

**UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU**

KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I KOLOREKTALNEJ

Kierownik: Prof. UM dr hab. n. med. Piotr Krowicz

Lek. med. Karolina Horbacka

**„Ocena zależności pomiędzy wiekiem dawcy a czynnością komórek
mezotelium otrzewnowego w warunkach stresu operacyjnego”**

Rozprawa doktorska

Promotor: Dr hab. n. med. Jacek Karoń

POZNAŃ 2012

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi niniejszej pracy
Panu Dr hab. med. Jackowi Karoniowi za zaangażowanie i opiekę naukową.*

*Pragnę również podziękować Panu Prof. dr hab. med. Andrzejowi Bręborowiczowi,
kierownikowi Katedry i Zakładu Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Pani Dr n. med. Alicji Połubińskiej za poświęcony mi
czas, pomoc w realizacji części doświadczalnej pracy, cenne rady i wskazówki.*

Spis treści

Wykaz skrótów używanych w tekście.....	5
1. WSTĘP	6
1.1. Właściwości komórek mezotelium otrzewnowego	6
1.1.1. Układ fibrynolityczny jamy otrzewnej.....	8
1.1.2. Wpływ urazu operacyjnego na funkcję i regenerację komórek mezotelium otrzewnowego	12
1.2. Patogeneza zrostów otrzewnowych.....	13
1.2.1. Mechanizmy i substancje zapobiegające tworzeniu pooperacyjnych zrostów	17
1.3. Syntetyczne siatki kompozytowe stosowane w chirurgii przepuklin i ich funkcja przeciwzrostowa	20
2. CELE PRACY	24
3. MATERIAŁ I METODY.....	25
3.1. Charakterystyka pacjentów.....	25
3.2. Izolacja i hodowla komórek ludzkiego mezotelium otrzewnowego	27
3.3. Ocena wybranych parametrów czynnościowych komórek mezotelium eksponowanych na poszczególne roztwory.....	28
3.4. Pomiar stężenia białka komórkowego	29
3.5. Generacja wolnych rodników tlenowych	30
3.6. Interleukina 6 (IL-6)	30
3.8. Inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1).....	31
3.9. Oznaczanie β -galaktozydazy	31
3.10. Analiza statystyczna wyników.....	31

4. WYNIKI	32
4.1. Charakterystyka czynności komórek mezotelium otrzewnowego po ekspozycji na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów oraz choroby podstawowej	32
4.2. Charakterystyka czynności komórek mezotelium otrzewnowego po ekspozycji na standardowe medium hodowlane z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów i choroby podstawowej	42
4.3. Charakterystyka czynności komórek mezotelium otrzewnowego, poddanych godzinnej preinkubacji z 0,9% roztworem soli fizjologicznej i płynem dializacyjnym Dianeal 1,36% w zależności od wieku pacjentów i choroby podstawowej	53
5. DYSKUSJA	67
6. WNIOSKI	79
7. STRESZCZENIE	80
8. PIŚMIENNICTWO	82

Wykaz skrótów używanych w tekście

App (ang. *appendicitis acuta*) – ostre zapalenie wyrostka robaczkowego

CRP (ang. *C-reactive protein*) – białko C-reaktywne

CU (łac. *colitis ulcerosa*) – wrzodziejące zapalenie jelita grubego

ECM (ang. *extracellular matrix*) – macierz pozakomórkowa

FAP (ang. *familial adenomatous polyposis*) – rodzinna polipowatość gruczolakowa

FGF (ang. *fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów

HA – CMC (ang. *hyaluronate and carboxymethylcellulose*) – hialuronian i karboksymetyloceluloza

HPMC (ang. *human peritoneal mesothelial cells*) – ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego

IL – interleukina

IL-1 ra (ang. *IL-1 receptor antagonist*) – antagonist receptora IL-1

LCD (ang. *Leśniowski-Crohn's disease*) – choroba Leśniowskiego-Crohna

LM (łac. *lymphadenitis mesenterialis*) – zapalenie węzłów chłonnych krezki

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

MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej

ORC (ang. *oxidized regenerated cellulose*) – utleniona regenerowana celuloza

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

PAI (ang. *plasminogen activator inhibitor*) – inhibitor aktywatora plazminogenu

PDGF (ang. *platelet derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu

PMN (ang. *polymorphonuclear leukocytes*) – leukocyty wielojądrzaste

SBO (ang. *small bowel obstruction*) – niedrożność jelita cienkiego

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

TGFβ (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostowy β

TIMP (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) – tkankowy inhibitor metaloproteinazy

TNFα (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy guza α

t-PA (ang. *tissue-type plasminogen activator*) – tkankowy aktywator plazminogenu

TP-IPAA (ang. *total proctocolectomy with ileal pouch anal anastomosis*) – proktokolektomia z zespoleniem zbiornika jelitowego z odbytem

u-PA (ang. *urokinase-type plasminogen activator*) – aktywator plazminogenu typu urokinazy

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

β-Gal – β-galaktozydaza

1. WSTĘP

1.1. Właściwości komórek mezotelium otrzewnowego

Otrzewna jest największą błoną surowiczą ludzkiego ciała, wyścielającą od wewnątrz ściany jamy brzusznej i miednicy mniejszej oraz znajdujące się tam narządy. Jej wolną powierzchnię pokrywa płaski nabłonek jednowarstwowy, zbudowany z komórek wielobocznych, połączonych systemem desmosomów. Komórki nabłonka spoczywają na błonie podstawnej, która oddziela je od warstwy podsurowiczej, składającej się z licznych włókien kolagenowych i sprężystych, makrofagów, komórek plazmatycznych oraz leukocytów.

Mimo, że upłynęło 185 lat od pierwszego odkrycia i opisanie struktury mezotelium (1), dopiero ostatnie dwie dekady dostarczyły wiedzy niezbędnej do prawidłowego zrozumienia aktywnej roli, jaką odgrywają komórki międzybłonka w utrzymaniu homeostazy wewnątrzotrzewnowej. Przyczyniło się do tego opracowanie techniki hodowli HPMC (ang. *human peritoneal mesothelial cells*) w warunkach *in vitro* i umożliwienie rozwoju dalszych badań. Pierwotne wyobrażenia ograniczały ich funkcję do tworzenia biernej bariery protekcyjnej dla narządów wewnętrznych, zapewniającej ich prawidłową ruchomość i położenie. W rzeczywistości komórki mezotelialne poprzez zdolność do lokalnej syntezy rozmaitych substancji mediatorowych, czynników wzrostu i molekuł adhezyjnych tworzą mikrośrodowisko, w którym mają miejsce kluczowe procesy regulacyjne, zachodzące w odpowiedzi na uraz operacyjny czy zapalenie otrzewnej. Na szczególną uwagę zasługuje kilka nowo poznanych właściwości mezotelium, odkrytych przy wykorzystaniu modelu doświadczalnego do badań nad dializą otrzewnową.

Komórki międzybłonka wykazują zdolność do miejscowej produkcji glikozaminoglikanów, w tym kwasu hialuronowego, istotnego dla prawidłowego gojenia uszkodzonej błony otrzewnowej (2); (3). W wielu badaniach *in vitro* oraz *in vivo* udowodniono istotną rolę, jaką odgrywa związenie wewnątrzotrzewnowego hialuronianu z receptorem CD44, obecnym na powierzchni komórek nowotworowych raka jajnika i jelita grubego, w progresji choroby (4); (5). Wolny hialuronian, obecny w płynie otrzewnowym jest inhibitorem, który po związaniu z receptorem na powierzchni komórek guza, hamuje ich przyleganie do mezotelium

(6). Efekt ten jest podstawą kwestionowania przez niektórych badaczy zasadności śródoperacyjnego płukania jamy brzusznej i praktyki pozostawiania drenów po zabiegach resekcyjnych, co ma sprzyjać śródtrzewnowemu rozprzestrzenianiu nowotworu, na skutek usuwania obecnego w płynie wolnego hialuronianu (7). W badaniach *in vivo* wykazano, że wewnątrztrzewnowe stężenie hialuronianu zwiększa się zarówno w przebiegu ostrego zapalenia otrzewnej, jak również przewlekłego – wywołanego długotrwałym procesem dializy (8). Wzrost stężenia tego glikozaminoglikanu w dializatach pacjentów w miarę czasu trwania dializy otrzewnowej może odzwierciedlać intensywność regeneracji mezotelium, w warunkach ciągłego uszkodzenia otrzewnej (9). Pozytywne wyniki badań *in vitro*, w których obserwowano stymulacyjny i ochronny wpływ hialuronianu na poprawę funkcji otrzewnej jako błony dializacyjnej, spowodowały wzrost zainteresowania rolą, jaką może on odgrywać w reakcji zapalnej, w odpowiedzi na uraz operacyjny i możliwe jego wykorzystanie do produkcji środków barierowych, zapobiegających tworzeniu pooperacyjnych zrostów (10); (11).

W wielu doświadczeniach wykazano, że komórki mezotelialne są źródłem czynników wzrostu i składników macierzy pozakomórkowej, biorących udział w reakcji zapalnej i następczych procesach naprawczych otrzewnej, m. in.: kolagenu I, III, IV, elastyny, fibronektyny, lamininy, TGF β (ang. *transforming growth factor β*), PDGF (ang. *platelet derived growth factor*), FGF (ang. *fibroblast growth factor*), VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), a także metaloproteinaz MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) i ich tkankowych inhibitorów TIMP (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) (12), (13), (14). Równowaga pomiędzy produkcją składników macierzy pozakomórkowej, a ich degradacją, umożliwia prawidłową regenerację otrzewnej po jej uszkodzeniu.

W ciągu ostatnich lat wiele uwagi poświęcono TGF β , jako kluczowemu czynnikowi, którego nadekspresja prowadzi do włóknienia i powstawania zrostów. Udowodniono, że inkubacja ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego z TGF β , nasila ekspresję kolagenu III i fibronektyny (15). Główny mediator reakcji zapalnej- IL-1 β , a także dializaty od pacjentów z peritonitis oraz warunki hipoksji tkankowej, stymulują produkcję TGF β (16); (12). W badaniach Holmdahl i wsp. (17), stężenie aktywnej i całkowitej postaci TGF β w tkance zrostowej, pobranej od pacjentów z intensywnym procesem zrostotwórczym w jamie brzusznej, było ponad dwukrotnie wyższe w porównaniu z fragmentami otrzewnej ściennej,

pobranej z miejsc pozbawionych zrostów. Ciekawy wydaje się, sugerowany przez autorów wpływ TGF β , na zmniejszenie lokalnej fibrylizy w jamie otrzewnej. Wraz ze wzrostem stężenia TGF β , obserwowano zwiększenie produkcji PAI-1, który poprzez inhibicję plazminy – proteazy odpowiedzialnej za degradację wielu składników macierzy pozakomórkowej – może przyczyniać się do gromadzenia składników ECM (ang. *extracellular matrix*) i następczego włóknienia. W badaniach doświadczalnych na modelach zwierzęcych, obserwowano mniejsze nasilenie adhezjogenezy, po dootrzewnowym podaniu przeciwciał anty TGF β -1 (18). W niektórych badaniach *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli HPMC, wykazano pozytywną zależność pomiędzy zaawansowaniem wieku dawcy a wielkością syntezy TGF β (19). Nadekspresja wspomnianego czynnika wydaje się być kluczowa dla patogenezy wielu schorzeń kojarzonych z grupą starszych pacjentów, między innymi: miażdżycy, osteoporozy, chorób nowotworowych (20). Nie można jednak wyprowadzić w pełni jednoznacznego wniosku, gdyż wiek nie jest bezwzględnym czynnikiem ryzyka powstania zrostów otrzewnowych. W moich doświadczeniach przyjrzałam się możliwym zależnościom, pomiędzy wiekiem pacjenta a poszczególnymi funkcjami komórek międzybłonka otrzewnej.

1.1.1. Układ fibrynolityczny jamy otrzewnej

Wartą wspomnienia właściwością komórek mezotelialnych jest ich zdolność do lokalnej syntezy czynników regulujących kaskadę krzepnięcia: tkankowego i urokinazowego aktywatora plazminogenu (t-PA, ang. *tissue-type plasminogen activator*; u-PA, ang. *urokinase-type plasminogen activator*) oraz ich inhibitorów (PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor 1*; PAI-2, ang. *plasminogen activator inhibitor 2*), (21). Aktywność t-PA jest większa niż u-PA i odpowiada za 95% tzw. aktywności aktywatora plazminogenu PAA (ang. *plasminogen activator activity*). Ponadto ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego są źródłem czynnika tkankowego - TF (ang. *tissue factor*) będącego głównym aktywatorem zewnątrzpochoźnego toru krzepnięcia. W następstwie uszkodzenia otrzewnej, pod wpływem amin biogennych, cytokin zapalnych, a w szczególności IL-1 β , dochodzi dodatkowo do ekspresji TF na błonach komórkowych, na których nie występuje on

w warunkach fizjologicznych (22). Kolejnym następstwem kaskady krzepnięcia jest aktywacja czynnika X, a następnie trombiny, która bierze udział w przekształceniu fibrynogenu, obecnego w płynie otrzewnowym, do fibryny. Równowaga pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy, przy niezaburzonym funkcjonowaniu komórek mezotelium, jest podstawowym warunkiem prawidłowego gojenia otrzewnej, bez nadmiernego gromadzenia złogów włókniaka i tworzenia zrostów.

W wielu badaniach udowodniono, że w trakcie zapalenia otrzewnej i podczas zabiegów chirurgicznych dochodzi do obniżenia wydajności wewnątrzotrzewnowej fibrynolizy (23); (24). Już po 30 minutach od początku operacji, zauważalny jest istotny spadek zdolności fibrynolitycznej, mierzonej aktywnością aktywatora plazminogenu (PAA), zarówno u pacjentów operowanych ze wskazań planowych jak i w trybie pilnym z powodu zapalenia otrzewnej (25). Zmniejszenie aktywności t-PA ma charakter miejscowej odpowiedzi otrzewnej na uraz, a więc monitorowanie zmian stężeń t-PA w surowicy dostarcza niepełnej, pośredniej informacji i należy je interpretować z ostrożnością.

Dodatkowo mechaniczne, śródoperacyjne uszkodzenia otrzewnej, koagulacja termiczna, niedokrwienie w miejscach rozciągnięcia tkanek przez retraktory, powoduje pogłębienie zaburzeń fibrynolizy. W badaniach Holmdahl i wsp. (26), obserwowali znaczne obniżenie aktywności t-PA w bioptatach otrzewnej, pobranych z miejsc uszkodzonych przez retraktory, w porównaniu z otrzewną, gdzie nie stosowano stałego ucisku i niedokrwienia tkanek. Powyższe spostrzeżenia autorów pozwalają na częściowe wyjaśnienie częstego występowania zrostów w linii chirurgicznego cięcia.

Śródoperacyjne obniżenie wewnątrzotrzewnowej zdolności fibrynolitycznej zostało udowodnione zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych, jak i u ludzi. Niestety większość obserwacji odnosi się tylko do okresu trwania zabiegu chirurgicznego, a zatem trudno wnioskować na temat aktywności fibrynolizy w okresie pooperacyjnym. Byłoby to jednak zasadne, biorąc pod uwagę fakt, że kluczowy dla tworzenia pooperacyjnych zrostów i gojenia uszkodzeń otrzewnej jest okres pierwszych 72 godzin po operacji. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach zaburzenia procesów fibrynolizy obserwowano w trakcie zabiegu i przez następne 48 do 72 godzin (27); (28). Podobnie w grupie 12 pacjentów poddanych planowej laparotomii, PAA mierzona w płynie otrzewnowym uległa

obniżeniu w pierwszych 6 godzinach po operacji, a w ciągu kolejnych 24 i 48 godzin odnotowano jej spadek do wartości nieoznaczalnych (29). Czas ten jest newralgiczny dla tworzenia zrostów, zatem wszelkie działania zapobiegawcze, w tym również modulowanie reakcji fibrynolitycznej powinny być podjęte w pierwszych godzinach po operacji.

Pozostaje jednak wciąż problematyczne z punktu widzenia praktyki klinicznej pytanie o powody, dla których u części pacjentów obserwujemy większą tendencję do tworzenia zrostów. Odpowiedź nie jest jednoznaczna, aczkolwiek jedną z hipotez może być obniżenie w tej grupie chorych otrzewnowej aktywacji plazminogenu, w następstwie zmniejszonej syntezy t-PA lub związanie jego aktywnej postaci w kompleksy z inhibitorem (PAI-1). W następstwie urazu otrzewnej dochodzi do uszkodzenia warstwy komórek mezotelium i ekspozycji warstwy podnabłonkowej, gdzie znajduje się główne źródło PAI-1, szczególnie w otrzewnej zmienionej zapalnie (30). Wartości wewnątrzotrzewnowego PAI-1 mogą być nawet dziesięciokrotnie większe w grupie pacjentów z zaawansowanym procesem zrostowym w porównaniu z chorymi, u których jego nasilenie jest mniejsze (31). Według Ivarsson i wsp. (31) PAI-1 może być wykorzystany jako marker rozległości i stopnia nasilenia zrostów otrzewnowych, a w konsekwencji jego oznaczenie może być przydatne w wyodrębnieniu pacjentów z grup ryzyka, u których wskazana byłaby adjuwantowa terapia przeciwzrostowa.

Teoretycznie, w świetle powyższych prac, miejscowa inhibicja PAI-1 mogłaby okazać się rozwiązaniem. W doświadczeniach na modelach mysich uzyskano pozytywne rezultaty, mierzone redukcją pooperacyjnych zrostów, po dootrzewnowym zastosowaniu przeciwciał przeciwko PAI-1 (32). Dyskusyjne pozostają pytania o długość pooperacyjnej terapii z udziałem t-PA lub inhibitora PAI-1, oraz właściwą objętość terapeutyczną (33), (49) w odniesieniu do bezpieczeństwa pacjentów, z uwagi na możliwe powikłania krwotoczne.

Mimo wielu badań, poruszających to zagadnienie, próby modyfikacji miejscowej kaskady krzepnięcia dotyczą głównie modelu doświadczalnego, z uwagi na trudności w stworzeniu obiektywnej i bezpiecznej metody pooperacyjnego monitorowania parametrów wewnątrzotrzewnowej fibrynolizy u człowieka.

Wraz z rozwojem nowoczesnych, minimalnie inwazyjnych technik chirurgicznych pojawiło się pytanie, dotyczące wpływu zabiegów laparoskopowych

na właściwości fibrynolityczne otrzewnej. Wydaje się, że zabiegi endoskopowe w porównaniu z metodami konwencjonalnymi charakteryzują się mniejszym urazem operacyjnym, głównie z uwagi na brak uszkodzenia otrzewnej ściennej przez rozległe cięcia chirurgiczne. Jednak pomijając fakt częstszego podczas laparoskopii użycia koagulacji termicznej, która przyczynia się w znacznym stopniu do uszkodzenia międzybłonna, dwutlenek węgla wykorzystywany do wytworzenia odmy otrzewnowej dodatkowo wpływa na zmniejszenie mikrokrążenia w naczyniach trzewnych, powodując kwasicę tkankową i niedokrwienie (34). Jedną z pierwszych prac na ten temat opublikował Nagelschmidt w 2001 roku (35), dowodząc obniżenia aktywności t-PA w próbkach otrzewnej trzewnej, pobranych pod koniec trwania 3-godzinnej zabiegu laparoskopowego na modelu zwierzęcym.

Odmienne wyniki uzyskał Brokelman i wsp. (36), którzy nie obserwowali zmian w efektywności fibrynolizy w trakcie trwania zabiegu chirurgicznego w grupie 50 pacjentów, u których wykonywano elektywną cholecystektomię metodą laparoskopową. Należy wziąć pod uwagę, że powyższe wyniki mogą być w tym przypadku częściowo wyjaśnione krótszym czasem operacji laparoskopowego usunięcia pęcherzyka żółciowego i konsekwentnie krótszą ekspozycją na zwiększone ciśnienie wewnątrzbrzuszne.

Z kolei prospektywne randomizowane badania, przeprowadzone w grupach pacjentów operowanych metodą laparoskopową lub konwencjonalną z powodu raka jelita grubego, nie potwierdziły wewnątrzotrzewnowych różnic w aktywności i stężeniach t-PA, PAI-1 oraz kompleksów t-PA/PAI-1, jednak w obu grupach obserwowano podobne zmniejszenie aktywności fibrynolitycznej (37).

W moich doświadczeniach poddałam analizie wpływ wewnątrzotrzewnowego odczynu zapalnego, a także choroby nowotworowej na funkcję fibrynolityczną komórek międzybłonna otrzewnej, z wykorzystaniem modelu hodowli HPMC. Interesująca wydała mi się również ocena zależności pomiędzy wiekiem pacjentów a wielkością syntezy t-PA i PAI-1, z uwagi na niewielką liczbę podobnych doniesień w piśmiennictwie.

1.1.2. Wpływ urazu operacyjnego na funkcję i regenerację komórek mezotelium otrzewnowego

Uraz otrzewnej, niezależnie od jego charakteru: operacyjny, zapalny lub niedokrwieny, powoduje oderwanie komórek międzybłonka od błony podstawnej, pozostawiając obnażoną powierzchnię. W kolejnym etapie komórki mezotelium poprzez produkcję czynników chemotaktycznych (IL-8, MCP-1; ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) i cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF α ; ang. *tumor necrosis factor α*), uruchamiają kaskadę reakcji, polegającą na zwiększeniu przepuszczalności naczyń, migracji granulocytów wielojądrowych i monocytów do uszkodzonych miejsc objętych zapaleniem (38).

Jako pierwsze, już po 30 minutach od urazu, pojawiają się leukocyty wielojądrowe - PMN (ang. *polymorphonuclear leukocytes*); po 12 godzinach PMN widoczne są w delikatnej sieci włókien fibrynowych, a po 48 godzinach większość uszkodzonej powierzchni jest pokryta warstwą makrofagów, ułożonych wewnątrz rusztowania z włókien fibrynowych (38); (39). Komórki przypominające pierwotne komórki mezenchymalne z systemem połączeń, tworzące jednolitą warstwę pokrywającą uszkodzenie, są widoczne po pięciu dniach. W tym czasie na powierzchni otrzewnej ściennej jednolita warstwa komórek wyposażona jest już w sieć mikrokosmków. Błona podstawna, początkowo krucha i wrażliwa na uszkodzenia, pojawia się najwcześniej w obrębie otrzewnej trzewnej wątroby – około piątego dnia. Siedem dni po urazie powierzchnię otrzewnej ściennej i trzewnej pokrywa jednolita warstwa komórek mezotelialnych, a ósmego dnia obecna jest we wszystkich miejscach ciągła błona podstawna.

Już badania Hertzlera z 1919 r udowodniły, że ubytki otrzewnej niezależnie od ich wielkości goją się w jednakowym czasie, dlatego regeneracja nie może być tylko wynikiem migracji komórek z brzegów uszkodzenia, jak ma to miejsce w przypadku mechanizmów zaangażowanych w procesy gojenia skóry. Źródło pierwotnych komórek mezotelialnych mogą stanowić różnicujące się fibroblasty, obecne w warstwie podnabłonkowej, oraz komórki prekursorowe z przyległych obszarów otrzewnej (39).

Proces regeneracji powinien zostać ukończony w ciągu siedmiu dni, jednak niektóre elementy techniki operacyjnej, mogą mieć wpływ na znaczne opóźnienie

gojenia. Uszkodzenie otrzewnej poprzez elektrokauterizację, prowadzi do martwicy i krwawień w warstwie podnabłonkowej, wydłużenia czasu trwania reakcji zapalnej, migracji komórek olbrzymich niezbędnych do fagocytozy powstałych ziarniaków, a w związku z tym przedłużania wewnątrzotrzewnowej regeneracji (40), (41). W takich sytuacjach, nawet po trzech tygodniach od urazu gojenie nie jest zakończone; blizna zawiera tkanki martwicze, ziarniniaki, PMN, z niewielkim udziałem włókien kolagenowych. Znacznie mniejszym urazem dla otrzewnej jest preparowanie tkanek przy użyciu nożyczek lub skalpela, w porównaniu z nożem elektrycznym (39).

Stopień uszkodzenia otrzewnej w trakcie zabiegu chirurgicznego determinuje rozległość i intensywność odpowiedzi zapalnej, która ma podstawowe znaczenie w mechanizmie powstawania pooperacyjnych zrostów.

1.2. Patogeneza zrostów otrzewnowych

Pierwszy opis obecności zrostów otrzewnowych pochodzi z 1836 roku i dotyczy obserwacji u pacjenta z gruźlicą w jamie brzusznej (42). Powyższy obraz interpretowano wówczas jako przekształcone w tkankę zrostową skoagulowane naczynie chłonne. Rozwój badań doświadczalnych i klinicznych pozwolił na odkrycie niektórych zależności istotnych w patogenezie zrostów.

Tworzenie włóknika jest podstawowym mechanizmem obronnym w trakcie zapalenia otrzewnej, który poprzez sklejanie sąsiednich narządów prowadzi do ograniczania i izolacji ogniska zakażenia. W późniejszych etapach zapalenia, w przypadku zaburzeń procesu fibrynolizy, długotrwałe „uwięzienie” bakterii w sieci włóknika, uniemożliwia działanie mechanizmów immunologicznych ustroju i prawidłową penetrację antybiotyków, w konsekwencji prowadząc do rozwoju ropni wewnątrzbrzusznych.

Zrosty otrzewnowe, o etiologii pozapalnej lub pooperacyjnej, powstają pomiędzy powierzchniami, na których doszło do uszkodzenia warstwy mezotelium. Elementem inicjującym jest aktywacja fibrynogenu w warunkach niedokrwienia i zaburzeń fibrynolizy, jakie towarzyszą zabiegom chirurgicznym, czy zapaleniu otrzewnej. Do powstałej sieci włókien fibrynowych napływają makrofagi, fibroblasty, komórki olbrzymie, eryocyty z uszkodzonych naczyń krwionośnych (43). Badania na szczurach dostarczyły informacji na temat ewolucji

morfologicznej tkanki zrostowej. W pierwszych trzech dniach w macierzy fibrynowej dominują PMN, makrofagi, elementy morfotyczne krwi; po siedmiu dniach kolagen i fibroblasty stanowiące główny składnik zrostów. W końcowym etapie zrosty ulegają przekształceniu w niepodlegające degradacji pasma włókniste, z obecnością włókien elastyny, naczyń krwionośnych, włókien nerwowych a nawet ognisk kalcyfikacji (43). Tak uformowane, dojrzałe, trudne do oddzielenia zrosty często uniemożliwiają jakąkolwiek interwencję chirurgiczną.

Na każdym etapie złożonego procesu powstawania zrostów istotną rolę odgrywa współdziałanie trzech mechanizmów: układu krzepnięcia, fibrynolizy oraz reakcji zapalnej uruchamianej w odpowiedzi na uraz otrzewnej. Ogólnoustrojowa aktywacja kaskady zapalnej sprzyja procesom koagulacji i zwiększonemu odkładaniu włóknika, jednak niekontrolowany i przedłużający się rozwój tego zjawiska prowadzi do patologicznych następstw, których przykładem jest obserwowany u pacjentów z ciężką sepsą zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Główne mediatory zapalenia – IL-1 oraz TNF- α hamują aktywność t-PA i zwiększają ekspresję PAI-1 a także czynnika tkankowego, nasilając tworzenie złożeń fibryny (44), (45). Właściwości prokoagulacyjne wykazuje również IL-6 (46), (47). W obserwacjach Stouthard'a i wsp. (48) dożylna infuzja IL-6 u pacjentów z przerzutowym rakiem nerki, powodowała aktywację układu krzepnięcia wyrażoną podwyższeniem kompleksów trombina-antytrombina III oraz fragmentów F1+2 protrombiny. Próba potwierdzenia klinicznej zależności pomiędzy reakcją zapalną oraz hamowaniem fibrynolizy a stopniem nasilenia zrostów otrzewnowych są badania Hellebrekers'a i wsp. (49), którzy obserwowali pozytywną korelację pomiędzy przedoperacyjnym stężeniem CRP (ang. *C-reactive protein*) oraz PAI-1 w surowicy a rozległością zrostów, ocenianych podczas laparoskopii.

Pooperacyjne zrosty otrzewnowe w następstwie zabiegów chirurgicznych występują u 67-93% chorych (50), (51), a w przypadku procedur ginekologicznych nawet u 97% pacjentek (52). W 1994 roku w Stanach Zjednoczonych hospitalizowano 303,836 pacjentów z powodu konieczności przeprowadzenia operacyjnej adhezjolizy, a związany z tym koszt opieki szpitalnej wyniósł 1,3 biliona dolarów (53). W krajach Europy zachodniej zrosty odpowiadają za 60-70% przyczyn niedrożności jelita cienkiego, a także w 15-40% są powodem niepłodności i czynnikiem ryzyka przewlekłych zespołów bólowych miednicy

małej u kobiet (54), (55). Ponadto zrosty otrzewnowe wydłużają czas operacji, zwiększają ryzyko jatrogennego uszkodzenia jelit podczas kolejnych zabiegów operacyjnych, utrudniając a często uniemożliwiając zastosowanie metody laparoskopowej. Według badania Ellis'a i wsp. (56) z grupy 41,841 pacjentów operowanych z powodu schorzeń chirurgicznych i ginekologicznych w 1986 roku (u 29,790 wykonano laparotomię, a 12,061 – operację metodą laparoskopową), w ciągu 10 lat odnotowano 21,347 powtórnych hospitalizacji, z czego 5,7% z powodu bezpośrednich powikłań zrostowych, wymagających leczenia chirurgicznego w 3,8% przypadków.

Najważniejszym czynnikiem ryzyka niedrożności jelita cienkiego SBO (ang. *small bowel obstruction*), jest rodzaj operacji i rozległość uszkodzenia otrzewnej. Chirurgii jelita grubego towarzyszy większa ilość powikłań zrostowych w porównaniu z zabiegami w zakresie jelita cienkiego, wyrostka robaczkowego czy pęcherzyka żółciowego (57). Za procedurę związaną z największym ryzykiem wystąpienia niedrożności jelita cienkiego, w zależności od piśmiennictwa ocenianym w granicach 13-35% uważana jest kolektomia z wytworzeniem zbiornika jelitowego (58), (59), (60), (61). Dla porównania ryzyko SBO w następstwie przeprowadzonej appendektomii wynosi 1-10%, a cholecystektomii metodą otwartą – 6,4% (61), (62). W odniesieniu do procedur ginekologicznych według różnych doniesień stopień ryzyka jest mniejszy i w przypadku histerektomii wynosi 2-3%, radykalnej histerektomii - 5% a uzupełnionej o radioterapię - wzrasta do 20% (63).

