywę jako absolutną konieczność. Leczenie wtórnej niedrożności jest trudne, a ponowna laparotomia niebezpieczna ze względu na niejasną anatomie narządów. Ponadto każda kolejna interwencja chirurgiczna powoduje powstawanie nowych zrostów, wpływając niekorzystnie na wewnątrzbrzuszne warunki anatomiczne i pogarszając w konsekwencji komfort życia chorego. Śmiertelność towarzysząca wtórnej niedrożności jest szacowana między 3-30% [80,81,83,84].

Pod względem lokalizacji najczęściej stwierdzane są pojedyncze, słabo unaczynione zrosty między wątrobą i siecią mniejszą, a przednią ścianą jamy brzusznej. Rozwijają się one u osób uprzednio operowanych bez względu na sposób przeprowadzenia zabiegu tj. laparotomii czy laparoskopii. Znacznie poważniejsze są zrosty powstające po rozległych

operacjach jamy brzusznej przebiegających z resekcją lub zespoleniem jelit, zwłaszcza gdy zabieg przebiegał ze wskazań życiowych bez wcześniejszego przygotowania pacjenta. W takich sytuacjach dodatkowe zagrożenie stwarza ryzyko kontaminacji jamy otrzewnej przez treść ropną lub kałową, co może potęgować stan zapalny, nasilać uszkodzenie komórek, głównie mezotelialnych i zwiększać późniejszy odczyn regeneracyjny. Dlatego też laparotomie przeprowadzane ze względu na jawne klinicznie zapalenie otrzewnej jamy brzusznej (*peritonitis*) lub miednicy mniejszej (*pelvoperitonitis*) stanowią nie tylko duże ryzyko okołoperacyjne, ale także zwiększają prawdopodobieństwo wczesnych i późnych powikłań. Analiza dostępnego piśmiennictwa wskazuje że tego typu „nagłe” interwencje, w szczególności operacyjne leczenie perforacji żołądka, perforacji jelit, niedrożności mechanicznej przewodu pokarmowego, ostrego zapalenie pęcherzyka żółciowego lub ostrego zapalenia wyrostka robaczkowego, wiążą się ze zwiększonym ryzykiem formowania zrostów otrzewnowych. Podobna sytuacja może również dotyczyć operacji elektrywnych zwłaszcza przeprowadzanych na jelicie grubym lub operacji ginekologicznych [84,85]. We wszystkich wymienionych przypadkach problemem jest nie tylko sama patologia danego narządu wymagająca leczenia operacyjnego, ale również ogólnoustrojowy stan zapalny utrudniający późniejsze gojenie [58,59,80,81,83,84,85].

Leczenie chorób wywołanych przez zrosty otrzewnowe nadal stanowi trudny problem tak diagnostyczny jak i terapeutyczny, a oceniając globalnie, także socjoekonomiczny. Zrosty mogą powodować szereg dolegliwości, często o zmiennym charakterze, zazwyczaj trwających latami [8,14,86]. Do najczęstszych należą przewlekłe bóle jamy brzusznej i miednicy, niepłodność, zaburzenia rytmu wypróżnień (zwłaszcza przewlekłe zaparcia), przetoki oraz zwiężenia lub nawet niedrożność przewodu pokarmowego. Podstawowym problem w leczeniu tych schorzeń jest skuteczna diagnostyka, która pozwalałaby jednoznacznie uznać istniejące zrosty otrzewnowe za główną przyczynę dolegliwości [58,59, 87]. Wydaje się że to zadanie najlepiej spełniłyby badania obrazowe, jednak zarówno ultrasonografia, jak i tomografia komputerowa czy nawet rezonans magnetyczny nie pozwalają stwierdzić obecności zrostów otrzewnowych z dostateczną czułością i specyficznością. Pomimo rozwoju techniki, nadal jedyną dostępną metodą pozostaje laparoscopia zwiadowcza, umożliwiającą detekcję zrostów niemal w 100%, jednak ze względu na inwazyjność jest nie do zaakceptowania jako badanie rutynowe [88]. Badania laboratoryjne także nie dają satysfakcjonujących efektów. Przede wszystkim mają charakter pośredni, a zbyt niska specyficzność nie pozwala na precyzyjną lokalizację patologii. Próba

wprowadzenia detekcji malonylodialdehydu w surowicy jako standardowego testu oceniającego ustrojową generację wolnych rodników zwiększającą potencjalne ryzyko rozwoju zrostów nie znalazła, jak na razie, szerszego zastosowania klinicznego [89,90]. Wobec powyższego najczęściej stosuje się tzw. diagnostykę „z wykluczenia”, traktując zrosty jako ostateczną przyczynę choroby, po wykluczeniu innych łatwiej poddających się diagnostyce przyczyn. Przedłuża to znacznie czas hospitalizacji, zwiększa koszty leczenia, a przede wszystkim naraża chorego na dodatkowe niedogodności [58,59,88].

Jednakże nawet potwierdzenie obecności zrostów otrzewnowych i uznanie ich jako głównej przyczyny choroby nie ułatwia dalszego leczenia. Terapia zachowawcza często bywa nieskuteczna, zwłaszcza w ujęciu długofalowym, natomiast leczenie chirurgiczne jest trudne i może prowadzić do kolejnych powikłań. W codziennej praktyce najczęściej stosuje się leki przeciwbólowe i rozkurczowe pozwalające rozwiązać problem uporczywego bólu i wzdęcia, zaleca się również dietę bogatą w błonnik i leki zmniejszające spastykę jelit. Cięższe powikłania jak np. niedrożność przewodu pokarmowego próbuje się w pierwszej kolejności leczyć zachowawczo (dieta ścisła, zgłębnik żołądkowy), pozostawiając ewentualny zabieg jako ostateczność. Należy jednak pamiętać że leczenie objawowe nie daje trwałego wyleczenia, pozwala jedynie na chwilowe uwolnienie od dolegliwości, polepszając komfort życia [86,87].

Trudności związane z diagnostyką i leczeniem chorób wywołanych przez zrosty prowadzą do stałego zwiększania nakładów finansowych przez służbę zdrowia. Już w końcu lat 80-tych poprzedniego stulecia, w samych tylko Stanach Zjednoczonych oszacowano liczbę dni hospitalizacji z powodu zrostów na blisko 950 tys. rocznie, o łącznym koszcie 1179.9 miliona dolarów [86]. W roku 1994 łączna liczba dni hospitalizacji z tytułu operacyjnego usunięcia zrostów wynosiła ponad 300 tys. dając kwotę 1,3 miliarda dolarów [91]. W Szwecji rokrocznie koszt leczenia powikłań powstałych na skutek zrostów waha się w przedziale 39,9 – 59,5 mln euro, z czego na hospitalizację z powodu niedrożności jelit przeznaczona jest blisko 13 milionów dolarów [92,93]. Z kolei w Wielkiej Brytanii rokrocznie terapii w warunkach szpitalnych wymagało 12 do 14 tys. przypadków niedrożności indukowanej zrostami [82]. Oczywiście należy uściślić że powyższe dane dotyczą przypadków, w których istniała potwierdzona klinicznie korelacja między dolegliwościami, a powstałymi uprzednio zrostami otrzewnowymi [86].

5. Współczesne strategie kontroli i przeciwdziałania zrostom otrzewnowym.

Obiektywnymi czynnikami wpływającymi na potencjał prozrostowy są m.in. rodzaj i czas zabiegu, dostęp operacyjny, kwalifikacje i sprawność operatora, rodzaj użytego sprzętu (nici, wszczepy, protezy), fakultatywne płukanie jamy otrzewnej (tzw. „toaleta” jamy brzusznej) oraz biologiczne predyspozycje pacjenta. Wiele prac podkreśla że odczyn regeneracyjny można zmniejszyć poprzez skrócenie czasu zabiegu, ograniczenie śródoperacyjnego krwawienia oraz używanie biokompatybilnych materiałów. Spore nadzieje w tym względzie wiązano z technikami laparoskopowymi, których dynamiczny rozwój rozpoczął się z końcem lat 80-tych. Możliwość wykonania operacji bez konieczności szerokiego otwierania jamy brzusznej, za pomocą 3-4 drobnych cięć potrzebnych na wprowadzenie optyki i narzędzi była absolutnym przełomem w dziedzinach zabiegowych. Główną zaletą było zmniejszenie traumatyzacji tkanek i niemal całkowita ochrona otrzewnej przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych (przesuszenie, ograniczenie transmisji bakterii) [74,79]. W efekcie skróceniu uległ czas hospitalizacji, wyeliminowano ryzyko zakażenia rany oraz zmniejszono ból pooperacyjny, poprawiając tym samym jakość życia. W odniesieniu do prewencji rozwoju zrostów otrzewnowych metody laparoskopowe wydawały się być absolutnym remedium, dającym nadzieję na całkowite rozwiązanie tego problemu. Okazało się jednak że w ślad za ograniczeniem dostępu do jamy brzusznej utrudnione zostały możliwości wglądu w głąb pola operacyjnego (obraz 2D) i zaopatrzenia niektórych, groźnych powikłań śródoperacyjnych, takich jak np. krwawienie lub perforacja jelita. Niemożność wykonania części manewrów chirurgicznych drogą laparoskopową niejednokrotnie wymusza wykonanie konwersji, tj. przejścia do laparotomii, co znacznie wydłuża zabieg i zwiększa traumatyzację tkanek. Kontynuowanie operacji po wcześniejszej nieudanej laparoskopii wymaga także większego doświadczenia, a nierzadko wykonania także dodatkowych czynności naprawczych [75,76,77].

Szczególnie niebezpieczne mogą okazać się operacje laparoskopowe wykonywane u chorych już uprzednio operowanych. Najczęstszym powikłaniem jest uraz tkanek miękkich podczas wprowadzania troakarów. Może wówczas dojść do uszkodzenia ściany lub nawet perforacji „podciągniętego” na zrostach jelita, a niekiedy skaleczenia jego krezki co grozi masywnym krwawieniem. Często w takich sytuacjach konieczne jest wstępne rozdzielenie zrostów umożliwiające dalszy postęp zabiegu. Szacuje się że może to przedłużyć zabieg o 1/5 i być przyczyną dodatkowych powikłań [74,77,79,]. W większości ośrodków wcześniejsze

operacje w obrębie jamy brzusznej są względny przeciwwskazaniem do laparoskopii [77,78].

Część autorów, zwłaszcza tych wywodzących się ze środowisk klinicznych stoi na stanowisku, że podstawowe znaczenie w genezie powstawania zrostów ma charakter pierwotnego urazu otrzewnej, a przede wszystkim jego rozległość i sposób zaopatrzenia. Takie ujęcie problemu ma wymusić ograniczenie procesów zrostotwórczych we wszystkich dziedzinach zabiegowych, głównie w chirurgii i ginekologii. Stosowane obecnie dość powszechnie techniki minimalnie inwazyjne zawdzięczają swój dynamiczny rozwój próbie ograniczenia uciążliwych powikłań występujących po klasycznej laparotomii [74,79,94]. Przykładem jest nie tylko szeroko stosowana laparoscopia, ale także coraz częstsze posługiwanie się endoskopią, która umożliwia wykonanie zabiegu bez jakiegokolwiek urazu otrzewnej. Nie bez znaczenia są także modyfikacje algorytmów operacyjnych m.in. wprowadzenie rękawiczek beztalkowych, rezygnacja z bawełnianych chust przy obłożeniu pola operacyjnego i zastąpienie ich materiałami syntetycznymi [17,61,95,96]. Wreszcie rekomenduje się stosowanie specjalnych płynów do irygacji jamy otrzewnej, zamiast dotychczas stosowanych soli fizjologicznej i płynu wieloelektrolitowego (PWE) [97,98,99,100]. Zmiana dotyczy także samej techniki chirurgicznej, preferowane są możliwie jak najmniejsze cięcia oraz dbałość o „porządek” pola operacyjnego (ograniczenie krwawienia, prewencja przed skażeniem żółcią, ropą lub treścią jelitową). Nadal dyskusyjne są pewne manewry chirurgiczne m.in. stosowanie drenów, szycie otrzewnej (peritonizacja) czy dobór odpowiednich szwów [101]. Wytyczne są w tych kwestiach niejednoznaczne, a wielośrodkowe, randomizowane badania jeszcze nie ukończone co uniemożliwia standaryzację tych działań.

Zrozumienie mechanizmu formowania zrostów doprowadziło do opracowania metod prewencji dedykowanych poszczególnym etapom adhezjogenezy. Postulowano m.in. zminimalizowanie śródoperacyjnego urazu, ograniczenie lokalnego niedokrwienia, przeciwdziałanie rozwojowi stanu zapalnego oraz lepszą regulację aktywności fibrynolitycznej [102,103,104]. Pomimo szeregu badań, do tej pory nie udało się opracować jednolitego algorytmu postępowania z chorym po przebytych urazach otrzewnej, nie udało się również wprowadzić do praktyki klinicznej leku o dostatecznej skuteczności i uniwersalności.

Brak skutecznych metod przeciwdziałania zrostom otrzewnym prowadzi do dynamicznego rozwoju badań, których celem jest z jednej strony precyzyjne wyjaśnienie procesów indukujących tworzenie zrostów, z drugiej znalezienie sposobu trwale

ograniczającego ich powstawanie. Testowane obecnie rozwiązania przewidują zastosowanie środków barierowych płynnych, barierowych stałych oraz niebarierowych, tabl.1. [8,100,105,106].

Klasyfikacja	Rodzaj substancji	Piśmiennictwo
Związki barierowe		
<p>Związki barierowe płynne</p> <ul style="list-style-type: none"> • wykształcenie specjalnej powłoki utrudniającej kontakt uszkodzonej tkanki z otoczeniem • zalety: duża łatwość wprowadzenia, rozległa penetracja i biodostępność oraz możliwość wielokrotnego stosowania np. za pomocą drenażu • wady: mała wybiórczość i brak kontroli dystrybucji (w praktyce uniemożliwia to ich miejscowe zastosowanie), często występują trudności z utrzymaniem stałego składu biochemicznego (lokalna zmienność stężenia danego związku) 	<ul style="list-style-type: none"> • kwas hialuronowy (<i>hialuronic acid, HA; Sepracoat</i>) • „klej” fibrynowy (<i>ang. fibryn glue</i>) • jonowe polipeptydy (<i>poli-L-glutamina, poli-L-arginina</i>) • Poliestry (<i>Polygalctin</i>) 	<p>[107,108,109]</p> <p>[103,110]</p> <p>[111, 112, 113]</p> <p>[114]</p>
<p>Związki barierowe stałe</p> <ul style="list-style-type: none"> • dobre wyniki w lokalnej prewencji zrostów • brak zastosowania w kompartmentach wielkopowierzchniowych • może wystąpić reakcja alergiczna na wszczep syntetyczny 	<ul style="list-style-type: none"> • pochodne celulozy (<i>karboksymetyloceluloza</i>), • seprafilm, • politetrafluoroetylen (<i>PTFE</i>) • siatki polipropylen (<i>PPM, prolene mesh</i>) 	<p>[105, 115]</p> <p>[105,115]</p> <p>[116]</p> <p>[116, 117, 118]</p>

<p>Związki niebarierowe</p> <ul style="list-style-type: none"> • nie tworzą trwałej bariery na powierzchni tkanek • posiadają indywidualne <i>spectrum</i> działania • algorytm stosowania w prewencji zrostów zależy od farmakokinetyki danej substancji • w większości przypadków na etapie prób doświadczalnych 	<ul style="list-style-type: none"> • hormony (<i>melatonina, steroidy, estrogen, GnRH</i>) • inhibitory kanałów jonowych • inhibitory proteaz serynowych (<i>chymaza, apronityna</i>) • przeciwciężła anty-TGF β • leki antyhistaminowe • antybiotyki (<i>Sirolimus, Tauroolidyna</i>) • antykoagulanty (<i>heparyny drobnocząsteczkowe, LMWH</i>) • fibrynolityki (<i>tkankowy aktywator plazminogenu PA, streptokinaza</i>) • antyoksydanty (<i>Resveratrol, błękit metylenowy, witamina E, resveratrol, melatonina, pentoxyfilina,</i>) • środki odkażające (<i>chlorohexydyna, nadtlenek wodoru, azotan srebra, polivinylopirolidon</i>) • silikon • roztwory do irygacji (<i>zbuforowane węglany, mleczały, icodextrin</i>) • leki doustne stosowane w innych schorzeniach (<i>Simvastatyna, Werapamil</i>) 	<p>[118, 119, 120, 121, 122, , 123, 124, 125]</p> <p>[126]</p> <p>[105]</p> <p>[127, 128, 129]</p> <p>[125]</p> <p>[115, 130, 131]</p> <p>[105,147,148,149]</p> <p>[132, 133, 134, 145, 146]</p> <p>[135, 136, 137, 138, 139, 140]</p> <p>[106, 150,151,152]</p> <p>[141]</p> <p>[142, 143]</p> <p>[122,144]</p>
<p>Terapia biologiczna</p>	<ul style="list-style-type: none"> • wszczepy komórkowe • roztwory zawierające fosfolipidy • roztwory zawierające polisacharydy 	<p>[157]</p> <p>[141, 156]</p> <p>[153, 154,155]</p>

Tabela. 1. Eksperymentalne metody ograniczające powstawanie zrostów otrzewnowych

6.Sól fizjologiczna – „niefizjologiczna”.

Niewątpliwie jednym z najstarszych, a zarazem najpopularniejszych związków używanych *in vivo* do śródoperacyjnego drenażu płuczącego jamy otrzewnej jest 0,9% roztwór chlorku sodu nazywany powszechnie solą fizjologiczną. Związek ten stanowi jeden z najczęstszych środków leczniczych powszechnie stosowanych w codziennej praktyce klinicznej. Swoją popularność zawdzięcza przede wszystkim uniwersalności i szerokiemu spektrum zastosowań, przy jednocześnie niewielkim ryzyku powikłań i dużej łatwości użycia [158]. Z ekonomicznego punktu widzenia sól cechuje stosunkowo niski koszt produkcji oraz trwałość co czyni ją lekiem niemal idealnym. W farmakoterapii podawana jest głównie drogą dożylną, jako krystaloid służąc do wypełniania łożyska naczyniowego i uzupełniania niedoborów elektrolitowych. Spełnia również funkcję medium dla innych substancji wymagających dożylnej drogi podania. Ponadto może być wykorzystywana do przemywania skóry, błon śluzowych, ran oraz jako płyn używany do drenażu lub śródoperacyjnego płukania otrzewnej [98,159,160].

Pierwsze próby dożylnego podawania elektrolitów sięgają pierwszej połowy XIX wieku kiedy to Thomas Latta walcząc z masywnym odwodnieniem u pacjentów z cholera opracował płyn zawierający, dobrane w odpowiednich proporcjach, sól (NaCl) oraz dwuwęglan sodu [8]. Pierwsze sukcesy terapeutyczne skłoniły ówczesny świat naukowy do intensywnej pracy, czego efektem było stosowanie pod koniec XIX wieku 3 roztworów, odpowiednio Latty , Ringera oraz Krebsa [6]. Dwa pierwsze w postaci soli fizjologicznej oraz płynu Ringera używane są do dnia dzisiejszego, trzeci wykorzystywany jest w praktyce laboratoryjnej jak medium hodowli komórkowych [161].

Ze względu na swoją uniwersalność i powszechne użycie sól fizjologiczna uważana jest za roztwór całkowicie biokompatybilny, który można stosować praktycznie bez ograniczeń. To przekonanie najdobitniej odzwierciedla słowo „*fizjologiczny*” czyli zgodny ze składem biochemicznym ustroju. Jednak wieloletnie, szczegółowe badania ujawniły nowe fakty burzące obraz soli fizjologicznej jako leku idealnego. Zwykła analiza chemiczna pokazuje że w 1000 ml 0,9% roztworu NaCl znajduje się odpowiednio 154 mmol [Na⁺] oraz 154 mmol [Cl⁻], a osmolalność wynosi 308 mOsm/l. Widać więc wyraźnie że jest to roztwór równomolowy, co pozostaje w wyraźnej sprzeczności ze składem elektrolitowym płynów ustrojowych gdzie jony [Na⁺] są w przewadze, a stosunek [Na⁺]:[K⁺] wynosi 1,38. Drugi podstawowy parametr różnicujący to pH, odpowiednio 5,5-6,0 dla soli (odczyn kwaśny) oraz

7,35-7,45 dla płynów ustrojowych (odczyn nieznacznie zasadowy). Dla porządku należy dodać że stosowany powszechnie roztwór 0,9% NaCl nie jest zbuforowany, co uniemożliwia zachowanie stałości pH. Podsumowując, powyższa analiza jednoznacznie wskazuje że termin „fizjologiczny” w odniesieniu do 0,9% soli nie odpowiada prawdzie i powinien ulec redefinicji . Należy tym samym rozważyć słuszność tak powszechnego stosowania tego roztworu w terapii, tym bardziej że szereg nowych doniesień podważa jego biokompatybilność [158,161,162,163].

Analizując powyższe zagadnienia dotyczące rozwoju zrostów otrzewnowych oraz uwzględniając kliniczny i społeczny aspekt tego problemu niniejsza praca oceni biogodność roztworu 0,9% NaCl jako płynu stosowanego do płukania jamy brzusznej podczas zabiegów chirurgicznych.

Cel pracy:

- 1.Ocena zmian składu roztworu 0,9% NaCl podczas prowadzonej *in vivo* inkubacji w jamie brzusznej szczura.
- 2.Badanie zmian biogodności roztworu 0,9% NaCl podczas inkubacji w jamie brzusznej szczura.
- 3.Observacja efektu działania na czynność ludzkiego mezotelium otrzewnowego płynu drenowanego z jamy brzusznej podczas zabiegów laparoskopowych po jej płukaniu roztworem 0,9% NaCl.

Material i metodyka

Badania prowadzono w celu określenia zmian biozgodności soli fizjologicznej stosowanej do rutynowego płukania jamy brzusznej podczas operacji przebiegających z otwarciem jamy otrzewnej. Prace obejmowały dwa odrębne etapy. W pierwszym opartym na modelu zwierzęcym u szczurów rasy Wistar, oceniano zmiany składu i właściwości roztworu 0.9% NaCl podczas jego inkubacji *in vivo* w jamie otrzewnowej. W kolejnej części eksperymentu oceniano wpływ pobranych z jamy brzusznej szczurów próbek płynu na czynność szczurzych komórek mezotelialnych hodowanych w warunkach *in vitro*.

