

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

lek. Andrzej Jawień

Ocena N-acetyloglukozaminy jako czynnika hamującego powstawanie zrostów otrzewnowych.

Praca na stopień doktora nauk medycznych

z II Katedry Chirurgii

Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Grzegorz Oszkinis

Promotor: prof. dr hab. med. Ryszard Staniszewski

Poznań 2012

## **ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE**

ACEI (ang. angiotensin converting enzyme inhibitor) – inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę

CAPD (ang. continous ambulatory peritoneal dialysis) – ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa

DPO – diagnostyczne płukanie otrzewnej

ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny

GA (ang. grading of adhesions) – skala nasilenia zrostów

GR – skala nasilenia zrostów Gawerky i Rózgi

IL – interleukina

MCP (ang. monocyte chemotactic protein) – chemotaktyczna proteina monocytów

NAG – N-acetyloglukozamina

PAI (ang. plazminogen activator inhibitor) – inhibitor aktywatora plazminogenu

PWE – płyn wieloelektrolitowy

TF (ang. tissue factor) – czynnik tkankowy

TNF (ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworu

tPA (ang. tissue plasminogen activator) – tkankowy aktywator plazminogenu

## **SPIS TREŚCI**

I.	<b>WSTĘP</b>	4
	I.1. Mezotelium otrzewnowe	4
	I.2. Rys historyczny badań nad otrzewną	6
	I.3. Fibrynogeneza i fibrynoliza wewnątrzotrzewnowa	6
	I.4. Gojenie otrzewnej	7
	I.5. Cytokiny	9
	I.6. Zrosty otrzewnej	9
	I.7. Zapobieganie powstawania zrostów	10
	I.8. Płukanie jamy otrzewnej	11
	I.9. N-acetyloglukozamina	12
II.	<b>CEL PRACY</b>	15
III.	<b>MATERIAŁ I METODY</b>	16
	III.1. Ocena zrostów w obrębie jamy otrzewnowej	21
	III.2. Uzyskiwanie popłuczyn z jamy otrzewnowej	22
	III.3. Ocena ilości komórek zapalnych w badanych popłuczynach	23
	III.4. Ocena rodzaju komórek zapalnych w badanych popłuczynach	24
	III.5. Ocena aktywności elastazy w badanych popłuczynach	25
	III.6. Pomiar cytokin MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 w badanych popłuczynach	25
	III.7. Ocena statystyczna	27
IV.	<b>WYNIKI</b>	28
	IV.1. Ocena nasilenia zrostów pooperacyjnych	28
	IV.2. Ocena odczynu komórkowego w jamie brzusznej	34
	IV.3. Ocena aktywności elastazy	43
	IV.4. Ocena nasilenia procesu zapalnego	45
V.	<b>DYSKUSJA</b>	53
VI.	<b>WNIOSKI</b>	58
VII.	<b>STRESZCZENIE</b>	59
VIII.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	63
IX.	<b>SPIS TABEL I RYCIN</b>	68

## **I. WSTĘP**

Zrosty otrzewnowe znane są chirurgom od kilkuset lat. Pomimo ogromnego postępu w medycynie i technikach chirurgicznych, nadal trapią one wielu lekarzy jako jedno z najczęstszych powikłań operacji w obrębie jamy brzusznej i miednicy mniejszej. Powstają one w konsekwencji regeneracji otrzewnej i występują u 63-97% chorych po laparotomiach [1-3], z czego być może 1/3 będzie wymagała w przyszłości hospitalizacji z powodu powikłań zrostów [4-6]. Najczęściej nie dają objawów klinicznych, jednak skutki ich obecności mogą być poważne: niedrożność zrostowa jelit, zespoły bólowe jamy brzusznej i miednicy mniejszej czy niepłodność [7]. Szacuje się, iż 0,9-1,3% wszystkich przyjęć na oddziały ogólnochirurgiczne jest spowodowanych zrostową niedrożnością jelit [4], natomiast po analizie przyjęć ponownych – odsetek ten wzrasta do 3,8%-5,7% [6,8,9]. Ocenia się, że 3,3-4,1% wszystkich laparotomii wykonuje się z powodu niedrożności przewodu pokarmowego spowodowanej obecnością zrostów [4], a same zrosty są przyczyną 37,0-59,2% niedrożności przewodu pokarmowego [6]. Dlatego tak istotnym wydaje się być znalezienie odpowiedniego środka do śródoperacyjnego płukania jamy otrzewnowej, w celu zapobieżenia powstawaniu zrostów otrzewnowych i uniknięcia związanych z nimi ciężkich powikłań.

### **I.1. Mezotelium otrzewnowe**

Mezotelium jako błona surowicza tworzy wewnętrzną warstwę jamy brzusznej (mezotelium otrzewnowe), jamy opłucnowej oraz worka osierdziowego. We wszystkich tych obszarach ma jednorodną budowę histologiczną, opisaną po raz pierwszy w 1863 roku przez Friedricha Daniela Von Recklinghausen'a [10]. W dalszych rozważaniach, dla uproszczenia, dla mezotelium otrzewnowego przyjęto nazwę otrzewna lub mezotelium.

Otrzewna jest bogato unaczynioną i unerwioną błoną, stanowiącą wewnętrzną warstwę ściany jamy brzusznej. Składa się ona z dwóch warstw : części podtrzymującej narządy jamy brzusznej – otrzewna trzewna, oraz części wyścielającej

ścianę jamy brzusznej – otrzewna ścienna [11]. W swoim składzie posiada różnorodne komórki, w tym: komórki mezotelialne, eozynofile, limfocyty, bazofile [12]. Jednym z zadań otrzewnej jest ciągła produkcja i wchłanianie płynu otrzewnowego, w związku z tym w przestrzeni wewnątrzotrzewnowej stale znajduje się około 5-20ml fizjologicznego płynu, którego głównym zadaniem jest nawilżanie powierzchni otrzewnej oraz narządów znajdujących się wewnątrzotrzewnowo [13]. Takie właściwości umożliwiają ciągłe przemieszczanie się narządów jamy brzusznej względem siebie [11]. Ponadto otrzewna pełni istotną funkcję w ograniczaniu procesu zapalnego rozwijającego się w jamie brzusznej [8,10,14]. W praktyce klinicznej wykorzystywana jest również półprzepuszczalność otrzewnej, która zapewnia usuwanie toksyn mocznicowych, nadmiaru wody i elektrolitów podczas dializy otrzewnowej [10]. Prawidłowa, niezaburzona funkcja mezotelium otrzewnowego umożliwia utrzymanie homeostazy poprzez wymianę cząsteczek i ciągłą produkcję niewielkiej ilości płynu otrzewnowego, jednak każdy proces chorobowy w obrębie otrzewnej oraz przeprowadzanie dializy otrzewnowej mogą tę równowagę zaburzyć [10].

Pod względem histologicznym otrzewna zbudowana jest z pojedynczej warstwy komórek mezotelium ułożonych na błonie podstawnej, pod którą znajduje się warstwa zbudowana z kolagenu, fibroblastów, tkanki tłuszczowej, naczyń krwionośnych i limfatycznych [13]. Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego podobne są pod względem budowy do pneumocytów II typu, natomiast płyn przez nie wytwarzany pokrewny jest do płucnego surfaktantu [15]. Wykazano, że odpowiednio pobudzone komórki mezotelium zdolne są do produkowania cytokin prozapalnych IL-6 oraz IL-8 oraz czynników chemotaktycznych, w ten sposób pobudzają namnażanie leukocytów oraz cząsteczek adhezyjnych [16,17]. Są one również odpowiedzialne za wytwarzanie substancji prokoagulogennych (czynnik tkankowy – ang. tissue factor - TF) oraz za pobudzanie procesu fibrynolitycznego poprzez produkcję tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) [18].