W retrospektywnych badaniach Leung'a i wsp. (64) wśród analizowanych 1777 pacjentów, u których w latach 1999-2002 wykonano appendektomię, 50 osób wymagało hospitalizacji z powodu objawów niedrożności przewodu pokarmowego, a w 20 przypadkach konieczne było leczenie operacyjne, polegające na uwolnieniu zrostów. Czynnikiem ryzyka SBO były: perforacja wyrostka robaczkowego, brak makroskopowych zmian zapalnych wyrostka robaczkowego, zastosowanie cięcia w linii środkowej, a także śródoperacyjnie stwierdzone przewlekłe zapalenie i zwłóknienie wyrostka robaczkowego lub rak w jego obrębie. Nasiloną reakcją zapalną w przebiegu perforacji może tłumaczyć intensywne generowanie zrostów. Z kolei brak makroskopowych zmian zapalnych w obrębie wyrostka robaczkowego, u pacjenta zakwalifikowanego do leczenia chirurgicznego z powodu dolegliwości bólowych w prawym dole biodrowym, zmusza do

śródooperacyjnej oceny całej jamy brzusznej i miednicy małej celem wykluczenia innych schorzeń. Według autorów bardziej rozległe uszkodzenie tkanek wynikające z konieczności poszerzonej eksploracji jamy brzusznej, może odpowiadać za większe ryzyko powstania zrostów i ich powikłań w postaci SBO w tej grupie pacjentów. W cytowanej pracy ryzyko wystąpienia SBO nie różniło się istotnie wśród chorych operowanych metodą otwartą lub laparoskopową.

W grupie pacjentów poddanych proktokolektomii odtwórczej z wytworzeniem zbiornika jelitowego TP-IPAA (ang. *total proctocolectomy with ileal pouch anal anastomosis*), ryzyko niedrożności jelita cienkiego jest wyższe, zwykle przekraczające 20% (61). Powyższa procedura stanowi leczenie operacyjne z wyboru w odniesieniu do pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, polipowatością rodzinną i wybranymi przypadkami synchronicznych nowotworów jelita grubego. Dodatkowo w uzasadnionych okolicznościach zachodzi konieczność wyłonienia czasowej ileostomii pętlowej, z uwagi na ryzyko nieszczelności zespolenia wytworzonego pomiędzy zbiornikiem jelitowym a pozostawionym mankietem odbytnicy. Według opinii części autorów najczęstszą przyczynę niedrożności jelita cienkiego w tej grupie chorych stanowią zrosty w okolicy wytworzonej ileostomii, a samo jej wyłonienie należy uznać za niezależny czynnik ryzyka SBO (61). Niestety możliwość rozwoju niebezpiecznych powikłań zrostowych jest w tych przypadkach akceptowaną koniecznością.

Z uwagi na obniżenie jakości życia pacjentów, a także wysokie koszty, wynikające z ponownych hospitalizacji i reoperacji, w ciągu ostatnich 30 lat intensywnie poszukuje się środków zapobiegawczych, hamujących kaskadę reakcji prowadzących do powstania zrostów otrzewnowych. Jednak mimo wielu projektów badawczych wciąż istnieją kontrowersje, dotyczące wskazań i skuteczności dostępnych na rynku substancji o potencjalnym działaniu przeciwzrostowym. Większość badań ocenia wpływ wspomnianych środków stosowanych w grupie pacjentek poddanych operacjom ginekologicznym. Brak natomiast rekomendacji w odniesieniu do chorych operowanych ze wskazań chirurgicznych. Powodem ograniczeń w projektowaniu badań klinicznych, analizujących wpływ wybranych środków jest konieczność przeprowadzenia ponownego zabiegu operacyjnego z oceną nasilenia zrostów. Modelową grupę badaną stanowią pacjentki leczone z powodu niepłodności, poddane zabiegom laparoskopowym a także wybrana grupa chorych, u których przeprowadzono resekcję jelita z wyłonieniem stomii i

następczą operację odtwarzającą ciągłość przewodu pokarmowego. Żadna z wprowadzonych w ostatnim czasie substancji przeciwzrostowych nie wykazuje potwierdzonej pełnej skuteczności, która pozwala na całkowitą kontrolę złożonych patomechanizmów adhezjogenezy i stwarza szansę na wyeliminowanie problemu zrostów otrzewnowych i związanych z tym powikłań.

1.2.1. Mechanizmy i substancje zapobiegające tworzeniu pooperacyjnych zrostów

Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu patomechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie zrostów, ze szczególnym uwzględnieniem podstawowej roli otrzewnowego układu fibrynolizy, wciąż aktualne wydaje się być pięć podstawowych strategii prewencyjnych, ogłoszonych 70 lat temu przez Boys'a (65): ograniczanie urazu otrzewnej, hamowanie kaskady krzepnięcia w płynie przesiękowym, usuwanie depozytów włóknika, zapobieganie przyleganiu struktur poprzez ich rozdzielenie oraz przeciwdziałanie organizacji włóknika poprzez hamowanie proliferacji fibroblastów.

Zmniejszanie uszkodzenia otrzewnej można osiągnąć stosując zasady właściwej, minimalnie inwazyjnej techniki chirurgicznej, bez nadmiernej retrakcji tkanek, czy ich intensywnej koagulacji. Wielu chirurgów uważa, że metody laparoskopowe wiążą się z mniejszą liczbą powikłań zrostowych, z uwagi na mniejszy stopień uszkodzenia tkanek oraz minimalną w porównaniu z operacjami otwartymi ekspozycją otrzewnej na wysychanie. W randomizowanym badaniu, porównującym grupę pacjentek poddanych operacji metodą laparoskopową lub klasyczną z powodu ekotopowej ciąży jajowodowej, u których następnie wykonano zabieg laparoskopowy z oceną nasilenia adhezjogenezy, obserwowano więcej zrostów w grupie poddanej operacji konwencjonalnej (66). Podobne wnioski opublikowano w kilku innych pracach (67); (68). Według ostatnich doniesień grupy badaczy z Cleveland Clinic Foundation, w grupie 40 chorych, u których wykonano proktokolektomię odtwórczą z wytworzeniem zbiornika jelitowego metodą laparoskopową lub klasyczną, większą intensywność procesu zrostowego wykazano w grupie operowanej sposobem otwartym (69). Brak jest jednak

poprawnie zaprojektowanych badań prospektywnych na dużej grupie chorych, porównujących metody laparoskopowe z konwencjonalnymi, w których powstawanie zrostów byłoby ocenianym punktem końcowym.

Do działań prewencyjnych, istotnych z punktu widzenia chirurga, należy zaliczyć usuwanie nagromadzonych tkanek martwiczych, krwi, depozytów fibryny, które można uzyskać poprzez śródoperacyjne płukanie jamy otrzewnej. Problematiczny okazuje się wybór odpowiedniego roztworu, który spełni funkcję irygacyjną, nie przyczyniając się do eskalacji odczynu zapalnego i uszkodzenia mezotelium. Powszechnie stosowany w tym celu w codziennej praktyce jest 0,9% roztwór soli fizjologicznej. Z uwagi na doniesienia doświadczalne, negatywnie oceniające wpływ NaCl na funkcję komórek międzybłonka i jej potencjalne działanie prozrostowe (70), (146), w mojej pracy postanowiłam przyjrzeć się niektórym zmianom, jakie zachodzą w hodowlach HPMC pod wpływem 0,9% roztworu NaCl.

Kolejnym elementem strategii przeciwarzrostowej, zgodnie z teorią Boys'a, jest dootrzewnowe stosowanie substancji o potencjalnym działaniu prewencyjnym, jako roztworów lub mechanicznych barier w postaci folii lub żelu, mających spełniać funkcję separującą obnażone powierzchnie otrzewnej.

Wykorzystanie w tym celu organicznych i naturalnie występujących w przyrodzie polimerów było przedmiotem analiz od początków XX wieku. W 1902 roku Vogel zaproponował połączenie gumy arabskiej jako środka nawilżającego razem z inhibitorem cholinesterazy, mającym działać prokinetycznie na perystaltykę jelit (71). Prowadzono badania z użyciem płynnej wazeliny (72), lanoliny oraz współcześnie mogących wywołać zdumienie błon barierowych wytworzonych z otrzewnej rekina, rybiego pęcherza czy błony owodniowej (73). Za prototyp współczesnych elementów barierowych można uznać błonę wykonaną z otrzewnej wołowej, wynalezioną przez dr Charlesa Cargila i nazwaną od jego nazwiska (ang. *Cargile Membrane*), którą firma Johnson & Johnson wprowadziła na rynek w 1905 roku (74). Od lat 40 XX wieku wiele badań koncentrowało się na rozwiązaniu problemu nadmiernego gromadzenia bogatowłóknikowego płynu przesiękowego w jamie otrzewnej, odpowiedzialnego za powstanie zrostów. Prowadzono doświadczenia z dootrzewnowym użyciem hirudyny, heparyny, trypsyny i pepsyny (73), (75), jednak efekt końcowy nie okazał się korzystny z powodu powikłań krwotocznych, szybkiej neutralizacji ocenianych substancji, a

także przypadków indukowania zapalenia otrzewnej w odniesieniu do trypsyny. Badano także możliwe wykorzystanie płynu owodniowego, sugerując jego potencjalne działanie fibrynolityczne z uwagi na obserwowane mniejsze nasilenie zrostów w grupie pacjentek poddanych cięciu cesarskiemu w porównaniu z chorymi, u których wykonano laparotomię z innych wskazań (76). Zaowocowało to wprowadzeniem na rynek w 1931 roku preparatu Amfetin[®] (Eli Lilly and Co.), lecz mimo pozytywnych wyników doświadczeń na modelach zwierzęcych jego skuteczność nie została potwierdzona u ludzi.

Idealny środek barierowy powinien być skuteczny, bezpieczny dla pacjenta, nieimmunogeny, ulegać całkowitej biodegradacji, nie powodować reakcji zapalnej i działać w trakcie krytycznej fazy remezotelializacji. W modelach zwierzęcych, Harris i wsp. (77) wykazali, że minimalny czas, w którym uszkodzone powierzchnie otrzewnej powinny być odseparowane za pomocą środka barierowego, wynosi 36 godzin. Autorzy implantowali fragmenty bariery silikonowej pomiędzy uszkodzone powierzchnie otrzewnej ściennej a trzewnej kątnicy, którą następnie usuwali w poszczególnych przedziałach czasowych. W grupie szczurów, u których środek barierowy utrzymywano przez 36 godzin, nie obserwowano zrostów pomiędzy kątnicą a przednią ścianą jamy brzusznej. Wśród szczurów, którym barierę usunięto po 6 godzinach, u wszystkich doszło do powstania zrostów.

W badaniach eksperymentalnych oceniano wiele środków, wykazując ich różną skuteczność prewencyjną, z których część wycofano z użycia z uwagi na nieakceptowalnie wysokie ryzyko powikłań (*Interget[®]; Lifecore Biomedical Inc., Chaska MN*), (10). Warto wspomnieć o dwóch błonach barierowych aktywnych biologicznie z najlepiej udokumentowanym zastosowaniem klinicznym, będących przedmiotem randomizowanych badań naukowych: SEPRAFILM[®] (Genzyme Corp, Cambridge, MA, USA) oraz INTERCEED[®] (Gynecare, Ethicon, Somerville, NJ, USA).

SEPRAFILM[®] składa się z dwóch polisacharydów: hialuronianu sodu i karboksymetylocelulozy (ang. *HA-CMC; sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose*). Po dootrzewnowej aplikacji przybiera postać żelu, który ulega bioresorpcji po 7 dniach. Skuteczność HA-CMC w zapobieganiu powstawaniu pooperacyjnych zrostów de novo, jak i po uprzednio wykonanej adhezjolinie wykazano w kilku prospektywnych, wielośrodkowych badaniach z

randomizacją, głównie w odniesieniu do procedur ginekologicznych (78); (79); (80); (81); (82), oraz operacji kolorektalnych (11); (83). Nie powinno się jednak stosować SEPRAFILM[®] bezpośrednio na okolicę wytworzonych zespołów jelitowych, z uwagi na obserwowany związek pomiędzy jego użyciem a zwiększonym ryzykiem nieszczelności zespołów (84).

INTERCEED[®] posiada formę błony barierowej, zbudowanej z utlenionej regenerowanej celulozy (ang. *ORC – oxidized regenerated cellulose*), która ulega biodegradacji po 14-28 dniach, aczkolwiek w części doniesień obserwowano jej całkowite wchłonięcie już po 4 dniach (85). Mimo początkowo negatywnych wyników części badań na modelach zwierzęcych (86), efektywność ORC w zapobieganiu pooperacyjnemu zrostom wykazano w 13 prospektywnych, randomizowanych programach badawczych (87); (88). Istotną wadą, z punktu widzenia codziennej praktyki chirurgicznej, jest konieczność wykonania dokładnej hemostazy, z powodu utraty antyadhezyjnych właściwości produktu w obecności krwi.

1.3. Syntetyczne siatki kompozytowe stosowane w chirurgii przepuklin i ich funkcja przeciwarzrostowa

Leczenie chirurgiczne pooperacyjnych przepuklin brzusznych stanowi wyzwanie dla współczesnej chirurgii, z uwagi na wysoki wskaźnik nawrotów, który w przypadku zaopatrzenia metodami klasycznymi, polegającymi na zeszytciu wrót, wynosi w granicach 31-54% (89). Zastosowanie materiałów syntetycznych pozwoliło na zmniejszenie powyższego wskaźnika do mniej niż 10%, w zależności od cytowanego piśmiennictwa (90). Początkowo wykorzystywano najbardziej rozpowszechnione siatki polipropylenowe, które mają zastosowanie w przypadku implantacji napowięziowych (ang. „*onlay*” *technique*) lub przedotrzewnowych (ang. „*underlay*” *technique*), kiedy siatkę umieszcza się pod mięśniami prostymi, ponad zeszytą otrzewną. Liczne doniesienia, dotyczące możliwych powikłań po wewnątrzotrzewnowej implantacji siatki polipropylenowej, z możliwością powstania przetok jelitowych (91), wykluczają zastosowanie tego materiału w technikach laparoskopowych z dostępu wewnątrzotrzewnowego, oraz w grupie pacjentów z dużymi ubytkami elementów powięziowo-mięśniowych powłok

brzusznych, gdzie zbliżenie otrzewnej lub powięzi nie jest możliwe. Zastosowanie w tych przypadkach znalazły produkty kompozytowe, których podstawową strukturę stanowi niewchłanialny materiał syntetyczny (polipropylen, poliester), odseparowany od wnętrza jamy brzusznej powłoczeniem ze środkiem antyadhezyjnym (kolagen, Gore-Tex, silikon, kwasy Ω -3, statyny, ORC).

Przykładem siatki kompozytowej stosowanej w chirurgicznym leczeniu przepuklin brzusznych jest PROCEED[®] (Ethicon, Inc, USA), zbudowana z makroporowego polipropylenu, wchłaniальной warstwy utlenionej, regenerowanej celulozy oraz polidwuoksanonu, służącemu spajaniu obydwu elementów. W badaniach na modelach zwierzęcych skuteczność wspomnianej siatki w zapobieganiu pooperacyjnemu zrostom jest różna, w zależności od rodzaju materiału służącego porównaniu (92); (93). Obiektywna ocena antyadhezyjnego wpływu siatki, implantowanej pacjentom jest kłopotliwa, z uwagi na konieczność ponownej wizualizacji wnętrza jamy brzusznej, stąd większość badań z użyciem powyższego kompozytu opiera się raczej na ocenie współczynnika nawrotów, powikłań pooperacyjnych, ryzyka infekcji, czy przewlekłych zespołów bólowych (94); (95); (96); (97). Biorąc pod uwagę wspomniane kryteria, wyniki obserwacji wydają się być korzystne dla implantu, jednak wiele z tych badań pozbawionych jest randomizacji. Istnieje niewielka liczba danych literaturowych, próbujących wyjaśnić możliwe działanie przeciwzrostowe wchłaniальной warstwy ORC, poprzez ocenę wpływu, jaki wywiera ona na funkcję komórek mezotelium, wyrażoną poprzez syntezę czynników zapalnych, czy modyfikację układu fibrynolizy. Tym bardziej ciekawe i niepozbawione podstaw wydaje mi się podjęcie próby charakterystyki tego zagadnienia.



Ryc.1. Siatka Proceed[®] (North Penn Hernia Institute)

1.4. Znaczenie czynników endogennych i egzogennych zaangażowanych w potencjalne mechanizmy powstawania zrostów otrzewnowych

Z punktu widzenia praktyki klinicznej wiadomo, że stopień nasilenia procesu zrostowego różni się w grupie pacjentów leczonych chirurgicznie. Rozległe zabiegi operacyjne, ze szczególnym uwzględnieniem procedur kolorektalnych, związane z przedłużoną ekspozycją otrzewnej na wysychanie, rozszerzoną eksploracją jamy brzusznej i większym uszkodzeniem tkanek, z reguły indukują powstanie masywnych, trudnych do oddzielenia zrostów (98). Jednak u części chorych poddanych dużej operacji nie obserwuje się zjawiska tworzenia zrostów, lub jego nasilenie jest niewielkie. Istotną rolę odgrywają indywidualne predyspozycje pacjenta, czego przykładem jest dyskutowana w ostatnich latach osobniczo zmienna zdolność do wewnątrzotrzewnowej degradacji fibryny (31), ale także obiektywne czynniki, które mogą być modyfikowane przez zespół leczący.

Wiek pacjenta nie jest bezwzględnym czynnikiem ryzyka powstawania zrostów, jednak w grupie osób powyżej 60 roku życia konieczność hospitalizacji z powodu powikłań zrostowych jest większa (99). Starsi pacjenci narażeni są na wynikające z leczenia operacyjnego systemowe zaburzenia procesów hemostazy (100), jednak brakuje doniesień literaturowych analizujących podobne zjawisko w mikrośrodkowisku jamy otrzewnej.

Istotne znaczenie ma stan kliniczny pacjenta i rodzaj schorzenia stanowiącego wskazanie do interwencji chirurgicznej. W grupie chorych operowanych z powodu zapalenia otrzewnej ryzyko powikłań zrostowych i wynikających z tego hospitalizacji jest większe (99). Badanie SCAR-3 (ang. *The Surgical and Clinical Adhesions Research-3*) (99) nie potwierdza podobnej zależności w odniesieniu do osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna, mimo że intensywny proces zrostotwórczy jest częstym zjawiskiem śródoperacyjnym wśród pacjentów z LCD.

Obok właściwej techniki operacyjnej również wybór biozgodnej substancji do irygacji jamy otrzewnej ma wpływ na proces prawidłowego gojenia uszkodzeń mezotelium, bez nadmiernego odkładania włókniaka i generowania zrostów. Nie istnieją rekomendacje, które zalecałyby użycie konkretnego roztworu z uwagi na brak badań wszechstronnie analizujących wpływ stosowanych środków na

czynność komórek mezotelium. Zrozumienie mechanizmów biorących udział w modyfikacji funkcji międzybłonka otrzewnej w odpowiedzi na zjawiska zachodzące podczas zabiegu operacyjnego, może być pomocne w ukierunkowaniu badań nad prewencją zrostów. W moich doświadczeniach poddałam analizie wpływ wieku pacjenta i choroby współistniejącej, a także roztworów stosowanych w irygacji otrzewnej oraz badanej siatki kompozytowej na zmiany wybranych parametrów czynnościowych mezotelium.

2. CELE PRACY

1. Charakterystyka zmian w czynności komórek międzybłonka otrzewnej w zależności od wieku pacjenta i współistniejącej choroby.
2. Ocena wpływu badanej siatki kompozytowej na funkcję komórek mezotelium otrzewnowego.
3. Określenie wpływu działania 0,9% roztworu soli fizjologicznej i płynu dializacyjnego Dianeal 1,36%, stosowanych w trakcie śródoperacyjnego płukania jamy otrzewnej na czynność komórek mezotelium.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka pacjentów

Komórki mezotelialne użyte w hodowli, zostały wyizolowane z fragmentów sieci większej, pobranych ze wskazań lekarskich od 51 pacjentów, operowanych zarówno w trybie planowym jak i pilnym, w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu pomiędzy 15.04.2011 a 31.10.2011. Wśród badanych chorych (K:M, 22:29) średnia wieku wynosiła 43,4 lata (16-70 lat).

Celem późniejszej analizy, pacjentów podzielono na pięć grup wiekowych oraz zakwalifikowano, w zależności od choroby podstawowej, stanowiącej wskazanie do laparotomii do jednej z trzech klas: *NZ* (bez zapalenia), *Z* (zapalenie), *Neo* (choroba nowotworowa).

Podgrupa *NZ* objęła głównie chorych z elektywnymi wskazaniami do operacji, u których nie obserwowano cech ograniczonego bądź rozlanego zapalenia otrzewnej, płynu wysiękowego ani odczynowego zapalenia węzłów chłonnych krezki. Znalazły się tu także trzy osoby z objawami niedrożności przewodu pokarmowego, u których śródoperacyjnie stwierdzono wczesny etap niedrożności zrostowej w zakresie pojedynczej pętli jelita krętego, przy prawidłowej żywotności jelita cienkiego i braku płynu przesiękowego w jamie brzusznej.

Do grupy *Z* zakwalifikowano pacjentów, operowanych głównie w trybie ostrożyżurowym z powodu ropowiczego i zgorzelinowego zapalenia wyrostka robaczkowego, zapalenia węzłów chłonnych krezki (łac. *lymphadenitis mesenterialis*) ze znacznym odczynem płynowym w otrzewnej, ostrego zapalenia pęcherzyka żółciowego, ostrego zapalenia trzustki, przedziurawienia wrzodu żołądka, a także chorób zapalnych jelit: wrzodziejącego zapalenia jelita grubego oraz choroby Leśniowskiego-Crohna.

W grupie *Neo* dominowały osoby z pierwotnymi gruczolakorakami jelita grubego oraz wznową procesu nowotworowego z narządu rodnoego. Szczegółową charakterystykę chorych i wskazania do zabiegu operacyjnego przedstawiono w tabeli 1.

Badane podgrupy wiekowe były porównywalne statystycznie (test Kruskala-Wallis) pod względem rodzaju choroby podstawowej.

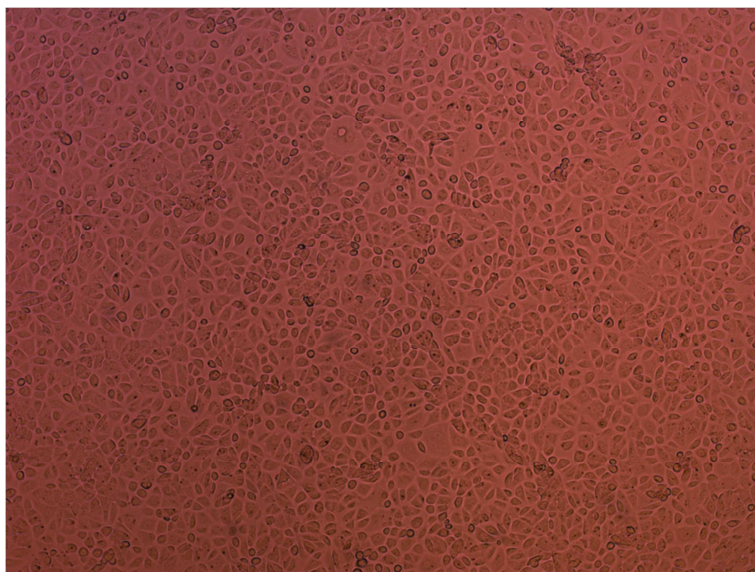
Praca otrzymała akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na posiedzeniu w dniu 14.04.2011, (nr. uchwały 332/11).

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej

GRUPA WIEKOWA	PŁEĆ K:M	ROZPOZNANIE NZ	ROZPOZNANIE Z	ROZPOZNANIE Neo
A (16-29 rż) n=10	6:4	wypadanie odbytnicy, n=1 wrzód samotny odbytnicy, n=1	LCD, n=2 CU, n=1 App, n=4	rak poprzeczny na podłożu FAP, n=1
B (30-39 rż) n=12	6:6	przepuklina pępkowa, n=1 kamica pęcherzyka żółciowego, n=1 jatrogenne uszkodzenie wątroby w wyniku biopsji, n=1	LCD, n=1 CU, n=2 App, n=3 LM, n=1 perforacja wrzodu odźwiernika, n=1	rak zagięcia wątrobowego, n=1
C (40-49 rż) n=10	3:7	FAP, n=1	LCD, n=1 CU, n=1 App, n=2 perforacja wrzodu odźwiernika, n=1	rak esicy, n=1 rak poprzeczny (rozśiew), n=1 guz miednicy małej, n=1 wznowa raka jelita grubego, n=1
D (50-59 rż) n=8	4:4	niedrożność zrostowa, n=2 laparotomia diagnostyczna, n=1	zapalenie trzustki, n=1 guz zapalny esicy na tle uchyłkowatości, n=1	rak kątnicy, n=1 rak zagięcia wątrobowego, n=1 wznowa mięsaka macicy, n=1
E (60-70 rż) n=11	3:8	gruczolak odbytnicy, n=1 niedrożność zrostowa, n=1	CU, n=1 App, n=1, zapalenie pęcherzyka żółciowego, n=1 ropień okołowyrastkowy, n=1 guz zapalny esicy na tle uchyłkowatości, n=2	rak kątnicy, n=1 rak esicy, n=1 rak zagięcia wątrobowego, n=1
Ogółem	22:29	n=11	n=28	n=12

3.2. Izolacja i hodowla komórek ludzkiego mezotelium otrzewnowego

Badania doświadczalne przeprowadzono w Zakładzie Patofizjologii Katedry Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Technika zakładania hodowli HPMC, monitorowanie jej wzrostu oraz identyfikacji komórek mezotelium, wykonywane były w oparciu o zasady opracowane i stosowane w Zakładzie Patofizjologii. Użyte odczynniki chemiczne pochodziły z firmy Sigma (Sigma-Aldrich Co. LLC.). Fragmenty sieci większej zaraz po pobraniu umieszczano w płynie Hanksa. Następnie, po dostarczeniu do laboratorium, materiał tkankowy z zachowaniem warunków jałowych, umieszczano w roztworze 0,05% trypsyny z dodatkiem 0,02% EDTA w płynie Hanksa i inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C intensywnie wytrząsając. Tak uzyskaną zawiesinę komórek płukano w standardowym medium hodowlanym (M199 GSH+10% FCS) i odwirowywano (1600 obrotów/min, temp. 25°C). W doświadczeniach użyto medium hodowlanego M199 z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (*FCS* – ang. *fetal calf serum*), glutaminy (20 mmol/l), streptomycyny (100 ug/ml), penicyliny (100 U/ml) oraz hydrokortyzonu (0,4 ug/ml). Po dwukrotnym przepłukaniu w medium i odwirowaniu, dodawano 7 ml M199 GSH+10% FCS i przelewano do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² (Nunc, USA), a następnie umieszczano w inkubatorze w temperaturze 37°C i powietrzu z 5% wysyceniem CO₂. Codziennie pod mikroskopem obserwowano tempo wzrostu komórek, a co trzy dni wymieniano medium hodowlane aż do momentu uzyskania zlewnej warstwy komórek, pokrywającej całą powierzchnię dna naczynia. Identyfikacji komórek mezotelium dokonano na podstawie ich charakterystycznego obrazu połączonych ze sobą komórek wielobocznych o układzie przypominającym „kostki brukowe” (1), (101).



Ryc. 2. Obraz mikroskopowy ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego w hodowli in vitro

Do uzyskanej w procesie hodowli zlewnej warstwy komórek, wykorzystanych następnie w doświadczeniach, dodawano 0,05% roztwór trypsyny suplementowany 0,02% EDTA w płynie Hanksa. Następnie wykonywano dwukrotne płukanie w medium hodowlanym, odwirowywano i pasażowano komórki do 24-studzienkowych płytek hodowlanych (Nunc, USA), umieszczonych w inkubatorze, celem osiągnięcia odpowiedniego wzrostu.

3.3. Ocena wybranych parametrów czynnościowych komórek mezotelium ekspozowanych na poszczególne roztwory

Hodowle HPMC, uzyskane od 51 pacjentów i przepasażowane do 24-studzienkowych płytek, po osiągnięciu prawidłowej dojrzałości morfologicznej, poddano 24-godzinnej ekspozycji na badane roztwory:

1. Standardowe medium hodowlane M199 GSH+10% FCS (kontrola).
2. Standardowe medium hodowlane M199 GSH+10% FCS inkubowane z badaną siatką kompozytową (Proceed[®]).
3. 0,9% roztwór NaCl (B Braun, Melsungen AG) przez godzinę, z następczą 24-godzinną ekspozycją na standardowe medium hodowlane.

4. Płyn dializacyjny Dianeal[®] 1,36 % (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) przez godzinę, z następczą 24-godzinną ekspozycją na standardowe medium hodowlane.

W powyższy sposób, w zależności od zastosowanego roztworu, wyróżniono cztery grupy doświadczalne. Komórki z każdej analizowanej grupy hodowano w czterokrotnych powtórzeniach.

Badaną siatkę kompozytową podzielono na cztery części i każdą z nich poddano wstępnej inkubacji w 100 ml medium hodowlanego przez 14 dni. Tak przygotowany roztwór użyty został w doświadczeniach.

Wszystkie roztwory uprzednio zbuforowano NaOH, uzyskując pH=7,45 w celu eliminacji możliwego toksycznego wpływu na komórki i przefiltrowano przy użyciu filtra strzykawkowego.

Po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji zebrano i zamrożono supernatanty, w których następnie dokonano pomiaru stężenia IL-6, t-PA oraz PAI-1. Pozostałe na dnie studzienek komórki, strypsynizowano i podliczono w komorze Bürkera.

Badania doświadczalne przeprowadziłam samodzielnie pod kierownictwem dr med. A. Połubińskiej.

3.4. Pomiar stężenia białka komórkowego

W czterech studzienkach z każdej hodowli dokonano pomiaru stężenia całkowitego białka komórkowego metodą Lowry'ego (152) w 96-dołkowych płytkach polistyrenowych. Jako reagent zastosowano 40% roztwór wodny odczynnika BIO-RAD. Do krzywej wzorcowej użyto roztworu 1 mg/ml albuminy w seryjnych rozcieńczeniach (5, 10, 20, 30, 40 µg/ml). Próbki rozcieńczano 10-krotnie bezpośrednio na studziencie dodając wody destylowanej. Objętość rozcieńczonych próbek jak i wzorca wynosiła 100 µl na studzienkę. Do każdej studzienki wprowadzano następnie po 100 µl odczynnika 40% BIO-RAD. Pomiar przeprowadzano wobec próby ślepej przy długości fali 620 nm na spektrofotometrze VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA). Stężenie białka w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

3.5. Generacja wolnych rodników tlenowych

Ocenę zdolności generowania wolnych rodników tlenowych przez komórki mezotelialne przeprowadzono w oparciu o reakcję przemiany dwuoctanu 2'7'dichlorodihydrofluoresceiny (DDF) do odpowiedzialnej za fluorescencję 2'7'dichlorofluoresceiny (DF). Do czterech studzienek z danej hodowli dodano po 1 ml roztworu medium hodowlanego z DDF i inkubowano przez 45 minut w temperaturze 37°C, a następnie poddano lizie. Pomiarów fluorescencji dokonano przy pomocy spektrofotometru Wallac Victor 2 Multi Label Counter (Perkin – Elmer, Finlandia). Uzyskane wyniki przeliczono na ilość białka komórkowego.