W drugim etapie badań oceniano wpływ 0.9% NaCl na czynność ludzkich komórek mezotelialnych w hodowli *in vitro*. Zastosowano w tym protokole doświadczalnym roztwór soli fizjologicznej użyty rutynowo do płukania jamy brzusznej podczas zabiegów laparoskopowych. Badano efekt drenowanego płynu na ludzkie komórki mezotelialne w hodowli *in vitro*.

1. Ocena zmian składu i biozgodności soli fizjologicznej na modelu zwierzęcym

W tej części pracy oceniano zmiany składu i właściwości roztworu 0.9% NaCl wprowadzonego do jamy brzusznej szczura w trakcie trwającej 4 godziny inkubacji. Dodatkowo badano wpływ uzyskanych w różnym czasie trwania wewnątrzotrzewnowej inkubacji próbek płynu na czynność szczurzych komórek mezotelialnych w hodowli *in vitro*.

1.1 Ocena zmian składu płynu wewnątrzotrzewnowego podczas 4. godzinnej inkubacji w jamie brzusznej szczura.

Badanie zmian składu oraz stopień biozgodności soli fizjologicznej wykonano u 10. szczurów, samców rasy Wistar, o średniej masie ciała 388 ± 22 g. Szczury znieczulano wstępnie przy pomocy eteru, a następnie eksperyment kontynuowano na zwierzętach poddanych neuroleptanalgezji (Fentanyl 0,004 mg/100 g. i Droperidol 0,2 mg/100 g masy ciała). Zwierzęta ważono, z powierzchni brzucha usuwano sierść, a następnie skórę

przykrywano sterylnym opatrunkiem 3M Tegaderm™ Medical-Surgical Division, (St. Louis, USA). Kolejno po wykonaniu 2 cm cięcia pośrodkowego jamy brzusznej wprowadzano dootrzewnowo 30 ml sterylnego roztworu 0,9% NaCl, o pH 5,8 i temp. 37°C. Cięcie w powłokach jamy brzusznej zamykano przy pomocy sterylnego zacisku. Płyn pozostawał w jamie otrzewnowej przez okres 4. godzin, przy czym w odstępach 30. minutowych, po zwolnieniu zacisku, w sposób jałowy pobierano 2 ml płynu do dalszych analiz.

Po uzyskaniu próbek płynu, mierzono wartość pH za pomocą pH- metru CP-411 Elmetron (Zabrze, Poland), określano ilość komórek w próbce oraz liczone ich skład odsetkowy. Po odwirowaniu (10 min, 150g) próbki zamrażano w temperaturze – 20°C, pozostawiając do czasu wykonania dalszych analiz. W uzyskanych próbkach płynu badano następujące parametry:

- A. Białko całkowite przy pomocy metody Lowry'ego [164].
- B. Elektrolity – sód [Na⁺] i potas [K⁺] w analizatorze elektrolitów 9180 Electrolyte Analyzer, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.
- C. Aktywność elastazy - pomiar kolorymetryczny, stosując jako substrat dla jej działania ester N-t-BOC-L-alanino-p-nitrofenylowy (Sigma Chemical, USA) [165].
- D. Stężenie Transformującego Czynnika Wzrostu β1 (*ang. Transforming Growth Factor beta*, TGF β1) przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (Biosource Europe S.A., Nivelles, Belgia).
- E. Stężenie Czynnika Wzrostu Śródbłonna Naczyniowego (*ang. Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (Biosource Europe S.A., Nivelles, Belgia).
- F. Stężenie Białka Chemotaktycznego dla Monocytów typu 1 (*ang. Monocyte Chemotactic Protein-1*, MCP-1) przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (Biosource Europe S.A., Nivelles, Belgia)

1.2 Wpływ płynu inkubowanego w jamie otrzewnej na szczurze komórki mezotelialne w warunkach *in vitro*.

1.2.1. Hodowla *in vitro* szczurzych komórek mezotelium otrzewnowego.

W celu założenia hodowli komórek mezotelialnych szczura, zwierzęta, samce rasy Wistar o masie ciała 350-450 g, usypiano eterem a następnie zwiększano stężenie eteru w mieszaninie oddechowej do momentu ustania akcji serca. Jamę otrzewnej otwierano w warunkach jałowych i wprowadzano do jej wnętrza 30 ml sterylnego płynu Hanksa bez wapnia i magnezu. Po wstępnym płukaniu płyn w całości odciągano przy użyciu pipety pasterowskiej. Kolejno podawano do jamy otrzewnej 30 ml roztworu 0.05% trypsyny z dodatkiem 0.02% EDTA w płynie Hanksa bez wapnia i magnezu, który przy pomocy delikatnego zewnętrznego masażu rozprowadzano w jamie brzusznej. Po 15. minutowej inkubacji całą zawartość płynu z jamy brzusznej zbierano ponownie przy użyciu pipety pasterowskiej. Pobrany płyn zawierający złuszczone szczurze komórki mezotelialne dwukrotnie płukano medium hodowlanym M199 + dodatkiem 20% płodowej surowicy cielęcej (*ang. FCS- fetal calf serum*) uzyskanej od GIBCO, Invitrogen Life Technologies (Wielka Brytania). Pozostałe odczynniki do hodowli komórek uzyskano z Sigma (St. Louis. USA).

Po odwirowaniu (150g/10min./10⁰C), komórki zawieszano w medium hodowlanym: M199 z dodatkiem 20% FCS, L-glutaminy (20mmol/l), penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100µg/ml) oraz hydrokortyzonu (0,4 µg/ml) i umieszczano w butelkach hodowlanych (Nunc, A/S, Dania) o pojemności 25 cm³ i inkubowano w 37°C w mieszaninie powietrza zawierającej 5% CO₂, do momentu uzyskania warstwy zlewnej komórek.

Po uzyskaniu zlewnej warstwy komórek mezotelialnych w butelkach hodowlanych, komórki były złuszczone roztworem 0.05% trypsyny z dodatkiem 0.02% EDTA w płynie Hanksa bez wapnia i magnezu, zawieszane w medium hodowlanym i posiewane na 48-studzienkowe płytki hodowlane (Nunc A/S, Dania).

1.2.2 Zdolność komórek mezotelialnych szczura do syntezy MCP-1 podczas ekspozycji na sól fizjologiczną lub jej pochodne powstałe podczas inkubacji *in vivo* roztworu 0.9% NaCl w jamie otrzewnej szczurów

Badania przeprowadzono na zlewnych warstwach komórek mezotelialnych szczura w 48- studzienkowych płytkach hodowlanych (Nunc, S/A, Dania) .

Badania wykonano na trzech pierwotnych liniach szczurzych komórek mezotelialnych eksponowanych przez okres 24. godzin na następujące media hodowlane:

- Standardowe medium hodowlane M199 + 20% FCS (kontrola)
- Standardowe medium hodowlane + 0,9% roztwór chlorku sodowego o pH 7,4 (1:1 v/v) + 20% FCS
- Standardowe medium hodowlane M199 + płyn uzyskany z płukania otrzewnej u szczurów (1:1 v/v).

Inkubację prowadzono w środowisku o temp. 37⁰C z 5% wysyceniem CO₂ w powietrzu, a po jej zakończeniu ze wszystkich studzienek zebrano supernatant jako materiał do dalszych badań. W zebranych próbkach oznaczano stężenie MCP-1, a pozostałe w studzienkach komórki mezotelium poddano lizie z użyciem 0,1 N NaOH i w tak uzyskanym lizacie oznaczano białko całkowite wg metody Bradford [166].

1.2.3. Ocena proliferacji szczurzych komórek mezotelialnych podczas ekspozycji na sól fizjologiczną lub jej pochodne powstałe podczas *in vivo* inkubacji roztworu 0.9% NaCl w jamie otrzewnowej szczurów.

Badania wykonano na trzech pierwotnych liniach szczurzych komórek mezotelialnych. Komórki posiewano w płytkach 48-studzienkowych z gęstością 5x10⁴ komórek/studzienkę. Po 12. godzinach medium hodowlane usuwano ze studzienek i zastępowano nowymi płynami hodowlanymi z dodatkiem ³H-metyl-tymidyny (Institute of Radioisotopes, Praga, Czechy) w stężeniu 1 μCi/ml. Stosowano następujące roztwory:

- Standardowe medium hodowlane M199 + 20% FCS (kontrola)
- Standardowe medium hodowlane + 0,9% roztwór chlorku sodowego o pH 7,4 (1:1 v/v) + 20% FCS
- Standardowe medium hodowlane M199 + płyn uzyskany z płukania otrzewnej u szczurów (1:1 v/v) + 20% FCS.

Po 24. godzinnej inkubacji supernatant usuwano ze studzienek, komórki płukano roztworem Hanksa bez jonów wapnia i magnezu, a następnie trypsynizowano roztworem 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA. Uzyskaną zawiesinę dwukrotnie precypitowano stosując kolejno

10% i 20% roztwór kwasu trójchlorooctowego. Następnie po dodaniu 0,1 N NaOH uzyskano lizat, którego radioaktywność mierzono przy użyciu licznika promieniowania β : Rackbeta 1209 (LKB Wallac/Perkin Elmer, Finlandia). Natężenie promieniowania proporcjonalne do wielkości inkorporacji znakowanej tymidyny uznawano jako wykładnik proliferacji komórkowej. Wyniki przedstawiono jako ilość impulsów zliczoną w czasie 1 minuty (CPM *ang. counts per minute*).

2. Ocena właściwości 0.9% roztworu NaCl drenowanego z jamy brzusznej po płukaniu tym roztworem pola operacyjnego w trakcie laparoskopowych zabiegów chirurgicznych u ludzi.

Celem badań przeprowadzonych w tej części projektu była ocena zmian właściwości roztworu soli fizjologicznej po jego wprowadzeniu do jamy brzusznej u pacjentów operowanych przy pomocy techniki laparoskopowej. Wstępnie oceniano objętość drenowanego płynu, a po jego odwirowaniu w celu usunięcia komórek i resztek tkanek, próbki płynu zamrażano w -20°C do dalszych badań na ludzkich komórkach mezotelialnych w hodowli *in vitro*.

2.1. Pobieranie płynu drenowanego z jamy brzusznej pacjentów podczas operacji laparoskopowych.

Ogółem zebrano 40. próbek płynu pochodzących od 40. chorych operowanych techniką laparoskopową z powodu kamicy pęcherzyka żółciowego. We wszystkich przypadkach wykonano standardowe, śródoperacyjne płukanie jamy brzusznej solą fizjologiczną w celu usunięcia pozostałych po zabiegu resztek tkankowych, krwi, żółci, fragmentów kamieni żółciowych lub innych zanieczyszczeń mogących wikłać przebieg leczenia. W każdym przypadku mierzono całkowitą objętość płynu wprowadzanego do jamy brzusznej, a płyn odprowadzony zbierano z zachowaniem zasad sterylności do specjalnego pojemnika. W warunkach laboratoryjnych mierzono całkowitą objętość zebranego płynu, pozostawiając 50 ml do dalszej analizy. Po dwukrotnym odwirowaniu (150g, 10 min./ 10^0C) płyn zlewno do czterech probówek i magazynowano w temperaturze -20°C zachowując do wykorzystania podczas dalszych badań.

Uzyskane próbki płynu drenażowego (n=40), na podstawie ich wyglądu makroskopowego podzielono na 4 grupy:

1. Próbki czyste, przezroczyste (n₁= 18),
2. Próbki z hemolizą małego stopnia (n₂=9),
3. Próbki z hemolizą dużego stopnia (n₃=9)
4. Próbki zawierające żółć (n₄=4)

2.2 Hodowla *in vitro* ludzkich komórek mezotelialnych

Pierwotne linie ludzkich otrzewnowych komórek mezotelialnych namnażano w hodowli *in vitro* według technik stosowanych w Zakładzie Patofizjologii [167]. Komórki mezotelialne pochodziły z fragmentów sieci większej usuwanych ze wskazań lekarskich podczas operacji w obrębie jamy brzusznej (np. zrosty otrzewnowe) . Odczynniki chemiczne, substancje i preparaty używane do hodowli pochodziły z firmy Sigma (St. Luis, USA).

Bezpośrednio po pobraniu, tkankę umieszczano w płynie Hanksa bez wapnia i magnezu. Następnie tkankę przenoszono do roztworu 0,05% trypsyny z dodatkiem 0,02% EDTA w płynie Hanksa bez wapnia i magnezu i wytrząsano w łaźni wodnej o temperaturze 37° C przez 30 min. Złuszczone komórki przemywano dwukrotnie medium hodowlanym, Do hodowli komórek mezotelialnych stosowano medium M199 z dodatkiem płodowej surowicy cielęcej (*ang. fetal calf serum – FCS*) – 10%, L - glutaminy (2mM), penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100µg/ml), hydrokortyzonu (0,4 µg/ml). Komórki posiewano do butelek hodowlanych (Sarsted, Niemcy) o powierzchni 25 cm² , które umieszczano w inkubatorze w środowisku o temp 37° C i powietrzu z 5% wysyceniem CO₂. Komórki hodowano aż do uzyskania ich warstwy zlewnej, wymieniając medium co drugi dzień.

Pasaż wykonywano roztworem 0,05% trypsyny z dodatkiem 0,02% EDTA w płynie Hanksa bez wapnia i magnezu. Uzyskaną zawiesinę komórek dwukrotnie płukano w medium hodowlanym i następnie posiewano na 48-studzienkowe płytki hodowlane.

2.3. Efekt drenowanego z jamy otrzewnowej roztworu 0.9% NaCl na czynność ludzkich komórek mezotelialnych w hodowli in vitro.

Badania wykonywano na zlewnych warstwach komórek ludzkiego mezotelium otrzewnowego w 48-studzienkowych płytkach hodowlanych. Usuwno medium hodowlane ze studzienek, a następnie komórki eksponowano na następujące roztwory:

- A. Medium M199 + 5% FCS
- B. Medium M199 + 10% FCS z dodatkiem 0.9% NaCl o pH 7,4 (1:1 v/v)
- C. Medium M199 + 10% FCS z dodatkiem próbki płynu uzyskanego z jamy brzusznej po jej płukaniu 0.9% NaCl (1:1 v/v).

Po 24 godzinach inkubacji w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, powietrze wzbogacone 5% CO₂) usuwano ze studzienek supernatant i zamrażano jego próbki do dalszych badań. Pozostałe w studzienkach komórki mezotelium poddawano lizie z użyciem 0,1 NaOH i w tak uzyskanym lizacie oznaczano białko całkowite wg metody Bradforda [166].

W uzyskanych supernatantach mierzono stężenia następujących substancji produkowanych przez komórki mezotelialne:

- A. Interleukina 6 (*ang. interleukin 6, IL-6*) mierzona przy pomocy przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (R&D Systems, Memphis, USA).
- B. Tkankowy aktywator plazminogenu (*ang. tissue-activator plazminogen, t-PA*) mierzony przy pomocy przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (Bender Medsystems GmbH, Austria).
- C. Inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (*ang.plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1*) mierzony przy pomocy przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (Technoclone GmbH, Austria)
- D. Ilość produkowanych substancji czynnych w komórkach mezotelium otrzewnowego przeliczano na ilość białka komórkowego z lizatu.

2.4. Efekt drenowanego z jamy otrzewnej roztworu 0.9% NaCl na proliferację ludzkich komórek mezotelialnych w hodowli in vitro.

Ludzkie komórki otrzewnowe posiewano w ilości 5×10^4 /studzienkę w 48-studzienkowych płytkach hodowlanych. Po 12. godzinach usuwano medium ze studzienek i zastępowano nowymi płynami hodowlanymi z dodatkiem ^3H -metyl-tymidyny (Institute of Radioisotopes, Praga, Czechy) w stężeniu $1 \mu\text{Ci/ml}$. Stosowano następujące roztwory:

- Standardowe medium hodowlane M199 + 5% FCS (kontrola)
- Standardowe medium hodowlane M199 + 10% FCS + 0,9% roztwór chlorku sodowego o pH 7,4 (1:1 v/v)
- Standardowe medium hodowlane M199 + 10% FCS + płyn z drenażu jamy otrzewnej (1:1 v/v)

Po 24. godzinnej inkubacji supernatant usuwano, komórki płukano roztworem Hanksa bez jonów wapnia i magnezu, a następnie trypsynizowano roztworem 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA. Uzyskaną zawiesinę dwukrotnie precypitowano stosując 10% roztwór kwasu trójchlorooctowego. Następnie po dodaniu 0,1 N NaOH uzyskano lizat, którego radioaktywność mierzono przy użyciu licznika promieniowania β : Rackbeta 1209 (LKB Wallac/Perkin Elmer, Finlandia). Natężenie promieniowania proporcjonalne do wielkości inkorporacji znakowanej tymidyny uznawano jako wykładnik proliferacji komórkowej. Wyniki przedstawiono jako ilość impulsów zliczoną w czasie 1 minuty (CPM, *ang. counts per minute*).

3. Metodyka oznaczeń stosowanych w eksperymentach

3.1 Szczurzy transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ (ang. *Transforming Growth Factor beta*, TGF $\beta 1$)

Stężenie TGF $\beta 1$ w próbkach medium pobranego z hodowli komórek mezotelium otrzewnowego mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu „*sandwich*” (Bender Medsystems GmbH, Austria). Czulość metody wynosiła 5 pg/ml. Pomiar wykonywano przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 620 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie TGF $\beta 1$ w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy TGF $\beta 1$ przeliczano na ilość komórek w hodowli.

3.2 Szczurzy czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF)

Stężenie VEGF w próbkach medium pochodzących z hodowli komórek mezotelialnych oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu „*sandwich*” (Bender Medsystems GmbH, Austria). Czulość metody wynosiła 13.5 pg/ml. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie VEGF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy VEGF przeliczano na ilość komórek w hodowli.

3.3 Szczurze białko chemotaktyczne dla monocytów-1 (ang. *Monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1)

Stężenie MCP-1 w próbkach medium zebranych jako supernatant oceniano wykorzystując metodę opartą na immunoabsorpcji enzymozależnej (ELISA), przebiegającej z wykorzystaniem płytek fabrycznie opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami dla szczurzego MCP-1 (Biosource International Kalifornia USA, KHC1012). Pomiar wykonywano wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm (wobec długości fali

referencyjnej 620 nm) za pomocą spektrofotometru ELx808 (Bio-Tech. Instruments, USA). Czulość metody wynosiła 5 pg/ml.

3.4 Elastaza leukocytów

Aktywność elastazy leukocytów oznaczono według metody opisanej przez Visser & Blout [168]. Oznaczenia wykonano na płytkach 96 studzienkowych (Corning, USA). Jako substrat stosowano N-t-butoksy-karbonyl-L ester nitrofenolu kwasu 2-aminopropanowego (Sigma, USA). Wstępnie próbki inkubowano przez 10 minut w 25°C, w buforze Tris-HCL (Sigma, USA), 0,1 mol/L (pH=7,8), następnie dodawano substrat w stężeniu 4 mmol/L, rozpuszczony w sulfotlenku dimetylowym (DMSO; Sigma, USA). Ilość uwalnianego w wyniku reakcji enzymatycznej p- nitrofenolu oceniano na podstawie przyrostu absorbancji przy długości fali 405 nm na spektrofotometrze Labsystem Multiscan MCC/340, typ 347 (Helsinki, Finlandia).

3.5 Ludzki tkankowy aktywator plazminogenu (*ang. tissue-activator plazminogen, t-PA*)

Stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) w próbkach medium pochodzących z hodowli komórek mezotelialnych mierzono przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA typu „sandwich” (Bender Medsystems GmbH, Austria). Detekcję absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA) przy długości fali 450 nm oraz 620 nm. Stężenie t-PA w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy t-PA przeliczano na ilość komórek w hodowli. Czulość testu wynosiła 6 pg/ml.

3.6 Ludzki inhibitor aktywatora plazminogenu - 1 (*ang. plasminogen activator inhibitor, PAI-1*)

Stężenie PAI-1 w próbkach medium z hodowli komórek mezotelialnych mierzono przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA typu „sandwich” (Technoclone GmbH,

Austria). Detekcję absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA) przy długości fali 450 nm oraz 540 nm. Stężenie PAI-1 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy PAI-1 przeliczano na ilość komórek w hodowli. Czułość testu wynosiła 0.5 ng/ml.

3.7 Ludzka interleukina 6 (IL-6)

Stężenie ludzkiej IL-6 w próbkach medium z hodowli mezotelium oznaczano za pomocą techniki immunoenzymatycznej ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) typu „sandwich” wykorzystując zestaw do oznaczeń firmy R&D Systems (R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano na spektrofotometrze EL x 800 (Bio-Tek Instruments, USA), przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie IL6 w badanych próbkach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej. Czułość metody wynosiła 0,7 pg/ml.

3.8 Białko całkowite w lizatach komórkowych

Białko całkowite mierzono w lizatach komórkowych. Stężenie białka oznaczano metodą Bradforda [166] wykorzystując Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Monachium, Germany) i stosując jako standard albuminę bydlęcą (BSA). Czułość metody była w przedziale 0,1 µg/ml. Przyjęto że 1µg białka komórkowego odpowiada średnio (+/-SD) $2,1-1,0 \times 10^3$ komórek mezotelialnych.

3.9 Ilościowa ocena komórek w płynie drenazowym

Oznaczenie ilości leukocytów w inkubowanym płynie wykonywano według metody opracowanej przez Bomskiego [169]. Próbkę płynu pobrano na heparynę (Polfa, Warszawa, Polska) uzyskując w stężeniu końcowym 10 j.m. heparyny/ml dializatu, a następnie rozcieńczono 10-krotnie płynem Turka (Aqua-Medica, Łódź, Polska). Białe krwinki liczono na powierzchni siatki Burkera o wym. 4x2mm (Fein-Optic, Niemcy) przy powiększeniu 200-krotnym. Liczbę krwinek białych w 1µl obliczano według następującego wzoru:

Liczba leukocytów w $1\mu\text{l}$ = rozcieńczenie / $n \times p \times h$

n- liczba komórek na danej powierzchni siatki

p- powierzchnia w mm^2

h- głębokość komory

3.10 Jakościowa ocena komórek w dializacie.

Dializat pobierano na heparynę (Polfa Warszawa, Polska) w stężeniu końcowym 10 j.m. heparyny na 1 ml dializatu, a następnie umieszczano na szkiełku podstawnym i wirowano w cytowirówce (MPW 341, Polska) przez 5 minut (100g). Po wykonaniu barwienia May & Grünwald-Giemsy zestawem Quick Panoptic Concentrated (QCA, Amposta, Spain) preparaty oglądano w powiększeniu immersyjnym w mikroskopie świetlnym (Carl Zeiss/Jena, Germany).