## **I.2. Rys historyczny badań nad otrzewną**

Pierwsze wzmianki na temat otrzewnej pojawiły się już w starożytnym Egipcie i Grecji, czemu dowodzi papirus Ebersa liczący około 5 tysięcy lat [19]. Także w szkicach słynnego Galena można odnaleźć notatki na temat otrzewnej [20]. W nowożytnej medycynie tematyką otrzewnej zajmowali się między innymi Bichat i Von Recklinghausen, którzy jako pierwsi opisywali jej budowę histologiczną – odpowiednio w 1827 i 1862 roku [9]. Pojawienie się mikroskopu elektronowego w 1931 roku pogłębiło tę wiedzę. Równoległe wielu badaczy poszukiwało funkcji fizjologicznych otrzewnej. W 1877 roku Wegner dokonał przełomowego odkrycia funkcji transportowych otrzewnej, co zapoczątkowało badania nad zastosowaniem dializy otrzewnowej [20]. Po raz pierwszy taki rodzaj dializy u człowieka zastosował Ganter w 1923 roku [19]. Jednak to Popovich i Moncrief w 1976 roku stworzyli ostateczne zasady ciągłej dializy otrzewnowej.

Innym przełomowym odkryciem było udowodnienie przebiegu mechanizmu gojenia uszkodzeń w obrębie otrzewnej. Pozwoliło to zrozumieć istotę powstawania zrostów otrzewnowych i odmienność gojenia otrzewnej w stosunku do gojenia skóry.

## **I.3. Fibrynogeneza i fibrynoliza wewnątrzotrzewnowa**

Fibrynogeneza jest procesem zamiany fibrynogenu we włóknik (fibrynę). To właśnie fibryna posiada zdolność wytwarzania mostków formujących zrosty otrzewnej. Pierwszą taką aktywność wykazuje już 4 godziny po podrażnieniu otrzewnej, natomiast po 16-24 godzinach występuje szczyt aktywności fibrynogenetycznej [21]. Bezpośrednio po urazie otrzewnej, czyli na przykład po zabiegu operacyjnym, następuje pobudzenie komórek mezotelium do namnażania się i produkowania czynnika tkankowego (TF), który stanowi sygnał inicjujący tzw. aktywność prokoagulogenną [22].

Fibrynoliza jest procesem przeciwnym do fibrynogenezy, definiowana jako rozpuszczanie włóknika. Po raz pierwszy opisana została w 1893 roku przez Dastre'a

[11]. Dalsze badania nad włóknikiem pozwoliły na odkrycie w 1959 roku aktywności fibrynolitycznej komórek mezotelium [23]. Fibrynoлиза określana jest jako enzymatyczny proces kaskadowy, a najważniejszym enzymem biorącym udział w tym procesie jest plazmina. Powstaje ona pod wpływem pobudzenia białka prekursorowego – plazminogenu przez tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) oraz aktywator plazminogenu o typie urokinezy (u-PA) [24]. Innymi składowymi kaskady fibrynolitycznej są czynniki hamujące fibrynoлизę, czyli inhibitory aktywatora plazminogenu (PAI-1, PAI-2, PAI-3), inhibitory plazminy ( $\alpha_2$ -antyplazmina, trombospondyna) [24,25]. Aktywność powyższych procesów zależna jest w dużej mierze od lokalizacji komórek mezotelium, a największą aktywność wykazuje w obrębie otrzewnej pokrywającej sieć większą [26].

#### **I.4. Gojenie otrzewnej**

Istnieją różne mechanizmy powodujące uszkodzenie otrzewnej: urazy fizyczne (na przykład wywołane narzędziami chirurgicznymi lub osuszeniem tkanek), chemiczne (talk z rękawiczek, roztwory do śródoperacyjnego płukania otrzewnej) oraz metaboliczne (zapalenie otrzewnej, niedokrwienie) [21,27]. Niezależnie od przyczyny uszkodzenia istotą mechanizmu jest przerwanie ciągłości warstwy komórek mezotelium [27]. W ten sposób następuje utrata naturalnej „nieadhezyjności” tych komórek, co w konsekwencji prowadzi do łączenia sąsiednich blaszek otrzewnej, inicjując tym samym powstawanie zrostów [21]. Jednym z pierwszych badaczy zajmujących się tym procesem był Raftery, który na podstawie obserwacji populacji szczurów udowodnił, że proces gojenia otrzewnej zachodzi inaczej niż w obrębie skóry [28]. Podczas gojenia skóry na brzegach rany trwa stopniowe namnażanie komórek naskórka, natomiast otrzewna regeneruje się poprzez jednoczasową endotelializację całej jej powierzchni, niezależnie od powierzchni uszkodzenia [29]. Według badań Rafterego po uszkodzeniu otrzewnej intensywne namnażanie czynników regeneracyjnych powoduje odbudowanie ubytku w przeciągu około 5-7 dni [28]. W kaskadzie tej uczestniczą różne typy komórek wchodzących w skład płynu otrzewnowego i otrzewnej: neutrofile, makrofagi, komórki mezotelialne [30]. Każde,

nawet minimalne uszkodzenie komórek mezotelium, wywołuje reakcję zapalną [28]. W związku z tym, że płyn otrzewnowy zajmuje szeroką przestrzeń, również komórki pobudzone do wywołania stanu zapalnego rozprzestrzeniają się łatwo, co sprawia, że proces regeneracyjny nie jest ograniczany do miejsca uszkodzenia otrzewnej [31]. W inicjowanie procesu regeneracji otrzewnej zaangażowane są mastocyty, które wywołują rozszerzenie naczyń otrzewnej i zwiększenie ich przepuszczalności, co prowadzi do gromadzenia wysięku bogatego w fibrynogen i uruchamiania kolejnych etapów komórkowych [32]. Bezsporny udział w tworzeniu zrostów mają również fibroblasty produkujące składniki macierzy międzykomórkowej [29,33].

Już po 12 godzinach od zranienia otrzewnej wokół miejsca uszkodzenia gromadzi się włóknik oraz liczne komórki: leukocyty wielojądrzaste, makrofagi, granulocyty kwasochłonne i mastocyty [29]. W miarę upływu czasu komórki te zastępowane są przez makrofagi, które układają się na formującym się włókniku [29,31]. Następnie pojawiają się pierwotne komórki mezenchymalne, które przekształcają się w komórki mezotelialne oraz fibroblasty [31]. Stopień tworzenia się włóknika podczas regeneracji otrzewnej zależy jest od aktywności procesów fibrynolitycznych, które doprowadzają do rozpuszczenia złożeń fibryny i nie dopuszczają do powstania rozległych zrostów. Zahamowanie procesów fibrynolitycznych sprzyja powstawaniu zrostów otrzewnej [34]. Jednym z czynników posiadających takie działanie jest rozległe uszkodzenie tkanek oraz ich niedotlenienie [31,35]. Wykazano, że sposób przecięcia otrzewnej ma również znaczenie w jej późniejszym gojeniu – cięcie wykonane skalpelem skutkuje mniejszymi zrostami niż cięcie elektryczne [33]. Również istnieją dowody wykazujące, że pozostawienie otrzewnej bez zszywania jej ogranicza proces powstawania zrostów [35].

W przypadku prawidłowej aktywności fibrynolitycznej tworzenie włóknika hamowane jest w ciągu pierwszych 72 godzin gojenia otrzewnej, a odbudowa komórek mezotelium trwa 5-7 dni [31,35]. Zaburzenia równowagi pomiędzy procesem fibrynolizy i fibrynogenezy prowadzi do uformowania stałych pasm włóknika, w obrębie których dochodzi do angiogenezy i neurogenezy [31]. Obecność czuciowych zakończeń nerwowych w zrostach otrzewnej może skutkować zespołami bólowymi jamy brzusznej i miednicy mniejszej [31].