3.6. Interleukina 6 (IL-6)

Pomiaru stężenia IL-6 dokonano w supernatantach, czterokrotnie dla danej grupy doświadczalnej w poszczególnych hodowlach komórek mezotelialnych. Oznaczenia wykonano, stosując kompletny zestaw, oparty o technikę immunoenzymatyczną ELISA – human IL-6 DuoSet (R&D Systems, USA). Pomiar absorbancji przeprowadzono za pomocą spektrofotometru VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA), przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie IL-6 w badanych próbkach określono na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy IL-6 przeliczono na ilość komórek w hodowli.

3.7. Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA)

Stężenie t-PA zmierzono w supernatantach, dwukrotnie dla danej grupy doświadczalnej w każdej hodowli HPMC. Zastosowano kompletny, specyficzny test immunoenzymatyczny ELISA (Bender Medsystems GmbH, Austria), wykorzystując płytki opłaszczane przeciwciałami dla ludzkiego t-PA. Pomiar absorbancji przeprowadzono za pomocą spektrofotometru VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA), przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 620 nm. Stężenie t-PA w badanych próbkach określono na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość produkcji t-PA przez komórki mezotelialne wyrażono przeliczając uzyskane wartości na ilość komórek w hodowli.

3.8. Inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1)

Pomiaru stężenia PAI-1 dokonano w supernatantach, czterokrotnie dla danej grupy doświadczalnej w poszczególnych hodowlach komórek mezotelialnych. Zastosowano zestaw do oznaczeń, oparty o technikę immunoenzymatyczną ELISA - human Serpin E1/PAI-1 DuoSet (R&D Systems, USA). Detekcję absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, USA), przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie PAI-1 określono na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy PAI-1 przeliczono na ilość komórek w hodowli.

3.9. Oznaczanie β -galaktozydazy

Oznaczanie β -galaktozydazy - markera procesu starzenia komórek - wykonano dla każdej hodowli, wykorzystując gotowy zestaw Lab-Tek Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Inc). W ten sposób wybarwione komórki analizowano pod mikroskopem, klasyfikując w 5-stopniowej skali aktywności β -Gal, w zależności od wybarwienia cytoplazmy i strątu barwnika. Wskaźnik aktywności obliczono sumując iloczyn liczby komórek i stopień reakcji barwnej w 100 kolejnych komórkach (102).

3.10. Analiza statystyczna wyników

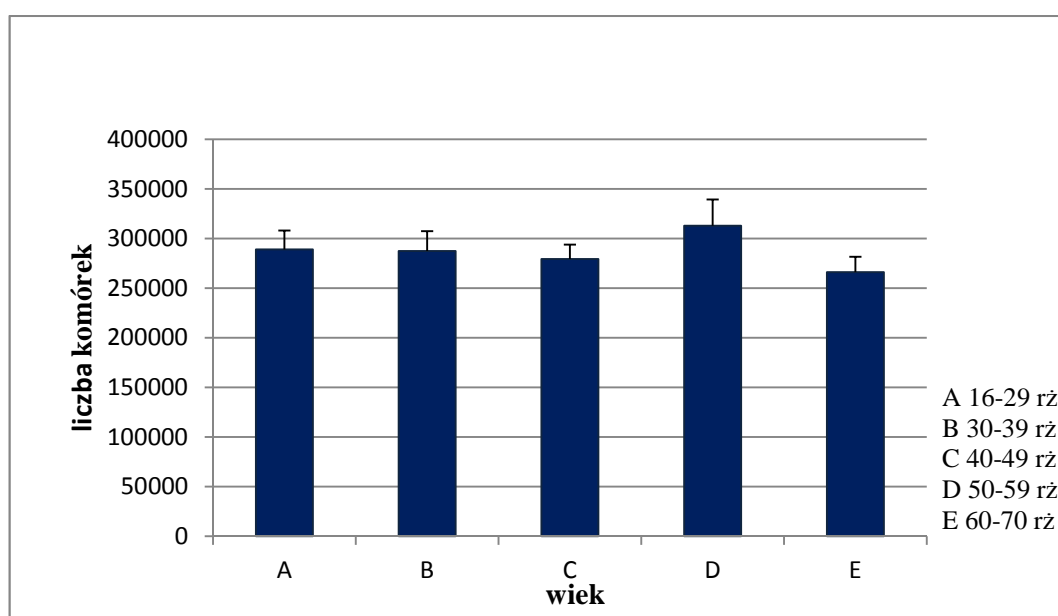
Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Statistica 10 (StatSoft, Inc). Wykorzystano testy nieparametryczne dla zmiennych niezależnych, w przypadku porównań wielokrotnych – test ANOVA rang Kruskala - Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna oraz dla zmiennych powiązanych – test Wilcoxon. Wartość $p < 0,05$ przyjmowano za granicę istotności statystycznej. Graficznie wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm błąd standardowy średniej (SEM).

4. WYNIKI

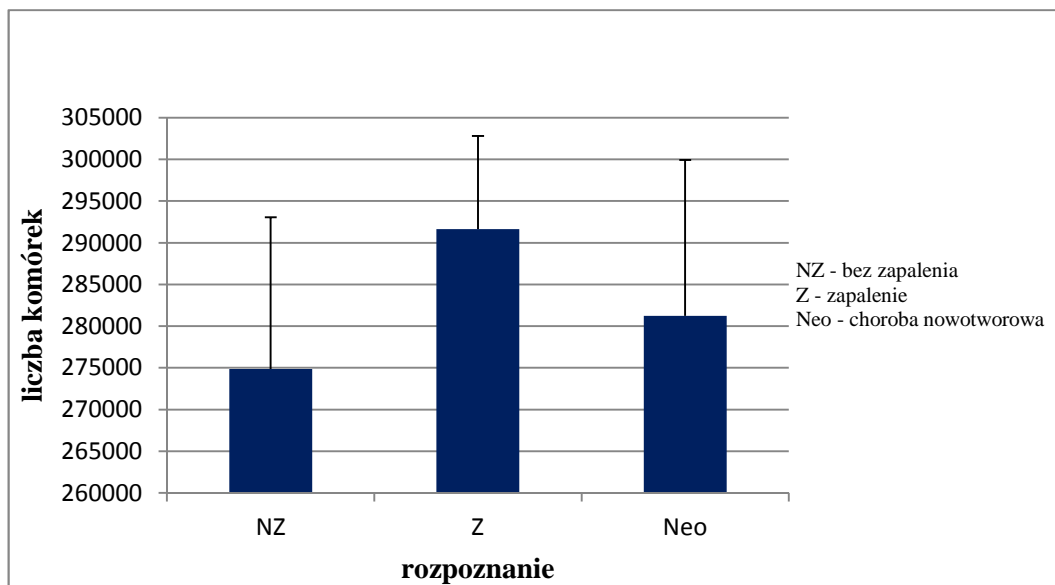
4.1. Charakterystyka czynności komórek mezotelium otrzewnowego po ekspozycji na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów oraz choroby podstawowej

Ekspozycja HPMC z hodowli uzyskanych od 51 dawców na standardowe medium hodowlane, stanowiące roztwór kontrolny, posłużyła jako model oceny możliwego wpływu wieku i czynnika chorobowego na wybrane funkcje komórek mezotelium.

Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w ocenie ilościowej komórek po 24-godzinnej ekspozycji na standardowe medium hodowlane w poszczególnych grupach wiekowych (Ryc. 3A), oraz w zależności od choroby podstawowej (Ryc. 3B), aczkolwiek największa liczba komórek charakteryzowała hodowle uzyskane od pacjentów ze stanem zapalnym (Z), a najmniejsza – od osób, u których nie stwierdzono śródoperacyjnie procesu zapalnego (NZ).

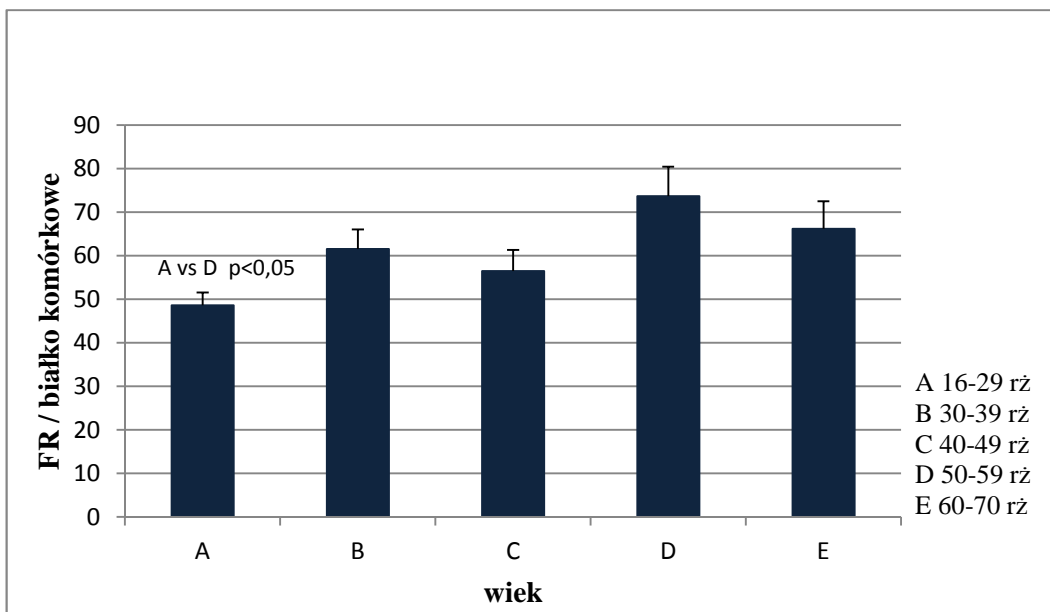


Ryc. 3A. Liczba komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów

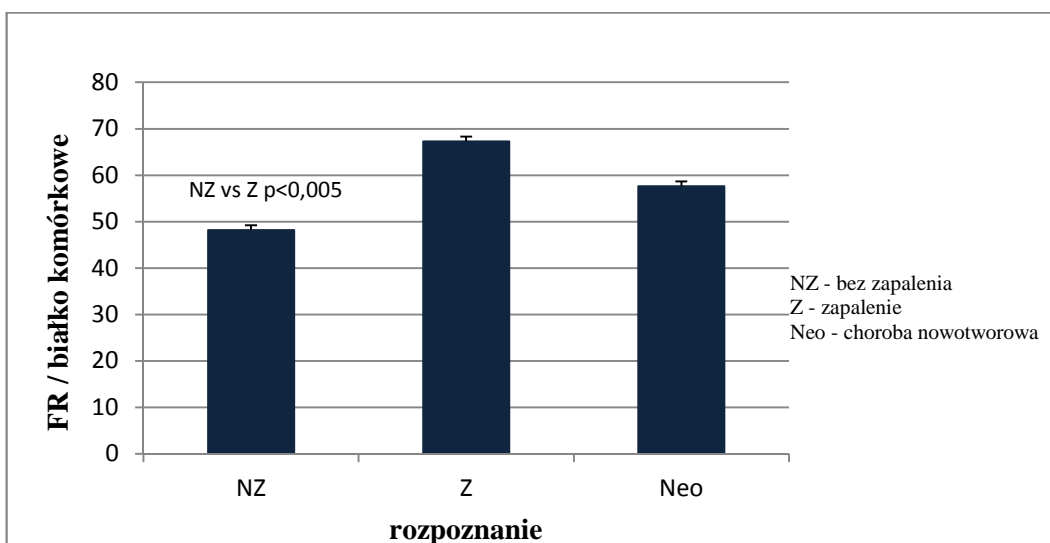


Ryc. 3B. Liczba komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Jednym z etapów doświadczenia była ocena stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego, mierzona poziomem generacji wolnych rodników tlenowych w przeliczeniu na białko komórkowe. Zauważalne różnice dotyczyły hodowli komórek od najmłodszej grupy pacjentów pomiędzy 16 a 29 rż, w której indeks FR/białko był najniższy, o 34% mniejszy w porównaniu z grupą chorych pomiędzy 50-59 rż. (Ryc. 4A). Nasilenie wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego było istotnie większe (+28%) wśród pacjentów z zapaleniem (Z), w porównaniu z osobami bez etiologii zapalnej choroby (NZ), (Ryc. 4B).

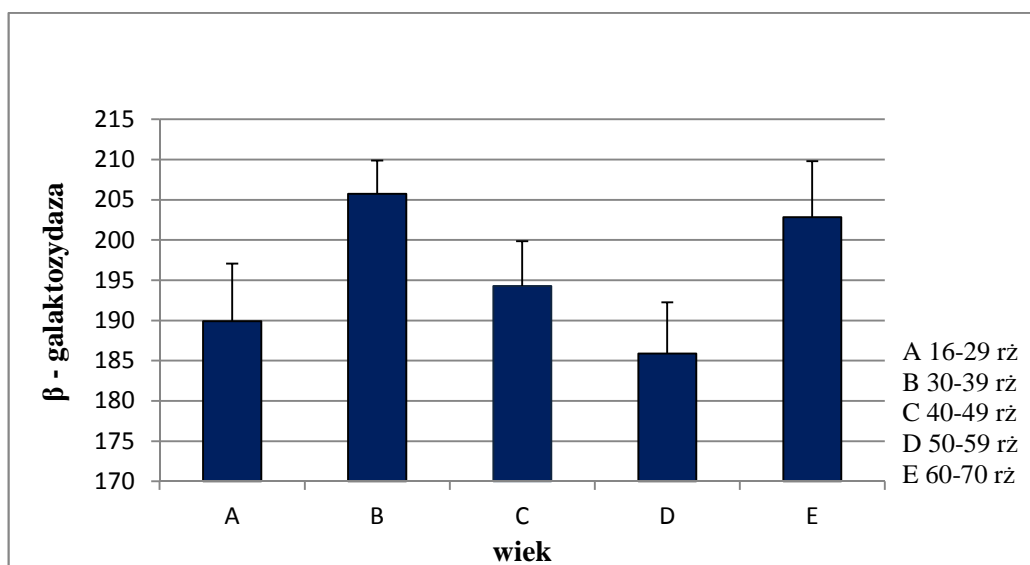


Ryc. 4A. Generacja wolnych rodników tlenowych przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów

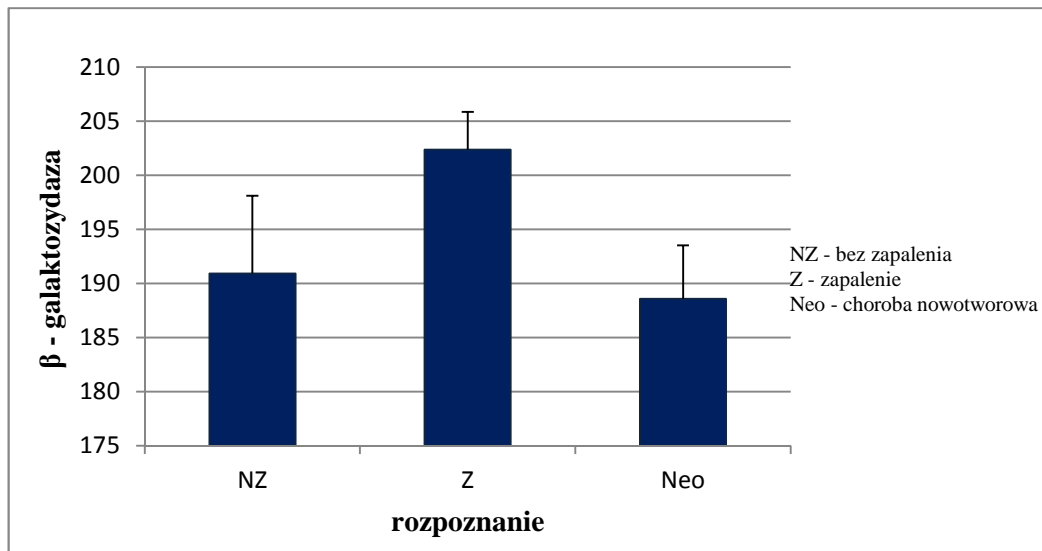


Ryc. 4B. Generacja wolnych rodników tlenowych przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Różnice poziomu aktywności β -galaktozydazy w hodowlach w poszczególnych grupach wiekowych nie okazały się znamienne (Ryc. 5A). Jednak analizując grupę najmłodszych pacjentów - do 29 rż (n=10) z osobami pomiędzy 30 a 70 rż (n=41), widoczna była tendencja w kierunku niższych wartości w pierwszej grupie; średnie wyniosły odpowiednio 183,9 oraz 198,3 z wynikiem na granicy istotności $p=0,057$. Wskaźnik aktywności β -Gal w komórkach izolowanych od pacjentów z zapaleniem otrzewnej, był większy w porównaniu z grupą NZ i Neo, jednak obserwowany efekt nie osiągnął statystycznej istotności (Ryc. 5B).



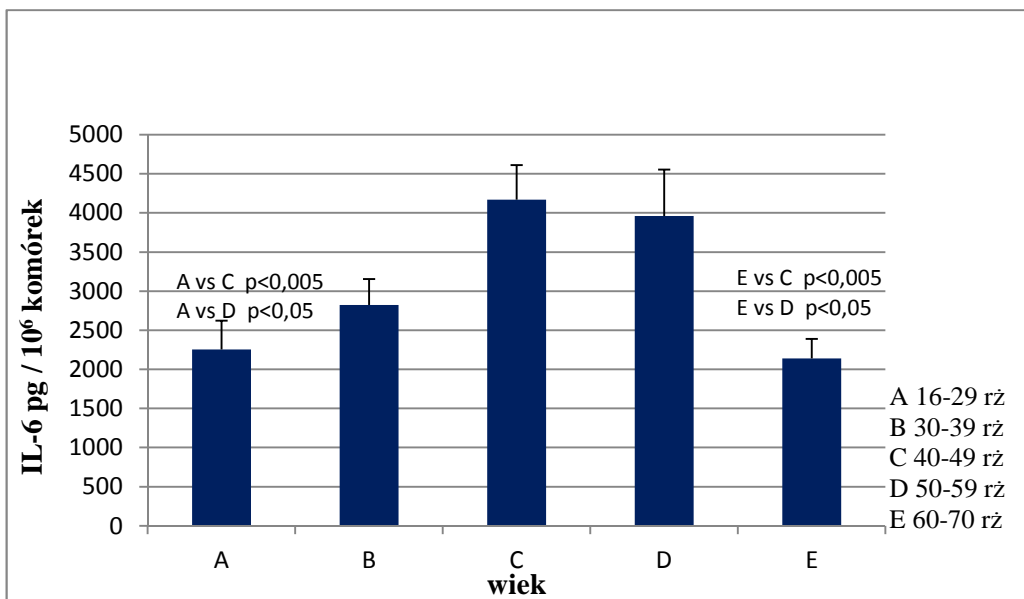
Ryc. 5A. Poziom β -galaktozydazy w komórkach mezotelium eksponowanych na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów



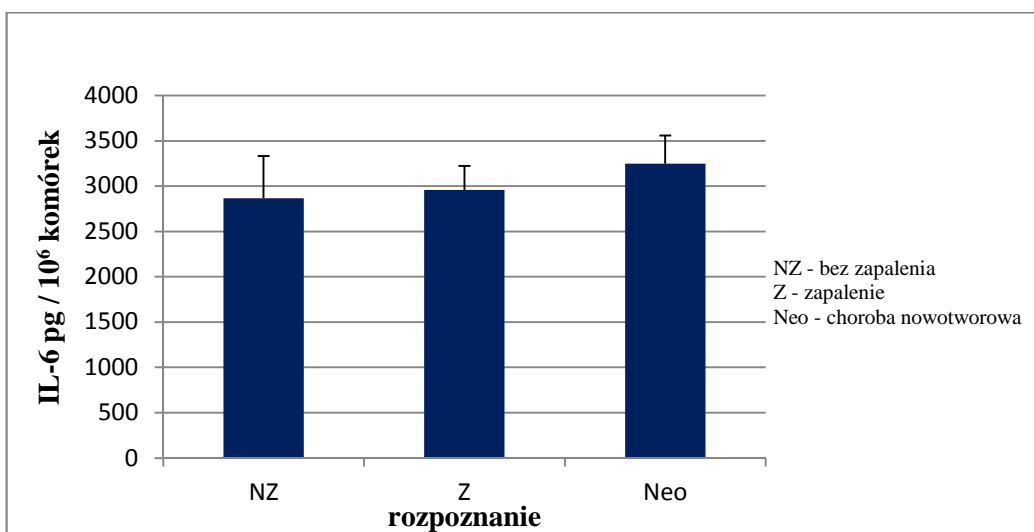
Ryc. 5B. Poziom β -galaktozydazy w komórkach mezotelium eksponowanych na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Obserwowano istotną zależność pomiędzy wiekiem dawcy, a poziomem produkcji IL-6 przez komórki mezotelialne (Ryc. 6A). Najniższe wartości charakteryzowały hodowle pacjentów ze skrajnych grup wiekowych: najmłodszej (A: 16-29 rż) oraz najstarszej (E: 60-70 rż), w których zmniejszenie sekrecji IL-6 było niemalże dwukrotne w stosunku do hodowli, uzyskanych od chorych w średnim przedziale wiekowym - pomiędzy 40 a 59 rż. Sekrecja badanej interleukiny przez HPMC w grupie A była istotnie obniżona, odpowiednio o 45,9% i 43% w porównaniu z grupą chorych C (40-49 rż) oraz D (50-59 rż). Poziom IL-6 w hodowlach uzyskanych od najstarszych osób (E) był zredukowany odpowiednio o 48,6% i 45,9%, w odniesieniu do pacjentów z grup C (40-49 rż) i D (50-59 rż).

Nie udowodniono natomiast statystycznie istotnego wpływu choroby zasadniczej na wielkość syntezy IL-6 (Ryc. 6B).



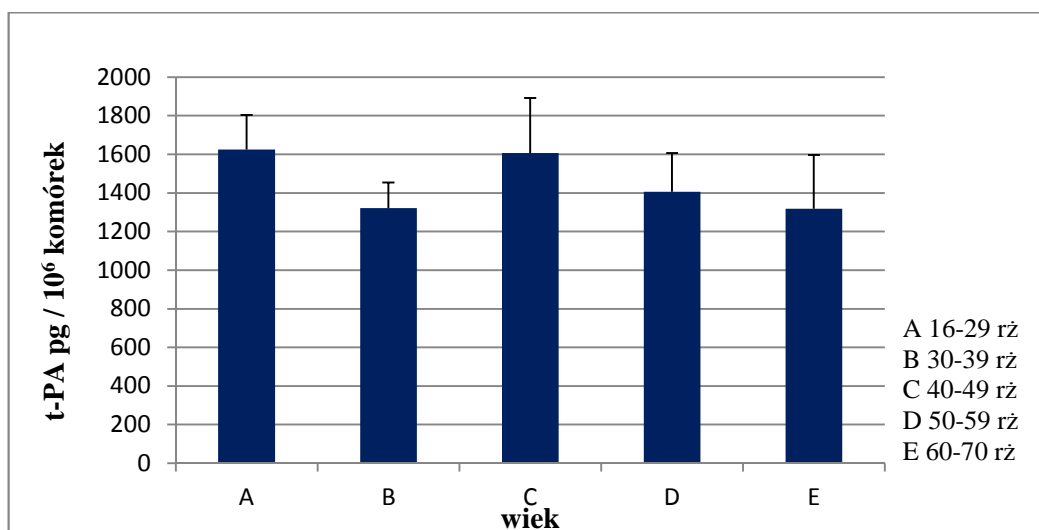
Ryc. 6A. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów



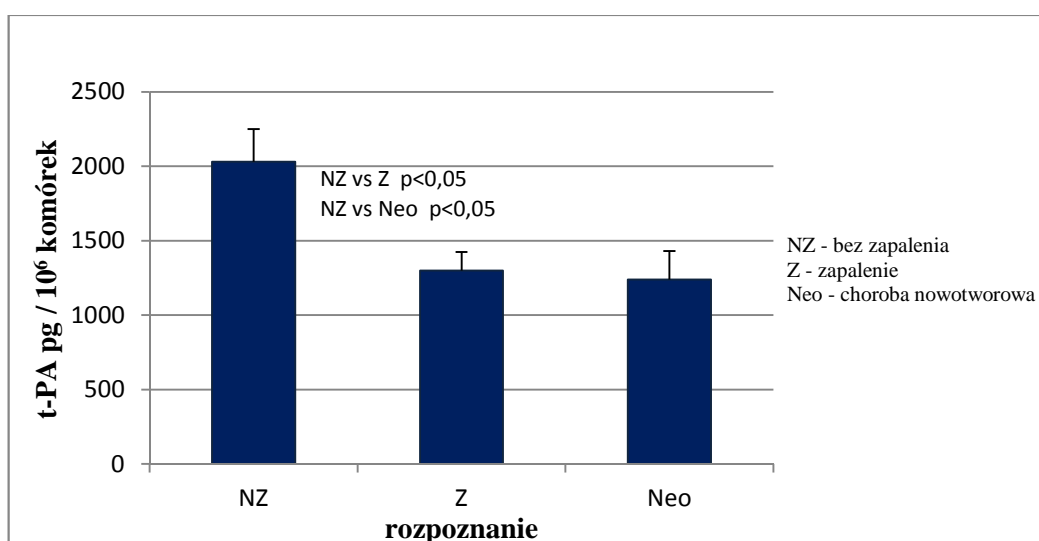
Ryc. 6B. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Nie wykazano, aby wiek pacjenta miał statystycznie znamiennej wpływ na lokalną produkcję t-PA (Ryc. 7A), mimo że największe wartości obserwowano w hodowlach w najmłodszej grupie.

Synteza t-PA była istotnie wyższa w hodowlach, uzyskanych od pacjentów bez choroby zapalnej (NZ), odpowiednio o 36% i 39% w porównaniu z osobami z etiologią zapalną (Z) i procesem nowotworowym (Neo) (Ryc. 7B).

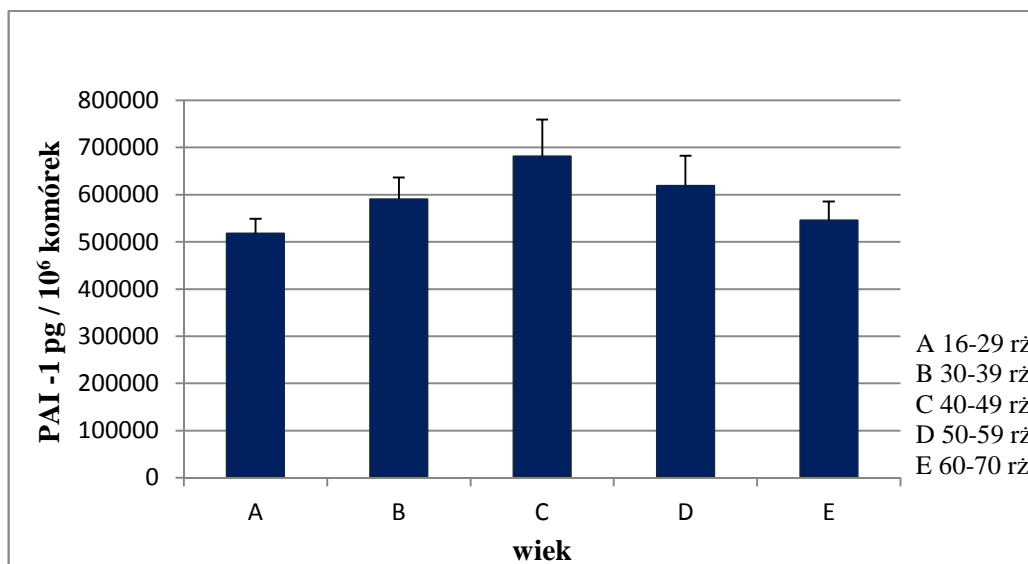


Ryc. 7A. Synteza t-PA przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów

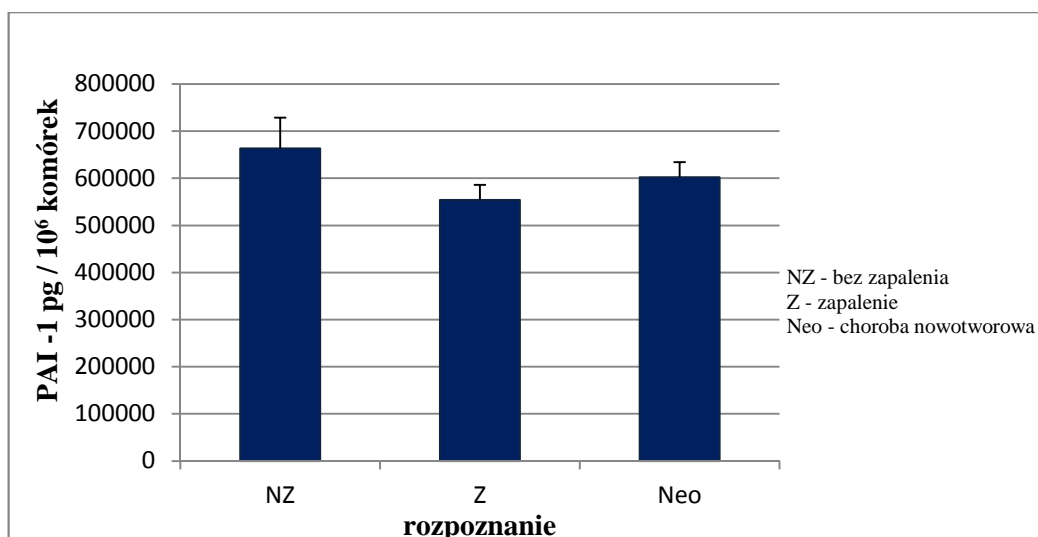


Ryc. 7B. Synteza t-PA przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Różnice w wielkości syntezy PAI-1 w hodowlach HPMC w poszczególnych grupach wiekowych oraz w zależności od rozpoznania nie były istotne statystycznie (Ryc. 8A i 8B).