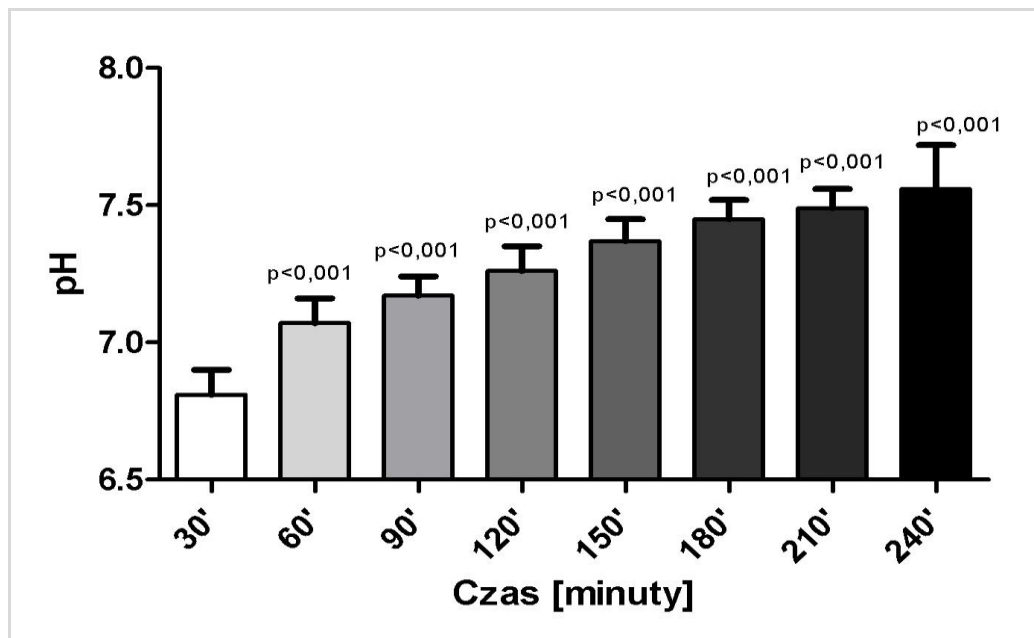
4. Analiza statystyczna

Wyniki badań przedstawiono w postaci wartości średnich \pm odchylenie standardowe (SD). Opracowanie statystyczne zmiennych powiązanych dla więcej niż dwóch grup badanych przeprowadzono stosując analizę wariancji (ANOVA) w modyfikacji Friedmana (dla zmiennych nieparametrycznych) oraz post-hoc test Dunnsa (dla zmiennych parametrycznych). Dla zmiennych niepowiązanych, nieparametrycznych dla więcej niż dwóch grup wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) w modyfikacji Kruskala-Wallisa. Ponadto w analizie statystycznej dla zmiennych zawartych w dwóch grupach wykorzystano test T – studenta dla zmiennych powiązanych parametrycznych oraz test kolejności par Wilcoxon dla zmiennych powiązanych nieparametrycznych. Jako istotne statystyczne przyjęto wartości $p < 0,05$.

Wyniki

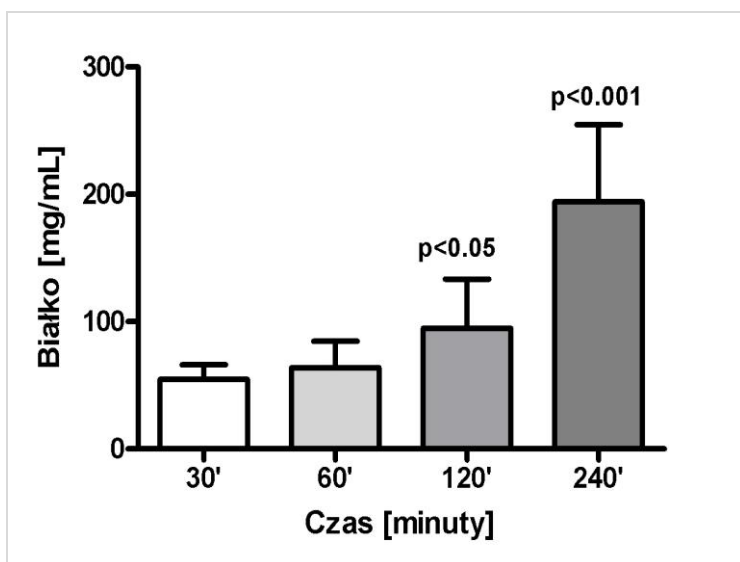
1. Ocena zmian składu płynu wewnątrztrzewnowego podczas 4 godzinnej inkubacji w jamie brzusznej szczura.

Inkubacja soli fizjologicznej w środowisku wewnątrztrzewnowym szczurów wykazała stopniowe, stale postępujące zmiany jej składu ilościowego jak i jakościowego. Wartość pH oceniana w ciągu kolejnych 4 godzin eksperymentu wzrastała od wartości średniej pH 6,81 stwierdzonej po pierwszych 30. minutach inkubacji do wartości pH 7,56 uzyskanej na zakończenie badania. W pierwszych 30. minutach obserwacji wartość pH pozostawała w zakresie odczynu kwaśnego, dochodząc do słabo zasadowego po 4 godzinach inkubacji (ryc.1.1).



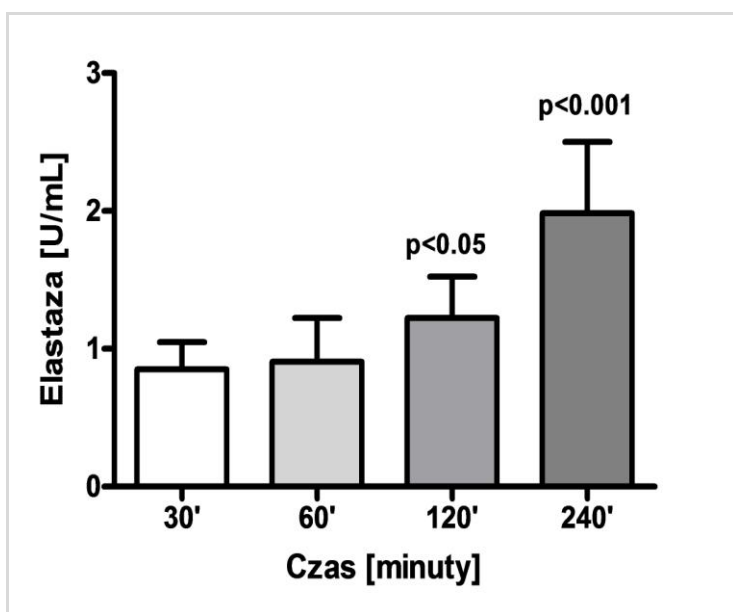
Ryc.1.1 Wartość pH w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9% NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

W badanym, czterogodzinnym przedziale czasowym stwierdzono również postępujący wzrost stężenia białka w inkubowanym płynie. W drugiej godzinie badania poziom białka wzrósł niemal dwukrotnie, a po 240. minutach wewnątrztrzewnowej ekspozycji stężenie białka w płynie było cztery razy wyższe w porównaniu do pomiaru dokonanego w 30. minucie inkubacji (Ryc.1.2).



Ryc.1.2 Stężenie białka w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9% roztworu NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

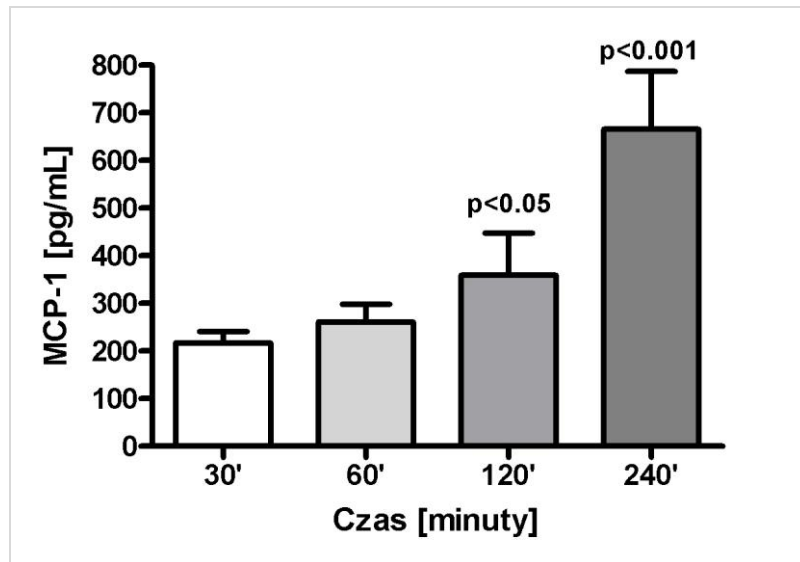
Podczas wewnątrztrzewnowej inkubacji 0.9% roztworu NaCl stopniowo narastał



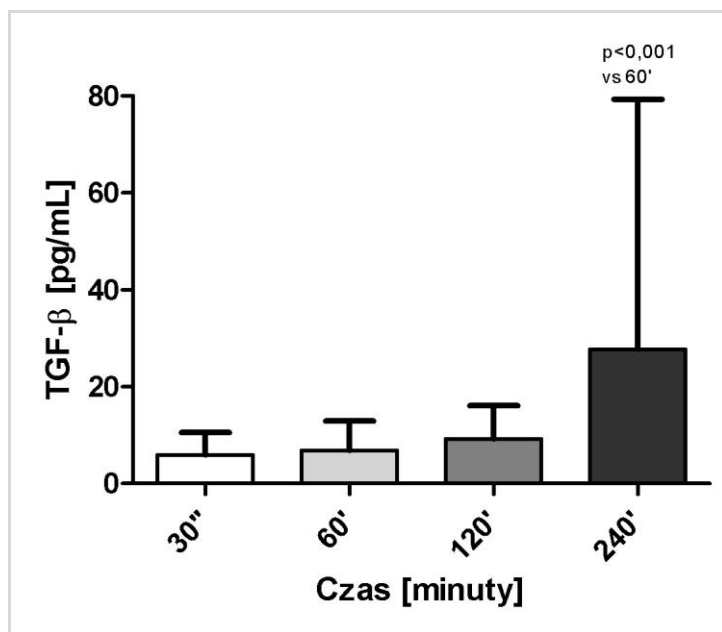
Ryc.1.3 Aktywność elastazy w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

Ekspozycja mezotelium otrzewnowego na 0.9% NaCl doprowadziła również do stopniowego wzrostu aktywności elastazy w inkubowanym płynie (Ryc.1.3). Podobnie jak w przypadku stężenia białka aktywność elastazy była najwyższa na zakończenie badania. Cechował ją blisko dwukrotny wzrost po upływie 240. minut eksperymentu w porównaniu do pierwszego pomiaru dokonanego w 30. minucie inkubacji.

Podczas wewnątrztrzewnowej inkubacji 0.9% roztworu NaCl stopniowo narastał odczyn zapalny, czego odzwierciedleniem był postępujący wzrost stężeń cytokin zapalnych w badanym płynie. Stężenie MCP-1 cechował istotny wzrost podczas całego okresu inkubacji (Ryc.1.4). Począwszy od 120. minuty eksperymentu stężenie MCP-1 było statystycznie istotnie wyższe niż w 30. minucie badania, a po 4. godzinach wzrosło niemal 3-krotnie w porównaniu do pierwszego pomiaru.



Ryc. 1.4 Wzrost stężenia MCP-1 w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura; pomiary dla 120' i 240' istotne statystycznie. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

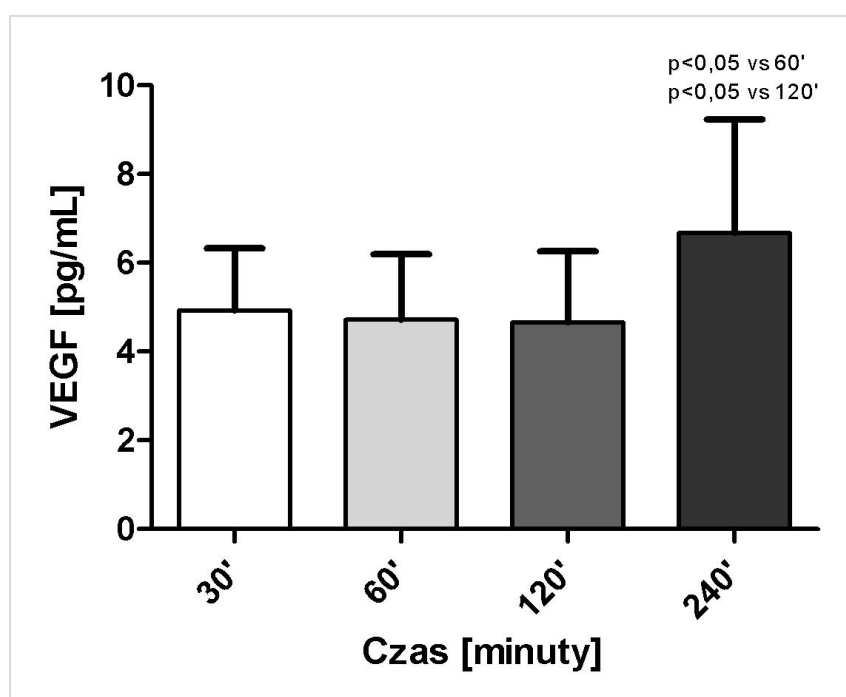


Ryc. 1.5 Zmiany stężenia TGF-β w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

Zmiany poziomu TGFβ w inkubowanym wewnątrztrzewnowo roztworze 0.9% NaCl były mniej dynamiczne ale również statystycznie istotne. W pierwszej połowie eksperymentu obserwowano umiarkowany wzrost stężenia tej cytokiny, dopiero w 240. minucie badania jej przyrost okazał się, w porównaniu do wartości początkowej, znamienne statystycznie.

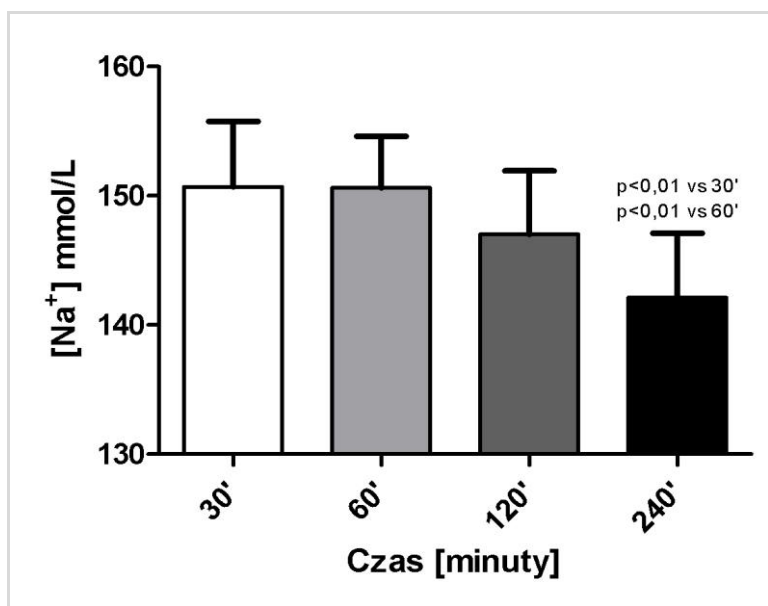
W przypadku pomiaru z 4. godziny eksperymentu zwraca uwagę większy niż w przypadku pozostałych wyników rozrzut wartości decydujący o relatywnie dużym odchyleniu standardowym (Ryc.1.5)

Podobnie jak w przypadku $TGF\beta$ poziom VEGF w inkubowanym wewnątrztrzewnowo roztworze 0.9%NaCl nie ulegał istotnym zmianom przez pierwsze 120 minut obserwacji. Jednak po 4. godzinie badania stężenie tej cytokiny było statystycznie wyższe zarówno wobec wartości pomiaru z 60. jak i 120. minuty obserwacji (Ryc. 1.6).

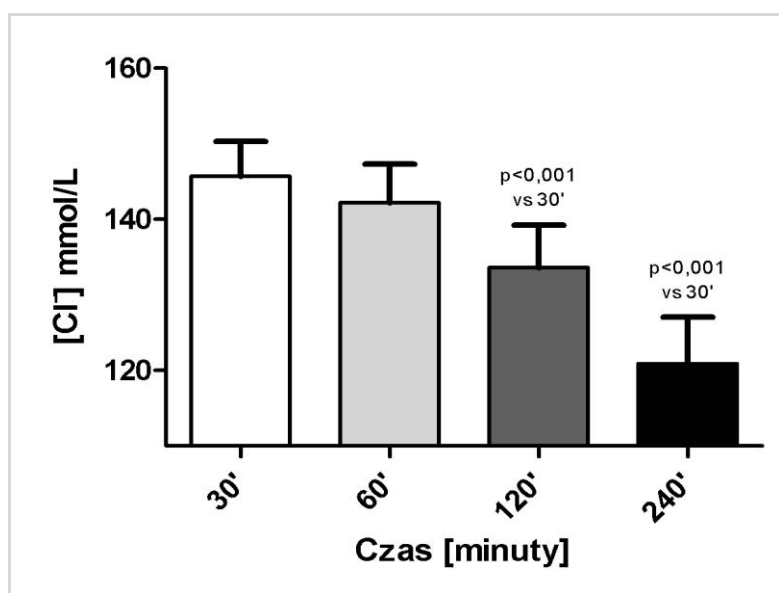


Ryc.1.6 Stężenie VEGF w kolejnych pomiarach w trakcie inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Stężenie uzyskane po 240 minutach inkubacji znamienne statystycznie. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

Poziom elektrolitów mierzony podczas eksperymentu charakteryzował się spadkiem stężenia jonów sodu i chloru oraz wzrostem stężenia jonów potasu. W trakcie 4 godzinnej inkubacji spadek jonów sodowych $[Na^+]$ przebiegał od wartości $150,7 \pm 5,1$ mmol/L do $142,1 \pm 5,0$ mmol/l przy czym największą dynamikę zmian obserwowano w drugiej części badania tj. od 120. minuty. Na zakończenie eksperymentu ta tendencja uległa wyraźnemu nasileniu sprawiając że wartość pomiaru z 240. minuty obserwacji była statystycznie znamienne. (Ryc.1.7)



Ryc. 1.7. Spadek stężenia jonów sodu w ciągu 4-godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'

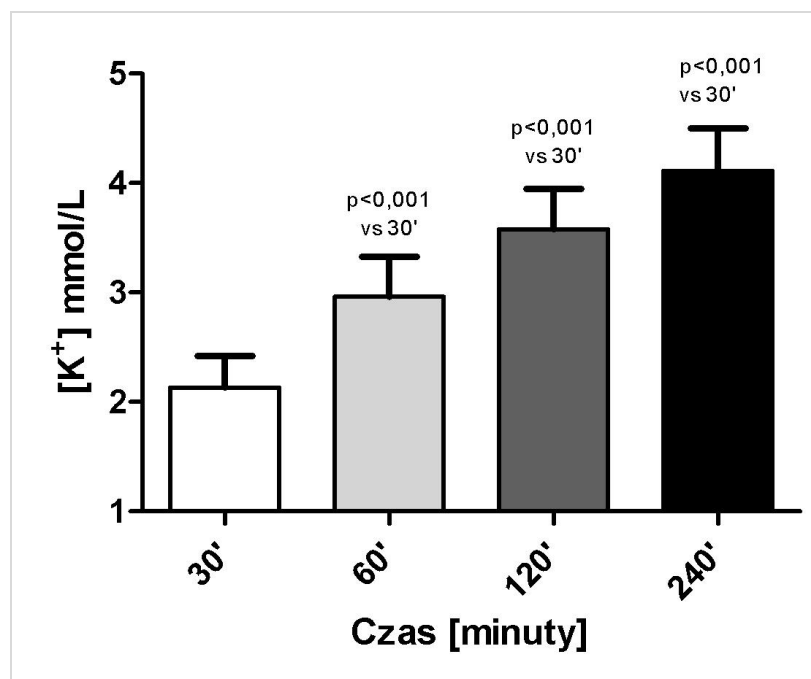


Ryc. 1.8 Spadek stężenia jonów chlorkowych podczas inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

W przypadku jonów chlorkowych [Cl⁻] spadek wartości stężeń w kolejnych pomiarach cechowała większa zmienność niż w przypadku jonów sodu. Począwszy od 2. godziny eksperymentu uzyskane kolejno wyniki różniły się statystycznie wobec pomiaru z 30. minuty badania. Ostatecznie przez cały okres obserwacji stężenie jonów chlorkowych spadło ze 145,7±4,6 mmol/l do 120,9±6,2 mmol/l (Ryc.1.8).

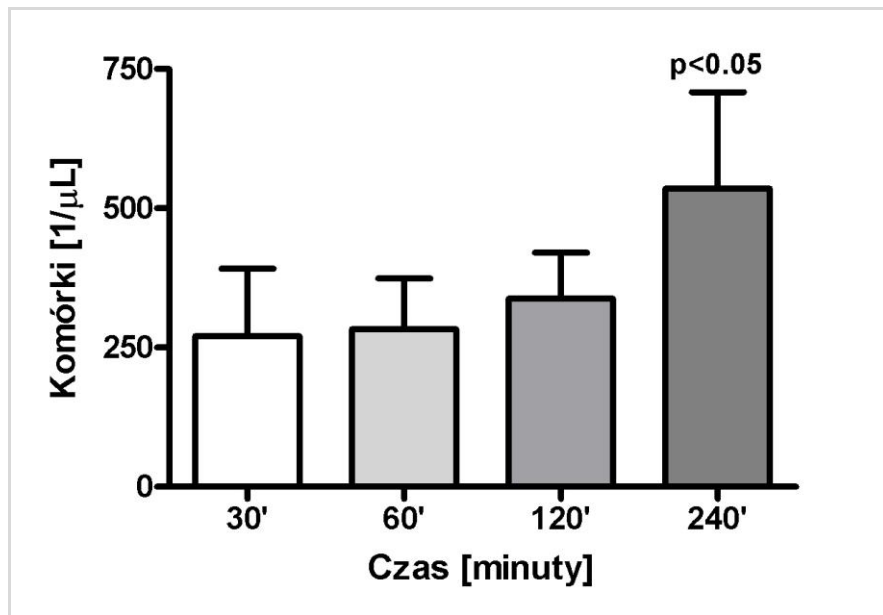
Stężenie jonów potasu [K⁺] narastało w kolejnych pomiarach począwszy od wartości początkowej 2,13±0,3 do 4,11±0,4 mmol/l na zakończenie inkubacji (Ryc. 1.9). Dynamikę wzrostu cechował stały progres wielkości stężenia obserwowany w kolejnych pomiarach nadając mu

niemal liniowy charakter. Od 60. minuty badania dalszy wzrost stężenia jonów potasowych był statystycznie istotny wobec pomiaru początkowego.