## **I.5. Cytokiny**

Powstawanie zrostów otrzewnej ściśle związane jest z reakcją zapalną, podczas której uwalniane są różne cytokiny, między innymi MCP-1, TNF- $\alpha$  oraz IL-6 [28,30,31]. Ich poziom jest wyznacznikiem nasilenia procesu zapalnego i może wskazywać na tendencje do tworzenia zrostów otrzewnej [31]. TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$ ) jest cytokiną wytwarzaną głównie przez makrofagi i monocyty, a jego uwalnianie pobudza wytwarzanie wolnych rodników, prowadząc do fagocytozy oraz apoptozy komórek [36]. Kolejną cytokiną wydzielaną również przez makrofagi i monocyty jest IL-6 (interleukina 6). Działa ona silnie prozapalnie, stymulując różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych oraz aktywując wytwarzanie limfocytów T i IL-1. Stymuluje również produkcję białek ostrej fazy [37]. Istotną w kaskadzie zapalnej cytokiną jest również MCP-1 (proteina chemotaktyczna dla monocytów 1), której uwalnianie powoduje pobudzanie chemotaksji limfocytów T oraz monocytów [38]. Mechanizmy reakcji zapalnej przebiegające u badanych szczurów zachodzą w podobny sposób, jedynie budowa biochemiczna niektórych cytokin nieznacznie się różni od tych, które występują u człowieka.

## **I.6. Zrosty otrzewnej**

Zrosty wewnątrzotrzewnowe są naturalnym efektem procesu gojenia wewnątrz jamy brzusznej. Tworzą włókniste połączenia pomiędzy ścianą jamy otrzewnej a organami znajdującymi się w jej obrębie lub łączą organy, które anatomicznie nie mają ze sobą połączenia [21,32]. Zrosty są zazwyczaj bogato unaczynione oraz unerwione [21]. Najczęściej pozostają bezobjawowe, jednak mogą również mieć poważne skutki kliniczne: niedrożność zrostowa jelit, zwężenie jelit, utrudniony pasaż pokarmowy, bezpłodność, przewlekłe zespoły bólowe brzucha i miednicy mniejszej (wywołane prawdopodobnie zmniejszoną ruchomością narządów w jamie brzusznej i miednicy), utrudnione warunki podczas reoperacji [6,7]. Zrosty

powstają w konsekwencji regeneracji otrzewnej u 63-97% chorych po laparotomiach [1-3]. 1/3 chorych może być w przyszłości hospitalizowana z powodu dolegliwości klinicznych wywołanych zrostami wewnątrztrzewnowymi [4-6].

Stanowią one również poważny problem socjoekonomiczny, pochłaniając znaczną część budżetu zdrowotnego. Przykładowo w Szwecji roczny koszt leczenia pacjentów ze zrostową niedrożnością jelita cienkiego wynosi około 13 milionów USD [4]. Ze względu na utrzymującą się wagę problemu wielu badaczy podejmuje próby stosowania metod, które mogłyby zapobiegać ich powstawaniu.

### **I.7. Zapobieganie powstawania zrostów**

Pierwsze doniesienia na temat zrostów wewnątrztrzewnowych pojawiły się w 1700 r. [39]. Jednak dopiero w XIX wieku problem ten rozpowszechnił się ze względu na prężny rozwój chirurgii. W 1872 roku Tomas Bryant jako pierwszy opisał pacjenta z niedrożnością jelita cienkiego wywołaną obecnością zrostów otrzewnej [39].

Podstawą unikania tworzenia zrostów jest dbałość o prawidłową technikę operacyjną. Istotna jest jak najmniejsza traumatyzacja tkanek, co uzyskać można przez zmniejszenie dostępu operacyjnego. Wykazano, że po zabiegach wykonanych techniką laparoskopową występuje mniej zrostów w porównaniu do techniki klasycznej, dlatego trend chirurgii laparoskopowej wydaje się być słusznym [40]. Innymi istotnymi czynnikami w zapobieganiu zrostom są również: dbałość o hemostazę, zapobieganie wysychaniu tkanek, precyzyjne zbliżanie do siebie tkanek oraz stosowanie najmniej traumatyzujących nici chirurgicznych [41]. Udowodniono również wpływ stosowanych rękawic chirurgicznych – według badań wykazano, że najrzadziej zrosty powstają w przypadku używania rękawic bezlateksowych [42].

W 1880r. pojawiły się pierwsze doniesienia na temat stosowania różnych substancji zapobiegających tworzeniu zrostów otrzewnej, takich jak: płyn owodniowy, otrzewna rekina, gumy, smary [43]. W ostatnich latach podejmowano próby zapobiegania zrostom z użyciem glikokortykosteroidów, niesteroidowych leków przeciwzapalnych, blokerów kanału wapniowego, roztworów krystaloidów (takich jak

sól fizjologiczna czy płyn Ringera), heparyny czy środków nasilających fibrylizację [44]. Jednak żadna z tych substancji nie okazała się idealna. Przykładowo ogólnoustrojowe podawanie heparyny ograniczało tworzenie zrostów, ale jednocześnie opóźniało gojenie rany pooperacyjnej i zwiększało ryzyko krwawienia [44]. Prowadzone są również badania doświadczalne i kliniczne mające określić wartość dootrzewnowego podawania roztworów wielkocząsteczkowego dekstranu, poliwinylpyrrolidonu, adenozy, fosfolipidów czy polimeryzowanej glukozy [44]. Istnieją także doniesienia wykazujące, że simwastatyna wykazuje korzystny wpływ przeciw tworzeniu zrostów poprzez pobudzenie aktywności fibrynolitycznej [44]. Prawdopodobnie również stosowanie niektórych leków doustnych może oddziaływać na proces gojenia otrzewnej. Na poziomie doświadczeń in vivo na modelach zwierzęcych udowodniono wpływ inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę (ACEI) na ograniczenie powstawania zrostów otrzewnej [45]. Jedną z pierwszych substancji badanych pod kątem śródoperacyjnego zastosowania w celach przeciwarzrostowych jest kwas hialuronowy [46]. Wykazano, że ma on działanie przeciwzapalne i przeciwplytkowe, ograniczając tym samym proces wytwarzania zrostów [47-49].

Istnieje również trend stosowania śródoperacyjnych barier fizycznych zawierających substancje o potencjalnym działaniu przeciwarzrostowym. Przykładem takiej bariery może być Seprafilm, czyli degradowalna błona zbudowana z karboksymetylocelulozy i kwasu hialuronowego lub Sepracoat, czyli hialuronian w postaci żelu [50-52]. Podobny mechanizm działania wykazuje preparat Adept, będący roztworem ikodekstryny, którego zadaniem jest zapobieganie przylegania narządów wewnątrzotrzewnowych w okresie około tygodnia po zabiegu operacyjnym [53].

## **1.8. Płukanie jamy otrzewnej**

Zabieg płukania jamy otrzewnej jest powszechnie stosowany. Jego najczęstsze zastosowanie to: jako jeden z etapów diagnostyki po urazach jamy brzusznej oraz w trakcie laparotomii, jako procedura mechanicznie oczyszczająca jamę otrzewną z bakterii, resztek krwi i tkanek oraz innych składników, jak na przykład treści kałowej. Preparatami stosowanymi w tym celu są między innymi 0,9% roztwór NaCl, płyn

Ringera, czy płyn wieloelektrolitowy PWE [54,55]. Płyny te pozytywnie wpływają na proces oczyszczania jamy otrzewnowej. Jednocześnie istnieją badania potwierdzające, że pobudzają one reakcję zapalną komórek mezotelium oraz proces tworzenia zrostów wewnątrztrzewnowych [55]. Według badań Cwalińskiego sól fizjologiczna wprowadzona do jamy otrzewnowej zmienia jej środowisko pod względem fizykochemicznym i biochemicznym, nabierając cech roztworu o działaniu przeciwzapalnym i cytotoksycznym w stosunku do komórek mezotelium [56]. Dostępne w literaturze badania wykazują również, że niekorzystne działanie płynów stosowanych do płukania jamy otrzewnej jest zależne od różnych czynników, jak na przykład temperatura, osmolarność, ładunek elektryczny oraz czas ekspozycji [53-55]. Udowodniono, że najbardziej optymalną do płukania otrzewnej jest temperatura nie większa niż 37°C. Natomiast temperatura powyżej 40°C sprzyja powstawaniu bardziej licznych i trwałych zrostów wewnątrztrzewnowych [56,57].