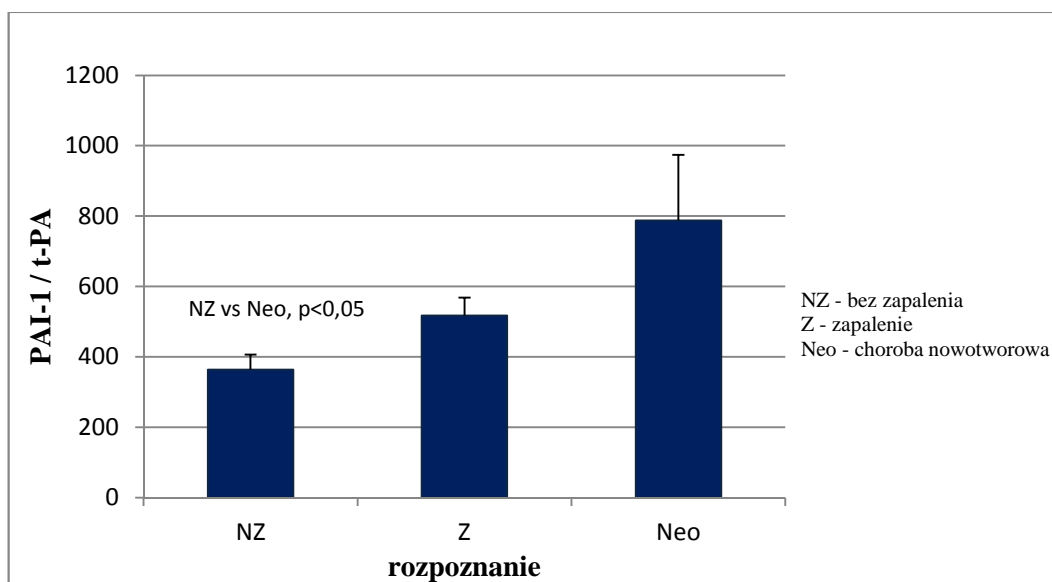


Ryc. 8A. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium ekspozowane na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów



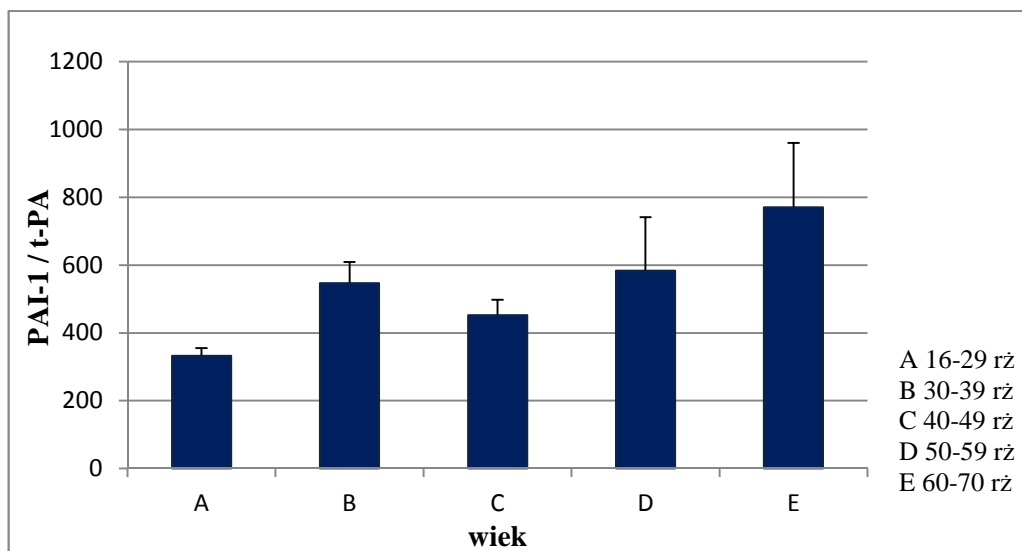
Ryc. 8B. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium ekspozowane na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Analizując wartości indeksu PAI-1/t-PA, tylko w hodowlach od pacjentów z chorobą nowotworową (Neo) odnotowano istotnie wyższe wartości (+53,7%), w porównaniu z chorymi bez zapalenia (NZ), (Ryc. 9A). Było to wynikiem wyższej produkcji t-PA w grupie NZ w odniesieniu do pozostałych.



Ryc. 9A. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium eksponowanych na standardowe medium hodowlane w zależności od choroby podstawowej

Różnice w wartości indeksu PAI-1/t-PA nie osiągnęły znamienności statystycznej w poszczególnych grupach wiekowych (Ryc. 9B).



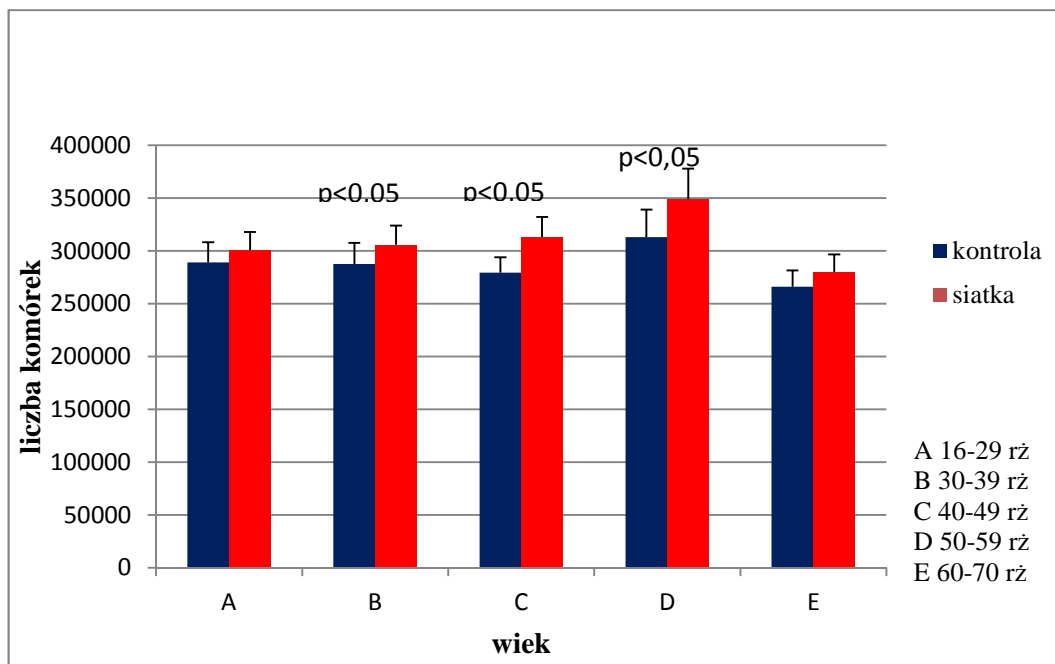
Ryc. 9B. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium eksponowanych na standardowe medium hodowlane w zależności od wieku pacjentów

4.2. Charakterystyka czynności komórek mezotelium otrzewnowego po ekspozycji na standardowe medium hodowlane z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów i choroby podstawowej

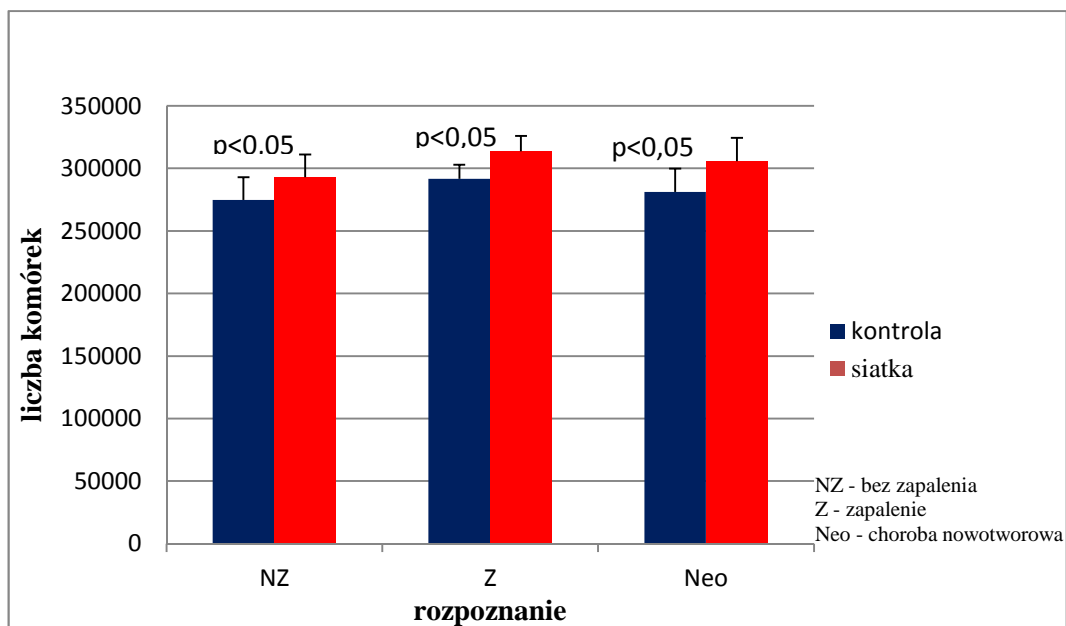
Rezultaty zmian w funkcji komórek mezotelium otrzewnowego po 24-godzinnej ekspozycji na medium z badaną siatką kompozytową porównano w odniesieniu do grupy kontrolnej, którą stanowiły hodowle HPMC poddane dobowej inkubacji ze standardowym medium hodowlanym.

Ekspozycja na medium z siatką spowodowała zwiększenie liczby komórek w porównaniu z kontrolą, w hodowlach od pacjentów w grupach wiekowych B (30-39 rż), C (40-49 rż) oraz D (50-59 rż) odpowiednio o 6,3%, 12% i 11,4%, (Ryc. 10A). Podobna obserwacja dotyczyła hodowli od dawców we wszystkich trzech grupach rozpoznania, odpowiednio: NZ (+6,6%), Z (+7,5%), Neo (+9%), (Ryc. 10B).

Można przypuszczać, że powyższy mechanizm stymulacji komórek pod wpływem ORC, stanowiącej powleczenie siatki, może być korzystny z punktu widzenia szybszej remezotelializacji i regeneracji otrzewnej.

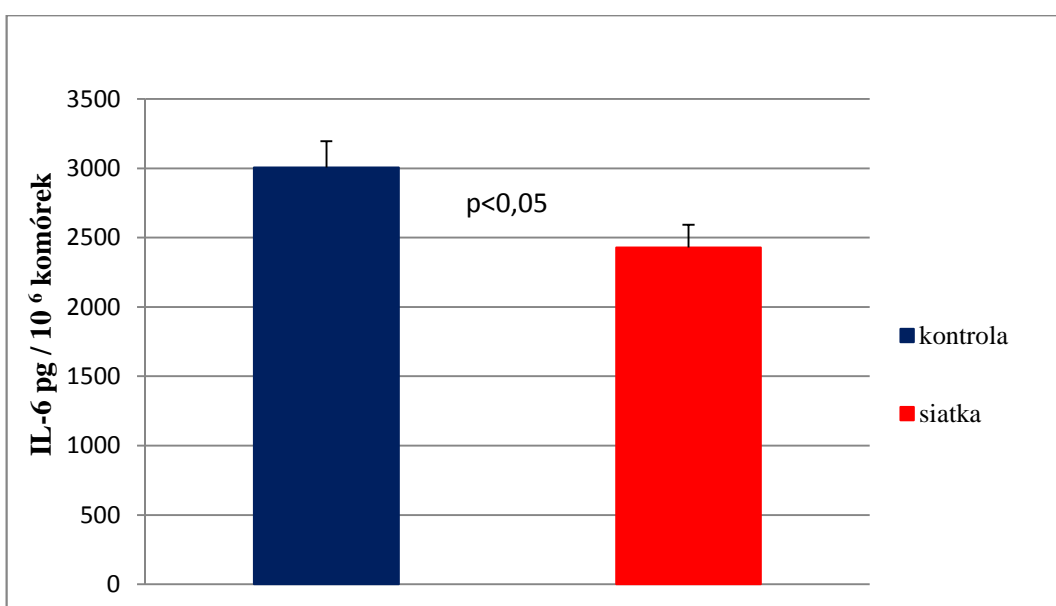


Ryc. 10A. Liczba komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów

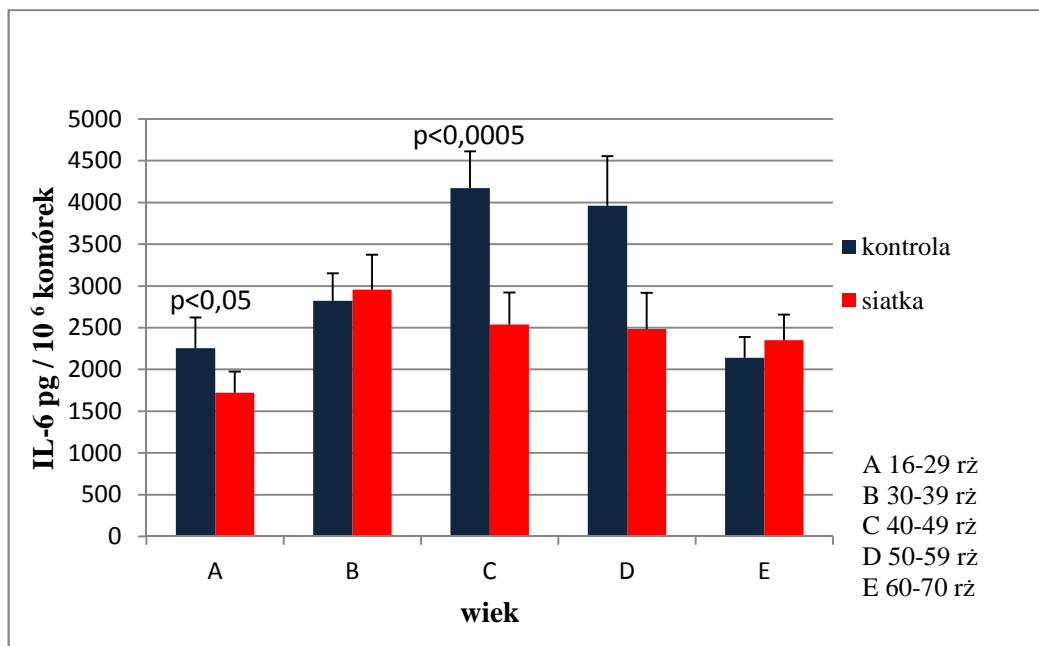


Ryc. 10B. Liczba komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od choroby podstawowej

Ekspozycja HPMC na znajdujące się w medium składniki siatki będącej przedmiotem doświadczenia, spowodowała redukcję syntezy IL-6 (Ryc. 11A). Wynik ten okazał się znamieny w hodowlach uzyskanych od najmłodszych pacjentów - A (16-29 rż), a także w grupie C (40-49 rż), gdzie wielkość syntezy była niższa odpowiednio o 23,6% i 39% (Ryc. 11B). W grupie D (50-59 rż) poziom IL-6 również był niższy w porównaniu z kontrolą, jednak wynik nie osiągnął istotności ($p=0,07$).

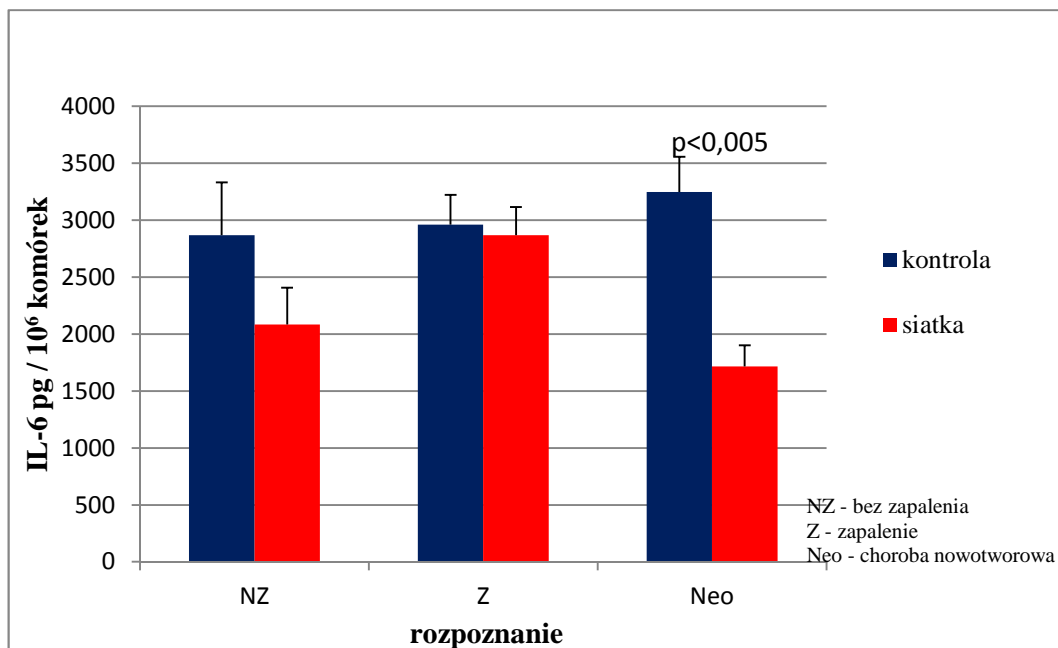


Ryc. 11A. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium ekspozowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową



Ryc. 11B. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów

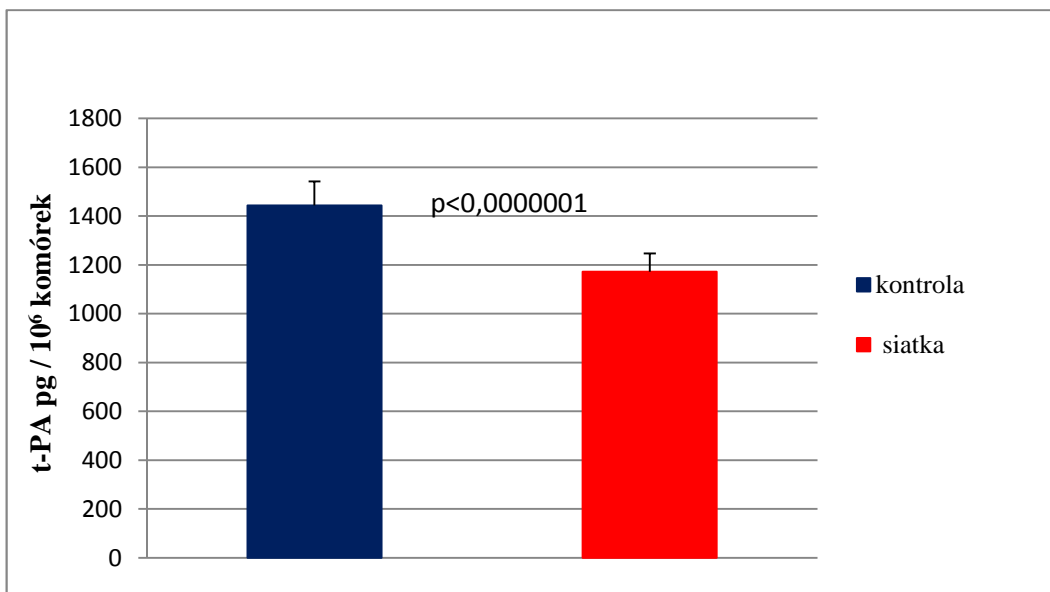
W stosunku do kontroli, obserwowano tendencję do obniżonego poziomu IL-6 po ekspozycji na medium z siatką w grupach NZ, Z i Neo, natomiast tylko w hodowlach od pacjentów z rozpoznaniem procesu nowotworowego wykazano znamiennej redukcję sekrecji powyższej interleukiny o 47% (Ryc. 11C). Dodatkowo komórki z hodowli pochodzących od osób z chorobą nowotworową, eksponowane na składniki badanej siatki wykazywały istotnie zmniejszoną sekrecję IL-6 (-40%) w porównaniu z HPMC od chorych z odczynem zapalnym. Podobnego efektu nie uwidoczono po ekspozycji na standardowe medium hodowlane. Zmniejszenie wielkości syntezy IL-6, najwyraźniej zaznaczone wśród pacjentów operowanych z powodu nowotworu, było więc spowodowane wpływem analizowanej siatki.



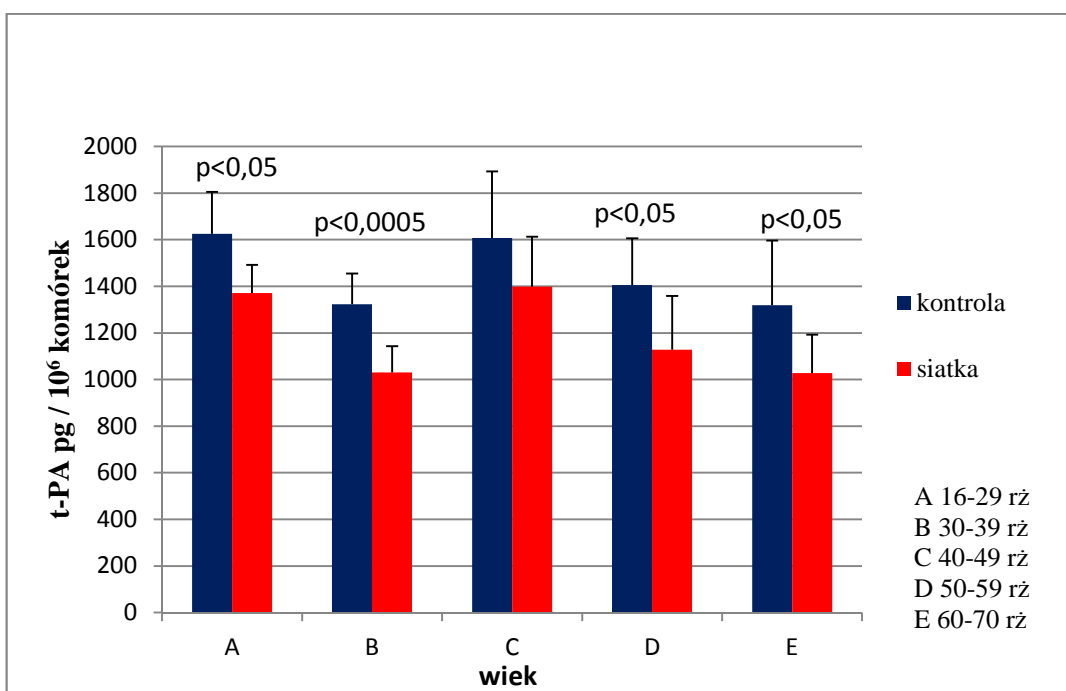
Ryc. 11C. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od choroby podstawowej

Badany materiał kompozytowy spowodował zmniejszenie syntezy t-PA w całej badanej populacji (Ryc. 12A). We wszystkich grupach wiekowych, z wyjątkiem C (40-49 rż) wartości t-PA były istotnie niższe w hodowlach HPMC, eksponowanych na medium ze składnikami badanej siatki w porównaniu z kontrolą, odpowiednio dla poszczególnych klas: A (16-29 rż), B (30-39 rż), D (50-59 rż) i E (60-70 rż) o 15%, 22%, 20% i 22%, (Ryc. 12B).

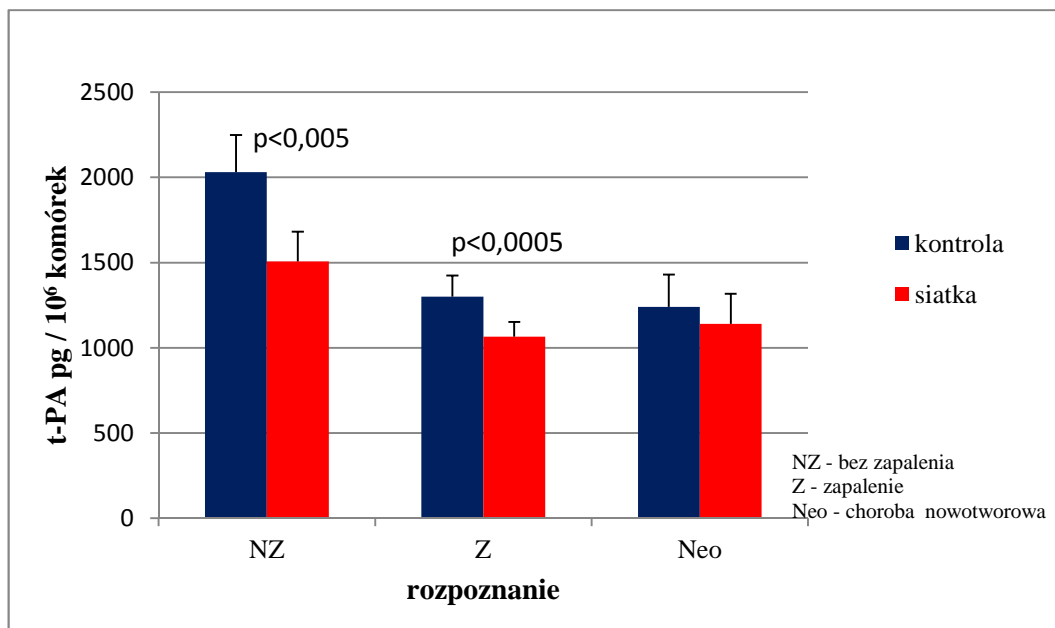
Istotnie statystycznie obniżenie sekrecji t-PA dotyczyło także hodowli komórek, pochodzących od pacjentów z wewnątrztrzewnowym odczynem zapalnym, jak i przy braku takiej etiologii. W odniesieniu do kontroli, wartości t-PA były o 26% niższe w grupie NZ i o 18% wśród chorych Z (Ryc. 12C).



Ryc. 12A. Synteza t-PA przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową



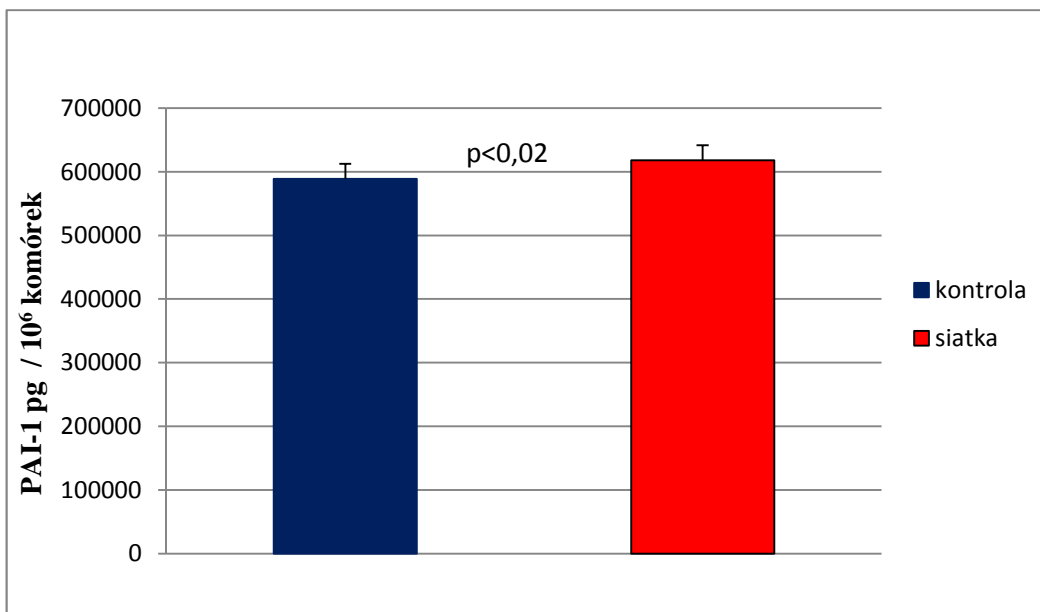
Ryc. 12B. Synteza t-PA przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów



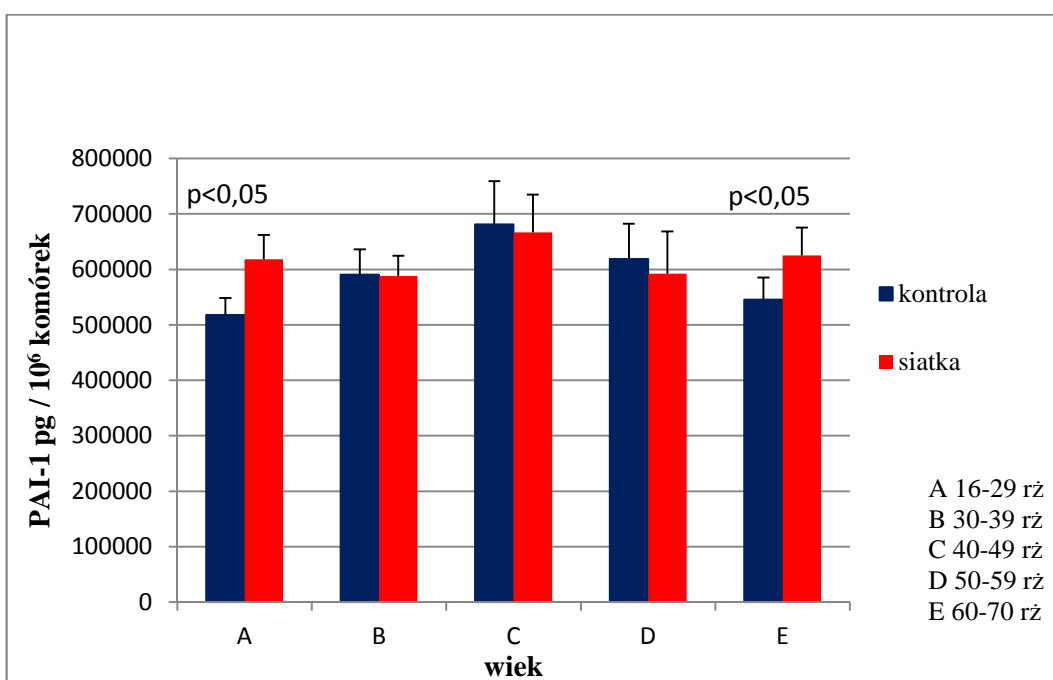
Ryc. 12C. Synteza t-PA przez komórki mezotelium ekspozowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od choroby podstawowej

Odwrotną tendencję obserwowano w przypadku syntezy PAI-1, która była znamienne wyższa w grupie badanej (Ryc. 13A). W porównaniu z kontrolą hodowle komórek mezotelium pacjentów z dwóch skrajnych klas wiekowych: A (16-29 rż) i E (60-70 rż), wykazywały odpowiednio o 16% i 13% wyższe poziomy PAI-1 (Ryc. 13B).