Ryc. 1.9 Wzrost stężenia jonów potasu w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

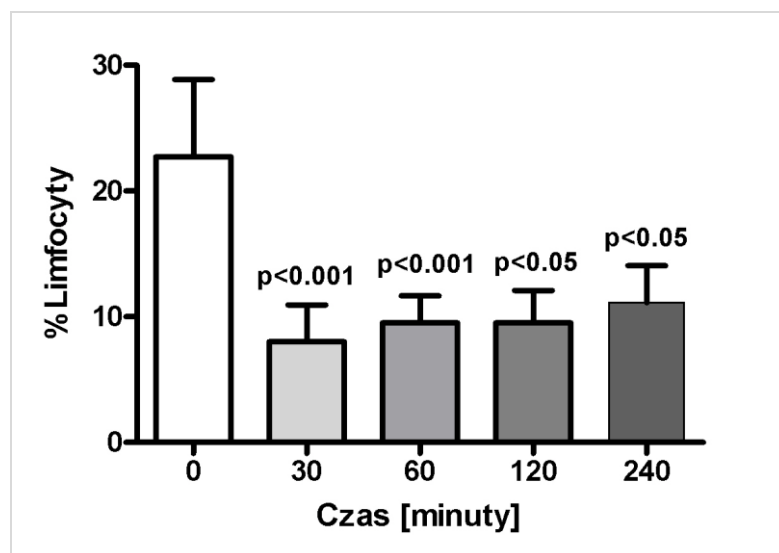
Analiza składu komórkowego wykazała zarówno zmiany ilościowe jak i jakościowe. W próbkach inkubowanego płynu pobieranych w kolejnych interwałach czasowych odnotowano postępujący przyrost liczby komórek z wartości początkowej 313/ μ l stwierdzonej po pierwszych 30. minutach do 750/ μ l w 4. godzinie badania (Ryc.1.10).



Ryc. 1.10 Przyrost ilości komórek w dializacie w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 30'.

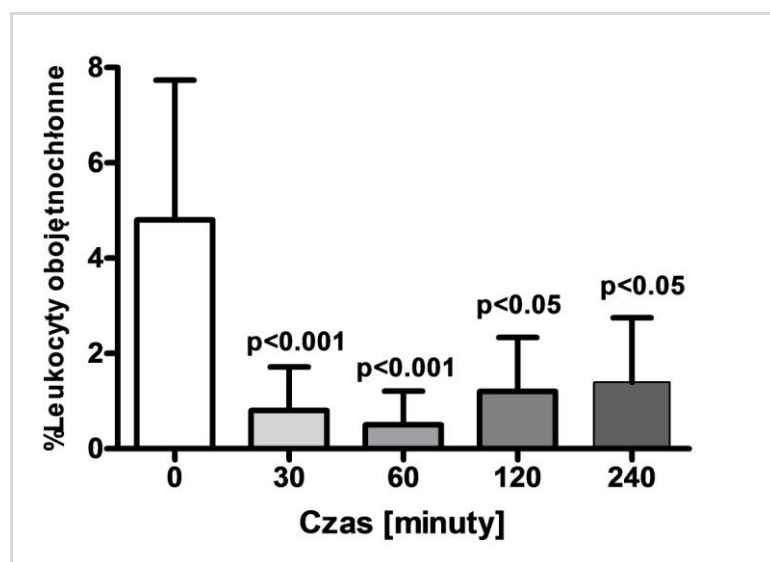
Zmianie uległ również profil morfologiczny komórek inkubowanego płynu. Porównując rozkład procentowy komórek zawartych w próbkach uzyskanych z płukania pustej jamy otrzewnowej z ich obecnością w jamie brzusznej na końcu eksperymentu stwierdzono spadek ilości limfocytów, leukocytów obojętnochłonnych oraz komórek tłuszcznych (Ryc.1.11-13) przy jednoczesnym procentowym wzroście liczby makrofagów i leukocytów kwasochłonnych (Ryc.1.14-15). Cechą znamioną istotną przy ocenie komórkowych zmian jakościowych inkubowanego płynu są relatywnie duże fluktuacje składu odsetkowego komórek mierzonego w kolejnych pomiarach zwłaszcza w odniesieniu do poziomu wyjściowego badanego w chwili rozpoczęcia eksperymentu (dla $t=0$).

Poziom limfocytów zawartych w badanym płynie cechował wyraźny spadek stężenia w ciągu pierwszych 30. minut trwania eksperymentu. Dalsza obserwacja ujawniła stopniowy wzrost poziomu limfocytów mierzony odpowiednio w 60., 120. oraz 240. minucie badania nie przekraczający jednak połowy wartości stężenia wyjściowego (dla $t=0$).



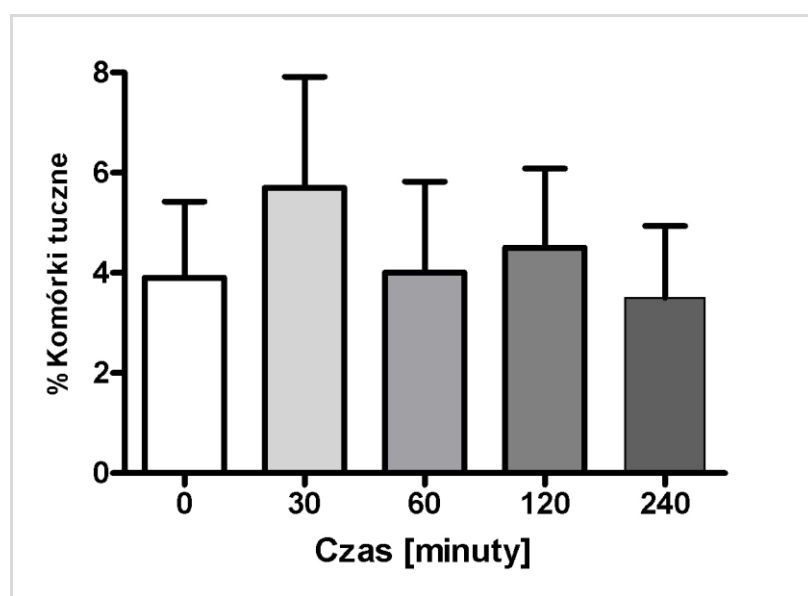
Ryc. 1.11 Zmienność populacji limfocytów w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 0'.

Podobną dynamikę zmian obserwowano w populacji leukocytów obojętnochłonnych, gdzie w 30. minucie eksperymentu obserwowano drastyczny spadek liczby komórek postępujący jeszcze w ciągu kolejnych 30 minut. Dopiero po upływie 2. godzin od rozpoczęcia wewnątrzbrzuszej inkubacji 0,9% roztworu NaCl skład odsetkowy leukocytów obojętnochłonnych uległ stopniowej odbudowie nie przekraczając jednak 1/3 wartości wyjściowej w chwili ukończenia badania.



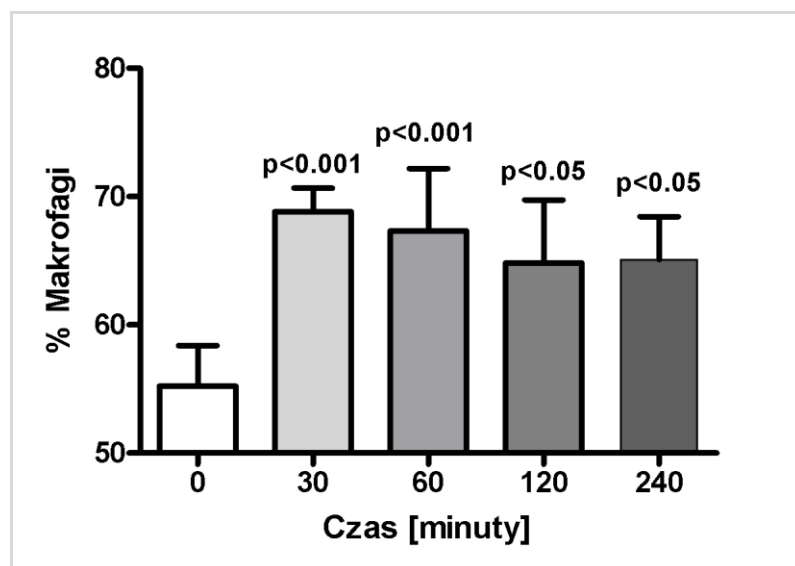
Ryc. 1.12 Procentowy udział populacji leukocytów obojętnochłonnych w kolejnych pomiarach podczas inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 0'.

Odsetek komórek tłuszcznych w inkubowanym płynie był zmienny przez cały czas trwania 4. godzinnej obserwacji. Początkowo, w chwili dokonania pierwszego pomiaru obserwowano tendencję wzrostową liczby komórek tłuszcznych, ale już po godzinie badania spadek niemal do wartości wyjściowej. Finalnie, na zakończenie eksperymentu, poziom komórek tłuszcznych w inkubowanym płynie wykazywał nieznaczne obniżenie, ale nieistotne statystycznie w porównaniu do ich ilości w 30 minucie doświadczenia.



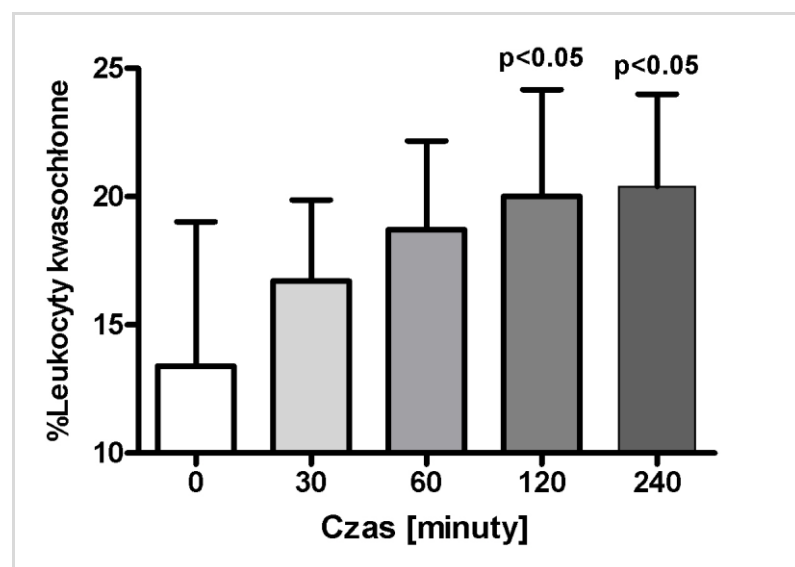
Ryc. 1.13 Zmiany w populacji komórek tłuszcznych w ciągu inkubacji 0,9%NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 0'

Z kolei oceniając zmiany w populacji makrofagów zachodzące podczas 4.godzinnej inkubacji należy zauważyć wyraźny wzrost udziału procentowego tej linii komórkowej mierzony na zakończenie eksperymentu. Należy zaznaczyć że po gwałtownym przyroście liczby komórek w pierwszych 30. minutach badania, dalsza obserwacja ujawniła postępujący regres stężenia trwający do 120. minuty. Od tego momentu populacja makrofagów pozostawała na stałym poziomie do końca inkubacji. Wartości kolejnych pomiarów były istotne statystycznie wobec stężenia wyjściowego (dla $t=0$).



Ryc.1.14 Procentowy udział populacji makrofagów w kolejnych pomiarach podczas inkubacji 0,9% NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 0'

Również populację kwasochłonnych leukocytów cechował wzrost ilości komórek w kolejnych przedziałach czasowych. Wyraźny progres ich ilości obserwowano do 120. minuty, później uległ on stabilizacji cechując się względnie stałą wartością w ciągu kolejnych dwóch godzin eksperymentu.

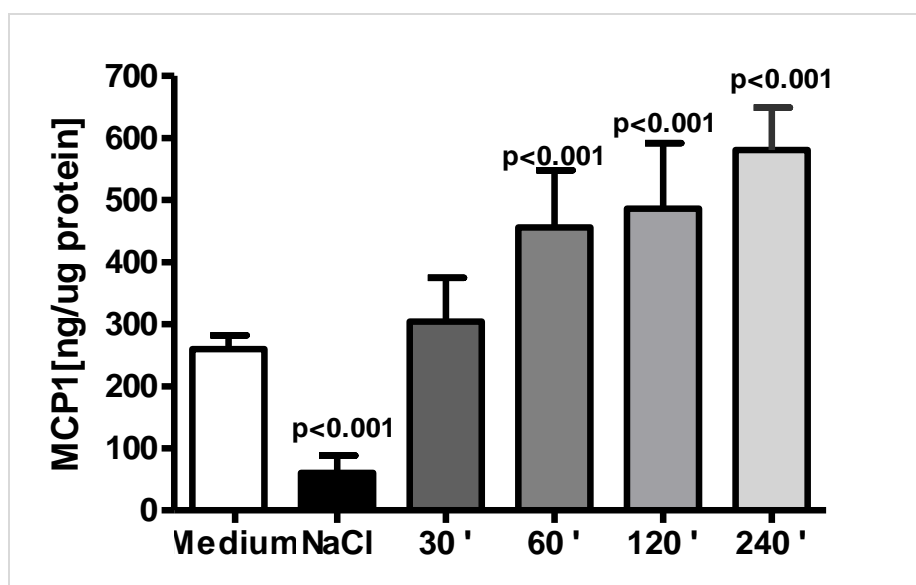


Ryc. 1.15 Zmienność populacji leukocytów kwasochłonnych w ciągu 4.godzinnej inkubacji 0,9% NaCl w jamie brzusznej szczura. Analiza statystyczna w porównaniu do czasu 0'.

2. Wpływ płynu inkubowanego w jamie otrzewnej na szczurze komórki mezotelialne w warunkach hodowli *in vitro*

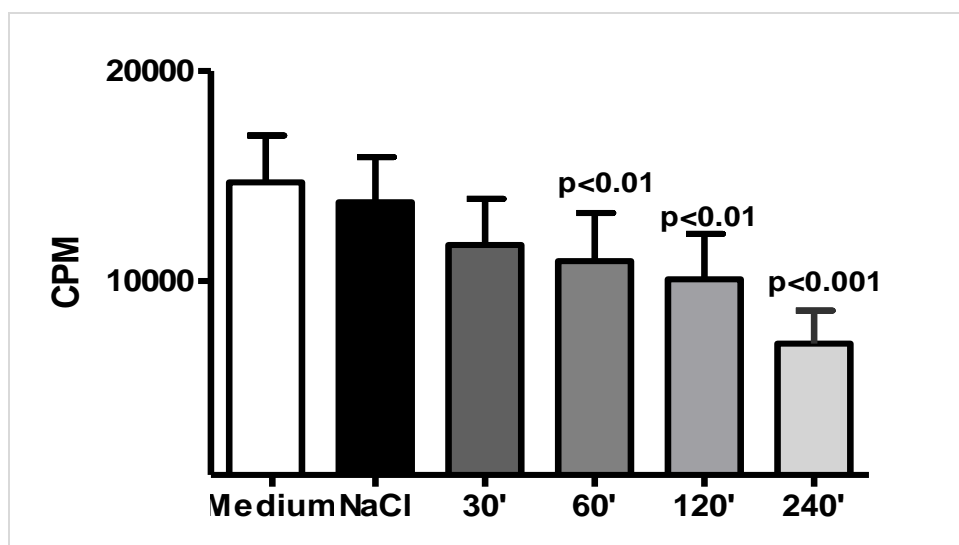
W drugim etapie badań prowadzonych na modelu zwierzęcym eksponowano pierwotne linie szczurzych komórek mezotelialnych w hodowli *in vitro* na próbki roztworu 0.9% NaCl zebrane podczas doświadczeń na szczurach.

Próbki roztworu 0.9% NaCl uzyskane po upływie odpowiednio 60., 120. oraz 240. minut inkubacji w jamie otrzewnowej silniej stymulowały produkcję MCP-1 w komórkach mezotelialnych niż standardowe medium hodowlane (Ryc.2.1). Jednocześnie zwraca uwagę silne supresyjne działanie na badane komórki „czystego” 0.9% roztworu NaCl nie poddanego uprzedniej inkubacji w jamie brzusznej.



Ryc.2.1 Produkcja MCP-1 w szczurzych komórkach mezotelialnych eksponowanych na medium kontrolne (Medium), 0.9% NaCl (NaCl) oraz próbki roztworu 0.9% NaCl inkubowanego przez okres 30', 60', 120' i 240' w jamie brzusznej szczurów. Analiza statystyczna w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Efekt badanych *ex-vivo* próbek 0.9% NaCl na proliferację komórek mezotelialnych był odwrotny niż ich stymulujące działanie na produkcję MCP-1 przez te komórki. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji roztworu 0.9% NaCl w jamie brzusznej narastało jego supresyjne działanie na wzrost komórek mezotelialnych (Ryc.2.2).



Ryc.2.2 Proliferacja komórek mezotelialnych eksponowanych na medium kontrolne (Medium), 0.9% NaCl (NaCl) i próbki roztworu 0.9% NaCl inkubowanego przez okres 30', 60', 120' i 240' w jamie brzusznej szczurów. Analiza statystyczna w odniesieniu do grupy kontrolnej.

3.Ocena parametrów czynnościowych ludzkich komórek mezotelialnych eksponowanych w hodowli *in vitro* na roztwór 0.9% NaCl drenowany z jamy brzusznej podczas zabiegów laparoskopowych.

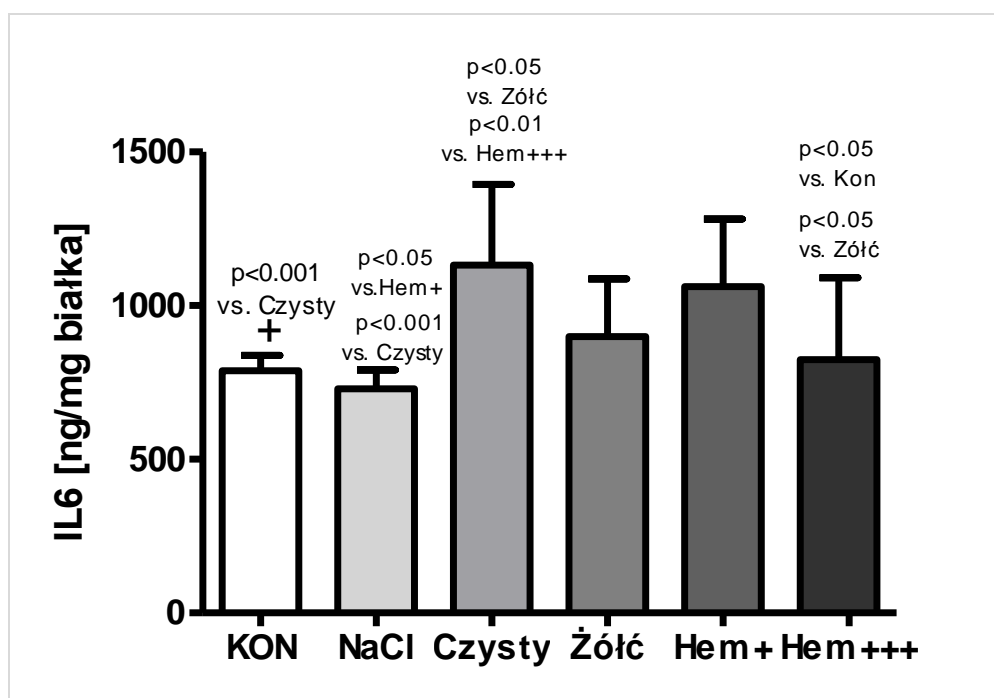
W ostatnim etapie badań oceniano zmiany czynnościowe charakteryzujące ludzkie komórki mezotelialne eksponowane na płyn uzyskany podczas śródoperacyjnego płukania jamy otrzewnej podczas zabiegów laparoskopowych.

Próbki płynu wykorzystywane w tym etapie badań uzyskano od 40. chorych operowanych laparoskopowo z powodu kamicy żółciowej. Płyn pobierano w trakcie operacji po rutynowym płukaniu jamy brzusznej dokonanym u 34. kobiet w wieku 20-82 lat (śr.51±15lat) oraz 6. mężczyzn w wieku od 25 do 68 lat (śr. 51 ± 15 lat). Planowo leczono 31. osób, a w trybie „ostrodyżurowym” 9.chorych. Przez tzw. tryb „ostro dyżurowy” uznawano pacjentów z nasiloną kolką żółciową, z wykładnikami ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego lub zapalenia przewlekłego w stadium zaostrzenia.

Podczas jednego zabiegu wprowadzano do jamy brzusznej średnio 675 ml (± 541ml) soli fizjologicznej, natomiast po zdrenowaniu tego roztworu, we wnętrzu jamy otrzewnej

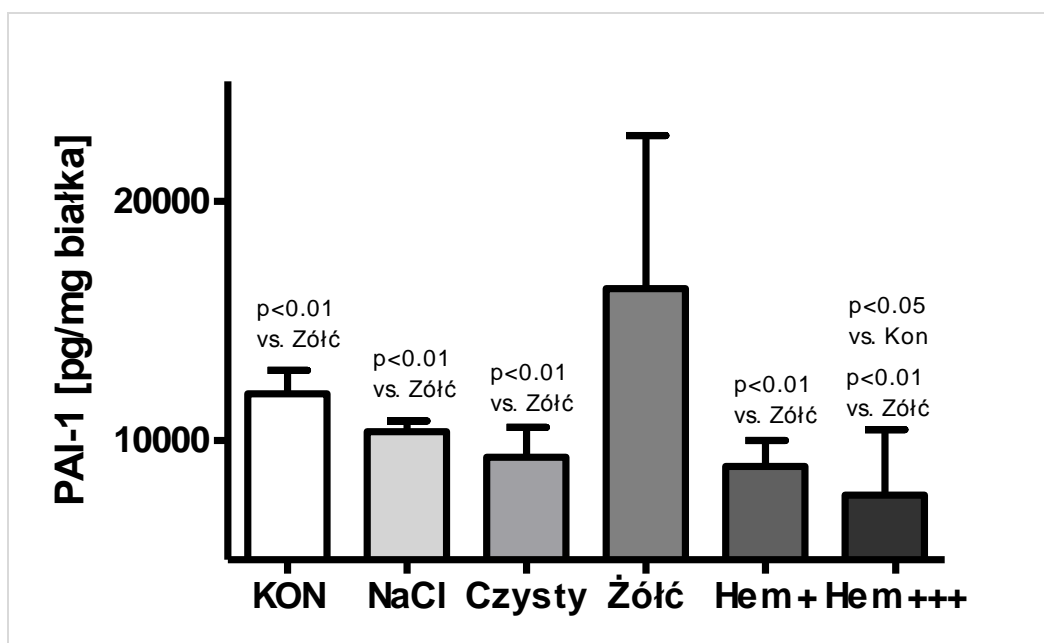
pozostawało średnio około 211 ml (± 190 ml) co stanowiło 33,8% (18,2%) w stosunku do średniej objętości wprowadzonej. Operacje w trakcie których uzyskiwano płyn o nasilonej hemolizie cechowało największe zaleganie płynu drenażowego w jamie brzusznej szacowane na blisko 40% ($\pm 22,5\%$) wobec objętości wprowadzonej. Dla porównania wśród pacjentów od których uzyskano płyn z dużą domieszką żółci współczynnik ten nie przekraczał 25% ($\pm 12,7\%$).