Do tej pory nie zbadano wpływu poszczególnych płynów na komórki mezotelium i stymulację zrostów wewnątrztrzewnowych w warunkach *in vivo*. Dlatego istotne jest odnalezienie preparatu, który wykazywałby obojętny wpływ na komórki mezotelium i mógłby być bezpiecznie stosowany podczas płukania otrzewnej. Jedną z substancji, która potencjalnie mogłaby mieć takie działanie jest N-acetyloglukozamina.

### **1.9. N-acetyloglukozamina**

W ostatnich latach w literaturze medycznej coraz częściej pojawiają się doniesienia wskazujące na pozytywny wpływ różnych substancji w zapobieganiu tworzeniu zrostów otrzewnej [58]. Szczególnie obiecujące wyniki dotyczą N-acetyloglukozaminy (NAG), która jako monosacharyd będący pochodną glukozy, jest związkiem szeroko rozpowszechnionym w organizmach żywych [59,60]. Pod względem chemicznym zbudowana jest z glukozaminy i kwasu octowego [61]. Najczęściej występuje w postaci polimeru będąc wyjściowym budulcem tworzącym związki niezwykle istotne do prawidłowego funkcjonowania organizmu [61,62]. W

połączeniu z kwasem N-acetylmuraminowym tworzy polimer budujący peptydoglikan, który wchodzi w skład ściany komórkowej bakterii [61]. NAG jest również monomerem chityny budującej szkielety zewnętrzne stawonogów oraz wchodzącej w skład ściany komórkowej grzybów, wodorostów oraz niektórych bakterii [61,63]. W połączeniu z kwasem glukuronowym jest również budulcem kwasu hialuronowego, niezwykle istotnego i szeroko rozpowszechnionego w organizmie zwierzęcego [62]. Struktura chemiczna kwasu hialuronowego odkryta została i opisana po raz pierwszy w 1934 roku przez Karla Meyera i Johna Palmera [58]. Od tego czasu hialuronian został bardzo doceniony i szeroko rozpowszechniony w medycynie i kosmetologii. Stosowany jest między innymi w leczeniu chorób stawów, zespołu suchego oka, ale również jako składnik wielu kremów przeciwzmarszczkowych [64,65].

NAG w organizmie ludzkim jest niezbędny w transporcie międzykomórkowym, wspomaga również funkcjonowanie układu immunologicznego, np. w odniesieniu do wirusa HIV oraz nowotworów [64]. Jest również bardzo istotny w leczeniu pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów – zmniejsza wykładniki stanu zapalnego, wspomaga regenerację chrząstki stawowej oraz zwiększa ruchomość stawów [65]. Niedobory N-acetyloglukozaminy związane są również z chorobami jelita grubego (Colitis Ulcerosa oraz choroba Leśniowskiego-Crohna, rak jelita grubego) oraz chorobami pęcherza moczowego, najprawdopodobniej ze względu na jego rolę w funkcjonowaniu układu immunologicznego [64]. NAG odgrywa ważną rolę w procesach gojenia, jednocześnie je przyspieszając i hamując nadmierny rozrost tkanki łącznej [63]. Działanie to dotyczy również otrzewnej [58, 64]. Dlatego też wydaje się być celowa ocena przydatności NAG do płukania jamy otrzewnej i określenie jego wpływu na komórki mezotelium i tworzenie zrostów wewnątrzotrzewnowych.

Dotychczasowe badania wykazały, że rutynowo stosowane płyny do płukania otrzewnej (roztwory jodopowidyny, roztwór glukozy, płyn dializacyjny, roztwór 0,9% NaCl) wpływają niekorzystnie na strukturę i metabolizm komórek mezotelium, nasilając powstawanie zrostów wewnątrzotrzewnowych [66,67]. Jednocześnie wiadomo, że uzupełnienie płynu dializacyjnego hialuronianem powoduje zmniejszenie wewnątrzotrzewnowego odczynu zapalnego i hamowanie rozrostu

tkanki łącznej w otrzewnej [59,60,62]. Powyższe doniesienia skłaniają do przeprowadzenia badań porównujących powszechnie stosowane do płukania otrzewnej substancje z płynem zawierającym NAG.

## **II. CEL PRACY**

1. Analiza wpływu wybranych preparatów do płukania śródoperacyjnego jamy otrzewnowej na proces powstawania i resorpcji zrostów śródtrzewnowych.
2. Wpływ działania 0,9% NaCl na proces powstawania zrostów śródtrzewnowych.
3. Ocena wpływu N-acetyloglukozaminy na powstawanie zrostów śródtrzewnowych.

### III. MATERIAŁ I METODY

Badania wykonywano we współpracy z Zakładem Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, z wykorzystaniem środków technicznych pracowni Zakładu. Kierownikiem jego jest prof. dr hab. med. Andrzej Bręborowicz. Materiał biologiczny wykorzystywany podczas badań pobierany był od 80 samców szczurów rasy Wistar o masie ciała 320-530g (Ryc.1). Wszystkie zwierzęta biorące udział w eksperymencie przez cały jego przebieg przebywały w indywidualnych klatkach, posiadając swobodny dostęp do paszy i wody (pasza standardowa, granulowana). Temperatura panująca w pomieszczeniach wynosiła  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Ze względu na brak dostępu światła dziennego zapewniono automatyczne, cyklicznie zmieniające się oświetlenie (co 12 godzin). Na całość badań przeprowadzanych na zwierzętach w latach 2008-2009 uzyskano odpowiednią zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Uchwała nr 33/2007 z dnia 18.05.2007r.).



Ryc. 1 Szczury rasy Wistar biorące udział w eksperymencie.



Całość badań podzielono na 2 etapy:

- A. Badania in vivo na szczurach, z oceną zrostów pooperacyjnych, po uprzednim, mechanicznym urazie otrzewnej ściennej i płukaniu jamy otrzewnowej poszczególnymi płynami (0,9% roztwór NaCl, płyn wieloelektrolitowy oraz płyn wieloelektrolitowy z dodatkiem NAG)
- B. Ocena procesu zapalnego, fibrynogenetycznego i fibrynolitycznego w popłuczynach uzyskanych z jamy otrzewnowej badanych szczurów

We wstępnym etapie dokonano podziału szczurów na 4 grupy doświadczalne. Podział wykonano losowo, przydzielając po 20 zwierząt do każdej z grup. Grupy oznaczono kolejnymi cyframi rzymskimi. W każdej z grup wykonywano otwarcie jamy brzusznej z wycięciem fragmentu otrzewnej o średnicy 6mm. Następnie, w zależności od ustalonej grupy, płukano jamę otrzewnową badanym płynem :

- Grupa I: grupa kontrolna (nie wykonywano płukania otrzewnej)
- Grupa II: płukanie 0,9% NaCl
- Grupa III: płukanie płynem wieloelektrolitowym Gambrosol trio (Gambro, Szwecja)
- Grupa IV: płukanie roztworem N-acetyloglukozaminy w płynie wieloelektrolitowym (40mmol/l)

Składniki	Gambrosol trio [g/l]
<b>Sole nieorganiczne</b>	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,271
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,054
NaCl	5,38
<b>Inne</b>	
Mleczan sodu	4,72

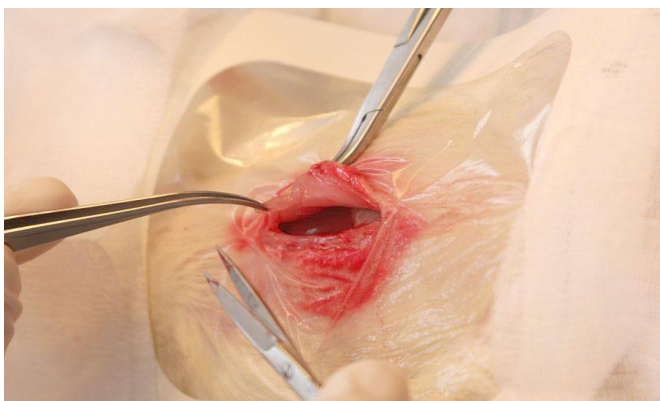
Tabela 1. Skład płynu wieloelektrolitowego Gambrosol trio.