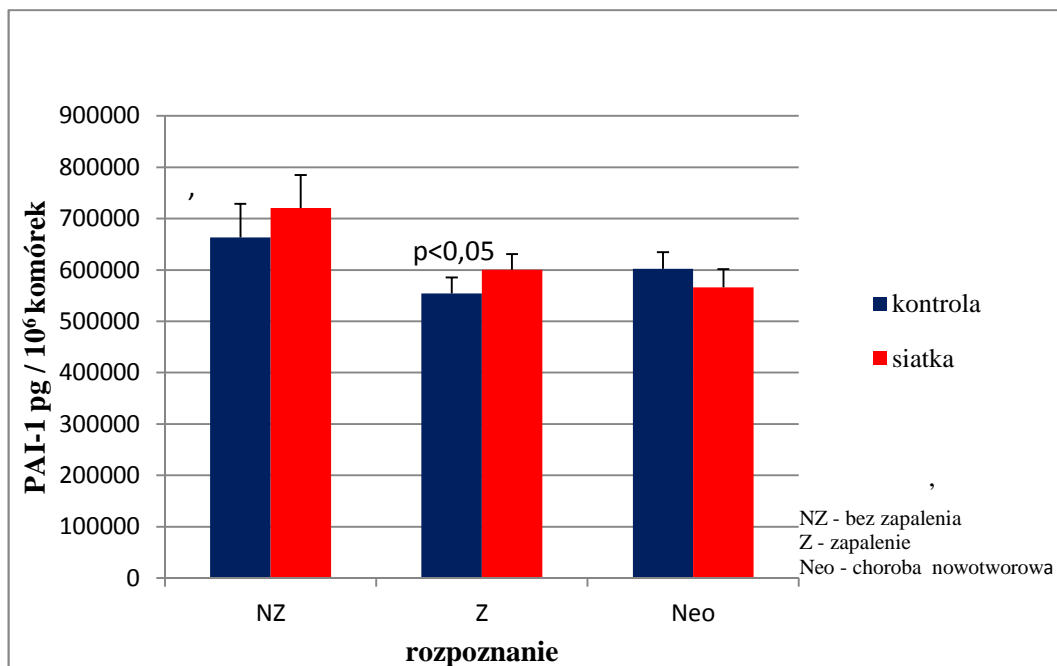
Wpływ ekspozycji na medium z badaną siatką, polegający na zwiększeniu sekrecji PAI-1, był także zauważalny w hodowlach, pochodzących od dawców z zapaleniem (Z), (Ryc. 13C).



Ryc. 13A. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową



Ryc. 13B. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów

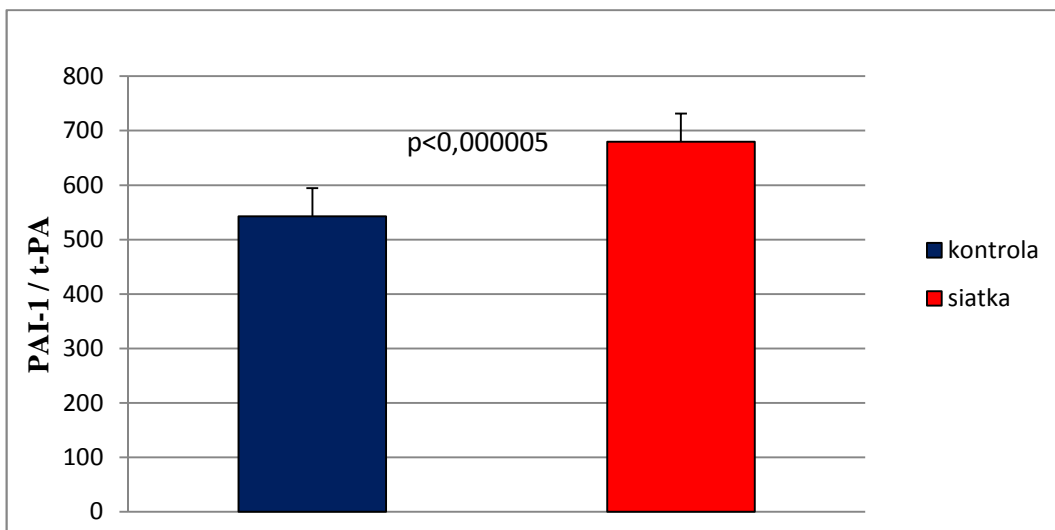


Ryc. 13C. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium eksponowane na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od choroby podstawowej

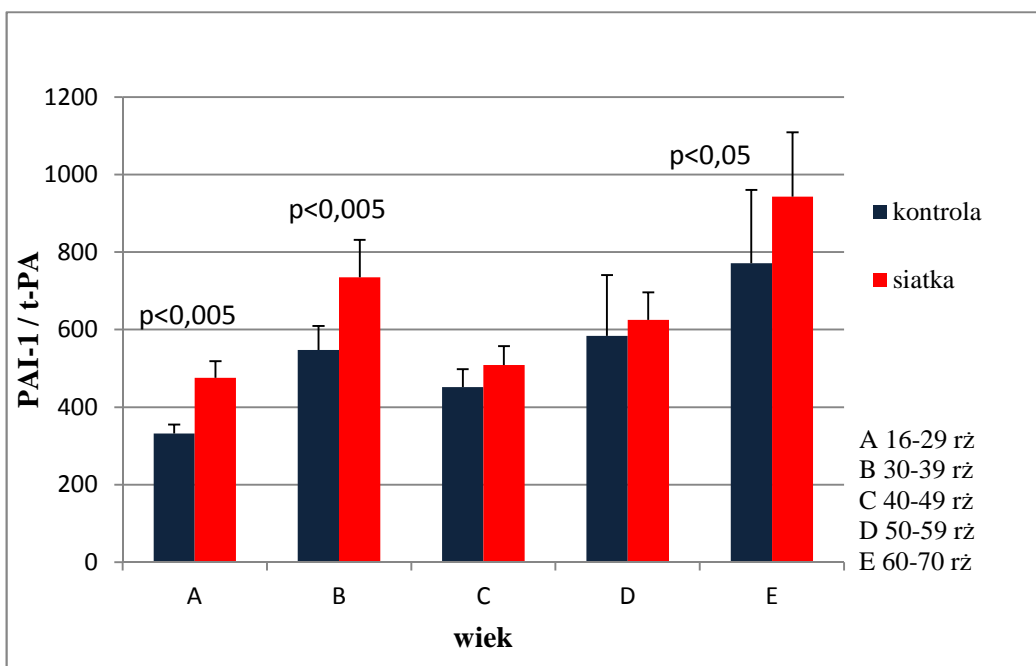
Badana siatka kompozytowa spowodowała istotne zmniejszenie aktywności fibrynolitycznej komórek mezotelium, wyrażonej podwyższeniem wielkości indeksu PAI-1/t-PA (Ryc. 14A).

Z uwagi na wysokie wartości syntezy PAI-1, również istotnie wyższy iloraz PAI-1/t-PA charakteryzował hodowle pacjentów w skrajnych grupach wiekowych A (16-29 rż) i E (60-70 rż), a także B (30-39 rż), w których wartości indeksu w porównaniu z kontrolą były większe odpowiednio o 30%, 18% i 25,5%, (Ryc. 14B).

Należy jednak zauważyć, że mimo wysokich wartości PAI-1 po ekspozycji HPMC na medium z siatką w hodowlach uzyskanych od młodych osób (A), poziom indeksu PAI-1/t-PA był u nich blisko dwukrotnie niższy (49%) w porównaniu z grupą najstarszych chorych (E). Taki wynik może być wytłumaczony wyższą sekrecją t-PA równoważącą działanie inhibitora, w hodowlach od najmłodszych pacjentów w porównaniu z osobami starszymi, mimo że efekt ten nie osiągnął statystycznej istotności ($p=0,08$), (Ryc. 12B).

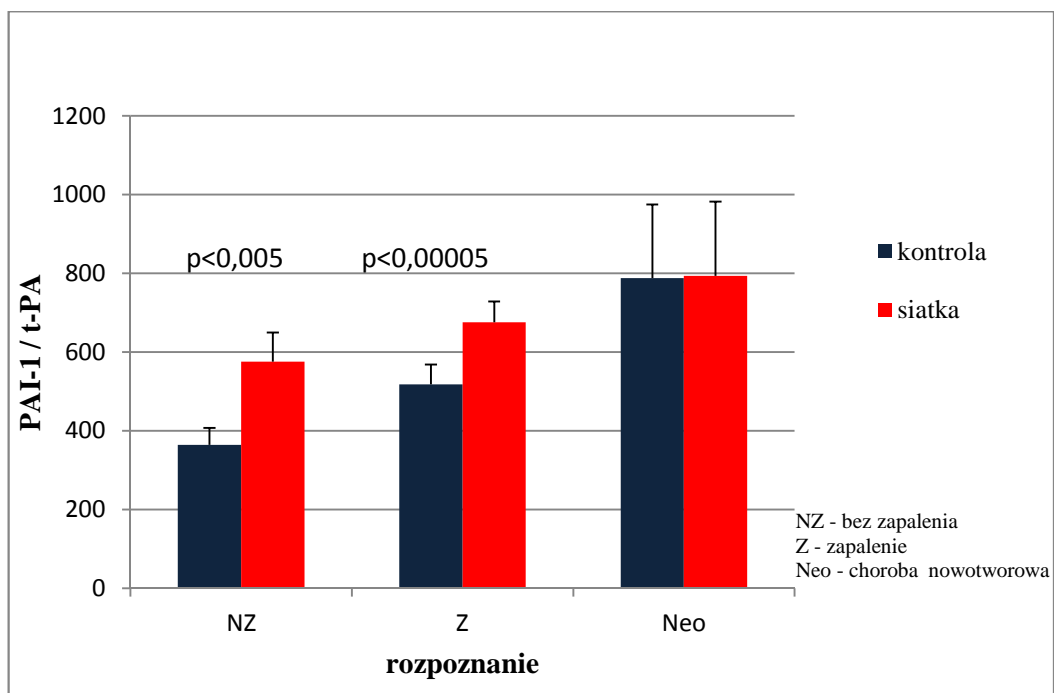


Ryc. 14A. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową



Ryc. 14B. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium ekspozowanych na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od wieku pacjentów

Znamienny natomiast okazał się wpływ ekspozycji na medium z siatką na zwiększenie wartości indeksu PAI-1/t-PA w hodowlach, pochodzących od osób z zapaleniem (+23%) oraz bez obecnego odczynu zapalnego (+37%), (Ryc. 14C).



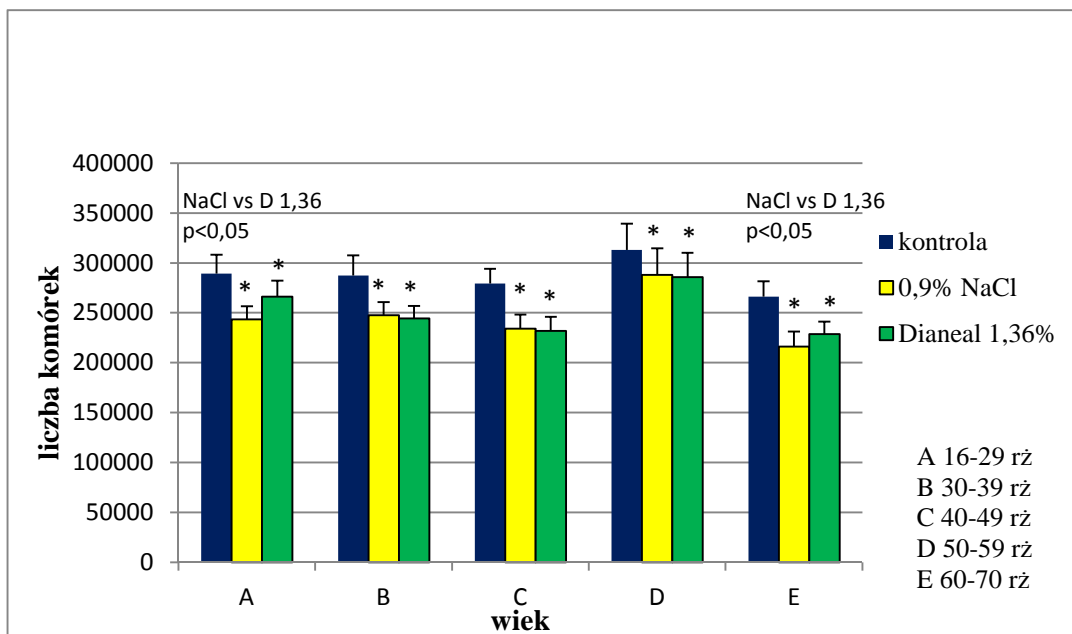
Ryc. 14C. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium eksponowanych na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz medium z badaną siatką kompozytową w zależności od choroby podstawowej

4.3. Charakterystyka czynności komórek mezotelium otrzewnowego, poddanych godzinnej preinkubacji z 0,9% roztworem soli fizjologicznej i płynem dializacyjnym Dianeal 1,36% w zależności od wieku pacjentów i choroby podstawowej

Do oceny możliwego wpływu roztworów soli fizjologicznej i Dianeal 1,36% na funkcję komórek mezotelium zastosowano model, w którym hodowle poddano godzinnej preinkubacji z badanymi substancjami, a następnie 24-godzinnej ekspozycji na standardowe medium hodowlane (faza regeneracji). Tak zaprojektowane doświadczenie posłużyło analizie możliwości wykorzystania powyższych roztworów podczas śródoperacyjnego płukania jamy otrzewnej, gdzie ekspozycja na składniki płynów, inaczej niż w warunkach dializy otrzewnowej nie jest długotrwała i przewlekła.

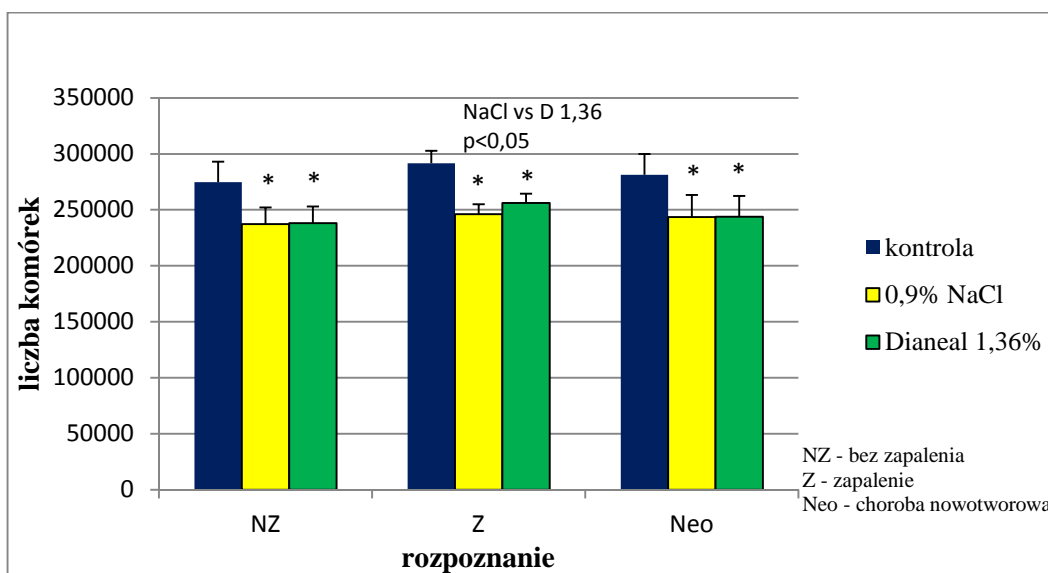
W hodowlach poddanych preinkubacji z 0,9% NaCl oraz Dianeal 1,36% obserwowano istotne zmniejszenie liczby komórek we wszystkich grupach wiekowych i niezależnie od rozpoznania (Ryc. 15A i 15B). W porównaniu z kontrolą, po zastosowaniu 0,9% roztworu soli fizjologicznej zanotowano mniejszą liczbę komórek w hodowlach, pochodzących od pacjentów z grup: A (-16%, $p < 0,0005$); B (-14%, $p < 0,0005$); C (-16%, $p < 0,0005$); D (-8%, $p < 0,05$); E (-19%, $p < 0,0005$); NZ (-14%, $p < 0,0005$); Z (-15%, $p < 0,000001$); Neo (-14%, $p < 0,005$). Liczebność komórek mezotelium po ekspozycji na badany płyn dializacyjny również uległa obniżeniu, względem roztworu kontrolnego w hodowlach we wszystkich analizowanych grupach chorych: A (-8%, $p < 0,05$); B (-15%, $p < 0,05$); C (-17%, $p < 0,0005$); D (-9%, $p < 0,005$), E (-14%, $p < 0,005$), NZ (-13%, $p < 0,005$); Z (-12%, $p < 0,000001$), Neo (-13%, $p < 0,0005$).

Dodatkowo zastosowanie 0,9% roztworu soli fizjologicznej powodowało większy spadek ilości HPMC w porównaniu z Dianeal 1,36% w hodowlach, pochodzących od najmłodszych i najstarszych pacjentów oraz w grupie chorobą zapalną (Z).



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

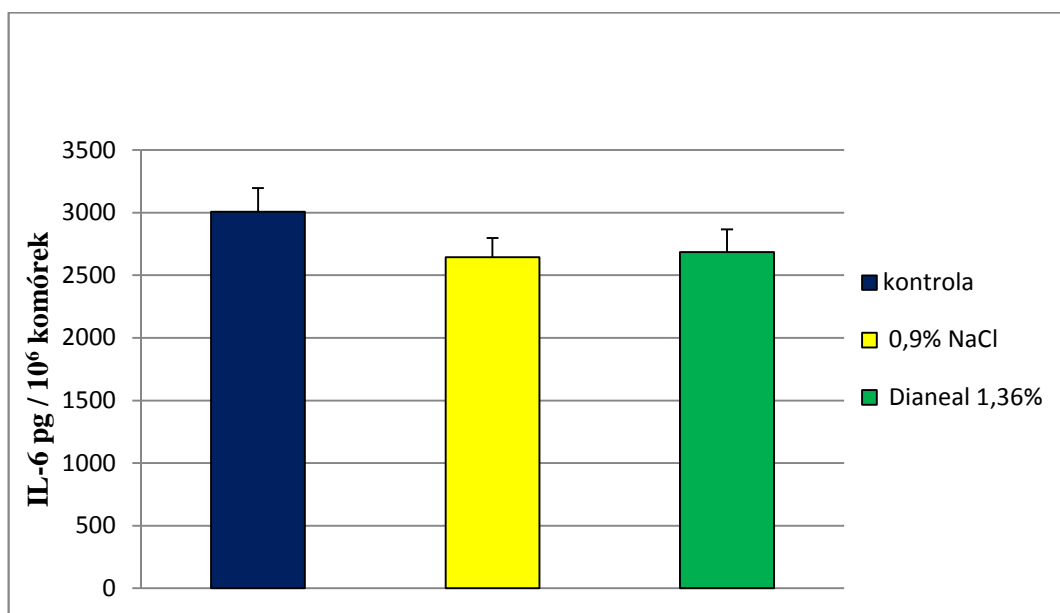
Ryc. 15A. Liczba komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od wieku pacjentów



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 15B. Liczba komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od choroby podstawowej

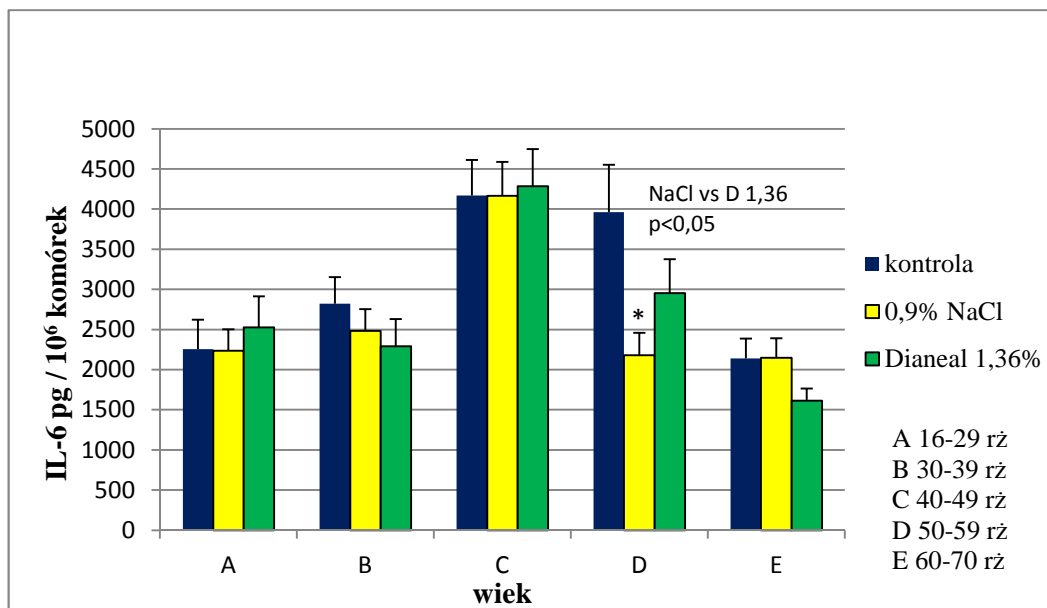
Płyn dializacyjny oraz 0,9% roztwór soli fizjologicznej nie miały istotnego wpływu na ogólny poziom syntezy IL-6 w całej populacji komórek (Ryc. 16A).



Ryc. 16A. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36

Wartości sekrecji IL-6 w hodowlach pod wpływem Dianeal 1,36% rozkładały się bardzo podobnie jak w grupie kontrolnej, wśród chorych ze wszystkich klas wiekowych (Ryc. 16B).

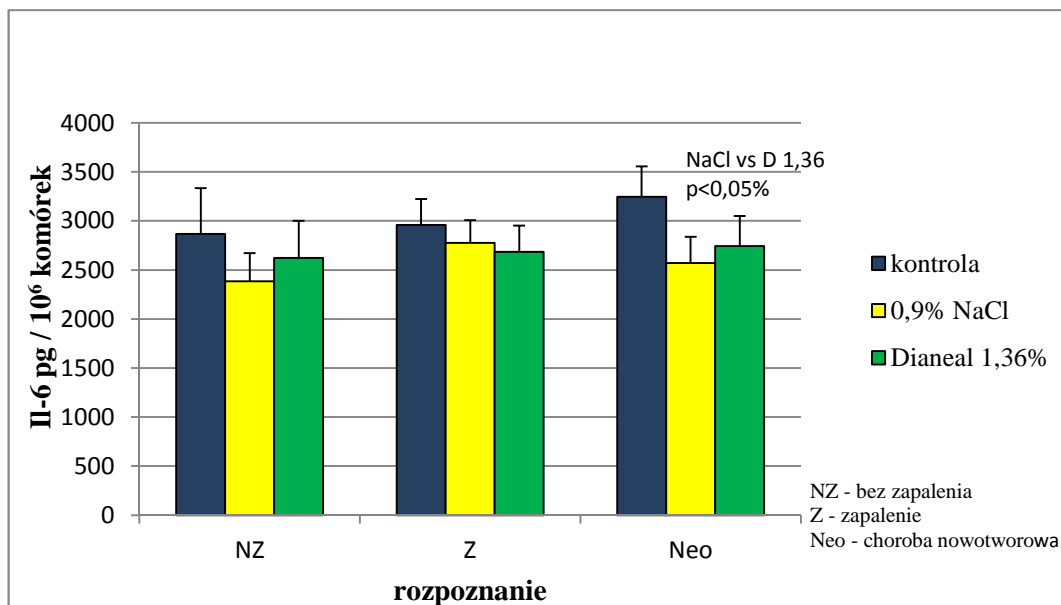
Podobne wyniki uzyskano po zastosowaniu 0,9% roztworu NaCl, jednak wyjątek stanowiły hodowle pochodzące od pacjentów pomiędzy 50-59 rż (C), gdzie obserwowano znamiennej statystycznie redukcję syntezy IL-6 o 45% w porównaniu z kontrolą (Ryc. 16B). Ponadto HPMC od dawców z tego przedziału wiekowego okazały się bardzo wrażliwe na wpływ 0,9% roztworu soli fizjologicznej, reagując 26% zmniejszeniem produkcji IL-6 w porównaniu z komórkami wstępnie inkubowanymi z Dianeal 1,36%.



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

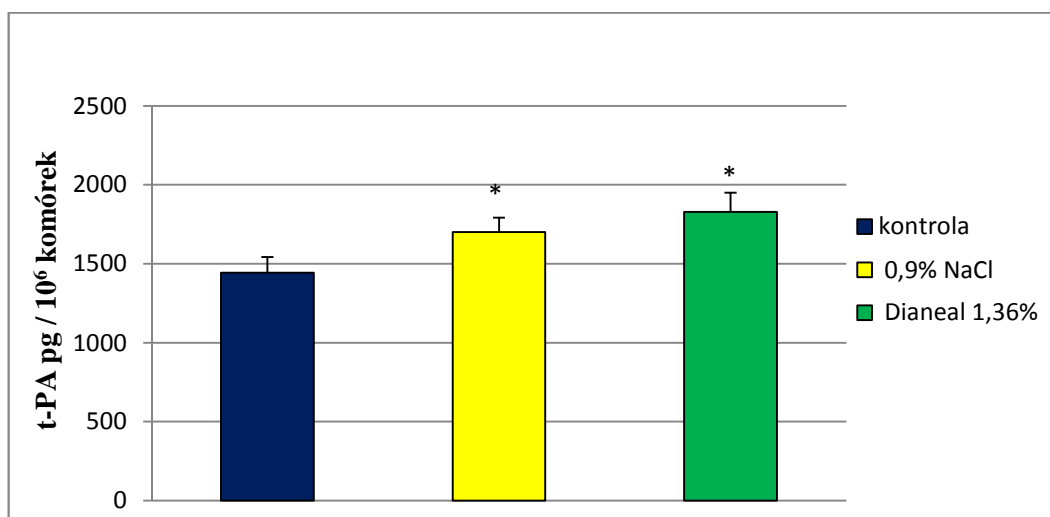
Ryc. 16B. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od wieku pacjentów

Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w poziomach IL-6 po zastosowaniu 0,9% NaCl, Dianeal 1,36% oraz medium kontrolnego w hodowlach pacjentów w zależności od choroby zasadniczej (Ryc. 16C). Jedynie komórki izolowane od osób z rozpoznaniem procesu nowotworowego, wykazywały obniżoną o 7% syntezę IL-6 pod wpływem ekspozycji na 0,9% roztwór soli fizjologicznej w porównaniu z płynem dializacyjnym.



Ryc. 16C. Synteza IL-6 przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od choroby podstawowej

Zarówno roztwór soli fizjologicznej jak i płyn dializacyjny powodowały efekt stymulujący syntezę t-PA w całej badanej populacji komórek (Ryc. 17A).

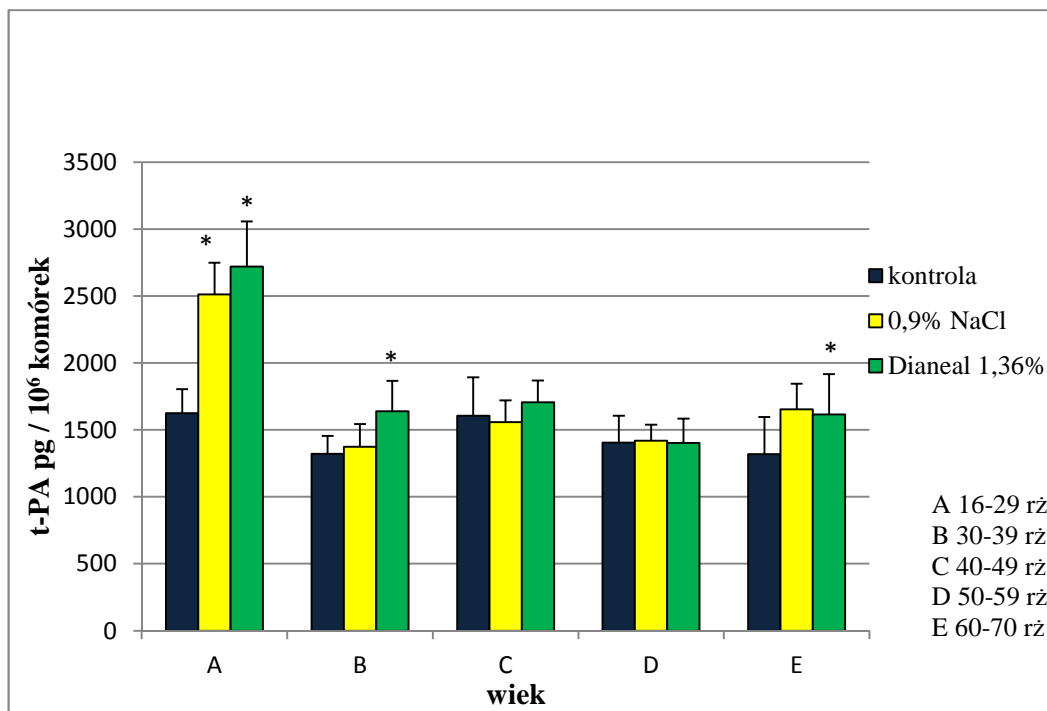


* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 17A. Synteza t-PA przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36

Inaczej niż w grupie kontrolnej, komórki izolowane od najmłodszych pacjentów wykazywały znamienne wyższą sekrecję t-PA pod wpływem 0,9% roztworu NaCl i Dianeal 1,36%. Stymulujący efekt soli fizjologicznej skutkowało zwiększeniem produkcji t-PA w hodowlach w grupie A w porównaniu z B, C, D i E odpowiednio o 45% ($p=0,0005$); 38% ($p<0,005$); 43% ($p<0,05$); 34% ($p<0,05$). Również po zastosowaniu płynu dializacyjnego wzrost syntezy t-PA w HPMC pobranych od najmłodszych osób był prawie dwukrotny w stosunku do starszych chorych: A vs B (+40%, $p<0,05$); A vs D (+48%, $p<0,05$); A vs E (+40,6%, $p<0,05$).