Tendencję wzrostową produkcji interleukiny 6 obserwowano we wszystkich grupach komórek mezotelialnych poddanych działaniu płynu drenażowego, jednakże tylko dla mezotelium hodowanego w środowisku zawierającym „czysty” płyn drenowany z jamy otrzewnowej produkcja IL6 była wyższa niż w grupie kontrolnej i w grupie z silną hemolizą. Komórki eksponowane na 0.9% NaCl wykazywały mniejszą produkcję IL6 w porównaniu do „czystego” roztworu 0.9% NaCl uzyskanego po wewnątrzotrzewnowej inkubacji. Jednocześnie produkcja interleukiny 6 była wyższa w medium kontrolnym w porównaniu do medium z dodatkiem 0.9% NaCl (Ryc.3.1).



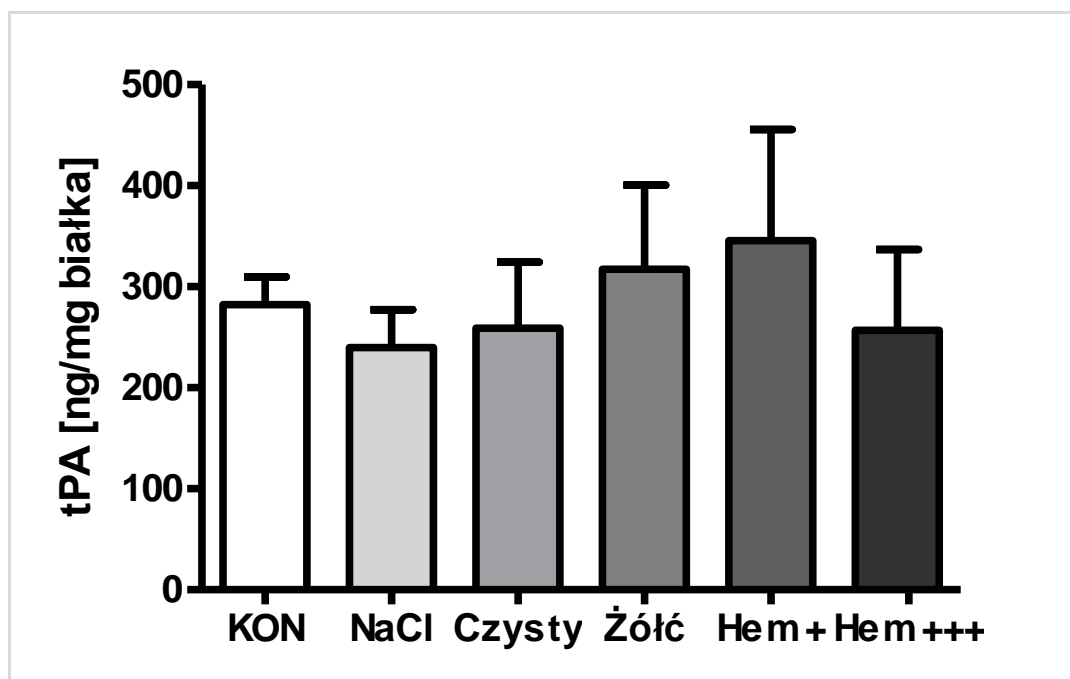
Ryc.3.1 Produkcja interleukiny 6 (IL6) w komórkach mezotelialnych eksponowanych na medium kontrolne (Medium), medium hodowlane z dodatkiem roztworu 0.9% NaCl (NaCl), lub medium hodowlane z dodatkiem drenowanego płynu zawierającego żółć (M + żółć), „czystego” płynu drenowanego (M + „czysty”), drenowanego płynu z hemolizą śladową (M + hem) lub drenowanego płynu z hemolizą (M +++).

Z kolei największe stężenie PAI-1 obserwowano w grupie eksponowanej na płyn drenowany zawierający żółć. Uzyskane dla tej populacji komórki wyniki zdecydowanie przewyższały zarówno stężenia mierzone w grupie zawierającej medium kontrolne jak i w pozostałych populacjach zawieszonych w innym typie płynu drenazowego. Najniższa synteza PAI-1 cechowała mezotelium hodowane w płynie „czystym” oraz zawierającym hemolizowaną krew (Ryc.3.2).



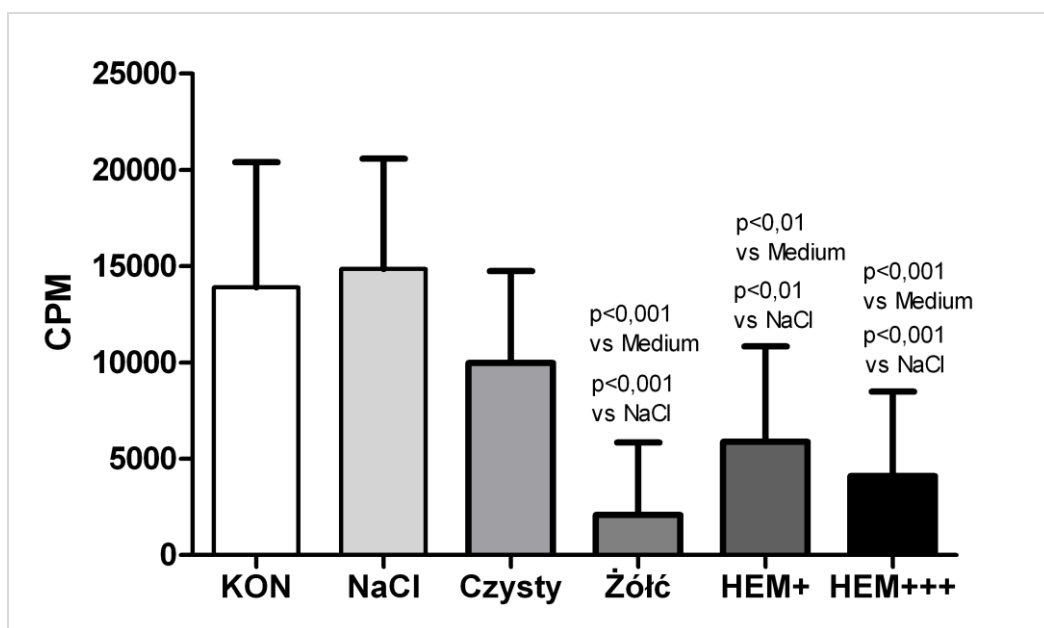
Ryc.3.2 Produkcja PAI-1 w komórkach mezotelialnych eksponowanych na medium kontrolne (Medium), medium hodowlane z dodatkiem roztworu 0.9% NaCl (NaCl), lub medium hodowlane z dodatkiem drenowanego płynu zawierającego żółć (M+żółć), „czystego” płynu drenowanego (M + „czysty”), drenowanego płynu z hemolizą (M +++) lub drenowanego płynu ze śladową hemolizą (M +).

W odniesieniu do syntezy tPA obserwowano tendencję wzrostową w grupie hodowanej w płynie ze śladową hemolizą oraz zawierającym żółć, ale te zmiany nie były statystycznie istotne. Z kolei mezotelium należące do grupy inkubowanej w 0,9% NaCl oraz w płynie „czystym” charakteryzował najmniejszy spośród wszystkich badanych populacji przyrost tPA nie potwierdzony jednak statystycznie (Ryc. 3.3).



Ryc.3.3 Produkcja t-PA w komórkach mezotelialnych ekspozowanych na medium kontrolne (Medium), medium hodowlane z dodatkiem roztworu 0.9% NaCl (NaCl), lub medium hodowlane z dodatkiem drenowanego płynu zawierającego żółć (M + żółć), „czystego” płynu drenowanego (M + „czysty”), drenowanego płynu ze śladową hemolizą (M +) lub drenowanego płynu z hemolizą (M +++).

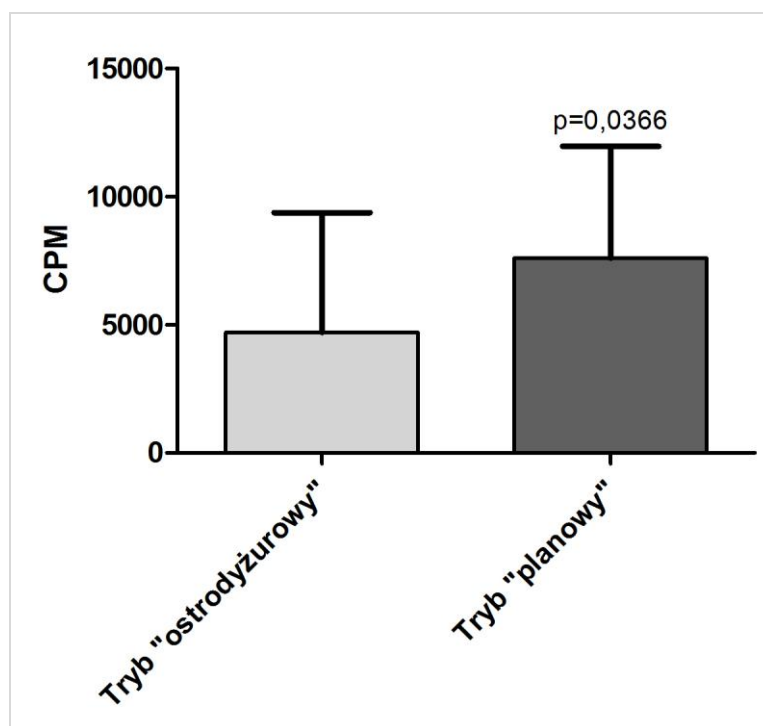
Natomiast proliferacja komórkowa była największa w obu grupach kontrolnych zawierających odpowiednio medium hodowlane oraz standardowy 0,9% roztwór NaCl. W pozostałych grupach eksperymentalnych, ekspozowanych na działanie płynu uzyskanego po płukaniu jamy brzusznej, z wyjątkiem płynu czystego, obserwowano zahamowanie proliferacji. Najniższy poziom wzrostu mezotelium odnotowano w hodowli zawieszonyj w płynie zawierającym żółć, nieco wyższy w obu grupach z hemolizą (Ryc.3.4).



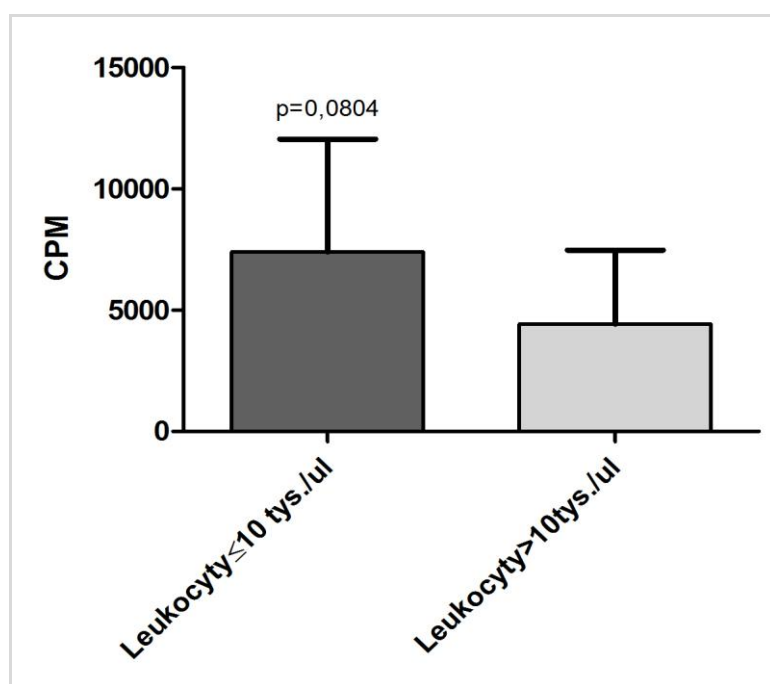
Ryc.3.4 Proliferacja komórek mezotelium otrzewnowego eksponowanych na medium kontrolne (Medium), medium hodowlane z dodatkiem roztworu 0.9% NaCl (NaCl), lub medium hodowlane z dodatkiem drenowanego płynu zawierającego żółć (M + żółć), „czystego” płynu drenowanego (M + „czysty”), drenowanego płynu ze śladową hemolizą (M +) lub drenowanego płynu z hemolizą (M +++).

4. Analiza badań laboratoryjnych w kontekście danych klinicznych.

Analizując możliwy wpływ czynników klinicznych na wyniki badań uzyskane drogą eksperymentalną w warunkach *in vitro* stwierdzono, że płyn irygacyjny uzyskany od pacjentów z podwyższoną liczbą leukocytów we krwi obwodowej oraz płyn od chorych kwalifikowanych do operacji w trybie ostrożyrowym może działać supresyjnie na proliferację komórek mezotelialnych. (Ryc.4.1, 4.2). Jako kryterium patologicznego wzrostu leukocytozy przyjęto wartość powyżej 10 tysięcy komórek na 1 μ l.

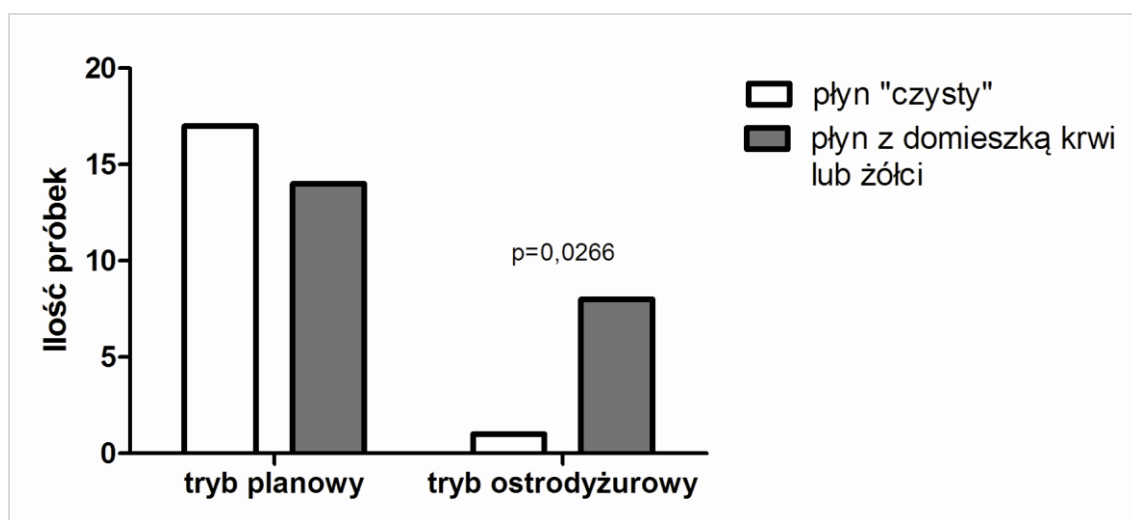


Ryc.4.1 Wpływ płynów uzyskanych od pacjentów u których wykonywano zabiegi ze wskazań nagłych (tryb „ostrodyżurowy”) lub planowo (tryb „planowy”) na proliferację komórek mezotelialnych.



4.2. Wpływ płynów uzyskanych od pacjentów z leukocytozą ≤ 10 tys/ μ l lub > 10 tys/ μ l na proliferację komórek mezotelialnych.

Ponadto zwraca uwagę że płyn „czysty” zawierający relatywnie najmniej zanieczyszczeń uzyskiwano w większości od chorych operowanych planowo (Ryc.4.3). Płyny ze śródoperacyjnej irygacji jamy brzusznej ze zwiększoną ilością żółci lub krwi pochodziły od pacjentów zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego ze względu na nasilone dolegliwości kliniczne, przyjętych na oddział chirurgiczny w ramach ostrego dyżuru.



4.3. Porównanie ilości próbek płynu bez widocznych domieszek materiału biologicznego (płyn „czysty”) oraz próbek z domieszką krwi lub żółci uzyskanych podczas zabiegów wykonywanych planowo i w ramach ostrego dyżuru.

Dyskusja

Sól fizjologiczna czyli 0,9% roztwór chlorku sodowego nadal stanowi jedną z najpopularniejszych substancji stosowanych w medycynie. Wśród wielu zalet umożliwiających szerokie zastosowanie tego krystaloidu jeden fakt pozostaje bezsporny: sól fizjologiczna w powszechnej świadomości uważana jest za roztwór biokompatybilny i w pełni przyjazny dla komórek ustroju. Tymczasem szereg badań, szczególnie opracowania publikowane w ostatnim dziesięcioleciu pokazują destrukcyjny wpływ soli na ludzkie komórki burząc mit jej całkowitej biogodności.

Poszukując źródła negatywnych zmian ustrojowych jakie może powodować stosowanie roztworu chlorku sodowego należy przeanalizować możliwe warianty jego oddziaływania w środowisku międzykomórkowym. W tym kontekście należy zwrócić uwagę na fizykochemiczne cechy tego roztworu. W istocie jego budowa jest dość prosta, oparta na równomolowym stosunku jonów sodu i chloru wynoszącym po 154 mmol dla $[Na^+]$ i $[Cl^-]$ w 1000 ml, z osmolalnością rzędu 308 mOsm/l. Dodatkowo stosowana w powszechnym obiegu sól nie jest buforowana, co powoduje że pH pozostaje w granicach 5,5-6,0. Biorąc pod uwagę powyższe fakty oraz pamiętając że komórka stanowi układ dynamiczny zachowujący równowagę dzięki szczególnym właściwościom półprzepuszczalnej błony komórkowej staje się jasnym że sól fizjologiczna będzie oddziaływać poprzez zmianę gradientu chemicznego i elektrycznego oraz w wyniku bezpośredniego oddziaływania jonów sodu lub chloru w reakcjach typu ligand – receptor [170,171].

W świetle powyższych rozważań badania przeprowadzone w niniejszej pracy miały na celu ocenę biokompatybilności soli fizjologicznej jako roztworu stosowanego do śródoperacyjnej irygacji jamy brzusznej, w szczególności analizę zmian zachodzących w środowisku wewnątrztrzewnowym oraz obserwację bezpośredniego wpływu na komórki mezotelialne. Zakres prowadzonych prac zaprojektowano z uwzględnieniem detekcji kluczowych zmian zachodzących zarówno w środowisku *in vitro* jak i *in vivo* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego oraz ludzkiego mezotelium.

W pierwszym etapie badań w czasie 4-godzinnej obserwacji oceniano zmiany równowagi kwasowo- zasadowej, stężenie elektrolitów, przyrost cytokin prozapalnych oraz profil komórkowy płynu wewnątrztrzewnowego. Odczyn inkubowanego w jamie brzusznej płynu wykazywał stały wzrost począwszy od wartości wyjściowej pH równej 6,81 mierzonej w 30. minucie eksperymentu do pH 7,56 uzyskanego w końcowym pomiarze. Powyższe zmiany są więc wykładnikiem dążenia otrzewnej do normalizacji pH od odczynu

kwaśnego do słabo zasadowego, charakterystycznego dla nienaruszonego środowiska śródtrzewnowego. Zwraca uwagę przebieg całego procesu, bowiem jeszcze w drugiej godzinie inkubacji wartość pH wprowadzonego płynu była nadal niższa niż pH płynów ustrojowych, pomimo faktu że błona otrzewnowa jest strukturą dynamiczną, o dużej powierzchni dyfuzyjnej, ściśle związanej z układem naczyń krwionośnych i limfatycznych.

Podobnie jak w przypadku równowagi kwasowo-zasadowej również stężenia elektrolitów cechowała stała tendencja do normalizacji, czyli do osiągnięcia poziomów sprzed dootrzewnowej infuzji soli fizjologicznej. Stężenia końcowe jonów sodu, chloru i potasu są w głównej mierze wynikiem sprawności dyfuzyjnej błony otrzewnowej, zależnej od gradientu elektrochemicznego, a więc stężeń wyjściowych po obu jej stronach. Ta zależność tłumaczy charakter zmian, które dla badanych jonów nie były jednakowe [170,172]. Podkreślenia wymaga fakt że trwająca w czasie eksperymentu normalizacja stężeń elektrolitów oraz pH w inkubowanym płynie może się odbywać w dwóch niezależnych mechanizmach. Z jednej strony dochodzi do wymiany jonów między środowiskiem wewnątrztrzewnowym, a przedziałem płynów ustrojowych zawartych w układzie krwionośnym oraz limfatycznym, z drugiej wprowadzony płyn ma charakter hiperosmotyczny w stosunku do środowiska wewnątrzkomórkowego komórek mezotelialnych [173]. Obserwowana szybkość zmian stężeń badanych elektrolitów będzie więc uzależniona od gradientu elektrochemicznego obu tych środowisk. Dodatkowo działanie hiperosmotyczne wprowadzonego płynu może oddziaływać toksycznie na mezotelium i w konsekwencji prowadzić, z udziałem niektórych cytokin ($TGF\beta$) do cytolizy lub apoptozy [174,175,176]. W przypadku jonów sodowych spadek stężenia w ciągu 4-godzinnej inkubacji był stosunkowo niewielki o blisko 8 mmol/l do wartości końcowej 142 mmol/l. Dla jonów chlorkowych i potasowych dążenie do wyrównania stężeń odpowiadających wartościom w płynach ustrojowych, wymusiło większą dynamikę zmian. Poziom jonów chlorkowych uległ zdecydowanej regresji ze 146 do 121 mmol/l, z kolei stężenie jonów potasu wzrosło niemal dwukrotnie z 2,13 do 4,11 mmol/l.