W każdej z grup etap laparotomii oraz pobierania fragmentu otrzewnej przebiegał identycznie. Przed wykonaniem laparotomii wszystkie zwierzęta zważono - waga I (Ryc.6). Zabieg wykonywany był w znieczuleniu ogólnym. Po wstępnej fazie usypiania

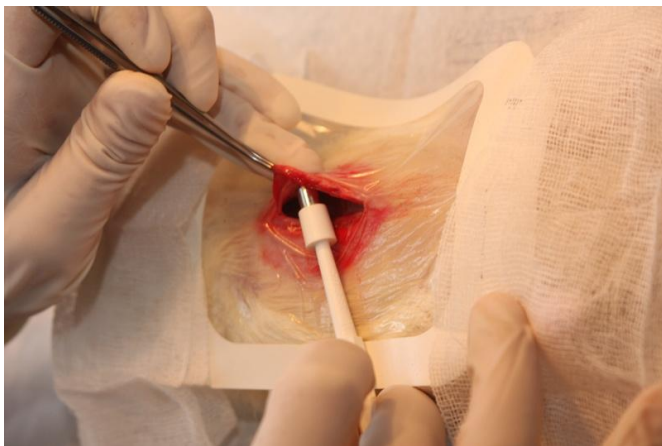
za pomocą halotanu (eksykator z oparami halotanu) stosowano leki domięśniowe: Fentanyl oraz Droperidol. Wstępny etap zabiegu obejmował golenie skóry brzucha, a następnie odkażenie skóry brzucha 70% etanolem. Zachowane były wszystkie obowiązujące zasady aseptyki. Kolejne etapy zabiegu obejmowały następujące czynności:

1. Przykrycie brzucha jałową folią chirurgiczną oraz jałową chustą chirurgiczną w celu zachowania zasad aseptyki.
2. Wykonanie cięcia skórno-mięśniowego w linii pośrodkowej ciała, 1 cm poniżej mostka. Długość cięcia wynosiła 4cm.
3. Przecięcie mięśni brzucha i otwarcie jamy otrzewnej. (Ryc.2)
4. Wycięcie fragmentu otrzewnej o średnicy 6mm, na przednio-bocznej, lewej, wewnętrznej powierzchni ściany brzucha. (Ryc.3)
5. Zeszyście powstałego ubytku otrzewnej ściennej szwem ciągłym, niewchłanialnym (monofilament 5-0).
6. Płukanie jamy otrzewnej badanym płynem (w zależności od przynależności do badanej grupy). (Ryc.4)
7. Jednowarstwowe zeszyście powłok jamy brzusznej za pomocą szwu ciągłego obejmującego otrzewną oraz warstwę mięśniową ściany brzucha. (Ryc.5)
8. Zamknięcie skóry brzucha za pomocą klamer skórnych.
9. Odkażenie rany pooperacyjnej za pomocą 70% etanolu.

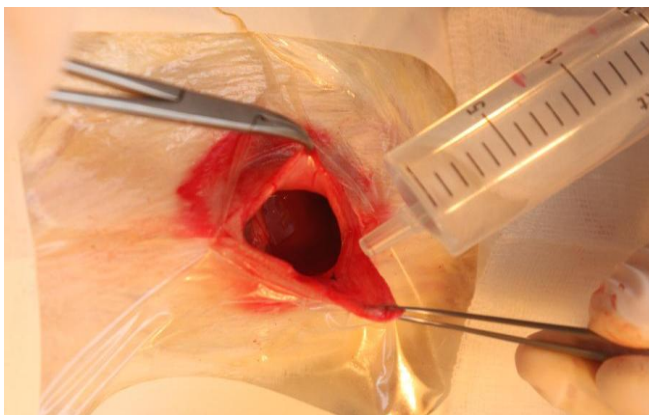
Całość zabiegu obejmowała czas 15-20min. Objawy znieczulenia ustępowały po 30min.



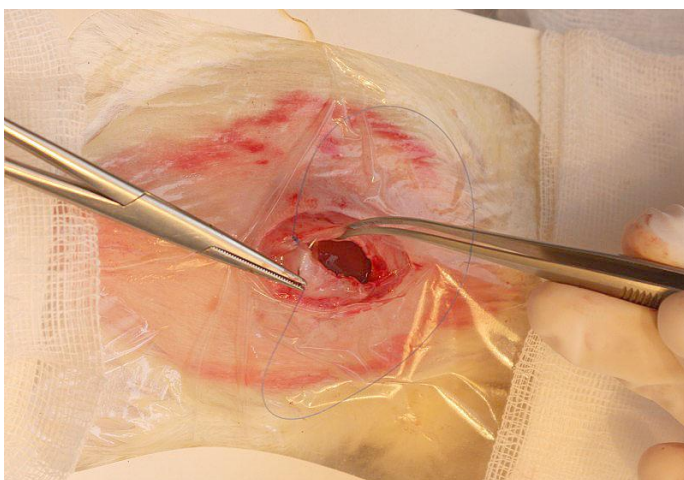
Ryc.2 Otwarcie jamy brzusznej.



Ryc.3 Wycięcie fragmentu otrzewnej ściennej o średnicy 6mm.



Ryc.4 Płukanie jamy otrzewnowej badanym roztworem.



Ryc.5 Jednowarstwowe zeszyte powłok brzusznych za pomocą szwu ciągłego.

Następnym etapem pierwszej części doświadczenia było ponowne wykonanie zabiegu operacyjnego. Spośród każdej z badanych grup losowo wybrano połowę szczurów i po upływie 24 godzin od pierwszego zabiegu wykonano ponowną laparotomię. U pozostałych zwierząt ponowną laparotomię wykonano po upływie 14 dni od pierwszego zabiegu. Przed wykonaniem powtórnej laparotomii ponownie zważono wszystkie badane szczury - waga II (Ryc.6).



Ryc. 6 Przed pierwszą i drugą laparotomią dokonano oceny masy ciała badanych szczurów.

Przebieg powtórnej laparotomii obejmował kolejno:

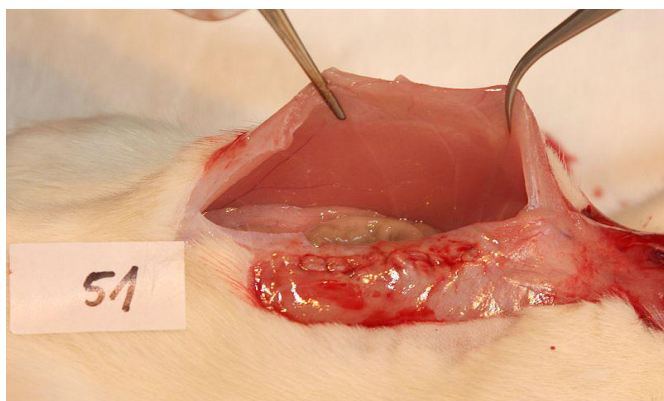
1. Znieczulenie ogólne z użyciem halotanu (eksykator z oparami halotanu).
2. Po stwierdzeniu zatrzymania akcji serca otwarcie klatki piersiowej, a następnie skrwawienie szczura poprzez otwarcie serca.
3. Otwarcie jamy brzusznej w linii równoległej, 2 cm od zagojonej rany pooperacyjnej po pierwszej laparotomii.
4. Ocena zrostów wewnątrz jamy brzusznej.