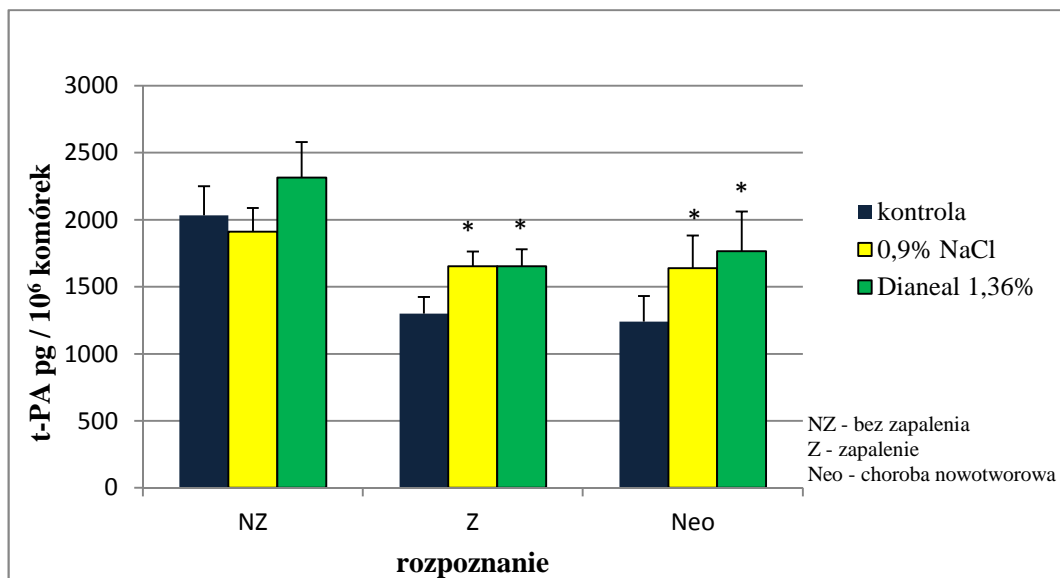
W porównaniu z kontrolą, w grupie A obserwowano o 35% wyższy poziom sekrecji t-PA w komórkach poddanych wstępnej inkubacji z 0,9% roztworem NaCl, oraz o 40% wyższy po zastosowaniu Dianeal 1,36% (Ryc. 17B). Płyn dializacyjny stymulował ponadto wydzielanie t-PA w hodowlach pacjentów pomiędzy 30 a 39 rż (+20%) oraz 60 a 70 rż (+18%) w odniesieniu do komórek z grupy kontrolnej. Nie wykazano różnic w wielkości syntezy t-PA, porównując wpływ Dianeal 1,36% oraz 0,9% NaCl w poszczególnych klasach wiekowych.



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 17B. Synteza t-PA przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od wieku pacjentów

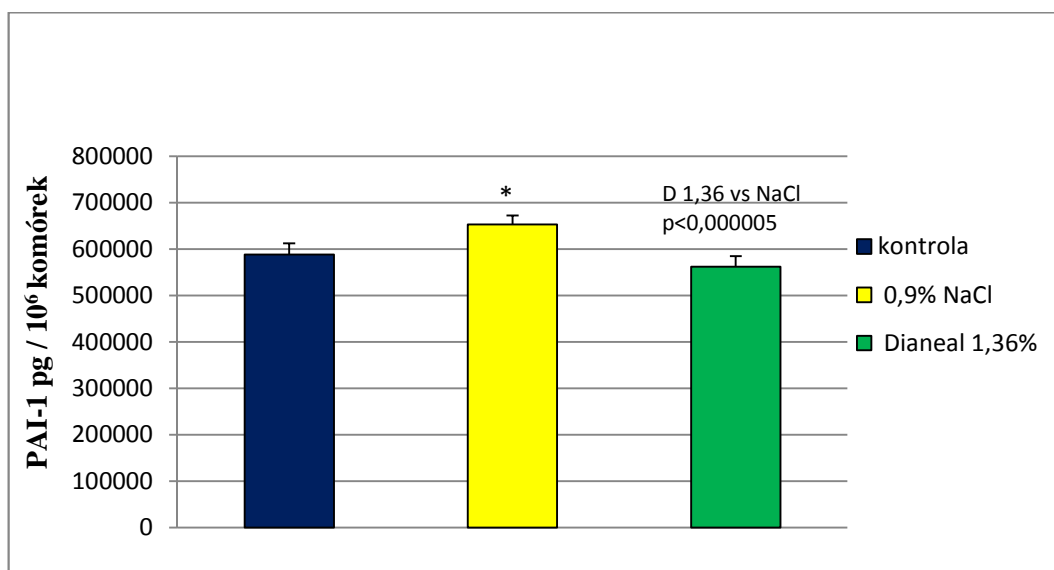
Podczas gdy wartości t-PA w hodowlach komórek izolowanych od osób, u których śródoperacyjnie nie stwierdzono stanu zapalnego (NZ), nie różniły się istotnie pod wpływem zastosowanych roztworów, HPMC uzyskane od pacjentów z zapaleniem (Z) oraz chorobą nowotworową (Neo), poddane działaniu 0,9% roztworu soli fizjologicznej, wykazywały odpowiednio o 21% i 24% wyższe poziomy t-PA, w porównaniu z kontrolą (Ryc. 17C). Płyn dializacyjny również wywoływał efekt stymulujący w powyższych grupach: Z (+21%), Neo (+30%). Porównując między sobą wpływ działania obydwu roztworów, różnice w wielkości produkcji t-PA nie osiągnęły istotności statystycznej.



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 17C. Synteza t-PA przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od choroby podstawowej

Pod wpływem 0,9% roztworu NaCl komórki mezotelialne wykazywały znamienne wyższą produkcję PAI-1 w porównaniu z kontrolą i grupą, w której stosowano płyn dializacyjny (Ryc. 18A).



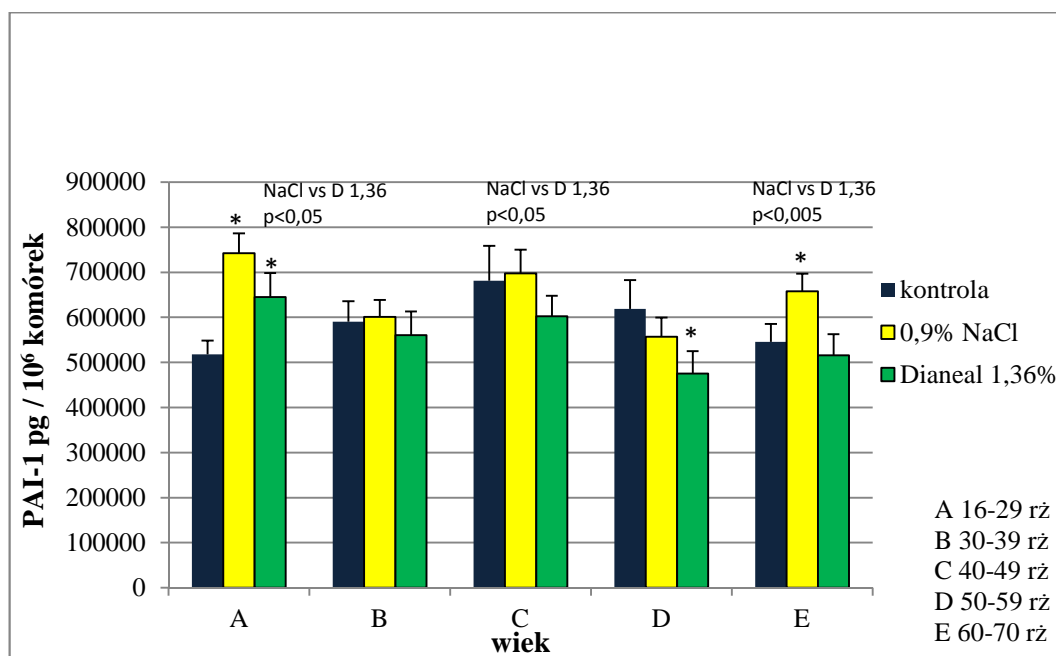
* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 18A. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36

Stymulujący wpływ 0,9% roztworu soli fizjologicznej był zauważalny w odniesieniu do syntezy PAI-1 w hodowlach, uzyskanych od chorych ze skrajnych grup wiekowych. Produkcja PAI-1 przez komórki mezotelium od najmłodszych (A) i najstarszych (E) pacjentów była odpowiednio o 30% i 17% wyższa w porównaniu z kontrolą (Ryc. 18B).

Podobnie Dianeal 1,36% wykazywał efekt pobudzający sekrecję PAI-1 przez HPMC izolowane jedynie od najmłodszych osób (+20% vs kontrola). Natomiast w hodowlach w pozostałych grupach wiekowych obserwowano tendencję do redukcji wydzielania inhibitora fibrynolizy, ale efekt ten był istotny statystycznie tylko w odniesieniu do grupy D, gdzie zanotowano zmniejszenie poziomu PAI-1 o 23% w porównaniu z kontrolą.

Po wstępnej inkubacji z płynem dializacyjnym, w porównaniu z roztworem soli fizjologicznej obserwowano istotnie mniejsze wartości PAI-1 w grupach: A (-13%), C (-13%) i E (-21%).



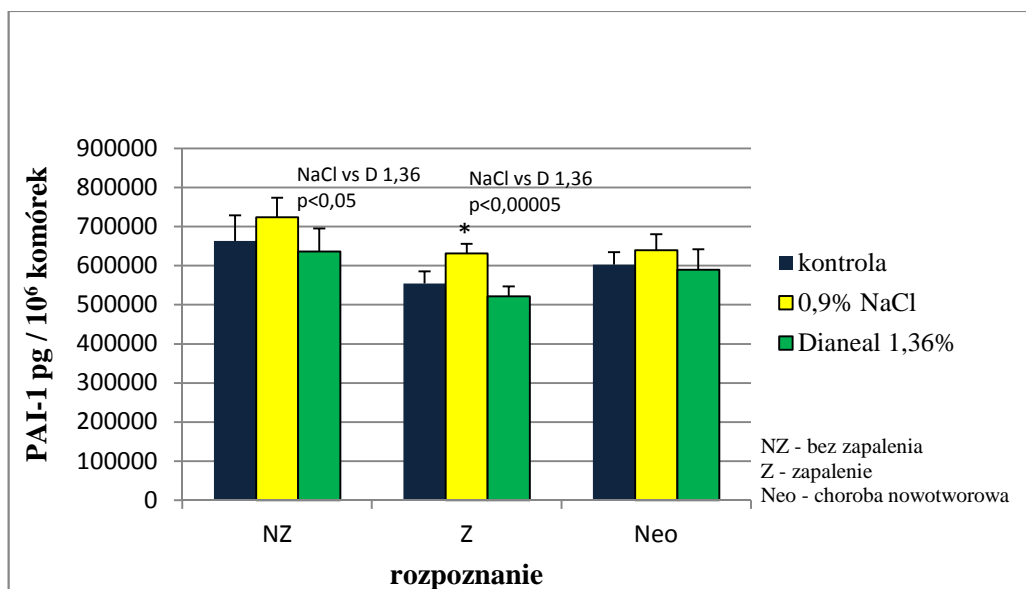
* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 18B. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od wieku pacjentów

W odniesieniu do komórek grupy kontrolnej, preinkubacja z płynem dializacyjnym nie wpłynęła znamienne na wartości PAI-1, niezależnie od rozpoznania. HPMC pobrane od pacjentów z chorobą zapalną (Z) produkowały o 12% więcej inhibitora aktywatora plazminogenu pod wpływem ekspozycji na 0,9% NaCl, w porównaniu z kontrolą (Ryc. 18C).

Analizując efekt wywierany przez obydwie substancje zauważono, że 0,9% roztwór soli fizjologicznej stymulował sekrecję PAI-1 w hodowlach uzyskanych od chorych Z oraz NZ odpowiednio o 17% i 12% w porównaniu z hodowlami poddanymi działaniu Dianeal 1,36%. Jedynie hodowle HPMC pacjentów z

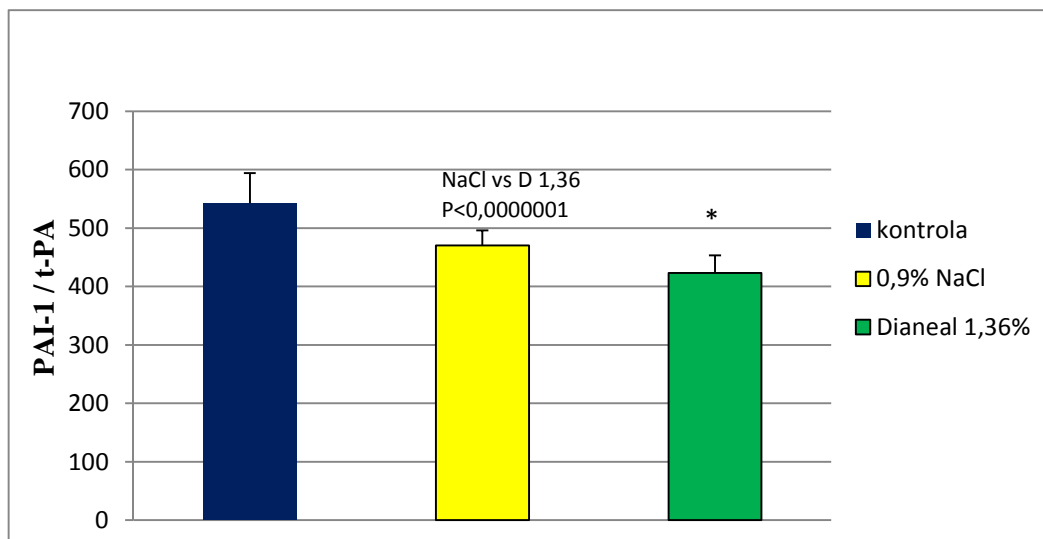
rozpoznaniem nowotworu nie różniły się istotnie pod względem poziomu PAI-1, bez względu na rodzaj substancji zastosowanej podczas inkubacji.



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 18C. Synteza PAI-1 przez komórki mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od choroby podstawowej

Roztwór soli fizjologicznej nie wykazywał wpływu na zmiany aktywności fibrynolitycznej mierzonej wielkością indeksu PAI-1/t-PA w ogólnej populacji komórek, w odróżnieniu do płynu dializacyjnego, który powodował zwiększenie fibrynolizy w porównaniu z grupą, w której zastosowano 0,9% NaCl oraz kontrolą (Ryc. 19A).



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 19A. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36

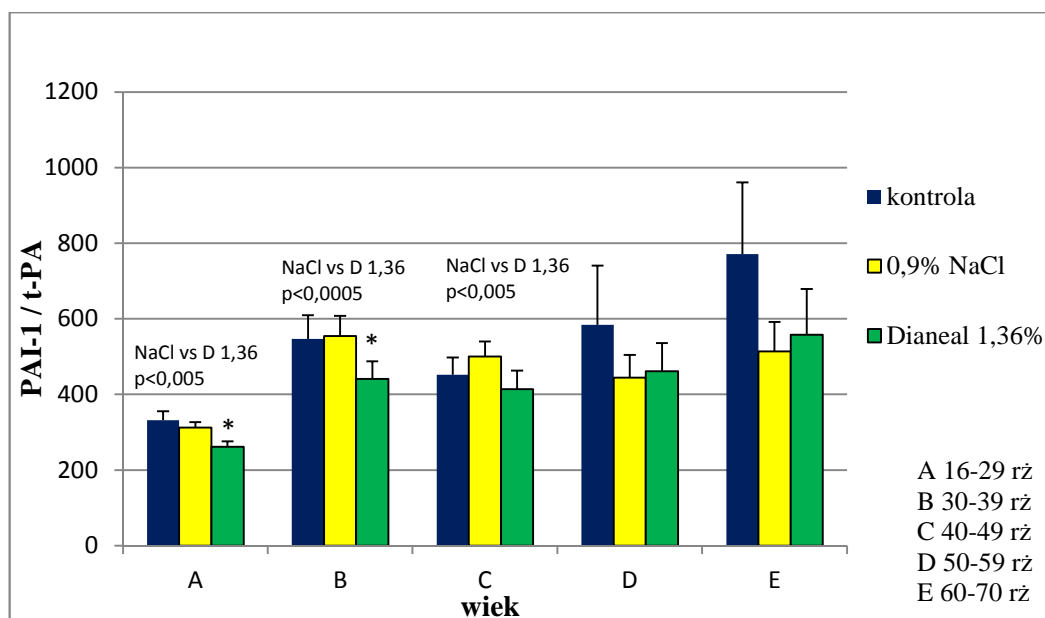
Po ekspozycji na standardowe medium hodowlane nie obserwowano statystycznie istotnych zmian w wartościach t-PA, PAI-1 oraz PAI-1/t-PA w hodowlach niezależnie od wieku dawcy. Godzinna inkubacja z 0,9% roztworem NaCl i Dianeal 1,36% stymulowała znamienne komórkową sekrecję t-PA wśród najmłodszych pacjentów i konsekwentnie powodowała wyraźne zmniejszenie wartości indeksu PAI-1/ t-PA w tej grupie, w stosunku do starszych dawców (tabela 2).

Tabela 2. Porównanie wartości indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium w poszczególnych grupach wiekowych w zależności od zastosowanego roztworu

0,9% NaCl	Dianeal 1,36%
A vs B (- 43%), p<0,005	A vs B (- 40%), p<0,005
A vs C (- 38%), p<0,005	A vs D (- 43%), p<0,05
A vs E (- 40%), p<0,05	A vs E (- 53%), p<0,005

W porównaniu z kontrolą, wartości indeksu PAI-1/t-PA dla HPMC po godzinnej ekspozycji z 0,9% roztworem NaCl nie różniły się statystycznie w pięciu kategoriach wiekowych. Natomiast pod wpływem płynu dializacyjnego zanotowano zmniejszenie ilorazu PAI-1/t-PA w hodowlach, pochodzących od młodych pacjentów z grup wiekowych A (16-29 rż) i B (30-39 rż) odpowiednio o 22% i 20% w odniesieniu do kontroli (Ryc.19B).

Znamiennie niższe poziomy PAI-1/t-PA obserwowano także w hodowlach dawców pomiędzy 16 a 49 rż, pod wpływem Dianeal 1,36% w porównaniu z zastosowaniem 0,9% NaCl. Wartość indeksu była mniejsza w grupach A, B oraz C odpowiednio o 16%, 20% i 17%.



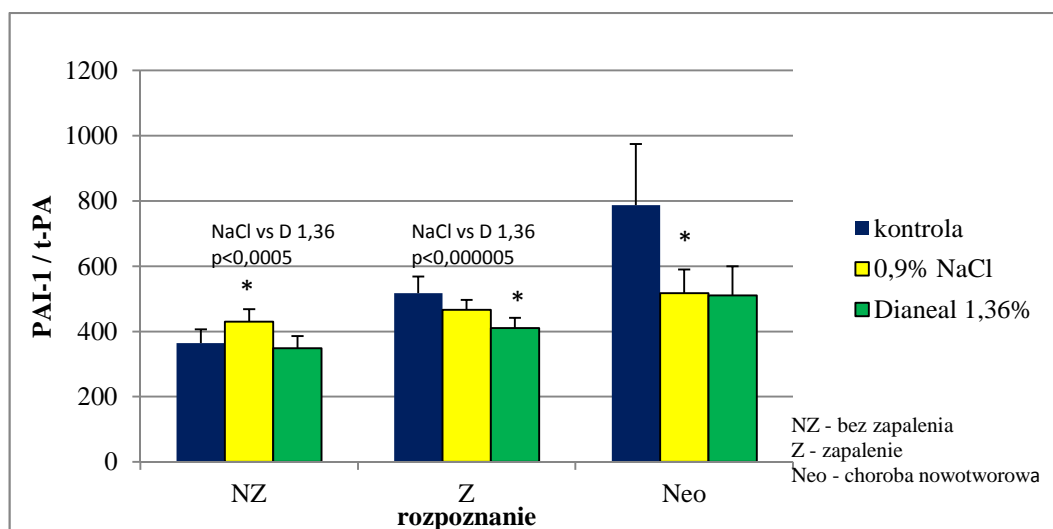
* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 19B. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od wieku pacjentów

Hodowle pochodzące od chorych, u których nie stwierdzono zapalenia, charakteryzowały się wyższym o 15% ilorazem PAI-1/t-PA po ekspozycji na 0,9% roztwór soli fizjologicznej w porównaniu z kontrolą. Odwrotnie, w przypadku hodowli uzyskanych od pacjentów z rozpoznaniem nowotworu obserwowano niższe o 34% poziomy indeksu, głównie za sprawą wyższej w tej grupie sekrecji t-PA w porównaniu z kontrolą (Ryc. 19C).

HPMC izolowane od chorych z zapaleniem i poddane preinkubacji z Dianeal 1,36%, charakteryzował niższy o 20% niż w grupie kontrolnej poziom ocenianego indeksu. W hodowlach od osób bez odczynu zapalnego różnice w wartości PAI-1/t-PA nie były znamienne, natomiast wskaźnik obliczony dla komórek mezotelium, pochodzących od pacjentów z chorobą nowotworową był mniejszy po zastosowaniu Dianeal 1,36% w odniesieniu do grupy kontrolnej, jednak efekt ten nie osiągnął statystycznej istotności ($p=0,07$).

Pod wpływem inkubacji z płynem dializacyjnym w odniesieniu do ekspozycji na 0,9% roztwór NaCl, wykazano istotnie niższe wartości PAI-1/t-PA w grupach dawców z chorobą zapalną jak i bez, odpowiednio o 12% i 19%. Za powyższy efekt odpowiedzialna jest obniżona synteza PAI-1 w tych hodowlach pod wpływem Dianeal 1,36%.



* oznacza statystycznie istotną różnicę w odniesieniu do komórek grupy kontrolnej

Ryc. 19C. Wartość indeksu PAI-1/t-PA dla komórek mezotelium po ekspozycji na standardowe medium hodowlane (kontrola) oraz godzinnej preinkubacji z solą fizjologiczną i Dianeal 1,36 w zależności od choroby podstawowej

5. DYSKUSJA

W ciągu ostatnich lat obserwujemy wzrost liczby interwencji chirurgicznych, wykonywanych w grupie starszych pacjentów, nie tylko ze wskazań nagłych, związanych z bezpośrednim zagrożeniem życia, ale także w przypadkach, kiedy planowy zabieg operacyjny ma na celu poprawę jakości życia chorego. Kwalifikacja do operacji rekonstrukcji przewodu pokarmowego po resekcji esicy sposobem Hartmann'a, czy plastyki dużej przepukliny brzusznej u 70-letniego pacjenta, może okazać się problematyczna a decyzje terapeutyczne, zarówno ze strony zespołu chirurgicznego jak i samego chorego często są trudne, ze względu na współistniejące schorzenia i związane z tym ryzyko operacyjne.

Niedocenianym i nie w pełni wyjaśnionym zjawiskiem jest fakt wpływu wieku dawcy na funkcję komórek mezotelium i związany z tym proces regeneracji otrzewnej po urazie operacyjnym. W części doświadczeń potwierdzono odwrotną zależność pomiędzy wiekiem kalendarzowym pacjenta a potencjałem proliferacyjnym różnych komórek, między innymi HPMC oraz fibroblastów (19), (103), (104). Z kolei badania Cristofalo i wsp. (105) nie udowodniły powyższego związku sugerując, że zdolność replikacyjna komórek *in vitro* nie odzwierciedla zmian zachodzących *in vivo*, a fizjologiczny wiek komórki nie zawsze odpowiada wiekowi kalendarzowemu pacjenta.

W swojej pracy nie analizowałam potencjału proliferacyjnego komórek mezotelium, skupiając się raczej na ocenie zmian w ich czynności w zależności od wieku dawcy, z uwagi na niewielką liczbę doniesień literaturowych na ten temat. Zmniejszone poziomy IL-6 obserwowałam w skrajnych grupach chorych: do 29 oraz powyżej 60 roku życia. Powyższe wyniki są odmienne od uzyskanych przez Nevado i wsp. (106), którzy odnotowali podwyższenie syntezy cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, TNF- α , a także syntazy tlenku azotu NOS (ang. *nitric oxide synthase*) i cyklooksigenazy COX (ang. *cyclooxygenase*), w hodowlach pochodzących od osób powyżej 65 roku życia, wnioskując, że HPMC starszych dawców charakteryzują się zapalnym profilem aktywności. Według badaczy, w powyższy sposób można tłumaczyć mechanizm wielu chorób wieku podeszłego, których wspólnym czynnikiem etiologicznym jest proces zapalny. Możliwe

powody odmienności w uzyskanych przeze mnie wynikach związane są z doborem dawców.

Nevado i wsp. analizowali hodowle pochodzące od 15 chorych, gdzie w pierwszej grupie, poniżej 65 roku życia znalazło się 11 pacjentów, ze średnią wieku 46,9 lat, podczas gdy drugą grupę, powyżej 65 roku życia stanowiło 4 dawców ze średnią wieku 76 lat. Porównanie właściwie dotyczyło średniej grupy wiekowej z osobami w wieku podeszłym. W analizowanym przeze mnie materiale w najmłodszej grupie 10 pacjentów średnia wieku wynosiła 22,6 lat, a najstarsza składała się z 11 osób, ze średnią wieku 63,7 lat, w tym tylko trzech chorych powyżej 65 roku życia. Ponadto, inaczej niż Nevado, w hodowlach uzyskanych od najstarszych i najmłodszych osób nie obserwowałam statystycznie istotnych różnic pod względem generacji wolnych rodników tlenowych. Możliwe, że prozapalny fenotyp komórek mezotelium nie jest wprost proporcjonalnie zależny od wieku dawcy, ale w myśl zasad cytogerontologii, za jego powstanie odpowiada głównie tzw. starzenie komórkowe, związane z nagromadzeniem uszkodzeń, obniżeniem zdolności mitotycznej i innymi nie do końca poznanymi czynnikami.

Z kolei Książek i wsp. (107) w badaniach z wykorzystaniem hodowli HPMC zaobserwowali obniżenie potencjału replikacyjnego komórek izolowanych od dawców powyżej 75 roku życia, a także zwiększoną kumulację 8-OH-dG (8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny), markera uszkodzenia DNA zależnego od stresu oksydacyjnego. Ciekawy wynik dotyczył porównania zdolności do generacji wolnych rodników tlenowych przez HPMC osób poniżej 25 roku życia z grupą powyżej 75 roku życia, gdzie nie wykazano istotnych statystycznie różnic, podobnie jak w moich doświadczeniach, mimo że autorzy analizowali zdecydowanie starszą grupę chorych. W warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego t-BHP (wodoronadtlenkiem tert-butylu), widoczny był wzrost generacji FR podobny w obydwu grupach, jednak w hodowlach uzyskanych od młodych pacjentów poziom FR powracał do wartości wyjściowych po 12 godzinach, podczas gdy HPMC starszych osób charakteryzowały utrzymujące się wysokie wartości wykładników stresu oksydacyjnego.

Interesującą obserwacją okazał się brak wykazanych przeze mnie znamienych różnic w aktywności β -galaktozydazy w hodowlach w poszczególnych kategoriach wiekowych. Dimri i wsp. (102) oznaczając wskaźnik β -Gal w fibroblastach i keratynocytach doszli do wniosku, że nie jest to marker

uniwersalny, ale przydatny w ocenie biologicznego potencjału replikacyjnego samych komórek, który nie zawsze jest jednoznaczny z wiekiem kalendarzowym dawcy, co może uzasadniać uzyskane przeze mnie wyniki.

Zastanawiający może być brak zależności pomiędzy rodzajem procesu chorobowego a wielkością komórkowej produkcji IL-6, powszechnie uważanej za cytokinę prozapalną, odpowiedzialną za indukcję syntezy wielu białek ostrej fazy: fibrynogenu, haptoglobiny, α_1 -antytrypsyny czy białka C-reaktywnego (108). Sekrecja IL-6 przez komórki mezotelium stymulowana jest przez substancje kluczowe dla stanu zapalnego - IL-1 β , TNF α , a także przez dializat, pochodzący od pacjentów z peritonitis (8), (109). Konsekwentnie więc należałoby się spodziewać podwyższonego poziomu tej cytokiny w analizowanej grupie osób z chorobami zapalnymi jelit oraz z zapaleniem otrzewnej. Jednak w warunkach *in vivo* współdziałanie między poszczególnymi cytokinami jest złożone i wielokierunkowe. W części doniesień podkreśla się przeciwzapalne właściwości IL-6, polegające na hamowaniu syntezy IL-1 i TNF α oraz stymulacji produkcji ich antagonistów (110), (111), (112).

Poza tym wśród analizowanych 28 pacjentów z śródoperacyjnie stwierdzonym procesem zapalnym, u 9 osób wskazaniem do interwencji chirurgicznej było wrzodziejące zapalenie jelita grubego bądź choroba Leśniowskiego-Crohna. Powyższa grupa chorych była przez okres wielu lat leczona zachowawczo z zastosowaniem sterydów i immunosupresji, czym można tłumaczyć niższy niż spodziewany poziom IL-6.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie t-PA oraz PAI-1 w zależności od wieku dawcy, jednak zauważono trend w kierunku wyższych wartości t-PA w hodowlach pochodzących od najmłodszych pacjentów, w porównaniu z osobami powyżej 60 roku życia. Obliczony dla poszczególnych grup indeks PAI-1/t-PA okazał się najmniejszy wśród chorych do 29 roku życia, aczkolwiek wynik był na granicy istotności (A vs E, $p=0,050724$).

Spodziewany i zgodny z wynikami innych autorów (26), (113), (114), (115), (116) jest obserwowany przeze mnie wpływ wewnątrztrzewnowego procesu zapalnego na zmniejszenie syntezy t-PA. Ponadto w hodowlach komórek endotelium inkubowanych z endotoksynami bakteryjnymi, TNF α oraz IL-1, Emeis i wsp. (117) odnotowali zwiększenie produkcji PAI-1. Nie obserwowałam podwyższonej sekrecji PAI-1 w hodowlach pacjentów z zapaleniem w stosunku do

dwóch pozostałych grup, być może wynika to z faktu jego związania w kompleksy z t-PA, jednak zdolność fibrynolityczna, mierzona niską wartością indeksu PAI-1/t-PA okazała się najwyższa wśród chorych bez stwierdzonego procesu zapalnego otrzewnej. Początkowo, w warunkach peritonitis niedostateczna fibrynoлиза i nadmierne odkładanie włókniaka ma podstawowe znaczenie w ograniczaniu ogniska zakażenia, jednak w przypadku chorób zapalnych jelit, a w szczególności choroby Leśniowskiego-Crohna może w znacznym stopniu nasilać powstawanie masywnych zrostów, silnie sklejających poszczególne pętle jelitowe i powodujących konieczność poszerzenia planowanej resekcji jelita.

Do lat 90. XX wieku w środowisku chirurgicznym panował raczej pesymistyczny pogląd na problematykę prewencji pooperacyjnych zrostów. Świadczy o tym niewielka liczba prac zarówno klinicznych jak i eksperymentalnych poruszających to zagadnienie. Doświadczenia ostatnich lat pozwoliły jednak na wyjaśnienie części mechanizmów prowadzących do powstania zrostów otrzewnowych, głównie w odniesieniu do znaczenia reakcji zapalnej i układu fibrynolizy. Z pozoru błahe elementy jak rodzaj użytych szwów (118), gazików (119), czy rękawic chirurgicznych (120), a także właściwa technika operacyjna z uwzględnieniem dyskutowanego od wielu lat wpływu peritonizacji (121), (122), (123), odgrywają rolę w procesie tworzenia zrostów. Zmiany w sposobie myślenia i nastawieniu chirurgów oraz ginekologów indukują rozwój przemysłu farmaceutycznego w poszukiwaniu substancji barierowych spełniających funkcję antyzrostową. Wątpliwe, że nagle pojawi się środek, który zupełnie wyeliminuje problem powikłań zrostowych, jednak nie umniejsza to znaczenia słusznego kierunku badań.