Oprócz oceny parametrów fizykochemicznych inkubowany płyn badano również pod względem zmienności cech biologicznych. Detekcji podlegała synteza cytokin prozapalnych oraz profil komórkowy z całkowitą liczbą komórek włącznie. Białko chemotaktyczne dla monocytów typu 1 (MCP-1) wzrastało wykładniczo w ciągu 4. godzin obserwacji osiągając w chwili zakończenia badania ponad 3-krotnie wyższe stężenie w porównaniu do pomiaru z 30. minuty badania. MCP-1 należy do głównych cytokin indukujących rozwój stanu

zapalnego, a jego obecność związana jest nie tylko z aktywacją monocytów, ale również limfocytów T i komórek dendrytycznych [177]. Ponadto białko to sprzyja degranulacji komórek tucznych oraz granulocytów zasadochłonnych zwłaszcza w obecności innych cytokin [171,178,179]. Podobna dynamika wzrostu choć o nieco mniejszym natężeniu cechowała elastazę, kolejny ważny marker stanu zapalnego. Odpowiada ona w głównej mierze za dekompozycję międzykomórkowej macierzy poprzez rozkład włókien elastycznych. Warto przy tym podkreślić że stężenie elastazy jest uzależnione od produkujących ten enzym komórek tj. granulocytów obojętnochłonnych oraz makrofagów [180,181,182]. W prezentowanym badaniu zwłaszcza ta druga z wymienionych populacji leukocytów mała kluczowe znaczenie dla syntezy elastazy. Czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) to kolejna z ocenianych w trakcie inkubacji cytokin. Pomimo że VEGF związany jest głównie z proliferacją i wzrostem śródbłonna należy pamiętać że czynnik ten może stymulować migrację monocytów i makrofagów oraz zwiększać przepuszczalność naczyń [183,184]. Stanowi więc obok MCP-1 oraz leukocytarnej elastazy kolejny marker prozapalny, którego wzrost, w świetle prezentowanych badań, jest bezpośrednio związany z dootrzewnowym podaniem soli fizjologicznej. Znamienne że w odróżnieniu od dwóch poprzednio prezentowanych czynników, wzrost VEGF ma miejsce dopiero pod koniec eksperymentu.

Podobna dynamika wzrostu charakteryzuje transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β), którego poziom mierzony w drugiej godzinie eksperymentu przewyższa dwukrotnie wartość z 30 minuty. Niemniej w drugiej części obserwacji można zauważyć gwałtowny przyrost stężenia TGF β i na zakończenie jest ono blisko 5 razy większe niż wartość wyjściowa. Synteza tej cytokiny odbywa się głównie z udziałem monocytów oraz limfocytów, a jej działanie ma wszechstronny charakter, zależny od sytuacji [171]. Z jednej strony może pobudzać tworzenie białek (białka macierzy, interleukiny) oraz wzmacniać proliferację komórek zwłaszcza mezenchymalnych, z drugiej hamuje podziały w komórkach dojrzałych oraz wprowadza część z nich na szlak apoptozy [185]. Ponadto TGF- β może zmniejszać zdolności fagocytarne limfocytów i monocytów [14,179,186,187]. Ostatecznym wykładnikiem wzmożonej syntezy opisanych wyżej substancji biologicznie czynnych był wzrost poziomu białka całkowitego, którego stężenie w chwili ukończenia obserwacji cechował ponad 4-krotny wzrost.

Konsekwencją rozwoju stanu zapalnego jest szereg zjawisk prowadzących do wzmożonej rekrutacji leukocytów oraz wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych. To

z kolei przyczynia się do migracji coraz większej liczby elementów komórkowych oraz w perspektywie czasowej zmiany ich charakteru jakościowego. Dokonując kolejnych pomiarów w wyznaczonych interwałach stwierdzono wyraźny przyrost całkowitej liczby komórek w inkubowanym płynie mierzony w stałej jednostce objętości. Z kolei wzrost ten koreluje ze wzrostem prozapalnych cytokin wzmagających stan zapalny, zwiększających przepuszczalność naczyń i działających chemotaktycznie dla leukocytów krwi obwodowej. Szczegółowa analiza poszczególnych populacji komórkowych zawartych w pobranych próbkach dowodzi że w trakcie 4-godzinnej ekspozycji mezotelium na sól fizjologiczną spada procentowy udział limfocytów, a wzrasta odsetek makrofagów i leukocytów kwasochłonnych. Leukocyty obojętnochłonne cechuje początkowy spadek udziału procentowego, z kolei poziom komórek tucznych pozostaje na stałym poziomie z okresowymi wzrostami wartości. Podkreślić należy że podane wyniki dla populacji leukocytów w poszczególnych fazach eksperymentu mają charakter procentowy, wyrażają zatem całościowy charakter zmian oraz pozwalają prognozować ich dalszy kierunek, nie odpowiadają jednak wartościom bezwzględnym.

Procentowy wzrost ilości makrofagów jest zjawiskiem typowym w sytuacji nasilenia stanu zapalnego. Komórki te stanowią podstawową linię obrony nierozzerwalnie związaną z funkcją fagocytarną, przy czym ich wzmożona rekrutacja odpowiada znacznemu przyrostowi MCP-1 [14,15,171,188]. Z kolei interesujący z punktu widzenia rozwoju zjawisk patofizjologicznych wydaje się być wzrastający odsetek leukocytów kwasochłonnych, komórek identyfikowanych przede wszystkim z rozwojem zapalenia na tle alergicznym [189]. Biorąc pod uwagę ich specyficzne właściwości m.in. syntezę prostaglandyn, leukotrienów, czynników wzrostu (TGF β , VEGF, PDGF) i niektórych interleukin oraz zdolność generacji wolnych rodników, można przyjąć że obok makrofagów pełnią one kluczową rolę w rozwoju poinfuzyjnego zapalenia wewnątrztrzewnowego. Z tego punktu widzenia sól fizjologiczna zamiast substancją biozgodną staje się alergenem, którego największy potencjał drażniący jest w chwili podania, a dalszy ciąg zdarzeń polega na próbach adaptacji 0,9%roztworu NaCl do warunków wewnątrztrzewnowych [190]. Ostatecznie jednak, pomimo normalizacji parametrów fizykochemicznych, biozgodności soli fizjologicznej nie udaje się uzyskać, gdyż w ślad za optymalizacją składu chemicznego oraz dążeniem do ujednoczenia stężeń elektrolitów, dochodzi do rozwoju reakcji zapalnej, a w konsekwencji zmian czynnościowych i strukturalnych samego mezotelium. Podobne zjawisko związane ze śródtrzewnowym

wzrostem liczby eozynofili może wystąpić w następstwie przewlekłej dializy otrzewnowej i sprzyjać formowaniu zrostów otrzewnowych [191, 192].

W drugiej części badań na modelu zwierzęcym oceniano przede wszystkim funkcje oraz zdolność adaptacji komórek mezotelialnych w zmiennym środowisku w warunkach *in vitro*. Wyselekcjonowane szczurze komórki mezotelialne zawieszono w standardowym medium hodowlanym, czystej soli fizjologicznej oraz próbkach płynu pobranego *ex vivo* z jamy otrzewnej szczurów. Uzyskane wyniki nawiązują do wniosków z poprzednich doświadczeń, ponieważ wzrost MCP-1 koreluje z czasem pobrania danej próbki płynu stanowiącej następnie medium do hodowli mezotelium. Oznacza to że wraz z wydłużeniem czasu pierwotnej inkubacji płynu drenażowego w jamie brzusznej szczura, jego skład również ulegnie zmianie odzwierciedlając w coraz większym stopniu narastający wewnątrzotrzewnowo stan zapalny.

Najniższe stężenie MCP-1 obserwowano w populacji komórek inkubowanych w kontrolnym roztworze 0,9% NaCl, co jednoznacznie pokazuje depresyjne działanie soli na mezotelium. Przyczyną może być jej efekt hiperosmotyczny, wyzwalający stres komórkowy, prowadzący do zahamowania wzrostu lub zniszczenia populacji [99, 174]. Jednocześnie w grupie komórek, które przetrwały niekorzystne działanie czystej soli fizjologicznej, zauważalne są oznaki adaptacji do nowych warunków czego odzwierciedleniem jest wzrost proliferacji komórkowej. W stosunku do grupy kontrolnej inkubowanej w standardowym medium hodowlanym największe natężenie replikacji DNA obserwowano w populacji zawieszanej w czystym 0,9% NaCl, natomiast pozostałe grupy cechował spadek proporcjonalny do długości pierwotnego zalegania płynu drenażowego. Podsumowując, im normalizacja wprowadzonej do otrzewnowo soli fizjologicznej trwała dłużej tym liczba podziałów komórkowych malała. Przepuszczalnie miał na to wpływ postępujący w czasie spadek potencjału hiperosmotycznego przy jednoczesnym wzroście stężenia prozapalnych cytokin [99, 193].

Etap trzeci pracy przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkich komórek mezotelialnych oraz płynu stosowanego do tzw. *toalety* jamy brzusznej podczas operacji cholecystectomii laparoskopowej. W części przypadków pobrane próbki zawierały oprócz samego chlorku sodu w stężeniu 0,9% także inne substancje, przede wszystkim krew i żółć. Po wstępnym przygotowaniu płyn drenażowy posłużył jako medium eksperymentalne w którym zawieszono i inkubowano uprzednio przygotowane linie ludzkich komórek mezotelialnych.

Oceniając wielkość syntezy IL6 największy przyrost stężenia stwierdzono w grupie komórek zawieszonych w płynie drenażowym zawierającym niewielką ilość zhemolizowanej krwi. Ponadto istotny statystycznie wzrost w stosunku do kontroli hodowanej w standardowym medium odnotowano w populacjach inkubowanych w płynie drenażowym „czystym” oraz hemolizą znacznego stopnia. W kontekście powyższych wyników, wielu autorów podkreśla wpływ hemoglobiny, a w zasadzie jej części prostetycznej - hemu – w promocji stanu zapalnego. Hem, żelazoporfiryna zawierająca jon żelaza, bierze udział w reakcjach typu redox i w zależności od warunków może być utleniaczem lub reduktorem. Przykładem działania zawartego w hemie żelaza może być zwiększone tworzenie wolnych rodników prowadzące do peroksydacji lipidów i protein błonowych, części DNA oraz lipoprotein osoczowych [194,195,196]. Uwalnianie z hemoglobiny żelazo wzmacnia ekspresję molekuł adhezyjnych na komórkach śródbłonna i retikulocytach oraz aktywuje leukocyty, w tym monocyty i makrofagi wchodzące w skład systemu fagocytujących mononuklearów oraz wielojądrowe granulocyty obojętnochłonne (*polymorphonuclear neutrophils PMNs*). Z kolei jednym z efektów pobudzenia mononuklearów może być, obok fagocytozy, wzrost syntezy cytokin prozapalnych, głównie IL 6 [194,197]. Graca-Souza i wsp. stwierdzili że uwolniony podczas hemolizy hem zmienia konformację wewnątrzkomórkowych filamentów aktynowych granulocytów obojętnochłonnych przyczyniając się do nasilenia chemotaksji i fagocytozy. Ponadto przyczynia się również do zwiększenia generacji wolnych rodników oraz indukuje syntezę interleukiny 8 [196].

Jednak nadal w ujęciu powyższych wyników pozostaje pytanie dlaczego w płynie z nasiloną hemolizą stężenie IL6 było niższe niż w płynie z hemolizą śladową. Odpowiedź może mieć związek z algorytmem pobierania płynu w czasie zabiegu. Płyn zawierający dużo erytrocytów pochodził od pacjentów u których warunki anatomiczne np. nasilony stan zapalny, zrosty otrzewnowe, determinowały krwawienie śródoperacyjne co z kolei wymagało częstego drenażu płuczącego i wydłużało czas zabiegu. Płyn wówczas pobierany zalegał relatywnie dłużej w jamie brzusznej, co powodowało – wskutek dyfuzji elektrolitów zmianę jego parametrów fizykochemicznych (mniejsza hiperosmotyczność). Z drugiej strony nasilona hemoliza sprzyja syntezie związków biologicznie czynnych przez leukocyty, część z nich jak np. TGF- β mogą z kolei hamować syntezę niektórych cytokin [197,198]. Ponadto zwiększona obecność hemu sprzyja generacji wolnych rodników, co w konsekwencji może osłabiać zdolność do syntezy IL6 przez komórki mezotelialne [196,199].

Kolejnym ważnym zagadnieniem badanym w tej części pracy była ocena aktywności fibrynolitycznej komórek mezotelialnych hodowanych w pobranym *ex vivo* płynie z drenażu otrzewnowego. Analizując rozkład stężeń PAI-1 zauważono że jego największa koncentracja miała miejsce w populacji mezotelium zawieszonym w płynie zawierającym żółć, przy czym uzyskana wartość była większa zarówno od stężenia PAI-1 w medium kontrolnym, jak i stężeń w pozostałych grupach eksperymentalnych. Co ciekawe w pozostałych grupach zawierających płyn drenażowy uzyskany poziom PAI-1 był niższy od stężenia w medium kontrolnym, choć w tym przypadku różnica nie była istotna statystycznie.

Z kolei tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) w największym stopniu narastał w środowisku ze śladową hemolizą. Stężenia tPA dla pozostałych hodowli nie różniły się między sobą w sposób istotny, co potwierdziła analiza statystyczna. Powyższe wyniki uświadamiają fakt, że charakter zjawisk regulujących wewnątrzotrzewnową aktywność fibrynolityczną cechuje duża złożoność, a dostępne piśmiennictwo nie daje w tej kwestii jednoznacznej odpowiedzi. Wpływ roztworu 0,9%NaCl z domieszką żółci na zwiększenie syntezy PAI-1 może wynikać z jego bezpośredniego oddziaływania biologicznego m.in. nasilania generacji reaktywnych form tlenu i wzmagania syntezy prozapalnych cytokin (TNF α , TGF β , IL1) oraz bezpośredniej aktywacji leukocytów [14,15,64]. Z drugiej strony, należy pamiętać że żółć stanowi mieszaninę kwasów żółciowych i nieorganicznych soli, a zatem może mieć działanie hiperosmotyczne zdolne wyzwolić reakcję stresową komórek mezotelialnych [200]. Relatywnie mniejsza synteza PAI-1 w pozostałych grupach eksperymentalnych w porównaniu do hodowli zawieszonych w standardowym medium może być efektem zwiększonej dyfuzji CO₂ w trakcie operacji laparoskopowych [8,201]. Część autorów sugeruje że zmniejszenie liczby zrostów po zabiegach laparoskopowych wynika właśnie z „ochronnego” wpływu dwutlenku węgla [8,202]. Podobnie taką prewencyjną rolę może mieć także sama sól fizjologiczna. Paradoksalnie, mimo że nie jest roztworem biozgodnym, może poprzez swój hiperosmotyczny potencjał zmniejszać lokalny stan zapalny i hamować syntezę PAI-1 promując tym samym fibrynolizę w większym stopniu niż roztwory normotoniczne [99].

Z kolei wzrost stężenia tPA w środowisku częściowej hemolizy będzie pochodną stymulującego wpływu elementów morfotycznych, przede wszystkim leukocytów i produkowanych przez nie cytokin [15,203]. Takemura i wsp.[188] podkreśla rolę makrofagów w regulacji potencjału fibrynolitycznego. Jednocześnie należy pamiętać że płyn drenażowy ze śladową hemolizą zawiera mniej hemu i jonów żelaza wobec czego jego wpływ

na tworzenie wolnych rodników i indukowanie stresu oksydacyjnego będzie mniejsze. Jednakże w celu stworzenia kompleksowej oceny zmian aktywności fibrynolitycznej obliczono współczynnik tPA/PAI-1, który nie różnił się istotnie między hodowlą prowadzoną w medium kontrolnym, płynie drenażowym „czystym” i płynie z domieszką żółci. Natomiast inkubację w płynie z hemolizą znaczną i częściową cechuje w porównaniu do pozostałych badanych grup, zwiększenie tPA/PAI-1, co może sugerować że takie warunki w sytuacji *in vivo* będą w większym stopniu sprzyjać fibrynolizie.

W odniesieniu do powyższych wyników refleksji wymaga depresyjny wpływ żółci na mezotelium. Grupa komórek hodowana w płynie drenażowym zawierającym żółć charakteryzowała się wyraźnym wzrostem PAI-1, największym ze wszystkich badanych grup oraz znacznym spadkiem potencjału proliferacyjnego. Taka sytuacja wynika z toksycznego oddziaływania żółci, głównie bilirubiny i soli kwasów żółciowych bezpośrednio na komórki. Assimakopoulos i wsp. [204] badając wpływ żółtaczki zaporowej na czynność komórek jelita cienkiego oraz narządów zaopatrywanych przez łożysko wrotne stwierdzili że następstwem cholestazy może być postępujące uszkodzenie bariery jelitowej skutkujące translokacją bakterii oraz wzrostem lokalnej i uogólnionej toksemii [205]. Z kolei brak żółci w świetle jelita przyczynił się do rozwoju niekorzystnych zmiany mikrośrodowiska polegających na zastąpieniu lokalnej flory bakteryjnej florą patologiczną [206]. Następstwem tych procesów było osłabienie motoryki jelita i spowolnienie pasażu prowadzące finalnie do atrezji nabłonka jelitowego [206,207]. Analizując wpływ żółci na rozwój lokalnego stanu zapalnego trzeba podkreślić, że należy ona do głównych promotorów tworzenia reaktywnych form tlenu. Z jednej strony mogą one powstawać bezpośrednio w danej tkance wskutek narastania wewnątrzkomórkowego stężenia kwasów żółciowych, z drugiej, jak wyjaśnia Ljubuncic i współautorzy [208], reakcja może przebiegać za pośrednictwem makrofagów, które aktywowane cholestazą, uwalniają wolne rodniki. Warto przy tym zauważyć że wewnątrzkomórkowe stężenie kwasów żółciowych może ulec koncentracji za sprawą zdolności ich łączenia z lipoproteinami niskiej gęstości (LDL) [209], co w dalszej perspektywie czasowej wydłuża oddziaływanie reaktywnych form tlenu na tkankę.

Konsekwencją uszkodzenia jelita cienkiego w warunkach cholestazy i narastającej w tych warunkach systemowej endotoksemii będzie wzmożona aktywacja układu leukocyтарnego, związana przede wszystkim ze nasilonym działaniem chemotaktycznym wobec makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych, syntezą prozapalnych cytokin m.in. IL-1, IL-6, TNF α oraz wzrostem uwalniania tlenku azotu (NO) [210,211]. Dodatkowo

pobudzone leukocyty cechuje wzmożona generacja wolnych rodników, głównie za sprawą aktywacji błonowej NADH/NADPH-zależnej oksydazy [212]. Unno i wsp.[211] sugerują że nadprodukcja tlenu azotu w połączeniu ze wzrostem stężenia anionu nadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$) prowadzi do powstania nadtlenoazotynu ($ONOO^{\cdot -}$) i dalej jego formy kwasowej ($ONOOH$). Oba te związki wzmagają uszkodzenie komórek oraz przyczyniają się do obniżenia integralności tkankowej.

Na zakończenie tego etapu badań oceniano potencjał proliferacyjny indukowany przez medium kontrolne oraz pobrane *ex vivo* płyny. Uzyskane wyniki jednoznacznie przekonują że za wyjątkiem grupy komórek hodowanych w płynie „czystym”, ekspozycja na płyn drenażowy zawierający krew lub żółć zmniejsza ilość podziałów mezotelium. Dowodzi to faktu że obecność związków nasilających rozwój stanu zapalnego m.in. kwasów żółciowych, elementów morfotycznych zwłaszcza leukocytów czy duże stężenie prozapalnych cytokin działa depresyjnie na replikację DNA. Jednocześnie, co warto podkreślić, nie stwierdzono istotnych różnic między proliferacją w medium hodowlanym, a kontrolnym roztworem 0,9%NaCl. Skłania to do wniosku że komórki mezotelium mimo wywierania przez sól fizjologiczną efektu hiperosmotycznego są zdolne do adaptacji i funkcjonowania nawet w niesprzyjających warunkach.

Podsumowaniem 3. etapu badań była konfrontacja wyników uzyskanych drogą laboratoryjną w warunkach *in vitro* z informacjami uzyskanymi na podstawie oceny klinicznej operowanych pacjentów. Próbowano ustalić czy pewne fakty wynikłe z badania podmiotowego, przedmiotowego lub zawarte w badaniach pracowni mogą wpływać na jakość pobranego płynu drenażowego i tym samym indukować konkretne efekty w badaniach *in vitro*. Starano się przede wszystkim ustalić wpływ w/w czynników na proliferację komórkową komórek mezotelialnych. Niewątpliwie czynnikiem mogącym sprzyjać zwiększeniu potencjału proliferacyjnego może być pojawienie się u pacjenta wykładników stanu zapalnego, czego odzwierciedleniem będzie nasilenie dolegliwości klinicznych związanych z chorobą. Płyn drenażowy pozyskany od chorych przyjętych na leczenie szpitalne w ramach ostrego dyżuru zmniejszał liczbę podziałów komórkowych, podobnie leukocytoza krwi obwodowej powyżej 10tys./ μ l. Ponadto stwierdzono że tzw. płyn drenażowy „czysty” czyli pobrane w trakcie operacji próbki soli fizjologicznej pozbawione dodatkowych zanieczyszczeń, pochodził w większości od pacjentów leczonych planowo. Natomiast płyn z nasiloną lub śladową hemolizą oraz płyn z domieszką żółci pobierano od chorych wyjściowo kwalifikowanych do zabiegu w trybie ostrodyżurowym. Operacje w tej

grupie pacjentów były w większości bardziej skomplikowane i trwały dłużej, a dodatkowo wskutek niejasnej anatomii podyktowanej zapaleniem pęcherzyka, mogło dochodzić do urazów naczyń lub ściany pęcherzyka, co tłumaczy obecność krwi lub żółci w zebranych próbkach. Trzeba także zaznaczyć, że pomimo istotności statystycznej, analiza oparta była na grupie 40. chorych.