### III.1. Ocena zrostów w obrębie jamy otrzewnowej

Zrosty w obrębie jamy brzusznej oceniano za pomocą wybranych skal zliczeniowych. Użyte zostały następujące skale:

**Skala zrostów według klasyfikacji GA (Grading of adhesions)** – pięciostopniowa skala jakościowa oceniająca siłę powstałych zrostów:

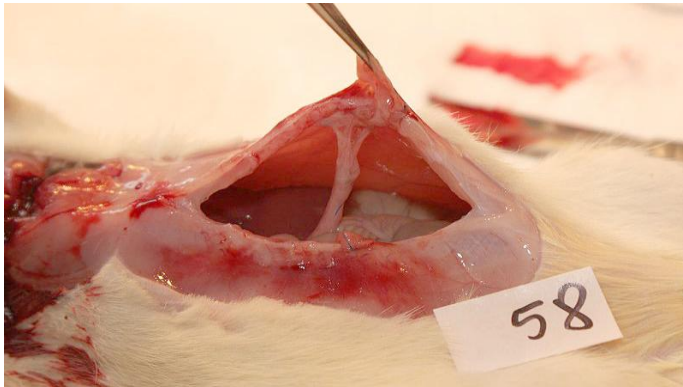
0. Brak zrostów (Ryc.7).
1. Zrosty oddzielające się pod wpływem siły ciężkości.
2. Zrosty oddzielające się na tępo.
3. Zrosty oddzielające się na ostro.
4. Zrosty z trudnością oddzielające się na ostro.



Ryc.7. Brak zrostów (0 wg klasyfikacji GA oraz GR)

**Skala zrostów według klasyfikacji GR (Gauwerky i Rózgi)** – sześciostopniowa skala jakościowa:

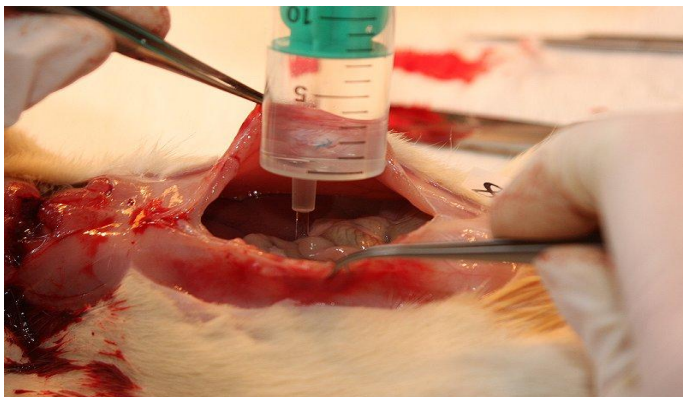
0. Brak zrostów.
1. Pojedynczy, cienki, punktowy zrost z raną otrzewnej ściennej lub raną główną.
2. Cienkie, nieliczne zrosty z raną otrzewnej ściennej lub raną główną, obejmujące mniej niż 50% długości rany. (Ryc.8)
3. Liczne zrosty obejmujące zarówno ranę otrzewnej ściennej jak i ranę główną.
4. Liczne zrosty obejmujące oprócz rany otrzewnej ściennej, jak i rany głównej, również nieuszkodzoną ścianę jamy brzusznej.
5. Zrosty narządów wewnętrznych.



Ryc.8. Cienkie, nieliczne zrosty z raną otrzewnej ściennej lub raną główną, obejmujące mniej niż 50% długości rany (2 w skali GR oraz GA)

### III.2. Uzyskiwanie popłuczyn z jamy otrzewnowej

Po dokonaniu oceny nasilenia zrostów, następnym zaplanowanym etapem było uzyskanie popłuczyn z jamy otrzewnowej badanych szczurów w celu oceny procesu zapalnego, fibrynogenetycznego oraz fibrynolitycznego. Aby uzyskać popłuczyny do jamy otrzewnowej wlewano 20 ml płynu Hanksa (Ryc.9), a następnie odczekiwano 3 minuty. Po tym czasie płyn zawarty w jamie brzusznej mieszano poprzez delikatny masaż powłok brzusznych. Następnie za pomocą pipety pasteurowskiej zbierano całą zawartość płynu znajdującego się w jamie brzusznej. W uzyskanym płynie oceniano ilościowo komórki, a następnie wykonywano ich rozmaz w celu oceny morfologicznej oraz ilościowej poszczególnych typów leukocytów.



Ryc.9. Płyn Hanksa wlewany do jamy otrzewnowej.

### III.3. Ocena ilości komórek zapalnych w badanych popłuczynach

Uzyskane popłuczyny poddane były dokładnej analizie oceniającej ilość oraz rodzaj komórek zapalnych. W tym celu wykorzystano metodę Bomskiego. Aby zliczyć ilość komórek zapalnych użyto komorę Burkera. (Ryc.10) Komora Burkera ma głębokość 0,1mm. Przedzielona jest siatką tworzącą 9 dużych kwadratów otoczonych potrójnymi liniami, tworzącymi powierzchnię  $1\text{mm}^2$ . Objętość każdego dużego kwadratu wynosi  $1/250\mu\text{l}$ . W obrębie każdego dużego kwadratu znajduje się 16 mniejszych kwadratów otoczonych podwójnymi liniami.

Aby otrzymać odpowiedni preparat do  $50\mu\text{l}$  badanych popłuczyn dodawano  $0,95\text{ml}$  odczynnika Turka (Aqua-Medica-Łódź). W ten sposób uzyskiwano 10-krotne rozcieńczenie preparatu, wybarwienie jąder komórkowych leukocytów oraz hemolizę ewentualnych erytrocytów. Tak przygotowane popłuczyny przenoszono do próbówki przykrytej korkiem i dokładnie mieszano. Następnie pobierano kroplę wymieszanego preparatu i aplikowano ją do komory na nasunięte szkiełko nakrywkowe. Odległość między szkłem nakrywkowym a dnem komory Burkera wynosiła  $0,1\text{mm}$ . Po upływie 3minut odpowiednio rozcieńczona próbka wpływała pod szkiełko nakrywkowe wypełniając właściwą część komory i powodując osadzanie się komórek na dnie komory.

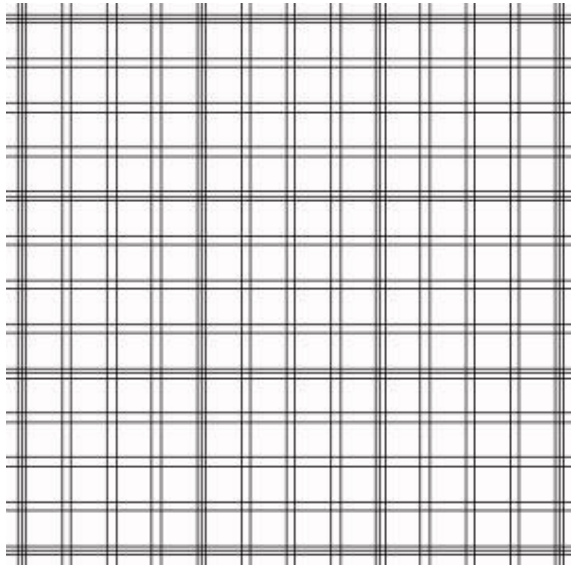
Następnie przystępowano do procesu zliczania komórek . W tym celu używano mikroskopu optycznego o powiększeniu 150-200 krotnym, licząc ilość komórek w każdym z 9 dużych kwadratów. Aby uzyskać wiarygodną wartość ilości komórek w 1 dużym kwadracie uśredniono wynik pomiaru uzyskanego z 9 kwadratów. Następnie używano poniższego wzoru w celu otrzymania ilości komórek w  $1\mu\text{l}$  popłuczyn.