Analizowanym przeze mnie materiałem kompozytowym o potencjalnym działaniu antyadhezjogennym była stosowana w chirurgii przepuklin siatka Proceed[®], której powleczenie bezpośrednio przylegające do jamy otrzewnej stanowi utleniona regenerowana celuloza. ORC stosowana jest również z dobrymi wynikami (124), (125) jako samodzielny preparat przeciwarzrostowy, dopuszczony do użytku przez FDA (ang. *Food and Drug Administration, USA*) w 1989 roku pod nazwą Interceed[®].

Większość eksperymentów z użyciem badanej siatki kompozytowej wykorzystuje modele zwierzęce w ocenie jej potencjału przeciwarzrostowego i reakcji otrzewnej. Zgodnie z moją wiedzą nie opisywano do tej pory w literaturze

wpływu powyższej siatki na funkcje komórek mezotelium w hodowlach in vitro. W dwóch doniesieniach materiał badawczy stanowiły hodowle HPMC poddane działaniu preparatu Interceed® (85), (139).

Medium ze składnikami badanej siatki powodowało zmniejszenie poziomu IL-6 w hodowlach od najmłodszych pacjentów do 29 roku życia oraz w przedziale 40-49 lat, co mogłoby sugerować przeciwzapalny wpływ substancji, jakkolwiek powszechnie wiadomo, że implanty stosowane w chirurgii jako ciała obce wzbudzają silną reakcję zapalną. Ilustracją indukcji miejscowego stanu zapalnego pod wpływem polipropylenu mogą być badania Di Vita i wsp. (126), którzy oceniali wartości IL-1, IL-6, IL-10 oraz IL-1 ra (ang. *IL-1 receptor antagonist*). Wśród chorych, którym implantowano siatkę odnotowano wyższe poziomy prozapalnej IL-1, podczas gdy grupa, poddana tylko zeszytciu powięzi charakteryzowała się większymi stężeniami cytokin przeciwzapalnych – IL-10, IL-1 ra. Nie wykazano różnic w poziomie IL-6.

Działanie przeciwzapalne kompozytu w odniesieniu do HPMC w analizowanych przeze mnie hodowlach można uznać za korzystne w aspekcie prewencji zrostowej w kontekście prac Di Filippo i wsp. (127), którzy uznali, że stężenie IL-6 w płynie otrzewnowym szczurów koreluje ze stopniem nasilenia pooperacyjnych zrostów, jak również w odniesieniu do innych autorów, którzy również podkreślali wpływ adhezyjogeny powyższej cytokiny (128), (129). Jednak nie należy zapominać, że reakcja jaką powoduje implant dotyczy wszystkich komórek mikrośrodowiska jamy otrzewnej, a nie tylko międzybłonna. Efekt jaki wywiera siatka Proceed® na otrzewną szczurów badał Emans i wsp. (130), obserwując nasiloną reakcję zapalną z obecnością makrofagów oraz komórek olbrzymich nawet 30 dni po implantacji materiału. Emans uznał, że makrofagi fagocytykujące elementy siatki indukują sekrecję cytokin i chemoatraktantów dla fibroblastów, przyczyniając się do nasilenia reakcji zrostotwórczej. W powyższym eksperymencie zrosty oceniane 7 dni po zabiegu było najmniej liczne po zastosowaniu powyższej siatki kompozytowej w stosunku do dwóch pozostałych siatek (polipropylenowej oraz powleczonej niedegradowalnym pirolidonem winylu i metakrylanem butylu – patent własny autorów). Jednak w grupie zwierząt, u których oceny dokonano 30 dni po implantacji obserwowano paradoksalnie znacznie więcej zrostów po zastosowaniu Proceed® w porównaniu do pozostałych, a w szczególności do zwykłej, niepowlekannej siatki polipropylenowej, która nie jest

przeznaczona do wykorzystania wewnątrztrzewnowego z uwagi na możliwe powikłania. Zgodnie z obowiązującą wiedzą w zakresie mechanizmu regeneracji otrzewnej, popartą pracami doświadczalnymi (131), najbardziej newralgiczny okres dla powstania zrostów obejmuje pierwsze siedem dni po operacji, gdyż tyle trwa proces remezotelializacji; w tym kontekście wynik prezentowany przez autorów jest zdumiewający.

Z kolei rezultaty doświadczeń przedstawionych przez Demir'a i wsp. (132) są odmienne od wyników uzyskanych przez Emans'a (130) i korzystne w odniesieniu do analizowanego materiału kompozytowego. W grupie królików, którym implantowano siatkę Proceed[®], obserwowano mniejsze nasilenie zrostów, ocenianych w 14 dobie pooperacyjnej oraz niższy stopień reakcji zapalnej, wyrażonej obecnością ziarniniaków i komórek olbrzymich w porównaniu do zwierząt, operowanych z użyciem materiału polipropylenowego i politetrafluoroetylenowego.

Powyższe obserwacje w odniesieniu do działania przeciwzapalnego kompozytu, mogą być wyjaśnione inhibicją niektórych funkcji makrofagów przez ORC w warunkach *in vivo* (133), (134). Habara i wsp. (133) udowodnili, że utleniona regenerowana celuloza hamuje sekrecję IL-6, metaloproteinaz: MMP-2 i MMP-9 oraz tlenu azotu w liniach mysich makrofagów, aktywowanych przez lipopolisacharyd. Według Reddy'ego i wsp. (134) ORC współzawodniczy z lipopolisacharydem o receptory z grupy *scavenger* na powierzchni makrofagów, w ten sposób blokując uwalnianie niektórych składników macierzy pozakomórkowej, cytokin, w szczególności IL-1 β i czynników wzrostu, bezpośrednio odpowiedzialnych za promowanie angiogenezy i działanie zrostotwórcze. Wykazane przez autorów inhibicyjne działanie ORC na wybrane funkcje makrofagów, a także dodatkowo obserwowane przeze mnie zmniejszenie sekrecji IL-6 w komórkach mezotelium pod wpływem badanej siatki, mogą odpowiadać za jej właściwości antyzrostowe, a z całą pewnością potwierdzają, że kompozyt nie stanowi jedynie bariery separującej wewnątrz otrzewnej ale wykazuje aktywność biologiczną, w związku z czym może powodować reakcję w miejscach odległych od pierwotnej aplikacji.

Proces powstawania zrostów jest skomplikowanym mechanizmem, w który zaangażowanych jest wiele nie w pełni poznanych czynników. Dowodem na to są doświadczenia Gago i wsp. (85), którzy wykazali, że w hodowlach HPMC

eksponowanych na Interceed[®] zwiększa się produkcja czynników o potencjalnym działaniu zrostotwórczym: TGF- β 1 i kolagenu typu I. Problematyczny wydaje się zastosowany przez autorów sposób przygotowania roztworu użytego w eksperymencie, polegający na rozpuszczeniu Interceed[®] w soli fizjologicznej, która również wykazuje samodzielne działanie w stosunku do HPMC, a więc nie jest wykluczone, że mogło to mieć wpływ na uzyskane wyniki. Możliwe też, że produkty rozpadu ORC powodują jeszcze inne zmiany w funkcji komórek mezotelium, które nie znajdują odzwierciedlenia w dotychczas ocenianych parametrach.

Ciekawy wydaje się wpływ składników badanej siatki na hodowle komórek pochodzące od pacjentów z rozpoznaniem nowotworu, gdzie odnotowano blisko dwukrotne obniżenie sekrecji IL-6. Zabieg operacyjny poprzez uruchomienie cytokinowej reakcji zapalnej promuje ekspresję molekuł adhezyjnych na powierzchni HPMC (135), czego konsekwencją w przypadku chorych z procesem neoplastycznym jest zwiększone przyleganie komórek guza do otrzewnej i progresja choroby (136). Płyn wysiękowy z jamy otrzewnej pacjentek z rakiem jajnika charakteryzuje się zwiększonym stężeniem IL-6, które przez niektórych autorów uważane jest za czynnik stymulujący wzrost guza (137), czy obniżający wrażliwość na chemioterapeutyki. Dodatkowo Offner i wsp. (138) wykazali, że IL-1 β i TNF- α indukują o wiele wyższe poziomy sekrecji IL-6 w hodowlach HPMC niż w liniach ludzkich komórek raka jajnika, w konsekwencji to właśnie komórki mezotelium mogą być głównym źródłem powyższej cytokiny w płynie wysiękowym jamy otrzewnej. Hamowanie syntezy IL-6 pod wpływem siatki w tym aspekcie należy uznać za korzystne, a przyszłe kierunki badań nad kontrolowaniem procesu otrzewnowej progresji nowotworowej mogłyby wykorzystać wpływ ORC.

Prezentowane przeze mnie wyniki nie udowodniły, aby działanie przeciwwzrostowe badanego materiału kompozytowego było wywołane zwiększeniem aktywności fibrynolitycznej HPMC. Pod wpływem medium z siatką obserwowano istotny spadek syntezy t-PA w hodowlach we wszystkich grupach wiekowych, z wyjątkiem chorych w przedziale 40-49 lat. Natomiast podwyższona sekrecja PAI-1 dotyczyła komórek izolowanych od pacjentów poniżej 29 oraz powyżej 60 roku życia. Grupa najmłodszych osób była jednak najmniej narażona na obniżenie wydajności fibrynolizy spowodowane składnikami badanej siatki.

Odmienne wyniki zaprezentował Gago i wsp. (139) obserwując wzrost aktywności fibrynolitycznej komórek mezotelium otrzewnowego po 24-godzinnej ekspozycji na Interceed®. Autorzy odnotowali 25% podwyższenie ekspresji t-PA mRNA, podczas gdy produkcja PAI-1 nie uległa zmianie, czego skutkiem był wyższy w porównaniu z kontrolą indeks t-PA/PAI-1. Oceniano hodowle pochodzące tylko od czterech pacjentek i podobnie jak w innych doświadczeniach autorzy uprzednio rozpuszczali badany materiał w 0,9% roztworze NaCl, buforując do pH=7,4. Podstawową różnicą było wykorzystanie w eksperymencie Gago i wsp. (139) Interceed®, podczas gdy moje badania dotyczyły wpływu siatki Proceed®, która oprócz ORC zawiera jeszcze polidwuoksanon oraz polipropylen.

W żadnym z powyższych doświadczeń autorzy nie obserwowali zmian morfologicznych HPMC, mogących sugerować toksyczny wpływ utlenionej regenerowanej celulozy. W przypadku analizowanych przeze mnie hodowli dodatkowo wykazano, że pod wpływem badanej siatki kompozytowej liczba komórek mezotelium ulega zwiększeniu, co również może mieć znaczenie w szybszej remezotelializacji w krytycznej dla powstawania zrostów fazie pierwszych dni po operacji.

Śródoperacyjne płukanie jamy brzusznej jest rutynowo stosowaną praktyką, której znaczenie z uwagi na dużą powszechność bywa często niedoceniane. Głównym zadaniem płynów podanych dootrzewnowo jest usunięcie martwiczych tkanek, krwi a także zmniejszenie kontaminacji w warunkach zapalenia otrzewnej. Jednak większość wykorzystywanych w tym celu substancji wykazuje toksyczne oddziaływanie w stosunku do komórek mezotelium, polegające na uszkodzeniu ich struktury bądź funkcji (70), (142), (143). Badania Edmiston (140) udowodniły, że bakterie ulegają szybkiej adhezji do komórek mezotelium, a irygacja nie zapewnia ich eliminacji. Walka z zakażeniem wewnątrzbrzusznym nie polega jedynie na mechanicznym usunięciu treści ropnej, raczej na odtworzeniu homeostazy i niezaburzonego funkcjonowania mikrośrodowiska otrzewnej. W tym kontekście nie pozbawiony sensu wydaje się pogląd Platell'a i wsp. (141), którzy uznali, stosowanie irygacji za rytuał pozbawiony biologicznej korzyści. Najbardziej rozpowszechnionym płynem irygacyjnym jest 0,9% roztwór soli fizjologicznej, jednak w części doświadczeń na zwierzętach (143), (145) oraz hodowlach HPMC (70), (142) wykazano jego niekorzystny wpływ, a więc problem wyboru najbardziej biokompatybilnej substancji wciąż pozostaje nierozwiązany.

W analizowanych hodowlach obserwowałam zmniejszenie liczby komórek we wszystkich grupach wiekowych pod wpływem godzinnej inkubacji zarówno z 0,9% roztworem NaCl jak i płynem dializacyjnym Dianeal 1,36%. Van Westreenen i wsp. (142) ponadto wykazali, że już po 15 minutach ekspozycji na roztwór NaCl zmienia się architektura hodowli, HPMC ulegają obkurczeniu, natomiast przy dłuższej ekspozycji dochodzi do rozerwania połączeń międzykomórkowych oraz obnażenia obszarów warstwy podnabłonkowej. Powyższe zamiany struktury niszczą integralność mezotelium, zwiększają jej przepuszczalność dla bogatowłóknikowego przesięku, eksponują głębiej położone warstwy i inicjują kaskadę krzepnięcia. Podobny efekt w powyższym eksperymencie wywoływały inne substancje, m.in. roztwór Hartmann'a (zbliżony w składzie do mleczanu Ringera), 1% roztwór powidyny, 0,02% roztwór chlorheksydyny. Autorzy wykazali ponadto ich bezpośrednio cytotoksyczne działanie, mierzone zwiększonym stężeniem LDH.

Z kolei Yao i wsp. (143) udowodnili, że irygacja jamy otrzewnej szczurów z użyciem 0,9% roztworu NaCl powoduje zmniejszenie liczby komórek międzybłonna, dodatkowo nasilone gdy irygacja ma miejsce w warunkach zapalenia otrzewnej. Efekt ten jest przejściowy, po 43 godzinach nie obserwowano różnic w liczebności HPMC u zwierząt, u których stosowano irygację względem grupy kontrolnej, gdzie nie wykonywano płukania. W opinii autorów jest to wynikiem aktywacji pierwotnych komórek mezenchymalnych. Poza zmniejszeniem liczby HPMC autorzy obserwowali także zmiany w ich funkcji, polegające na zwiększonej ekspresji mRNA dla TNF- α i IL-1 β w komórkach izolowanych od szczurów z indukowanym peritonitis i zastosowaną jednocześnie irygacją, w porównaniu z grupą z zapaleniem otrzewnej. Nasilenie reakcji zapalnej było więc dodatkowo spotęgowane zastosowanym roztworem soli fizjologicznej. Podobnie van Westreenen i wsp. (142) obserwowali wzrost sekrecji IL-8 w hodowlach inkubowanych z 0,9% NaCl. Indukcja reakcji zapalnej w otrzewnej nie jest klinicznie korzystna, w kontekście wyników Holzheimer'a i wsp. (144), którzy udowodnili, że wzrost poziomu m.in. IL-6, IL-1, TNF- α w płynie otrzewnym pacjentów poddanych relaparotomii z powodu zapalenia otrzewnej jest czynnikiem rokowniczo niekorzystnym.

W moim eksperymencie w większości hodowli nie obserwowałam istotnych różnic w produkcji IL-6 w zależności od użytego roztworu, z wyjątkiem komórek

izolowanych od dawców w przedziale 40-49 lat, gdzie poziom IL-6 był zdecydowanie niższy w wyniku godzinnej ekspozycji na 0,9% NaCl. Z kolei Połubińska i wsp. (70) wykazali znamiennej redukcję syntezy IL-6 w HPMC poddanych 6-godzinnej preinkubacji z 0,9% roztworem soli fizjologicznej. Takiego efektu nie odnotowano po zastosowaniu płynu Hanks'a, Earles'a ani płynu dializacyjnego – Gambrosol-Trio[®] 10 (Gambro, Lund, Sweden). Autorzy uważają, że zdolność do produkcji IL-6 przez komórki mezotelium można uznać za miarę jej prawidłowej aktywności. Powyższy efekt potwierdziłam w hodowlach uzyskanych od jednej grupy wiekowej; możliwe, że powodem jest przyjęty przeze mnie krótszy czas preinkubacji, poza tym nie wiadomo jaki był wiek dawców w doświadczeniach autorów, gdyż nie było to przedmiotem analizy.

Nie obserwowałam znamiennego wpływu roztworu soli fizjologicznej na zdolność fibrynolityczną komórek mierzona indeksem PAI-1/t-PA w porównaniu z kontrolą. Jednak analiza powyższego współczynnika w zależności od wieku dawcy udowodniła, że najniższe wartości zanotowano dla najmłodszej grupy pacjentów. Wynika to z podwyższonej pod wpływem 0,9% NaCl produkcji t-PA przez komórki izolowane od osób do 29 roku życia, czego nie obserwowano w innych przedziałach wiekowych. Roztwór soli fizjologicznej jednocześnie stymulował syntezę PAI-1 w tych hodowlach, przypuszczalnie prowadząc do związania t-PA w nieaktywny kompleks, czego efektem jest brak różnicy w wartości indeksu PAI-1/t-PA w porównaniu z kontrolą. Jednak powyższy wynik może sugerować, że proces otrzewnowej fibrynolizy zaburzony w warunkach urazu operacyjnego, jest najbardziej wydajny i najszybciej osiąga równowagę w grupie młodych pacjentów.

Powyższe wyniki są odmienne od uzyskanych przez Połubińską i wsp. (70), którzy wykazali, że 6-godzinna preinkubacja z 0,9% roztworem soli fizjologicznej wpływa hamująco na produkcję zarówno t-PA jak i PAI-1 przez HPMC, co podobnie jak obniżona synteza IL-6 jest miarą funkcjonalnego uszkodzenia komórki. Z kolei Tarhan i wsp. (145) oceniali bioptaty otrzewnej szczurów, u których indukowano proces zrostowy poprzez abrazję kątnicy a następnie zastosowano irygację roztworem 0,9% NaCl lub 0,5% taurolidyny. W próbkach otrzewnej pobranych w 10 dobie po operacji nie obserwowano różnic w poziomie PAI-1, jednak wykazano znamienne wyższe stężenia t-PA w przypadku obydwu grup, u których zastosowano płukanie w porównaniu ze zwierzętami, gdzie nie przeprowadzono żadnej irygacji. W grupie badanej stwierdzono ponadto mniejsze

nasilenie procesu zrostowego. Natomiast rezultaty prac van Westreenen'a i wsp. (146) wskazują na prozrostowe działanie większości płynów w tym 0,9% roztworu soli fizjologicznej w jamie otrzewnej szczurów. Wyniki badań na modelach zwierzęcych muszą być interpretowane ostrożnie w odniesieniu do potencjalnego wpływu badanych substancji na ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego, chociażby z uwagi na międzygatunkowe różnice w kinetyce układu fibrynolitycznego.

W cytowanych już doświadczeniach Połubińska i wsp. (70), sugerują, że najbardziej korzystnym wśród badanych roztworów jest płyn dializacyjny Gambrosol-Trio[®] 10, który nie powodował efektu cytotoksycznego, nie zaburzał produkcji IL-6 w hodowlach i stymulował syntezę t-PA w porównaniu z zastosowanym standardowym medium kontrolnym. W hodowlach preinkubowanych z Dianeal 1,36% obserwowałam zależny od wieku wzrost syntezy t-PA. W grupie pacjentów pomiędzy 16 a 39 rokiem życia odnotowano niższe w odniesieniu do kontroli wartości PAI-1/t-PA. Zjawisko stymulacji uwalniania t-PA przez HPMC pod wpływem glukozy opisali także Sitter i wsp. (147). W kontekście mojej pracy można przypuszczać, że aktywność układu fibrynolitycznego indukowana wpływem glukozy może być dodatkowo modyfikowana przez wiek dawcy. Komórki otrzewnej młodych pacjentów zachowują najwyższy potencjał fibrynolityczny, mający na celu przywrócenie równowagi zaburzonej w warunkach stresu operacyjnego.

Wykorzystanie większości płynów dializacyjnych podczas śródoperacyjnego płukania otrzewnej wydaje się dyskusyjne z uwagi na ich niskie pH (5,0-5,5), hiperosmolarność, wysokie stężenie glukozy i produktów jej rozpadu. Powyższe czynniki w wyniku powtarzalnej ekspozycji na płyny, jak ma to miejsce podczas dializy, są odpowiedzialne za negatywny wpływ na właściwości filtracyjne błony otrzewnowej oraz proliferację, regenerację i funkcje komórek mezotelium, fibroblastów i makrofagów (148), (149).

Idealny roztwór bezpieczny w irygacji dootrzewnowej nie może wykazywać efektu cytotoksycznego ani modyfikować funkcji komórek w niepożądanym kierunku, hamując fibrynolizę i nasilając reakcję zapalną, które odgrywają fundamentalne znaczenie w patogenezie zrostów. Sprawą przyszłości jest połączenie cech idealnie biogodnego roztworu z działaniem antyadhezyjnym. Z pewnością taki efekt nie jest możliwy do osiągnięcia przy

zastosowaniu dostępnych na rynku krystaloidów, gdyż szybkość wchłaniania 30-50 ml/h całkowicie eliminuje te substancje z jamy brzusznej po 24h, a w pełni skuteczny mechanizm prewencyjny powinien separować tkanki potencjalnie narażone na powstanie zrostów w czasie krytycznej fazy remezotelializacji. Pewne nadzieje wiązano z 4% roztworem ikodekstryny (Adept[®], Baxter, Deerfield, IL, USA) z uwagi na łatwość użycia podczas zabiegów laparoskopowych oraz powolną eliminację z jamy otrzewnej, co zapewnia separowanie tkanek w oparciu o zjawisko hydroflotacji, jednak mimo pozytywnych wyników w badaniach randomizacyjnych (150) problem zrostów nie został wyeliminowany. Ponadto zgodnie z zaleceniem producenta Adept[®] nie powinien być używany u pacjentów poddanych resekcji jelita oraz appendektomii, co znacznie ogranicza jego przydatność w grupie chorych operowanych ze wskazań chirurgicznych.

Pierwsza opublikowana informacja dotycząca zastosowania środka zapobiegającego powstawaniu pooperacyjnych zrostów pochodzi z 1886 roku i zaleca dootrzewnowe użycie roztworu soli fizjologicznej (151). Obecnie dysponujemy większą wiedzą i możliwościami oddziaływania na potencjalne szlaki złożonego procesu adhezjogenezy niż Müller ponad 100 lat wcześniej, jednak powikłania zrostowe wciąż są nieodłącznym elementem codziennej praktyki chirurgicznej. Wydaje się, że rozwój nowych metod, być może opartych na terapii genowej, modulującej funkcję komórek mezotelium i makrofagów, oparty będzie na próbie regulacji kluczowych mechanizmów wyzwalanych w odpowiedzi na uraz operacyjny: reakcji zapalnej i wewnątrzotrzewnowej aktywności fibrynolitycznej.

6. WNIOSKI

1. Komórki międzybłonka otrzewnej uzyskane od pacjentów w przedziale wiekowym 30-59 lat wykazują wyższą aktywność zapalną (produkcja IL-6) niż komórki z pozostałych grup wiekowych.
2. Komórki mezotelialne izolowane od osób z chorobami wywołującymi odczyn zapalny lub aktywną chorobą nowotworową w jamie brzusznej charakteryzują się zmniejszoną syntezą t-PA.
3. Badana siatka kompozytowa hamuje produkcję IL-6 w komórkach mezotelialnych, jednak efekt ten nie występuje we wszystkich grupach wiekowych.
4. Analizowany materiał kompozytowy działa hamująco na uwalnianie IL-6 przez komórki mezotelialne uzyskane od pacjentów z aktywnym procesem nowotworowym w jamie brzusznej.
5. Badana siatka wpływa na zmniejszenie aktywności fibrynolitycznej komórek międzybłonka otrzewnej, jednak efekt ten nie jest widoczny we wszystkich grupach wiekowych.
6. Ekspozycja komórek mezotelialnych na hipertoniczny płyn dializacyjny Dianeal 1,36% powoduje wzrost ich aktywności fibrynolitycznej, jednak nie we wszystkich grupach wiekowych.

7. STRESZCZENIE

Zabieg operacyjny wyzwała miejscową reakcję zapalną i zaburzenia równowagi pomiędzy układem krzepnięcia a fibrynolizy w mikrośrodowisku jamy otrzewnej. Zmiany w czynności HPMC indukowane w warunkach stresu operacyjnego i modyfikowane przez indywidualne predyspozycje chorego, odpowiadają za uruchomienie mechanizmów prowadzących do powstania zrostów otrzewnowych i związanych z tym groźnych dla zdrowia powikłań. Celem badań było określenie w jakim stopniu zmienia się czynność mezotelium otrzewnowego w wyniku starzenia organizmu, a także ocena potencjalnego wpływu wieku pacjenta-dawcy oraz choroby podstawowej na modyfikację reakcji komórek mezotelium, w odpowiedzi na śródoperacyjne płukanie jamy otrzewnej 0,9% roztworem NaCl oraz ekspozycję na biodegradowalne elementy badanej siatki kompozytowej. Materiał badawczy stanowiły pierwotne hodowle ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego, uzyskane z fragmentów sieci większej 51 pacjentów w przedziale wieku 16-70 lat. Czynność HPMC oceniano na podstawie poziomu syntezy IL-6, t-PA, PAI-1. Wykazano, że komórki międzybłonka otrzewnej uzyskane od pacjentów w przedziale wiekowym 30-59 lat wykazują wyższą aktywność zapalną, wyrażoną zwiększeniem sekrecji IL-6 niż komórki z pozostałych grup wiekowych. Aktywność fibrynolityczna komórek mezotelium nie zależy od wieku, ale od rodzaju wewnątrzotrzewnowego procesu chorobowego i jest największa w grupie bez zapalenia. Badana siatka kompozytowa wpływa na zmniejszenie aktywności fibrynolitycznej komórek międzybłonka otrzewnej, jednak efekt ten nie jest widoczny we wszystkich grupach wiekowych. W tym kontekście działania przeciwzrostowego powyższej siatki nie można wytłumaczyć zwiększeniem procesu wewnątrzotrzewnowej fibrynolizy. Za korzystne w prewencji zrostowej należy uznać działanie przeciwzapalne kompozytu polegające na zmniejszeniu IL-6, obserwowane w niektórych grupach wiekowych. Pod wpływem płynu dializacyjnego Dianeal 1,36% obserwowano zwiększenie aktywności fibrynolitycznej w hodowlach pacjentów pomiędzy 16 a 39 rokiem życia. Najniższym współczynnikiem PAI-1/t-PA charakteryzowały się hodowle uzyskane od najmłodszych osób, niezależnie od zastosowanego roztworu. W tym kontekście można wnioskować, że proces otrzewnowej fibrynolizy zaburzony w warunkach urazu operacyjnego, jest najbardziej wydajny i najszybciej osiąga równowagę w grupie młodych pacjentów.

SUMMARY

Surgery evokes a local inflammatory response and causes imbalance between the intraperitoneal coagulation and fibrinolytic system. The alterations in HPMC functions induced by surgical stress and modified by individual's predispositions are responsible for a cascade of events leading to adhesion formation and dangerous health-related complications. The aim of the study was to analyze the changes in mesothelial activity as a consequence of the aging process and moreover to evaluate the potential impact of a donor's age and underlying disease on the functional modifications of mesothelial reactions in response to intraoperative peritoneal lavage with 0,9% physiological salt solution, and exposure to the biodegradable elements of the composite prosthetic mesh. Experiments were performed on primary omentum-derived human peritoneal mesothelial cells cultures, obtained from 51 patients (age range 16-70 years). HPMC activity was assessed by a level of IL-6, t-PA, PAI-1 synthesis. It was demonstrated that mesothelial cells derived from donors at the age between 30-59 years are characterized by higher pro-inflammatory activity expressed by stimulation of IL-6 synthesis in comparison with cells obtained from the remaining groups. Fibrinolytic capacity of human mesothelial cells is an age-independent consequence of intraabdominal condition most effective in patients without underlying inflammatory process. Evaluated composite prosthetic mesh attenuates mesothelial fibrinolytic activity however this effect is not present in all the age groups. Consequently its impact on reducing postoperative adhesion cannot be simply explained by the increase in intraperitoneal fibrinolysis. In terms of adhesion prevention, anti-inflammatory properties of above mentioned prosthetic mesh manifested by reduction of IL-6 observed in some of the age groups may be considered beneficial. Dialysis fluid Dianeal 1,36% enhanced fibrinolytic activity in mesothelial cells derived from patients between 16-39 years old. The cultures from the youngest patients were characterized by the significant decrease in the PAI-1/t-PA ratio independently on the type of solution applied. Considering this observation it may be concluded that peritoneal fibrinolytic capacity impaired during surgical trauma is the most effective and quickly reaches a balanced final state in the youngest patients.

8. PIŚMIENICTWO

1. **Whitaker D., Papadimitriou J.M., Walters M.N.** The mesothelium and its reactions. *Crit. Rev. Toxicol.* 1982, 10, pp. 81-144.
2. **Yung S., Coles G.A., Williams J.D., Davies M.** The source and possible significance of hyaluronian in the peritoneal cavity. *Kidney Int.* 1994, 46, strony 527-533.
3. **Bręborowicz A., Korybalska K., Grzybowski A., Wieczorkowska-Tobis K., Martis L., Oreopoulos DG.** Synthesis of hyaluronic acid by human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokines and dialysate. *Perit. Dial. Int.* 1996, 16, strony 374-378.
4. **Casey R.C., Skubitz A.P.** CD44 and betal integrins mediate ovarian carcinoma cell migration toward extracellular matrix proteins. *Clin. Exp. Metastasis.* 2000, 18, strony 67-75.
5. **Catterall J.B., Jones L.M., Turner G.A.** Membrane protein glycosylation and CD44 content in the adhesion of human ovarian cancer cells to hyaluronan. *Clin. Exp. Metastasis.* 1999, 17, strony 583-591.
6. **Jones L.M., Gardner M.J., Catterall J.B., Turner G.A.** Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin. Exp. Metastasis.* 1995, 13, strony 373-380.
7. **Mutsaers S.E.** Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology.* 2002, 7, strony 171-191.
8. **Yung S., Coles G.A., Davies M.** IL-1beta, a major stimulator of hyaluronian synthesis in vitro of human peritoneal mesothelial cells: relevance to peritonitis in CAPD. *Kidney Int.* 1996, 50, strony 1337-1343.
9. **Lai K.N., Szeto C.C., Lai K.B., Lam C.W., Chan D.T., Leung J.C.** Increased production of hyaluronian by peritoneal mesothelial cells and its significance in patients on CAPD. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 33, strony 318-324.
10. **Choong-Leong Tang Jayne D.G., Francis Seow-Choen, Yen-Yee Ng, Kong-Weng Eu, Mustapha N.** A randomized controlled trial of 0,5% ferric hyaluronate gel (Intergel) in the prevention of adhesions following abdominal surgery. *Ann. Surg.* 2006, Tom 243, 4, strony 449-455.
11. **Fazio V.W., Cohen Z., Fleshman J.W., van Goor H, Bauer JJ, Wolf BG, Corman M, Beart RW, Wexner SD, Becker JM, Monson JRT, Kaufman HS, Beck DE, Bailey R, Ludwig KA, Stamos MJ, Darzi A, Bleday R, Dorazio R, Madoff R, Smith LE, Gearhart S, Lillemoe K, Gohl J.** Reduction in adhesive small bowel obstruction by Seprafilm Adhesion Barrier after intestinal resection. *Dis Colon Rectum.* 2005, 49, strony 1-11.
12. **Perfumo F., Altieri P., Degl'Innocenti M.L. et al.** Effects of peritoneal effluents on mesothelial cells in culture: Cell proliferation and extracellular matrix regulation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996, 11, strony 1803-1809.