Biorąc pod uwagę cały harmonogram przeprowadzonych badań widać jednoznacznie że stawiane na początku powyższych rozważań pytanie *o rolę fizjologii w stosowaniu soli fizjologicznej* jest w pełni zasadne i więcej - wymaga gruntownej rewizji powszechnie panujących przekonań. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki oceniające biozgodność 0,9% roztworu chlorku sodowego wskazują jednoznacznie że może on wywoływać szereg niekorzystnych zmian zarówno w samych komórkach jak i w otaczającym je środowisku. Wnioski wynikające z powyższych obserwacji są zgodne z opiniami innych autorów zajmujących się tym tematem. W części prac zwraca się szczególną uwagę na rolę soli fizjologicznej w stymulacji tworzenia reaktywnych form tlenu. Przyjmuje się że wskutek jej dootrzewnowej infuzji rośnie stężenie jonów sodu w środowisku zewnątrzkomórkowym co z kolei determinuje ich napływ do wnętrza komórek odbywający się z pomocą antysportu Na^+/H^+ . Efektem jest wzmożona aktywacja Na^+/K^+ -ATPazy wzmagająca generację wolnych rodników, co pośrednio tłumaczy destrukcyjny wpływ roztworów hiperosmotycznych [64,213]. Z działaniem hipertonicznym wiąże się również promowanie lokalnego stanu zapalnego. Może to być związane, zdaniem niektórych autorów, aktywacją szlaku cyklooksygenazy-2 (poprzez MAP – kinazy) i wzrostem syntezy prostaglandyn [176,214]. Shapiro i wsp.[174] udowodnili że synteza IL8 przez makrofagi umieszczone w roztworach hipertonicznych wzrasta niezależnie od składu chemicznego zastosowanego roztworu [215] .

Działanie cytotoksyczne, może się także manifestować w zahamowaniu metabolizmu komórkowego i w konsekwencji zaburzeniu fizjologicznych czynności. Wielu autorów podkreśla zwłaszcza upośledzenie aktywności fibrynolitycznej związanej z niedostateczną syntezą t-PA z jednoczesnym wzrostem produkcji PAI-1 co może być podstawą rozwoju zrostów otrzewnowych [14,15,22,162]. Dodatkowo sprawę komplikuje fakt że w pewnych sytuacjach dootrzewnowe stosowanie roztworów hipertonicznych sprzyja normalizacji potencjału fibrynolitycznego i może hamować rozwój stanu zapalnego [99]. Dla porządku należy dodać że takie zaskakujące działanie cytoprotekcyjne miały roztwory soli fizjologicznej uprzednio buforowane do pH=7,4.To z kolei skłania do wniosku że obok samego składu roztworu kluczowym z punktu widzenia biozgodności jest także odczyn

roztworu. Uważa się że kwaśne pH płynów infuzyjnych stanowi niezależny czynnik cytotoksyczny mogący prowadzić do rozwoju zrostów otrzewnowych [216].

Podsumowując rozważania na temat biogodności soli fizjologicznej nie sposób odnieść się do faktu że ten wydawać by się mogło prosty związek ma tak wiele wariantów biologicznego działania. Niewątpliwie dootrzewnowa infuzja 0,9% NaCl wiąże się z natychmiastowym wzrostem potencjału hiperosmotycznego oraz spadkiem pH co z kolei prowadzi do rozwoju stresu komórkowego oraz depresji funkcjonalnej komórek mezotelialnych. W kolejnych etapach za sprawą wyrównania gradientu stężeń po obu stronach błony otrzewnowej parametry fizykochemiczne płynu wewnątrzotrzewnowego ulegają normalizacji. Kosztem tych zmian jest jednak rozwój lokalnego stanu zapalnego oraz uszkodzenie komórek mezotelialnych wskutek przekroczenia ich możliwości adaptacyjnych. A zatem w świetle powyższych rozważań soli fizjologicznej nie można uznać za roztwór biokompatybilny.

Wnioski

- 1.Sól fizjologiczna wprowadzona do jamy otrzewnej zmienia środowisko wewnątrztrzewnowe pod względem fizykochemicznym oraz biologicznym.
- 2.Podczas wewnątrztrzewnowej inkubacji 0,9% roztworu NaCl jego skład staje się zbliżony do składu płynów ustrojowych.
- 3.Sól fizjologiczna podczas wewnątrztrzewnowej inkubacji nabiera cech roztworu o działaniu prozapalnym i cytotoksycznym w stosunku do komórek mezotelialnych.
- 4.W warunkach klinicznych wpływ roztworu 0,9% NaCl stosowanego do płukania otrzewnej na komórki mezotelium zależy w dużym stopniu od jego „zanieczyszczeń” innymi czynnikami biologicznymi, takimi jak żółć czy hemoglobina.

Tłumaczenie stosowanych skrótów obcojęzycznych

CPM (*ang. counts per minute*) - impulsy naliczone w czasie 1 minuty

HA (*ang. hyaluronic acid*) - kwas hialuronowy

EDTA (*ang. ethylenediaminetetraacetate*) - kwas etylenodiaminotetraoctowy

FCS (*ang. fetal calf serum*) - płodowa surowica cielęca

IL 1 (*ang. interleukin-1*) - interleukina 1

IL 4 (*ang. interleukin-4*) – interleukina 4

IL 6 (*ang. interleukin-6*) – interleukina 6

IL 8 (*ang. interleukin-8*) – interleukina 8

IL10 (*ang. interleukin-10*) – interleukina 10

LDL (*ang. low-density lipoprotein*) - lipoproteiny niskiej gęstości

LMWH (*ang. low-molecular-weight heparin*) – heparyna drobnocząsteczkowa

MCP-1 (*ang. monocyte chemotactic protein-1*) - białko chemotaktyczne dla monocytów typu 1

NO (*ang. nitric oxide*) - tlenk azotu

PAA (*ang. plasminogen activator activity*) - aktywność aktywatora plazminogenu

PAI-1,-2, -3 (*ang. plasminogen activator inhibitor - 1,-2,-3*) - inhibitory aktywatora plazminogenu typu 1,2 i 3

PDGF (*ang. platelet-derived growth factor*) - płytkowy czynnik wzrostu

PMNs (*ang. polymorphonuclear neutrophils*) - wielojądrowe granulocyty obojętnochłonne

PPM (*ang. polypropylene mesh*) - siatka polipropylenowa

PTFE (*ang. polytetrafluoroethylene*) - politetrafluoroetylen

TGF- β (*ang. transforming growth factor β*) - transformujący czynnik wzrostu beta

TF (*ang. tissue factor*) - czynnik tkankowy

TNF α (*ang. tumor necrosis factor alfa*) - czynnik martwicy nowotworów alfa

tPA (*ang. tissue plasminogen activator*) - tkankowy aktywator plazminogenu

uPA (*ang. urokinase plasminogen activator*) - aktywator plazminogenu typu urokinazy

VEGF (*ang. vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

Piśmiennictwo

1. di Zerega G.S., Rodgers K.E.: *The peritoneum*. Springer-Verlag; New York 1992: 29.
2. Bochenek A.: Reicher M.: *Anatomia człowieka. Tom II*. PZWL; Warszawa 1992: 153.
3. Woźniak W.: *Anatomia człowieka. Podręcznik dla studentów i lekarzy*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner; Wrocław 2003: 335-339.
4. Colombi A.: *Dializa otrzewnowa*. PZWL. Warszawa 1984: 9-14.
5. Grzybowski A., Bręborowicz A.: *Otrzewna jako błona dializacyjna, I. Fizjologia*. *Przegl. Lek.* 1996; 53: 565-573.
6. Kuzlan M., Pawlaczyk K., Wieczorowska-Tobis K. i wsp.: *Peritoneal surface area and its permeability in rats*. *Perit Dial Int* 1997 May-Jun; 17:295-300.
7. Rubin J., Herrera G.A., Collins D. : *An autopsy study of the peritoneal cavity from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 97-102.
8. Winckiewicz M., Staniszewski R., Połubińska A., Bręborowicz A.: *Mezotelium otrzewnowe – rola w przemianach fibryny*. *Przegl Lek* 2006; 63: 778-81.
9. Bręborowicz A, Rodela H, Knapowski J, Oreopoulos DG.: *Permeability of different parts of the peritoneal mesothelium to solutes: an in vitro study*. *Perit Dial Int* 1989; 9: 135-41.
10. Noszczyk W.: *Chirurgia. Tom II*. PZWL, Warszawa 2005: 970-981
11. Szmidi J., Kuźdzał J.: *Podstawy Chirurgii. Tom II*. Medycyna Praktyczna, Kraków 2010: 592-614
12. Gokal R., Nolph K. *Historical developments and overview of peritoneal dialysis*. In: Gokal R., Nolph K., eds. *The textbook of peritoneal dialysis*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994:1–16.
13. Szczeklik A.: *Choroby wewnętrzne. Podręcznik multimedialny oparty na zasadach EBM*. Medycyna Praktyczna, Kraków 2006; Tom II: 1555-1579.
14. Holmdahl L.: *The role of fibrinolysis in adhesion formation*. *Eur J Surg Suppl.* 1997; 577: 24-31.
15. Holmdahl L., Eriksson E., Al-Jabreen M., Risberg B.: *Fibrinolysis in human peritoneum during surgery*. *Surgery* 1996; 119: 701-705.
16. Renz H., Schmidt A., Hofman P. i wsp. *Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, eicosanoid, and hydrogen peroxide release from macrophages exposed to glove starch particles*. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 21-28.

17. Luijendijk R.W., de Lange D., Wauters C. i wsp.: *Foreign material in postoperative adhesions*. Ann Surg 1996; 223: 242-248.
18. Nordstrand K., Melhus O., Eide T.J. i wsp. *Intraabdominal granuloma reaction in rats after introduction of maize-starch powder*. APMIS 1987; 95: 93-98.
19. Raftery A.T.: *Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an electron microscopical study*. J. Anat. 1973; 115: 375-392.
20. Ellis H., Harrison W., Hugh T.B.: *The healing of peritoneum under normal and pathological conditions*. Br J Surg 1965; 52: 471-76.
21. Martin J., Yung S., Robson R.L. i wsp.: *Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human peritoneal mesothelial cells*. Perit Dial Int. 2000; 20: 524-33.
22. Ince A., Eroglu A., Tarhan O., Bülbül M.: *Peritoneal fibrinolytic activity in peritonitis*. Am J Surg. 2002; 183: 67-9.
23. Traczyk Z.: *Hemostaza: Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. PZWL, Warszawa 1995: 439-444.
24. Harper H., Murray R., Granner D., Mayes P., Rodwell V.: *Biochemia Harpera*. PZWL, Warszawa 2008; 939-947.
25. Bullock J., Boyle J., Wang M.: *Fizjologia*. Wydawnictwo Urban & Partner, Wrocław 2000: 181-186.
26. Raftery A.T.: *Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an enzyme histochemical study*. J Anat. 1976; 121: 589-97.
27. Raftery A.T.: *Regeneration of peritoneum: a fibrinolytic study*. J Anat. 1979; 129: 659-4.
28. Falk P., Bergström M., Palmgren I. i wsp.: *Studies of TGF-beta(1-3) in serosal fluid during abdominal surgery and their effect on in vitro human mesothelial cell proliferation*. J Surg Res. 2009; 154: 312-6.
29. Okamoto Y., Takai S., Miyazaki M.: *Significance of chymase inhibition for prevention of adhesion formation*. Eur J Pharmacol 2004; 484: 357-9.
30. Yao V., Platell C., Hali J.C.: *Role of peritoneal mesothelial cells in peritonitis*. Br. J. Surg. 2003; 90: 1187-94.
31. Hau T., Payne D., Simmons R.L.: *Fibrinolytic activity of the peritoneum during experimental peritonitis*. Surg Gynecol Obstet 1979; 148: 415-18.
32. Ballantyne C.M., Nambi V.: *Markers of inflammation and their clinical significance*. Atheroscler Suppl. 2005; 6: 21-9.

33. Bergenfeldt M.: *Protease-antiprotease levels and whole-blood chemiluminescence in acute peritonitis*. Gastroenterol Jpn 1993; 28: 687-98.
34. Holmdahl L., Al-Jabreen M., Risberg B.: *The role of fibrinolysis in the formation of post-operative adhesions*. Wound Rep Reg 1994; 7: 171-176.
35. Brokelman W.J., Holmdahl L., Bergström M. i wsp. *Peritoneal fibrinolytic response to various aspects of laparoscopic surgery: a randomized trial*. J Surg Res. 2006;136: 309-13
36. Raftery A.T.: *Effect of peritoneal trauma on peritoneal fibrinolytic activity and intraperitoneal adhesion formation. An experimental study in the rat*. Eur Surg Res. 1981; 13: 397-401.
37. Holmdahl L., Al-Jabreen M., Risberg B.: *Experimental models for quantitative studies on adhesion formation in rats and rabbits*. Eur Surg Res 1994; 26: 248-256.
38. Hellebrekers B., Trimbos-Kemper G., Bakkum E. i wsp.: *Short-term effect of surgical trauma on rat peritoneal fibrinolytic activity and its role in adhesion formation*. Thromb Haemost 2000; 84: 876-81.
39. Witowski J., Bręborowicz A., Knapowski J., Oreopoulos D.: *In vitro culture of human peritoneal mesothelium for investigation of mesothelial dysfunction during peritoneal dialysis*. J Physiol Pharmacol 1994; 45: 271-84.
40. Astrup T., Albrechtsen O.K.: *Estimation of the plasminogen activator and the trypsin inhibitor in animal and human tissues*. Scand J Clin Lab Irwest 1957; 9: 233-43.
41. Hanss M., Collen D. *Secretion of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by cultured human endothelial cells: modulation by thrombin, endotoxin and histamine*. J Lab Clin Med 1987; 109: 97-104.
42. Holmdahl L., Falkenberg M., Ivarsson M., Risberg B.: *Plasminogen activators and inhibitors in peritoneal tissue*. APMIS 1997; 105: 25-30.
43. Holmdahl L., Eriksson E., Rippe B., Risberg B.: *Cinetics of transperitoneal t-PA absorption*. Fibrinolysis 1996; 10: 1-7.
44. Saksela O., Hovi T., Vaveri Z.: *Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor are secreted by cultured human monocytes-macrophages*. Am J Pathol 1994; 144: 1269-1280.
45. Vipond M., Whawell S., Thompson J., Dudley H.: *Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions*. Lancet 1990; 335: 1120-1122.
46. Falk K., Bjorquist P., Stromqvist M., Holmdahl L.: *Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1*. Br. J. Surg. 2001; 88: 286-89.

47. Sulaiman H., Dawson L., Laurent G. i wsp.: *Role of plasminogen activators in peritoneal adhesion formation*. Biochem Soc Trans 2002; 30: 126 - 31.
48. Todd A.S.: *The histological localisation of fibrinolysis actiyator*. J Pathol Bacteriol 1959; 78: 281-3.
49. van Hinsbergh V., Kooistra T., Scheffer M. i wsp.: *Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells*. Blood 1990; 75: 1490.
50. Myhre-Jensen O., Larsen S., Astrup T.: *Fibrinolytic activity in serosal and synovial membranes*. Arch Pathol 1969; 88: 623-30.
51. Ranby M., Brandstróm A. : *Biological control of tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis*. Enzyme 1988; 40: 130-43.
52. Eskeland G., Kjaerheim A.: *Regeneration of parietal peritoneum in rats. 2. An electron microscopical study*. Acta Pathol Microbiol Scand. 1966; 68: 379-95.
53. Eskeland G., Eskeland T.: *Development of mesothelium on the outer surface of intraperitoneal diffusion chambers*. Acta Pathol Microbiol Scand. 1966; 66: 447-64.
54. Postlethwaite A., Seyer J., Kang A.: *Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III sollagens and collagen-derived peptides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978,75: 871-5.
55. Rout U., Saed G., Diamond M.: *Expression pattern and regulation of genes differ between fibroblasts of adhesion and normal human peritoneum*. Reprod Biol Endocrinol. 2005, 10: 1-14.
56. Dobbie J., Lloyd J.: *Mesothelium secretes lamellar bodies in a similar manner to type II pneumocyte secretion of surfactant*. Perit Dial Int. 1989, 9: 215-19.
57. Bevan PG. *Adhesive obstruction*. Ann R Coli Surg Engl 1984; 66: 164-69.
58. Parker M., Ellis H., Moran B. i wsp.: *Postoperative adhesions: ten-year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery*. Dis Colon Rectum. 2001; 44: 822-29.
59. Ellis H., Moran B., Thompson J. i wsp.: *Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study*. Lancet. 1999, 353: 1476-80.
60. Ellis H.: *The aetiology of post-operative abdominal adhesions: an experimental study*. Br J Surg 1962; 50: 10-16.
61. Jagelmann D., Ellis H. *Starch and intraperitoneal adhesion formation*. Br J Surg 1973; 60: 111-114.

62. Fabiano G., Pezzolla A., Maiorino R., Ferrarese F.: *Peritoneal adhesions: pathophysiology*. G Chir. 2008 Mar; 29: 115-25.
63. O'Leary D., Coakley J.: *The influence of suturing and sepsis on the development of postoperative peritoneal adhesions*. Ann R Coll Surg Engl 1992; 74: 134-137.
64. Połubinska A., Bręborowicz A., Staniszewski R., Oreopoulos DG.: *Normal saline induces oxidative stress in peritoneal mesothelial cells*. J Pediatr Surg. 2008, 43: 1821-6.
65. Książek K., Bręborowicz A., Jörres A., Witowski J.: *Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose*. Free Radic Biol Med. 2007, 42: 636-41.
66. Korybalska K., Bręborowicz A., Martis L., Oreopoulos D.G.: *In vitro detection of hydrogen peroxide in mesothelial cells*. Adv Perit Dial. 1996, 12: 7-10.
67. Bręborowicz A., Witowski J., Wieczorowska K. i wsp.: *Toxicity of free radicals to mesothelial cells and peritoneal membrane*. Nephron. 1993, 65: 62-6.
68. Książek K., Piątek K., Witowski J.: *Impaired response to oxidative stress in senescent cells may lead to accumulation of DNA damage in mesothelial cells from aged donors*. Biochem Biophys Res Commun. 2008, 373: 335-9.
69. diZerega G.S.: *Biochemical events in peritoneal tissue repair*. Eur. J. Surg. Suppl. 1997, 577: 10-6.
70. Collen D., Lijnen H.R.: *Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis*. Blood 1991, 78: 3114 - 24.
71. Gervin A., Puckett C., Silver D.: *Serosal hypofibrinolysis*. Am J Surg 1973, 125: 80-88.
72. Thompson J.N., Paterson-Brown S., Harbourne T. i wsp.: *Reduced human peritoneal plasminogen activating activity: possible mechanism of adhesion formation*. Br J Surg 1989, 76: 382-84.
73. Holmdahl L., Eriksson E., al-Jabreen M., Risberg B.: *Fibrinolysis in human peritoneum during operation*. Surgery 1996, 119: 701-5.
74. Brokelman W., Holmdahl L., Falk P. i wsp.: *The peritoneal fibrinolytic response to conventional and laparoscopic colonic surgery*. J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2009, 19: 489-93.
75. Molinas C.R., Elkelani O., Campo R. i wsp.: *Role of the plasminogen system in basal adhesion formation and carbon dioxide pneumoperitoneum enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in transgenic mice*. Fertil Steril. 2003, 80: 184-92.
76. Molinas C.R., Koninckx P.R.: *Hypoxaemia induced by CO(2) or helium pneumoperitoneum is a cofactor in adhesion formation in rabbits*. Hum. Reprod. 2000, 15: 1758-63.

77. Ghariani B., Houissa H., Sebai F.: *Laparoscopic treatment of mechanical small bowel obstruction*. Tunis Med. 2011, 89: 274-77.
78. Chiu C.C.: *Open adhesiolysis is more effective in reducing adhesion reformation than laparoscopic adhesiolysis in an experimental model*. Br J Surg. 2010, 97: 962-3
79. Neudecker J., Junghans T., Ziemer S. i wsp.: *Effect of laparoscopic and conventional colorectal resection on peritoneal fibrinolytic capacity: a prospective randomized clinical trial*. Int J Colorectal Dis 2002, 17: 426-29.
80. Ellozy S.H., Harris M.T., Bauer J.J. i wsp.: *Early postoperative small-bowel obstruction: a prospective evaluation in 242 consecutive abdominal operations*. Dis Colon Rectum 2002, 45: 1214-7.
81. Duron J.J., du Montcel S.T., Berger A. i wsp.: *Prevalence and risk factors of mortality and morbidity after operation for adhesive postoperative small bowel obstruction*. French Federation for Surgical Research. Am J Surg 2008, 195: 726-34.
82. Ellis H.: *The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction*. Eur J Surg Suppl. 1997, 577: 5-9.
83. Menzies D. *Postoperative adhesions: their treatment and relevance in clinical practice*. Ann R Coli Surg Engl 1993; 75: 147-153.
84. Hansen J.H.: *Ileus caused by adhesions. Occurrence after various types of laparotomies*. Ugeskr Laeger 1982, 144: 2919-21.
85. Ivarsson M.L., Holmdahl L., Franzen G., Risberg B.: *Cost of bowel obstruction resulting from adhesions*. Eur J Surg 1997, 163: 679-84.
86. Ray N.F., Larsen J.W. Jr, Stillman R.J., Jacobs R.J.: *Economic impact of hospitalizations for lower abdominal adhesiolysis in the United States in 1988*. Surg Gynecol Obstet 1993, 176: 271-276.
87. Stanciu D., Menzies D. : *The magnitude of adhesion-related problems*. Colorectal Dis Suppl 2007, 2: 35-8.
88. Donckier V., Closset J., Van Gansbeke D. i wsp.: *Contribution of computed tomography to decision making in the management of adhesive small bowel obstruction*. Br J Surg. 1998, 85: 1071-74.
89. Heydrick S.J., Reed K.L., Cohen P.A. i wsp.: *Intraperitoneal administration of methylene blue attenuates oxidative stress, increases peritoneal fibrinolysis, and inhibits intraabdominal adhesion formation*. J Surg Res 2007, 143: 311-19.