13. **Offner F.A., Feichtinger H., Stadlmann S., Obrist P., Marth C., Klingler P., Grage B., Schmahl M., Knabbe C.** Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am. J. Pathol.* 1996, 148, strony 1779-1688.
14. **Djafarzadeh R., Sauter M., Notohamiprodjo S., Noessner E., Goyal P., Siess W., Wörhle M., Ribeiro A., Himmelein S., Sitter T., Nelson P.** Recombinant GPI-anchored TIMP-1 stimulates growth and migration of peritoneal mesothelial cells. *PLoS ONE.* 2012, 7 (4), strony 1-10.
15. **Saed G.M., Zhang W., Chegini N., Holmdahl L., Diamond M.P.** Alteration of type I and III collagen expression in human peritoneal mesothelial cells in response to hypoxia and transforming growth factor beta 1. *Wound Repair Regen.* 1999, 7, strony 504-510.
16. **Yang W.S., Kim B.S., Lee S.K., Park J.S., Kim S.B.** IL-1beta stimulates the production of extracellular matrix in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit. Dial. Int.* 1999, 19, strony 211-220.
17. **Holmdahl L., Kotseos K., Bergström M., Falk P., Ivarsson M.L., Chegini N.** Overproduction of transforming growth factor - 1 beta (TGF1beta) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrynolytic impairment. *Surgery.* 2001, Tom 129, 5, strony 626-632.
18. **Lucas P.A., Warejcka D.J., Young H.E., Lee B.Y.** Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor-beta 1. *J. Surg. Res.* 1996, 65, strony 135-138.
19. **Książek K., Winckiewicz M., Staniszewski R., Bręborowicz A., Witowski J.** Correlation between the donor age and the proliferative lifespan of human peritoneal mesothelial cells in vitro: Is TGF-beta 1 a link? *Exper. Geront.* 2007, 42, strony 840-843.
20. **Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F.** Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 2000, 4, strony 1350-1358.
21. **van Hinsbergh V.W., Kooistra T., Scheffer M.A., Hajo vB., van Muijen G.N.** Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood.* 1990, 75, strony 1490-1497.
22. **Pasierski T., Undas A., Zawilska K., Sosnowski C.** *Leczenie przeciwzakrzepowe.* Kraków : Medycyna Praktyczna, 2007.
23. **Vipond M.N., Whawell S.A., Thompson J.N., Dudley H.A.** Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet.* 1990, 335, strony 1120-1122.
24. **Whawell S.A., Wang Y., Fleming K.A., Thompson E.M., Thompson J.N.** Localization of plasminogen activator inhibitor-1 production in inflamed appendix by in situ mRNA hybridization. *J. Pathol.* 1993, 169, strony 67-71.
25. **Holmdahl L., Eriksson E., Al-Jabreen M.** Fibrinolysis in human peritoneum during operation. *Surgery.* 1996, 119, strony 701-705.
26. **Holmdahl L., Eriksson E., Eriksson B.I.** Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma. *Surgery.* 1998, Tom 123, 5, strony 539-544.

27. **Raftery A.T.** Effect of peritoneal trauma on peritoneal fibrynolytic activity and intraperitoneal adhesion formation. *Eur. Surg. Res.* 1981, 13, strony 397-401.
28. **Raftery A.T.** Regeneration of peritoneum: a fibrynolytic study. *J. Anat.* 1979, 129, strony 659-664.
29. **Scott-Coombes D.M., Whawell S.A., Vipond M. N. et al.** The human intraperitoneal fibrinolytic response to elective surgery. *Br. J. Surg.* 1995, Tom 82, 3, strony 414-417.
30. **Holmdahl L., Falkenberg M., Ivarsson M.L., Risberg B.** Plasminogen activators and inhibitors in peritoneal tissue. *APMIS.* 1997, 105, strony 25-30.
31. **Ivarsson M.L., Bergström M., Eriksson E., Risberg B., Holmdahl L.** Tissue markers as predictors of postoperative adhesions. *Br. J. Surg.* 1998, 85, strony 1549-1554.
32. **Falk K., Björquist P., Strömquist M., Holmdahl L.** Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1. *Br. J. Surg.* 2001, 88, strony 286-289.
33. **Orita H., Fukasawa M., Girgis W., diZerega G.S.** Inhibition of postsurgical adhesions in a standardized rabbit model: intraperitoneal treatment with tissue plasminogen activator. *Int. J. Fertil.* 1991, 36, strony 172-177.
34. **Brokelman W.J.A., Lensvelt M., Borel Rinkes I.H.M., Klinkenbijn J.H.G., Reijnen M.M.P.J.** Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. *Surg. Endosc.* 2011, 25, strony 1-9.
35. **Nagelschmidt M., Gerbecks D., Minor T.** The impact of gas laparoscopy on abdominal plasminogen activator activity. *Surg. Endosc.* 2001, 15, strony 585-588.
36. **Brokelman W.J.A., Holmdahl L., Bergström M., Falk P., Klinkenbijn J.H.G., Reijnen H.M.P.J.** Peritoneal fibrinolytic response to various aspects of laparoscopic surgery: a randomized trial. *J. Surg. Res.* 2006, 136, strony 309-313.
37. **Neudecker J., Junghans T., Ziemer S., Raue W., Schwenk W.** Effect of laparoscopic and conventional colorectal resection on peritoneal fibrynolytic capacity: a prospective randomized clinical trial. *Int. J. Colorectal Dis.* 2002, 17, strony 426-429.
38. **van der Wal J.B.C., Jeekel J.** Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. *Colorectal Dis.* 2007, 9 (suppl. 2), strony 9-13.
39. **diZerega G.S., Campeau J.D.** Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum. Reprod. Update.* 2001, Tom 7, 6, strony 547-555.
40. **Elkins T.E., Stovall T.G., Warren J., et al.** A histologic evaluation of peritoneal injury and repair: implications for adhesion formation. *Obstet. Gynecol.* 1987, 70, strony 225-228.
41. **Filmar S., Jeta N., McComb P., et al.** A comparative histologic study on the healing process following tissue transection: Part I. Co2 laser and electromicrosurgery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989, 160, strony 1068-1072.

42. **Arung W., Meurisse M., Detry O.** Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World J. Gastroenterol.* 2011, 17 (41), strony 4545-4553.
43. **diZerega G.S., Rodgers K.** *The Peritoneum.* New York : Springer-Verlag, 1990.
44. **Boermeester M.A., van Leeuwen P., Coyle S.M., et al.** Interleukin-1 blockade attenuates mediator release and dysregulation of the hemostatic mechanism during human sepsis. *Arch. Surg.* 1995, 130, strony 739-748.
45. **van Deventer S.J., Buller H.R., Ten Cate J.W., et al.** Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood.* 1990, 76, strony 2520-2526.
46. **van der Poll T., Levi M., Hack C.E., et al.** Elimination of IL-6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J. Exp. Med.* 1994, 179, strony 1253-1259.
47. **Levi M., van der Poll T., Ten Cate H., et al.** The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanism in sepsis and endotoxemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 1997, 27, strony 3-9.
48. **Stouthard J.M., Levi M., Hack C.E., Veenhof C.H., Romijn H.A., Sauerwein H.P., van der Poll T.** Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb. Haemost.* 1996, 76, strony 738-742.
49. **Hellebrekers B.W.J., Trimbos-Kemper T.C., Boesten L., Jansen F.W., Kolkman W., Trimbos J.B. et al.** Preoperative predictors of postsurgical adhesion formation and the Prevention of Adhesions with Plasminogen Activator (PAPA-study): results of a clinical pilot study. *Fertil. Steril.* 2009, 91, strony 1204-1214.
50. **Weibel M.A., Majno G.** Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery. *Am. J. Surg.* 1973, 126, strony 345-353.
51. **Menzies D., Ellis H.** Intestinal obstruction from adhesions - how big is the problem? *Ann.R.Coll.Surg.Engl.* 1990, 72, strony 60-63.
52. **Diamond M.P., Daniell J.F., Johns D.A., et al.** Postoperative adhesion development following operative laparoscopy: evaluation at early second look procedures. *Fertil.Steril.* 1991, 55, strony 700-704.
53. **Ray N.F., Denton W.G., Thamer M., et al.** Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *J.Am.Coll.Surg.* 1998, 186, strony 1-9.
54. Operative Laparoscopy Study Group: Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: Evaluation at early second look procedures. *Fertil. Steril.* 1991, 55, strony 700-704.
55. **Vrijland W.W., Jeekel J., van Geldorp H.J., et al.** Abdominal adhesions: intestinal obstruction, pain, and infertility. *Surg. Endosc.* 2003, 17, strony 1017-1022.
56. **Ellis H., Moran B.J., Thompson J.N., et al.** Adhesion related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet.* 1999, 353, strony 1476-1480.

57. **Parker M.C., Ellis H., Moran B.J., et al.** Postoperative adhesions: ten year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery. *Dis. Colon. Rectum.* 2001, 44, strony 822-830.
58. **Fazio V.W., Ziv Y., Church J.M., et al.** Ileal pouch-anal anastomoses complications and function in 1005 patients. *Ann. Surg.* 1995, 222, strony 120-127.
59. **McMullen K., Hicks T.C., Ray J.E., et al.** Complications associated with ileal pouch-anal anastomosis. *World J. Surg.* 1991, 15, strony 763-766.
60. **Schnuriger B., Barmparas G., Branco B.C., Lustenberger T., Indaba K., Demetriades D.** Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. *Am. J. Surg.* 2011, 201, strony 111-121.
61. **MacLean A.R., Cohen Z., MacRae H.M., O'Connor B.I., Mukraj D., Kennedy E.D., Parkes R., McLeod R.S.** Risk of small bowel obstruction after the ileal pouch-anal anastomosis. *Ann. Surg.* 2002, 235 (2), strony 200-206.
62. **Zbar R.I., Crede W.B., McKhann C.F., et al.** The postoperative incidence of small bowel obstruction following standard, open appendectomy and cholecystectomy: a six year retrospective cohort study at Yale-New Haven Hospital. *Conn. Med.* 1993, 57, strony 123-127.
63. **Montz F.J., Holschneider C.H., Solh S. et al.** Small bowel obstruction following radical hysterectomy: risk factors, incidence, and operative findings. *Gynecol. Oncol.* 1994, 53, strony 114-120.
64. **Leung T.T., Dixon E., Gill M., Mador B.D., Moulton K.M., Kaplan G.G., MacLean A.R.** Bowel obstruction following appendectomy: what is the true incidence? *Ann Surg.* 2009, 250 (1), strony 51-53.
65. **Boys F.** The prophylaxis of peritoneal adhesions. A review of the literature. *Surgery.* 1942, 11, strony 118-168.
66. **Lundorff P., Hahlin M., Källfelt B., Thorburn J., Lindblom B.** Adhesion formation after laparoscopic surgery in tubal pregnancy: a randomized trial versus laparotomy. *Fertil. Steril.* 1991, 55, strony 911-915.
67. **Audebert A.J., Gomel V.** Role of microlaparoscopy in the diagnosis of peritoneal and visceral adhesions in the prevention of bowel injury associated with blind trocar insertion. *Fertil. Steril.* 2000, 73, strony 631-635.
68. **Polymeneas G., Theodosopoulos T., Stamatiadis A. et al.** A comparative study of postoperative adhesion formation after laparoscopic versus open cholecystectomy. *Surg. Endosc.* 2001, 15, strony 41-43.
69. **Hull T.L., Joyce M.R., Geisler D.P., Coffey J.C.** Adhesions after laparoscopic and open ileal pouch - anal anastomosis surgery for ulcerative colitis. *Br. J. Surg.* 2012, Tom 99, 2, strony 270-275.
70. **Połubińska A., Winckiewicz M., Staniszewski R., et al.** Time to reconsider saline as the ideal rinsing solution during abdominal surgery. *Am. J. Surg.* 2006, 192, strony 281-285.

71. **Vogel K.** Clinical and experimental study of peritoneal adhesion occurring after laparotomy. *Ann. Surg.* 1902, 36, strony 961-962.
72. **Claypool J.R., Vance B.M., Robertson P.R., Field C.W.** A study in the prevention of adhesions. *J.Am.Med.Assoc.* 1910, 55, str. 312.
73. **al. diZerega G.S. et al.** *Peritoneal Surgery.* New York : Springer-Verlag, 2000.
74. **Craig A.B., Ellis A.G.** An experimental and histological study of Cargile membrane with reference to (1) its efficacy in preventing adhesion in the abdominal and cranial cavities and around nerves and tendons and (2) its ultimate fate in the tissues. 1905, 41 (6), strony 801-822.
75. **Lehman E.P., Boys F.** Heparin in the prevention of peritoneal adhesions; report of progress. *Ann. Surg.* 1940, 112, strony 969-974.
76. **Johnson H.L.** Amniotic fluid concentrate in the prevention of adhesions. *N. Engl. J. Med.* 1928, 199, strony 661-664.
77. **Harris E.S., Mogan R.F., Rodeheaver G.T.** Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. *Surgery.* 1995, 117, strony 663-669.
78. **Diamond M.** Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. Seprafilm Adhesion Study Group. *Fertil. Steril.* 1996, 66, strony 904-910.
79. **Bristow R., Montz F.** Prevention of adhesion formation after radical oophorectomy using sodium hyaluronate - carboxymethylcellulose (HA-CMC) barrier. *Gynecol. Oncol.* 2005, 99, strony 301-308.
80. **Vrijland W.W., Tseng L. N., Eijkman H.J., et al.** Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid - carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial. *Ann. Surg.* 2002, 235, strony 193-199.
81. **Tsuji S., Takahashi K., Yomo H.** Effectiveness of antiadhesion barriers in preventing adhesions after myomectomy in patients with uterine leiomyoma. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2005, 123, strony 244-248.
82. **Gonzalez - Quintero V., Cruz - Pachano F.** Preventing adhesions in obstetric and gynecologic surgical procedures. *Rev. Obset. Gynecol.* 2009, 2, strony 38-45.
83. **Becker J.M., Dayton M.T., Fazio V.W., et al.** Prevention of postoperative abdominal adhesions by sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study. *J. Am. Coll. Surg.* 1996, 183, strony 297-306.
84. **Beck D.E., Cohen Z., Fleshman J.W., Kaufman H.S., van Goor H., Wolff B.G.** A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm Adhesion Barrier in abdominopelvic surgery of the intestine. *Dis. Colon Rectum.* 2003, Tom 46, 10, strony 1310-1319.

85. **Gago L.A., Saed G.M., Wang R.X., Kruger M., Diamond M.P.** Effects of oxidized regenerated cellulose on the expression of extracellular matrix and transforming growth factor- β 1 in human peritoneal fibroblast and mesothelial cells. *Am.J.Obst.Gynecol.* 2003, Tom 189, 6, strony 1620-1625.
86. **Haney A.F., Doty E.** Expanded polytetrafluoroethylen but not oxidized regenerated cellulose prevents adhesion formation and reformation in a mouse uterine horn model of surgical injury. *Fertil. Steril.* 1993, 3, strony 550-558.
87. **Larsson B.** Efficacy of Interceed in adhesion prevention in gynecologic surgery: a review of 13 clinical studies. *J. Reprod. Med.* 1996, 41, strony 27-34.
88. **Wiseman D.M., Trout J.R., Franklin R.K., Diamond M.P.** Metaanalysis of the safety and efficacy of an adhesion barrier (Interceed TC7) in laparotomy. *J. Reprod. Med.* 1999, 44, strony 325-331.
89. **Anthony T., Bergen P.C., Kim L. T., Henderson M., Fahey T., Rege R.V., Turnage R.H.** Factors affecting recurrence following incisional herniorrhaphy. *World. J. Surg.* 2000, 24, strony 95-100.
90. **Luijendijk R.W., Lemmen M.H., Hop W.C., Wereldsma J.C.** Incisional hernia recurrence following "vest-over-pants" or vertical Mayo repair of primary hernias of the midline. *World. J. Surg.* 1997, 21, strony 62-65.
91. **Halm J.A., de Wall L.L., Steyerberg E.W., Jeekel J., Lange J.F.** Intraperitoneal polypropylen mesh hernia repair complicates subsequent abdominal surgery. *World J. Surg.* 2007, 31, strony 423-429.
92. **Burger J.W., Halm J.A., Wijsmuller A.R., ten Raa S., Jeekel J.** Evaluation of new prosthetic meshes for ventral hernia repair. *Surg. Endosc.* 2006, Tom 20, 8, strony 1320-1325.
93. **Novitsky Y.W., Harrell A.G., Cristiano J.A., Paton B.L., Norton H.J., Peindl R.D., Kercher K.W., Heniford B.T.** Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long intra-abdominal implantation in a rabbit. *J. Surg. Res.* 2007, Tom 140, 1, strony 6-11.
94. **Berrevoet F., Fierens K., De Gols J., Navez B., Van Bastelaere W., Meir E., Ceulemans R.** Multicentric observational cohort study evaluating a composite mesh with incorporated oxidized regenerated cellulose in laparoscopic ventral hernia repair. *Hernia.* 2009, 13, strony 23-27.
95. **Moreno-Egea A., Aquayo-Albasini J.L., Ballester M.M., Cases Baldo M.J.** Treatment of incisional hernias adapting an intra-abdominal approach with a new low-density prosthetic material: proceed: our preliminary experience on 50 cases. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* 2009, Tom 19, 6, strony 497-500.
96. **Rosenberg J., Burcharth J.** Feasibility and outcome after laparoscopic ventral hernia repair using Proceed mesh. *Hernia.* 2008, Tom 12, 5, strony 453-456.
97. **Śmietański M., Krajewski J., Bigda J., Śmietańska I., Bury K., Gumiela P., Śledziński Z.** Laparoskopowe zaopatrzenie przepukliny brzusznej z użyciem implantu Proceed: trzy lata obserwacji pierwszej grupy chorych. *Wideochirurgia.* 2008, Tom 3, 4, strony 151-156.
98. **Luijendijk R.W., de Lange D.C.D., Wauters C.C.A.P., et al.** Foreign material in postoperative adhesions. *Ann.Surg.* 1996, 223, strony 242-248.

99. **Parker M.C., Wilson M.S., Menzies D., Sunderland G., Clark D.N., Knight A.D., Crowe A.M. Surgical and Clinical Adhesion Research Group (SCAR).** The SCAR-3 study:5-year adhesion-related readmission risk following lower abdominal surgical procedures. *Colorectal Dis.* 2005, 7(6), strony 551-558.
100. **Boldt J., Hüttner I., Suttner S., Kumle B., Piper S.N., Berchthold G.** Changes of haemostasis in patients undergoing major abdominal surgery - is there a difference between elderly and younger patients? *Br.J.Anaesth.* 2001, 87, strony 435-440.
101. **Stylianou E., Jenner L.A., Davies M., Coles G.A., Williams J.D.** Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 1990, 37, strony 1563-1570.
102. **Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 92, strony 9363-9367.
103. **Rubin H.,** Cell aging in vivo and in vitro. *Mech. Ageing Dev.* 1997, 98, strony 1-35.
104. **Yegorov Y.E., Zelenin A.V.** Duration of senescent cells survival in vitro as a characteristic of organism longevity, an additional to the proliferative potential of fibroblast. *FEBS Letters.* 2003, 541, strony 6-10.
105. **Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C.** Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, Tom 95, strony 10614-10619.
106. **Nevalo J.,Vallejo S., El-Assar M., Peiro C., Sanchez-Ferrer C.F., Rodriguez-Manas L.** Changes in human peritoneal mesothelial cells during aging. *Kidney Int.* 2006, 69, strony 313-322.
107. **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, strony 335-338.
108. **Kishimoto T.** The biology of Interleukin-6. *Blood.* 1989, Tom 74, 1, strony 1-10.
109. **Topley N., Jörrens A., Luttmann W., Petersen M.M., Lang M.J., Thierauch K.H., Müller C., Coles G.A., Davies M., Williams J.D.** Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: Induction by IL-1 beta and TNF alpha. *Kidney Int.* 1993, Tom 43, strony 226-233.
110. **Tilg H., Trehu E., Attkins M.B., Dinarello C.A., Mier J.W.** Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 1994, 83, strony 113-118.
111. **Barton B.E., Jackson J.V.** Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide - galactosamine septic shock model. *Infect. Immun.* 1993, 61, strony 1496-1499.
112. **Ulich T.R., Yin S., Guo K., Yi E.S., Remick D., de Castillo J.** Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 1991, 138, strony 1097-1101.

113. **Ivarsson M.L., Holmdahl L., Falk P., Mölne J., Risberg B.** Characterization and fibrinolytic properties of mesothelial cells isolated from peritoneal lavage. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 1998, 58, strony 195-204.
114. **Sitter T., Godde M., Spannagl M., Fricke H., Kooistra T.** Intraperitoneal coagulation and fibrinolysis during inflammation: in vivo and in vitro observations. *Fibrinolysis.* 1996, 10 (suppl.2), strony 99-104.
115. **Tietze L., Elbrecht A., Schauerte C. et al.** Modulation of pro- and antifibrinolytic properties of human peritoneal mesothelial cells by transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1), tumor necrosis factor-alfa (TNF-) and interleukin-1 (IL-1). *Thromb. Haemostasis.* 1998, 79, strony 362-370.
116. **Sitter T., Toet K., Fricke H., Schiffel H., Held E., Kooistra T.** Modulation of procoagulant and fibrinolytic system components of mesothelial cells by inflammatory mediators. *Am. J. Phys.* 1996, 271, strony R1256-R1263.
117. **Emeis J.J., Kooistra T.** Interleukin-1 and lipopolysaccharides induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J.Exp.Med.* 1986, 163, strony 1260-1266.
118. **Bakkum E.A., Dalmeijer R.A., Verdel M.J., et al.,.** Quantitative analysis of the inflammatory reaction surrounding sutures commonly used in operative procedures and the relation to postsurgical adhesion formation. *Biomaterials.* 1995, 16, strony 1283-1289.
119. **Down R.H.L., Whitehead R., Watts J.M.** Why do surgical packs cause peritoneal adhesions? *Aust. N. Z. J. Surg.* 1980, 50, strony 83-85.
120. **Klink B., Boynton C.J.** Starch peritonitis, A case report and clinopathological review. *Am Surg.* 1990, 56, strony 672-674.
121. **Kapustian V., Anteby E.Y., Gdalevich M., Shenhav S., Lavie O., Gemer O.** Effect of closure versus nonclosure of peritoneum at cesarean section on adhesions: a prospective randomized study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012, Tom 206, 56, strony e1-e4.
122. **Cheong y.C., Premkumar G., Mettwally M., Peacock J.L., Li T.C.** To close or not to close? A systematic review and meta-analysis of peritoneal non-closure and adhesion formation after cesarean section. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009, 147, pp. 3-8.
123. **Franchi M., Ghezzi F., Zanaboni F., et al.** Nonclosure of peritoneum at radical abdominal hysterectomy and pelvic node dissection: a randomized trial. *Obstet. Gynecol.* 1996, 87, strony 40-43.
124. **Interceed (TC7) Adhesion Barrier Study Group.** Prevention of postsurgical adhesions by Interceed (TC7), an absorbable adhesion barrier: a prospective randomized multicenter clinical study. *Fertil. Steril.* 1989, 51, strony 933-938.
125. **Sekiba K., Obstetrics and Gynecology Adhesion Prevention Comitee.** Use of Interceed (TC7) absorbable adhesion barrier to reduce postoperative adhesion reformation in infertility and endometriosis surgery. *Obstet. Gynecol.* 1992, 79, strony 518-522.

126. **Di Vita G., Patti R., D'Agostino P., Ferlazzo V., Angileri M., Sieli G., Buscemi S., Caruso G., Arcona M., Cillari E.** Modification in the production of cytokines and growth factors in drainage fluids following mesh implantation after incisional hernia repair. *Am. J. Surg.* 2006, 191, strony 785-790.
127. **Di Filippo C., Falsetto A., De Pascale V., Tufariello E., De Lucia D., Rossi F., D'Amico M., Cennamo A.** Plasma levels of t-PA and PAI-1 correlate with the formation of experimental postsurgical peritoneal adhesions. *Mediat. Inflamm.* 2006, (4) 13901, strony 1-4.
128. **Buyalos R.P., Funari V.A., Azzizz R., et al.** Elevated interleukin-6 level in peritoneal fluid of patients with pelvic pathology. *Fertil. Steril.* 1992, 58, strony 302-306.
129. **Saba A., Kaida A., Godziachvili V., et al.** Effects of IL-6 and its neutralising antibodies on peritoneal adhesions formation and wound healing. *Am. Surg.* 1996, 62, strony 569-772.
130. **Emans P., Schreinemacher M.H.F., Gijbels M.J.J., Beets G.L., Greve J.W.M., Koole L.H., Bouvy N.D.** Polypropylene meshes to prevent abdominal herniation. Can stable coatings prevent adhesion in the long term? *Ann. Biomed. Engin.* 2008, Tom 37, 3, strony 410-418.
131. **Baptista M.L., Bonsack M.E., Felemovicius I., Delaney J.P.** Abdominal adhesions to prosthetic mesh evaluated by laparoscopy and electron microscopy. *J. Am Coll. Surg.* 2000, 190, strony 271-280.
132. **Demir U., Mihmanli M., Coskun H., Dilege E., Kalyoncu A., Altinli E., Yilmez B.** Comparison of prosthetic materials in incisional hernia repair. *Surg. Today.* 2005, 35, strony 223-227.
133. **Habara T., Nakatsuka M., Konishi H., Asagiri K., Noguchi S., Kudo T.** The biological effects of antiadhesion agents on activated RAW264.7 macrophages. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, Tom 61, 15 (4), strony 628-633.
134. **Reddy S., Santanam N., Reddy P., Rock J., Murphy A., Parathasarathy S.** Interaction of Interceed oxidized regenerated cellulose with macrophages: A potential mechanism by which Interceed may prevent adhesions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997, Tom 177, 6, strony 1315-1321.
135. **Jonijc N., Peri G., Bernasconi S., et al.** Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J. Exp. Med.* 1992, 176, strony 1165-1174.
136. **van Rossen M.E., Hofland L.J., van den Tol M.P., et al.** Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumor cell adhesion to the peritoneum. *J. Pathol.* 2001, 193, strony 530-537.
137. **Wu S., Rodabaugh K., Martinez-Maza O., Watson J.M., Silberstein D.S., Boyer C.M., Peters W.P., Weinberg J.B., Berek J.S., Bast R.C.** Stimulation of ovarian cell proliferation with monocyte products including IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α . *Am. J. Obst. Gynecol.* 1992, 166, strony 997-1007.
138. **Offner F.A., Obrist P., Stadlmann S., Feichtinger H., Klingler P., Herod M., Zwierzina H., Hittmair A., Mikuz G., Abendstein B., Zeimet A., Marth C.** IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells. *Cytokine.* 1995, Tom 7, 6, strony 542-547.

139. **Gago L.A., Saed G., Elhammady E., Diamond M.P.** Effect of oxidized regenerated cellulose (Interceed) on the expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human peritoneal fibroblast and mesothelial cells. *Fertil. Steril.* 2006, Tom 86, Suppl.3, strony 1223-1227.
140. **Edmiston C.E.Jr., Goheen M.P., Kornhall S., Jones F.E., Condon R.E.** Fecal peritonitis: microbial adherence to serosal mesothelium and resistance to peritoneal lavage. *World J. Surg.* 1990, 14, strony 176-183.
141. **Platell C., Papadimitriou J., Hall J.C.** The influence of lavage on mortality and morbidity in patients with peritonitis. *J.Am.Coll.Surg.* 2000, 191, strony 672-680.
142. **van Westreenen M. Mul F.J.P., Pronk A., van Papandrecht H., Diepersloot R.J.A., Roos D., Leguit P.** Influence of perioperative lavage solutions on peritoneal defence mechanisms in vitro. *Eur. J. Surg.* 1999, 165, strony 1066-1071.
143. **Yao V., Platell C., Hall J.C.** Lavage enhances the production of proinflammatory mediators by peritoneal mesothelial cells in an experimental model. *Dis. Colon Rectum.* 2005, 48, strony 560-566.
144. **Holzheimer R.G., Schein M., Wittmann D.H.** Inflammatory response in peritoneal exudate and plasma of patients undergoing planned relaparotomy for severe secondary peritonitis. *Arch. Surg.* 1995, 130, strony 1314-1319.
145. **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, strony 151-157.
146. **van Westreenen M., van den Tol P.M., Pronk A., Marquet R.L., Jeekel J., Leguit P.** Perioperative lavage promotes intraperitoneal adhesion in rat. *Eur.J. Res.* 1999, 31, strony 196-201.
147. **Sitter T., Mandl-Weber S., Wörhle M., Haslinger B., Goedde M., Kooistra T.** D-glucose increases the synthesis of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in human peritoneal mesothelial cells. *Thromb. Haemost.* 1999, 82, pp. 1171-1176.
148. **Topley N., Kaur D., Petersen M.M., Jörres A., Passlick-Deetjen J., Coles G.A., Williams J.D.** Biocompatibility of bicarbonate buffered peritoneal dialysis fluid: influence on mesothelial cell and neutrophil function. *Kidney Int.* 1996, 49 (5), pp. 1447-1456.
149. **Witowski J., Topley N, Jörres A., Liberek T., Coles G.A., Williams J.D.** Effect of lactate-buffered peritoneal dialysis fluids on human peritoneal mesothelial cell interleukin-6 and prostaglandin synthesis. *Kidney Int.* 1995, 47(1), strony 282-293.
150. **Brown C., Luciano A.A., Martin D., Peers E., Scrimgeour A., diZerega G.S.** Adept (icodextrin 4% solution) reduces adhesion after laparoscopic surgery for adhesiolysis: a double-blind, randomized, controlled study. *Fertil. Steril.* 2007, Tom 88, 5, strony 1413-1426.
151. **Richardson E.H.** Studies on peritoneal adhesions. *Ann. Surg.* 1911, 54, strony 758-797.
152. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, strony 265-275.