90. Overhaus M., Schaefer N., Hirner A. i wsp.: *Influence of temporary abdominal wall repair on the intestinal integrity: an experimental study in the rat.* Eur Surg Res 2008, 40: 55-60.
91. Ray N.F., Denton W.G., Thamer M. i wsp.: *Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994.* J Am Coll Surg 1998, 186: 1-9.
92. Tingstedt B., Isaksson J., Andersson R.: *Long-term follow-up and cost analysis following surgery for small bowel obstruction caused by intra-abdominal adhesions.* Br J Surg 2007, 94: 743-8.
93. Ivarsson M.L., Holmdahl L., Franzén G., Risberg B.: *Cost of bowel obstruction resulting from adhesions.* Eur J Surg 1997, 163: 679-84.
94. Bergstrom M., Ivarsson M.L., Holmdahl L.: *Peritoneal response to pneumoperitoneum and laparoscopic surgery.* Br J Surg 2002, 89: 1465-69.
95. Ellis H. *The hazards of surgical glove dusting powders.* Surg Gynecol Obstet 1990, 171: 521-527.
96. Holmdahl L., Al-Jabreen M., Xia G., Risberg B. *The impact of starch-powdered gloves on the formation of adhesions in rats.* Eur J Surg 1994, 160: 257-261.
97. Tarhan O.R., Barut I., Sezik M.: *An evaluation of normal saline and taurolidine on intra-abdominal adhesion formation and peritoneal fibrinolysis.* J Surg Res 2008, 144: 151-57.
98. Sahakian V., Rogers R.G., Halme J., Hulka J.: *Effects of carbon dioxide-saturated normal saline and Ringer's lactate on postsurgical adhesion formation in the rabbit.* Obstet Gynecol 1993, 82: 851-53.
99. Połubinska A., Winckiewicz M., Staniszewski R. i wsp.: *Time to reconsider saline as the ideal rinsing solution during abdominal surgery.* Am J Surg 2006, 192: 281-85.
100. Kappas A.M., Fatouros M., Papadimitriou K. i wsp.: *Effect of intraperitoneal saline irrigation at different temperatures on adhesion formation.* Br J Surg 1988, 75: 854 - 56.
101. Buckman R.F, Buckman P.D., Hufnagel H.V., Gervin A.S.: *A physiologic basis for the adhesion-free healing of deperitonealized surfaces.* J Surg Res 1976, 21: 67-76.
102. Holtz G.: *Prevention of postoperative adhesions.* J Reprod Med 1980, 24:141.
103. Aydinli B., Öztürk G., Bafiolu M. i wsp.: *Prevention of Adhesions by Omentoplasty: An Incisional Hernia Model in Rats.* Turk J Med Sci 2007, 37: 93-97.
104. Menzies D, Ellis H. *Intestinal obstruction from adhesions: how big is the problem?* Ann R Coli Surg Engl 1990; 72: 60-63.
105. Kutlay J., Ozer Y., Isik B., Kargici H.: *Comparative effectiveness of several agents for preventing postoperative adhesions.* World J Surg 2004, 28: 662-65.

106. Topcu O., Kuzu I., Karayalcin K.: *Effects of peritoneal lavage with scolical agents on survival and adhesion formation in rats.* World J Surg 2006, 30: 127-33.
107. Wiczorowska K., Bręborowicz A., Martis L., Oreopoulos D.G.: *Protective effect of hyaluronic acid against peritoneal injury.* Perit Dial Int. 1995;15: 81-83.
108. Sitter T., Sauter M., Haslinger B.: *Modulation of fibrinolytic system components in mesothelial cells by hyaluronan.* Perit Dial Int 2003, 23: 222-27.
109. Diamond M.: *Reduction of de novo postsurgical adhesions by intraoperative precoating with Sepracoat (HAL-C) solution: a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled multicenter study.* The Sepracoat Adhesion Study Group. Fertil Steril. 1998, 69: 1067-74.
110. Prieto-Díaz-Chávez E., Medina-Chávez J.L., Ramírez-Barba E.J. i wsp.: *Reduction of peritoneal adhesion to polypropylene mesh with the application of fibrin glue.*, Acta Chir Belg 2008, 108: 433-7.
111. Tingstedt B., Nehéz L., Lindman B., Andersson R.: *Effect of bioactive polypeptides on leaking large bowel anastomosis and intestines in the rat.* J Invest Surg 2007, 20: 229-35.
112. Nehéz L., Tingstedt B., Axelsson J., Andersson R.: *Differently charged polypeptides in the prevention of post-surgical peritoneal adhesions.* Scand J Gastroenterol 2007, 42: 519-23.
113. Tingstedt B., Nehéz L., Lindman B., Andersson R.: *Efficacy of bioactive polypeptides on bleeding and intra-abdominal adhesions.* Eur Surg Res 2007, 39: 35-40.
114. de Vries Reilingh T.S., van Goor H., Koppe M.J. i wsp.: *Interposition of polyglactin mesh does not prevent adhesion formation between viscera and polypropylene mesh.* J Surg Res 2007, 140: 27-30.
115. Erpek H., Tuncyurek P., Soyder A., Boylu S.: *Hyaluronic acid/carboxymethylcellulose membrane barrier versus taurolidine for the prevention of adhesions to polypropylene mesh.* Eur Surg Res 2006, 38: 414-7.
116. Raptis D.A., Vichova B., Breza J. i wsp.: *A comparison of woven versus nonwoven polypropylene (PP) and expanded versus condensed polytetrafluoroethylene (PTFE) on their intraperitoneal incorporation and adhesion formation.* J Surg Res 2011, 169: 1-6.
117. Ansaloni L., Catena F., Coccolini F. i wsp.: *Peritoneal adhesions to prosthetic materials: an experimental comparative study of treated and untreated polypropylene meshes placed in the abdominal cavity.* J Laparoendosc Adv Surg Tech A 2009, 19: 369-74.
118. Bozkurt S., Yuzbasioglu M.F., Bulbuloglu E. i wsp.: *Prevention of postoperative peritoneal adhesions by administration of estrogen.* J Invest Surg 2009, 22: 263-7.
119. Hatipoglu A., Türkyilmaz Z., Mert S.: *The effects of melatonin on postoperative intraabdominal adhesion formation.* Yonsei Med J 2007, 48: 659-64.

120. Ersoz N., Ozler M., Altinel O. i wsp.: *Melatonin prevents peritoneal adhesions in rats*. J Gastroenterol Hepatol 2009, 24: 1763-7.
121. Ara C., Kirimlioglu H., Karabulut A.B. i wsp.: *Protective effect of melatonin against oxidative stress on adhesion formation in the rat cecum and uterine horn model*. Life Sci. 2005, 77: 1341-50.
122. Kappas A.M., Sarsoum G.H., Ortiz J.B., Keighley M.R.: *Prevention of peritoneal adhesions in rats with Verapamil, hydrocortisone sodium succinate, and phosphatidylcholine*. Eur J Surg 1992, 158: 33-35.
123. Kirdak T., Uysal E., Korun N.: *Assessment of effectiveness of different doses of methylprednisolone on intraabdominal adhesion prevention*. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2008, 14: 188-91.
124. Schindler A.E.: *Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of postoperative adhesions: an overview*. Gynecol Endocrinol 2004, 19: 51-5.
125. Avsar F.M., Sahin M., Aksoy F. i wsp.: *Effects of diphenhydramine HCl and methylprednisolone in the prevention of abdominal adhesions*. Am J Surg 2001, 181: 512-5.
126. Steinleitner A., Lambert H., Kazensky C. i wsp.: *Reduction of primary postoperative adhesion formation under calcium channel blockade in the rabbit*. J Surg Res 1990, 48: 42-5.
127. Lucas P.A., Warejcka D.J., Young H.E., Lee B.Y.: *Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor-beta1*. J Surg Res 1996, 65: 135-8.
128. Chegini N.: *The role of growth factors in peritoneal healing: transforming growth factor beta (TGF-beta)*. Eur J Surg Suppl 1997, 577: 17-23.
129. Diamond M.P., El-Hammady E., Wang R., Saed G.: *Regulation of transforming growth factor-beta, type III collagen, and fibronectin by dichloroacetic acid in human fibroblasts from normal peritoneum and adhesions*. Fertil Steril 2003, 79: 1161-7.
130. Kanko M., Ozbudak E., Ozerdem A. : *Effect of sirolimus in the prevention of adhesions around intraabdominal prosthetic graft*. World J Surg 2006, 30: 1648-52.
131. Erpek H., Tuncyurek P., Soyder A., Boylu S.: *Hyaluronic acid/carboxymethylcellulose membrane barrier versus taurolidine for the prevention of adhesions to polypropylene mesh*. Eur Surg Res 2006, 38: 414-7.
132. James D., Ellis H., Hugh T.B.: *The effect of streptokinase on experimental intraperitoneal adhesion formation*. J Pathol Bact 1965, 90: 279-287.
133. Schafer B.M., Maier K., Eickhoff U. i wsp.: *Plasminogen activation in healing human wounds*. Am J Pathol 1994, 144: 1269-1280.

134. Lai H.S., Chen Y., Chang K.J., Chen W.J.: *Tissue plasminogen activator reduces intraperitoneal adhesion after intestinal resection in rats*. J Formos Med Assoc 1998, 97: 323-27.
135. Sogutlu G., Karabulut A.B., Ara C. i wsp.: *The effect of resveratrol on surgery-induced peritoneal adhesions in an experimental model*. Cell Biochem Funct 2007, 25: 217-20.
136. Ustün Y., Engin-Ustün Y., Ovayolu A. i wsp.: *The effect of resveratrol on prevention of the development of postoperative adhesions in a rat model*. Gynecol Endocrinol 2007, 23: 518-22.
137. Mahdy T., Mohamed G., Elhawary A.: *Effect of methylene blue on intra-abdominal adhesion formation in rats*. Int J Surg 2008, 6: 452-5.
138. Dinc S., Ozaslan C., Kuru B. i wsp.: *Methylene blue prevents surgery-induced peritoneal adhesions but impairs the early phase of anastomotic wound healing*. Can J Surg 2006, 49: 321-8.
139. Lai H.S., Chu S.Y., Chen Y. i wsp.: *Effect of pentoxifylline on intraperitoneal adhesions after intestinal resection in rats*. J Formos Med Assoc 1994, 93: 911-915.
140. Aksakal O., Yilmaz B., Gungor T. i wsp.: *A randomised controlled trial on melatonin and rosiglitazone for prevention of adhesion formation in a rat uterine horn model*. Arch Gynecol Obstet 2010, 282: 55-61.
141. Bertram P., Treutner K.H., Tietze L. i wsp.: *Effects of intra-abdominal drainages on adhesion formation and prevention by phospholipids in a rat model*. Drainages and adhesion formation. Eur Surg Res 2003, 35: 92-7.
142. Pawlaczyk K., Holmes C.J., Czekalski S. i wsp.: *Effects of bicarbonate/lactate dialysis solution on the inflammatory response of spontaneous peritonitis in rats undergoing chronic peritoneal dialysis*. Blood Purif 2009, 28: 200-8.
143. Brown C.B., Luciano A.A., Martin D. i wsp.: *Adept (icodextrin 4% solution) reduces adhesions after laparoscopic surgery for adhesiolysis: a double-blind, randomized, controlled study*. Fertil Steril 2007, 88: 1413-26.
144. Haslinger B., Kleemann R., Toet K.H., Kooistra T.: *Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor-alpha-activated human peritoneal mesothelial cells*. Kidney Int 2003, 63: 2065-74.
145. Doody K.J., Dunn R.C., Buttram V.C.: *Recombinant tissue plasminogen activator reduces adhesion formation in a rabbit uterine horn model*. Fertil Steril 1989, 51: 509-12.
146. Rivkind A.I., Lieberman N., Durst A.L.: *Urokinase does not prevent abdominal adhesion formation in rats*. Bur Surg Res 1985, 17: 254-58.

147. Al-Chalabi H.A., Otubo J.: *Value of a single intraperitoneal dose of heparin in prevention of adhesion formation: an experimental evaluation in rats.* Int J Feral 1987, 32: 332-35.
148. Jansen R.P.: *Failure of peritoneal irrigation with heparin during pelvic operations upon young women to reduce adhesions.* Surg Gynecol Obstet 1988, 166: 154-60.
149. Grulich-Henn J., Preissner K.T., Muller-Berghaus G.: *Heparin stimulates fibrinolysis in mesothelial cells by selective induction of tissue-plasminogen activator but not plasminogen activator inhibitor-1 synthesis.* Thromb Haemost 1990, 64: 420-25.
150. Maleckas A., Daubaras V., Vaitkus V. i wsp.: *Increased postoperative peritoneal adhesion formation after the treatment of experimental peritonitis with chlorhexidine.* Langenbecks Arch Surg 2004, 389: 256-60.
151. Güzelsağaltıcı N., Girgin S., Gedik E. i wsp.: *Intraperitoneal octenidindihydro-chloride - phenoxyethanol solution to prevent peritoneal adhesion formation in a rat peritonitis model.* Acta Obstet Gynecol Scand 2007, 86: 395-400.
152. Müller S.A., Treutner K.H., Haase G. i wsp.: *Effect of intraperitoneal antiadhesive fluids in a rat peritonitis model.* Arch Surg 2003, 138: 286-90.
153. Bae J.S., Ahn S.J., Yim H. i wsp.: *Prevention of intraperitoneal adhesions and abscesses by polysaccharides isolated from Phellinus spp in a rat peritonitis model.* Ann Surg 2005, 241: 534-40.
154. Bae J.S., Jang K.H., Jin H.K.: *Comparison of intraperitoneal anti-adhesive polysaccharides derived from Phellinus mushrooms in a rat peritonitis model.* World J Gastroenterol 2005, 11: 810-6.
155. Reijnen M.M., Skrabut E.M., Postma V.A. i wsp.: *Polyanionic polysaccharides reduce intra-abdominal adhesion and abscess formation in a rat peritonitis model.* J Surg Res 2001, 101: 248-53.
156. Müller S.A., Treutner K.H., Tietze L. i wsp.: *Influence of early drainage of intraperitoneal phospholipids on efficacy of adhesion prevention.* J Invest Surg 2002, 15: 23-8.
157. Bertram P., Tietze L., Hoopmann M. i wsp.: *Intraperitoneal transplantation of isologous mesothelial cells for prevention of adhesions.* Eur J Surg 1999, 165: 705-9.
158. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K. : *Farmakologia i toksykologia Mutschlera., MedPharm, Wrocław 2008*
159. Roberts L.M., Sanfilippo J.S., Raab S.: *Effects of laparoscopic lavage on adhesion formation and peritoneum in an animal model of pelvic inflammatory disease.* J Am Assoc Gynecol Laparosc 2002, 9: 503-7.

160. van Westreenen M., van den Tol P.M., Pronk A. i wsp.: *Perioperative lavage promotes intraperitoneal adhesion in the rat*. Eur Surg Res 1999, 31: 196-201.
161. Veech R.L.: *The toxic impact of parenteral solutions on the metabolism of cells: a hypothesis for physiological parenteral therapy*. Am J Clin Nutr 1986, 44: 519-51.
162. Bręborowicz A., Oreopoulos D.G.: *Is normal saline harmful to the peritoneum?* Perit Dial Int 2005, Suppl 4: 67-70.
163. Wiczorowska-Tobis K., Połubinska A., Bręborowicz A I wsp.: *A comparison of the biocompatibility of phosphate-buffered saline and dianeal 3.86% in the rat model of peritoneal dialysis*. Adv Perit Dial. 2001, 17: 42-6.
164. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L.: *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J Biol Chem 1951, 193: 265-275.
165. Akatsuka M., Yamamoto Y., Tobetto K. i wsp.: *Suppressive effects of hyaluronic acid on elastase release from rat peritoneal leukocytes*. J Pharm Pharmacol 1993, 45: 110-114.
166. Bradford M. A.: *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 1976, 72: 248-254.
167. van Bronswijk H., Verbrugh H.A., Bos H.J. i wsp.: *Cytotoxic effects of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and of bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro*. Perit Dial Int 1989, 9: 197-202.
168. Visser L, Blout ER.: *The use of p-nitrophenyl N-tert-butylloxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase*. Biochim Biophys Acta 1972, 268: 257-60.
169. Bomski H. *Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne*. PZWL 1995.
170. Kawiak J., Zabel M.[red]: *Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii*. Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2009: 128-159
171. Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoń J. [red]: *Podstawy Cytofizjologii*. PWN, Warszawa 1998: 520-23; 537-565.
172. Jaroszyk F.: *Biofizyka. Podręcznik dla Studentów*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001: 328-337.
173. Nishida Y., Shao J.C., Kiribayashi K. i wsp.: *Advanced glycation end-products reduce the viability of human peritoneal mesothelial cells*. Nephron 1998, 80: 477-8.

174. Shapiro L., Dinarello C.A.: *Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production*. Exp Cell Res 1997, 231: 354-62.
175. Kültz D., Chakravarty D. *Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98: 1999-2004.
176. Tian W., Boss G.R., Cohen D.M.: *Ras signaling in the inner medullary cell response to urea and NaCl*. Am J Physiol Cell Physiol 2000, 278: 372-80.
177. Assi K., Patterson S., Dedhar S. i wsp.: *Role of epithelial integrin-linked kinase in promoting intestinal inflammation: effects on CCL2, fibronectin and the T cell repertoire*. BMC Immunol 2011, 12: 42.
178. Sakai N., Wada T., Furuichi K. i wsp.: *MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes*. J Leukoc Biol 2006, 79: 555-63.
179. Luster A. D. *Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med 1998, 338: 436-445.
180. Vassalli J.D., Granelli-Piperno A., Reich E.: *Neutral proteinases of leucocytes and the inflammatory process*. Ciba Found Symp 1979, 75: 381-95.
181. Plow E.F.: *Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway*. J Clin Invest. 1982 Mar;69(3):564-72.
182. Plow E.F.: *The major fibrinolytic proteases of human leukocytes*. Biochim Biophys Acta 1980, 630: 47-56.
183. Bussolati B., Ahmed A., Pemberton H.: *Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration*. Blood 2004, 103: 761-6.
184. Chung B.H., Cho Y.L., Kim J.D., Jo H.S.: *Promotion of direct angiogenesis in vitro and in vivo by Puerariae flos extract via activation of MEK/ERK-, PI3K/Akt/eNOS-, and Src/FAK-dependent pathways*. Phytother Res 2010, 24: 934-40.
185. Border, W. A., Noble, N. A.: *Transforming growth factor β in tissue fibrosis*. N. Engl J Med, 1994, 331: 1286-1292.
186. Idell S., Zwieb C., Boggaram J. i wsp.: *Mechanisms of fibrin formation and lysis by human lung fibroblasts: influence of TGF-beta and TNF-alpha*. Am J Physiol 1992, 263: 487-94.
- 187.. Stepień-Wyrobiec O., Hrycek A., Wyrobiec G.: *Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie tocznia rumieniowatego układuowego*. Postepy Hig Med Dosw 2008, 62: 688-93.

188. Takemura R., Werb Z.: *Secretory products of macrophages and their physiological functions*. *Am J Physiol*. 1984, 246: 1-9.
189. Hellman C., Lundahl J., Hylander B., Halldén G.: *Phenotypic alterations of recruited eosinophils in peritoneal fluid eosinophilia*. *Perit Dial Int*. 2000, 20: 295-300.
190. Lindor L.J., Loegering D.A., Wassom D.L., Gleich G.J.: *Recovery of eosinophils from the peritoneal cavity of the guinea pig*. *J Immunol Methods* 1981, 41: 125-34.
191. Ejaz A.A., Fitzpatrick P.M., Durkin A.J.: *Pathophysiology of peritoneal fluid eosinophilia in peritoneal dialysis patients*. *Nephron* 1999, 81: 125-30.
192. Edelstam G., Fredens K., Venge P.: *Role of eosinophilic granulocytes in women with infertility and pelvic adhesions*. *Inflammation*. 1994, 18: 361-71.
193. Bręborowicz A., Rodela H., Oreopoulos D.G.: *Toxicity of osmotic solutes on human mesothelial cells in vitro*. *Kidney Int* 1992, 41: 1280-85.
194. Jurado R.L.: *Iron, infections, and anemia of inflammation*. *Clin Infect Dis* 1997, 25: 888-95.
195. Ambruso D.R., Johnston R.B. Jr.: *Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system*. *J Clin Invest* 1981, 67: 352-60.
196. Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P. i wsp. *Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase*. *Antioxid Redox Signal* 2010, 12: 185-98.
197. Konijn A.M., Hershko C.: *Ferritin synthesis in inflammation. I. Pathogenesis of impaired iron release*. *Br J Haematol* 1977, 37: 7-16.
198. Graça-Souza A.V., Arruda M.A., de Freitas M.S. i wsp.: *Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes*. *Blood* 2002, 99: 4160-65.
199. Birgegard G., Caro J.: *Increased ferritin synthesis and iron uptake in inflammatory mouse macrophages*. *Scand J Haematol* 1984, 33: 43-8.
200. Hansen K.A., Lowman L., Fiedler E.P. i wsp.: *Pelvic adhesion formation after intraperitoneal installation of gallstones in a rabbit model*. *Fertil Steril* 1999, 72: 868-72.
201. Ziprin P., Ridgway P.F., Peck D.H., Darzi A.W.: *Laparoscopic-type environment enhances mesothelial cell fibrinolytic activity in vitro via a down-regulation of plasminogen activator inhibitor-1 activity*. *Surgery* 2003, 134: 758-65.
202. Molinas C.R., Koninckx P.R.: *Hypoxaemia induced by CO(2) or helium pneumoperitoneum is a co-factor in adhesion formation in rabbits*. *Hum Reprod* 2000, 15: 1758-63.

203. Idell S., Kumar A., Zwieb C. i wsp.: *Effects of TGF-beta and TNF-alpha on procoagulant and fibrinolytic pathways of human tracheal epithelial cells*. Am J Physiol 1994, 267: 693-703.
204. Assimakopoulos S.F., Vagianos C.E., Patsoukis N. i wsp.: *Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats*. Acta Physiol Scand 2004, 180: 177-85.
205. Clements W.D., Erwin P., McCaigue M.D. i wsp.: *Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction*. Gut 1998, 42: 293-9.
206. Deitch E.A.: *The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure*. Arch Surg 1990, 125: 403-4.
207. Nieuwenhuijs V.B., van Dijk J.E., Gooszen H.G., Akkermans L.M.: *Obstructive jaundice, bacterial translocation and interdigestive small-bowel motility in rats*. Digestion 2000, 62: 255-61.
208. Ljubuncic P., Fuhrman B., Oiknine J. i wsp.: *Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages*. Gut 1996, 39: 475-8.
209. Ceryak S., Bouscarel B., Fromm H.: *Comparative binding of bile acids to serum lipoproteins and albumin*. J Lipid Res 1993, 34: 1661-74.
210. Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW, Buurman WA. *Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice*. Hepatology. 1992 Jun;15(6):1132-6.
211. Unno N., Wang H., Menconi M.J.: *Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats*. Gastroenterology 1997, 113: 1246-57.
212. Tsuji K., Kubota Y., Yamamoto S. i wsp.: *Increased neutrophil chemotaxis in obstructive jaundice: an in vitro experiment in rats*. J Gastroenterol Hepatol 1999, 14: 457-63.
213. Mori T., Cowley A.W. Jr.: *Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose*. Hypertension 2004, 43: 341-6.
214. Lim W., Jung J., Surh Y. i wsp.: *Hypertonic sodium chloride and mannitol induces COX-2 via different signaling pathways in mouse cortical collecting duct M-1 cells*. Life Sci 2007, 80: 2085-92.
215. Shapiro L., Dinarello C.A. *Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 12230-4.
216. Shao J.C., Yorioka N., Nishida Y., Yamakido M.: *Effect of pH and glucose on cultured human peritoneal mesothelial cells*. Scand J Urol Nephrol 1999, 33: 248-56.