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

**n**- liczba komórek na danej powierzchni siatki

**p**- powierzchnia w  $\text{mm}^2$ , na której liczone krwinki

**h**- głębokość komory'



Ryc.10. Komora Burkera służąca do zliczenia ilości komórek zapalnych.

#### **III.4. Ocena rodzaju komórek zapalnych w badanych popłuczynach**

W celu wykonania analizy rodzaju komórek zapalnych w popłuczynach wykonano rozmazy komórkowe za pomocą cytowirówki MPW 341 firmy MPW MED Instruments (Warszawa, Polska). Wykorzystując siłę odśrodkową uzyskano rozwarstwienie preparatu i osadzenie komórek na dnie próbówki. Po oddzieleniu osadu komórkowego od pozostałego płynu wykonano rozmazy, czyli cienkowarstwowe preparaty mikroskopowe. Następnie wykonywano barwienie zmodyfikowaną metodą May & Grunwalda & Giemsy. W skład zestawu barwiącego (Quick Panoptic Concentrated) firmy QCA (Hiszpania) wchodziły następujące odczynniki: roztwór hexametylo-p-rosaniliny, bufor ksantynowy i tiazynowy. Preparaty poddawano dokładnemu osuszeniu, po czym zanurzano je kolejno w odczynnikach barwiących, rozpoczynając od roztworu hexametylo-p-rosanilinowego. Czas barwienia dla każdego odczynnika wynosił 10 sekund. Następnie preparaty płukano wodą destylowaną, osuszano w temperaturze pokojowej i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym za pomocą balsamu kanadyjskiego. W kolejnym etapie dokonano ocenę mikroskopową rozmazu. Wykorzystywano mikroskop świetlny, oglądając preparaty za pomocą obiektywu immersyjnego o 1000-krotnym



powiększeniu. W przygotowanych rozmazach oceniano morfologię komórek oraz procentowy rozkład poszczególnych komórek zapalnych:

- makrofagów
- limfocytów
- eozynofili
- mastocytów
- neutrofilii

### **III.5. Ocena aktywności elastazy w badanych popłuczynach**

Kolejnym etapem badania popłuczyn było określenie aktywności elastazy leukocytów. Oznaczeń elastazy dokonywano bezpośrednio po uzyskaniu preparatów popłuczyn. W tym celu wykorzystano metodę opisaną przez Visser & Blout. Jako substrat zastosowano N-t-butoksy-karbonyl-L ester nitrofenolu kwasu 2-aminopropanowego (Sigma Chemical CO., USA), a do oznaczeń użyto płytek 96-studzienkowych (Corning, USA). Uzyskane próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze 25°C, w buforze Tris-HCL (Sigma Chemical CO., USA), 0,1 mol/L (pH=7,8). W następnym etapie dodawano substrat w stężeniu 4 mmol/L, rozpuszczony w sulfotlenku dimetylowym (DMSO), (Sigma Chemical CO., USA). Ilość uwalnianego w wyniku reakcji enzymatycznej p-nitrofenolu oceniano na podstawie przyrostu absorbancji przy długości fali 405 nm na spektrofotometrze Labsystem Multiscan MCC/340, typ 347 (Helsinki, Finlandia).

### **III.6. Pomiar cytokin MCP-1, TNF-alpha, IL-6 za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA typu „Sandwich”.**

Pomiary zostały wykonane przy odpowiednich, dla każdej cytokiny, długościach fal na spektrofotometrze. Stężenia oznaczone były na podstawie odpowiednich krzywych wzorcowych.

**Pomiar stężenia MCP-1 w badanych popłuczynach:**

Stężenie MCP-1 w próbkach mierzono wykorzystując test firmy Biosource International dla oznaczania szczurzego MCP-1 (KRC 1012, California, USA). W celu oznaczenia zastosowano metodę ELISA (test immunoabsorpcji enzymozależnej), w której używa się płytek fabrycznie opłaszczonych przeciwciałami specyficznymi dla MCP-1. Pomiar wykonano wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm na spektrofotometrze Labsystem Multiscan MCC/340, typ 347 (Helsinki, Finlandia). Stężenie MCP-1 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

**Pomiar stężenia szczurzego czynnika martwicy guza -  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) w badanych popłuczynach:**

Stężenie TNF $\alpha$  w próbkach określano wykorzystując test firmy Biosource International dla oznaczania szczurzego TNF- $\alpha$  (KRC 3013, California, USA). Zasadą oznaczania była metoda ELISA (test immunoabsorbancji enzymozależnej), w której używano płytki opłaszczonej specyficznymi przeciwciałami, wiążącymi szczurzy TNF $\alpha$ . Powstały kompleks związany z peroksydazą reagującą z nadtlaniem wodoru powodował powstanie barwnego produktu. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia TNF $\alpha$  w próbce. Pomiar wykonywano wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm na spektrofotometrze Labsystem Multiscan MCC/340, typ 347 (Helsinki, Finlandia). Stężenie TNF $\alpha$  w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

**Pomiar stężenia interleukiny 6 (IL-6) w badanych popłuczynach:**

Stężenie IL-6 w próbkach wyznaczano za pomocą testu firmy Biosource International dla oznaczania szczurzej IL-6 (KRC 0012, California, USA). Do oznaczenia wykorzystano metodę immunoabsorpcji enzymozależnej (ELISA), w której użyto płytki opłaszczone specyficznymi przeciwciałami, wiążącymi szczurzą IL-6. Zgodnie z zasadą tej metody powstały kompleks zostaje związany z peroksydazą, która reagując z nadtlaniem wodoru powoduje powstanie barwnego produktu. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia IL-6 w próbce. Pomiar wykonywano

wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm na spektrofotometrze Labsystem Multiskan MCC/340, typ 347 (Helsinki, Finlandia).

### **III.7. Ocena statystyczna**

Analizy statystycznej uzyskanych wyników dokonano przy użyciu programu komputerowego Statistica v. 7.0. Zmienne interwałowe przedstawiono w postaci średniej i odchylenia standardowego. Zmienne porządkowe przedstawiono w postaci mediany i rozstępu.

Zgodność zmiennych interwałowych z rozkładem normalnym sprawdzono przy użyciu testu Kołmogorowa-Smirnowa. Do analizy statystycznej uzyskanych w badaniu wyników zastosowano następujące testy: Manna Whitneya, Kruskala Wallisa oraz test t-Studenta. Przyjęto poziom istotności  $\alpha=0,05$ .

## IV. WYNIKI

### IV.1. Ocena nasilenia zrostów pooperacyjnych:

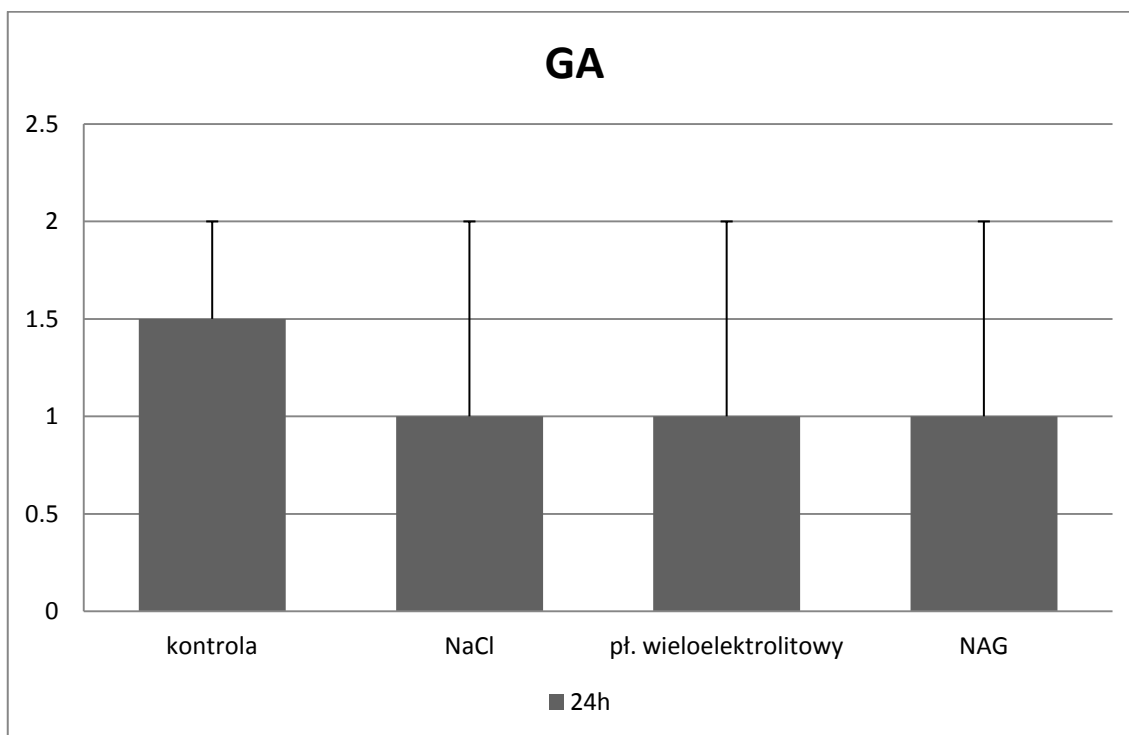
#### Punktacja zrostów według klasyfikacji GA

- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami

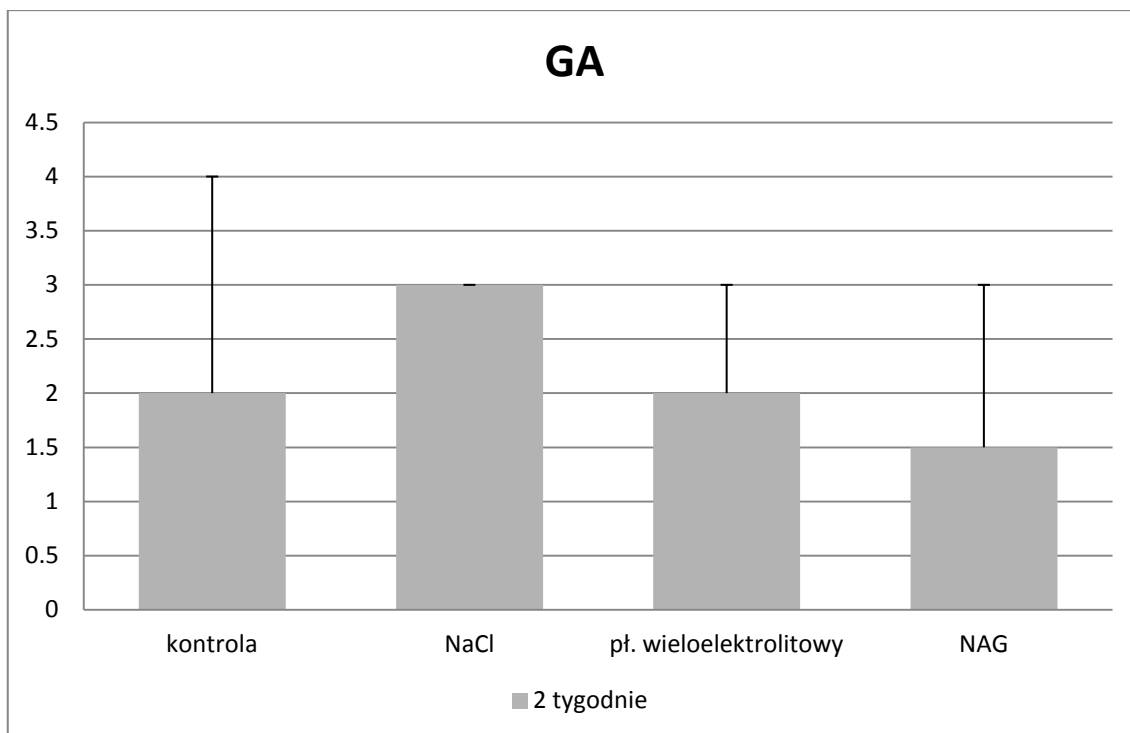
Analiza statystyczna porównująca zrosty oceniane w skali GA w 2. dobie po płukaniu otrzewnej nie wykazała istotnie statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami badanymi (Ryc.11). Podobny wynik uzyskano w 14. dobie po płukaniu otrzewnej (Ryc.12)

- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą od laparotomii

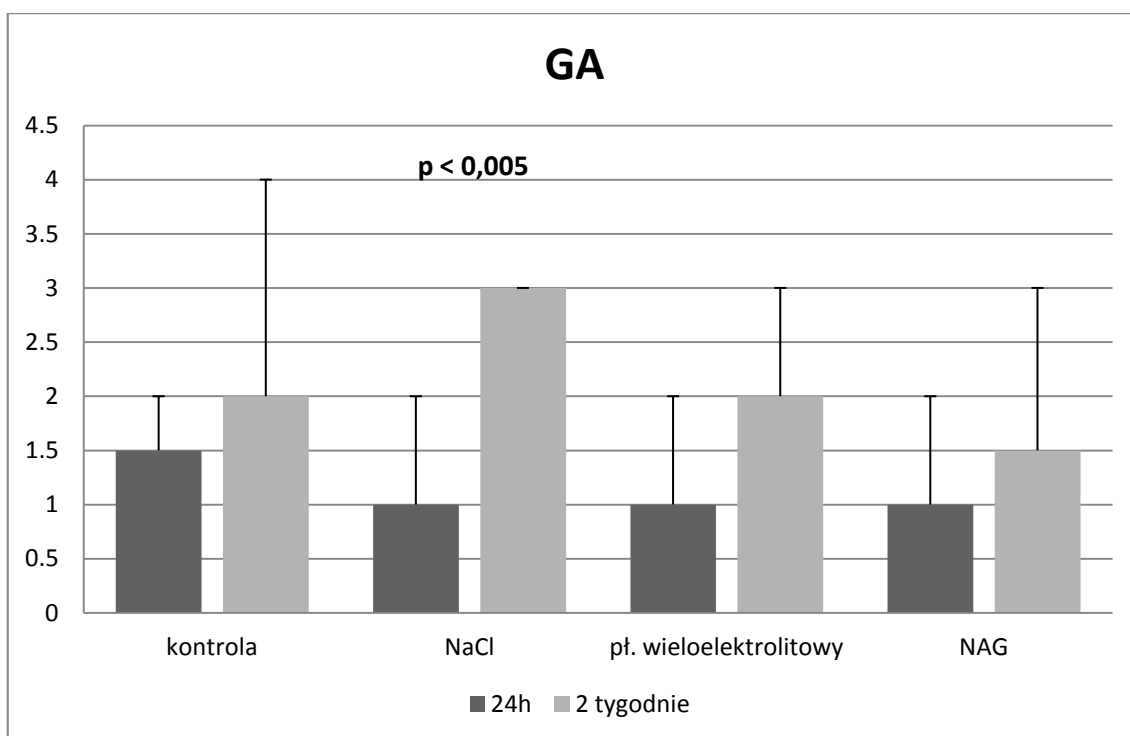
Porównanie nasilenia zrostów po 2 tygodniach również nie wykazało istotnych statystycznie różnic dla grupy I (grupa kontrolna), III (płukanie płynem wieloelektrolitowym) oraz IV (płukanie NAG). Natomiast dla grupy II (płukanie NaCl) wykazano istotnie statystyczne nasilenie zrostów ( $p < 0,005$ ) po 2 tygodniach (Ryc.13).



Ryc. 11. Ocena nasilenia zrostów (GA) po 24h od płukania otrzewnej.



Ryc.12. Ocena nasilenia zrostów (GA) po 14 dobach od płukania otrzewnej.



Ryc.13. Porównanie nasilenia zrostów (GA) po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

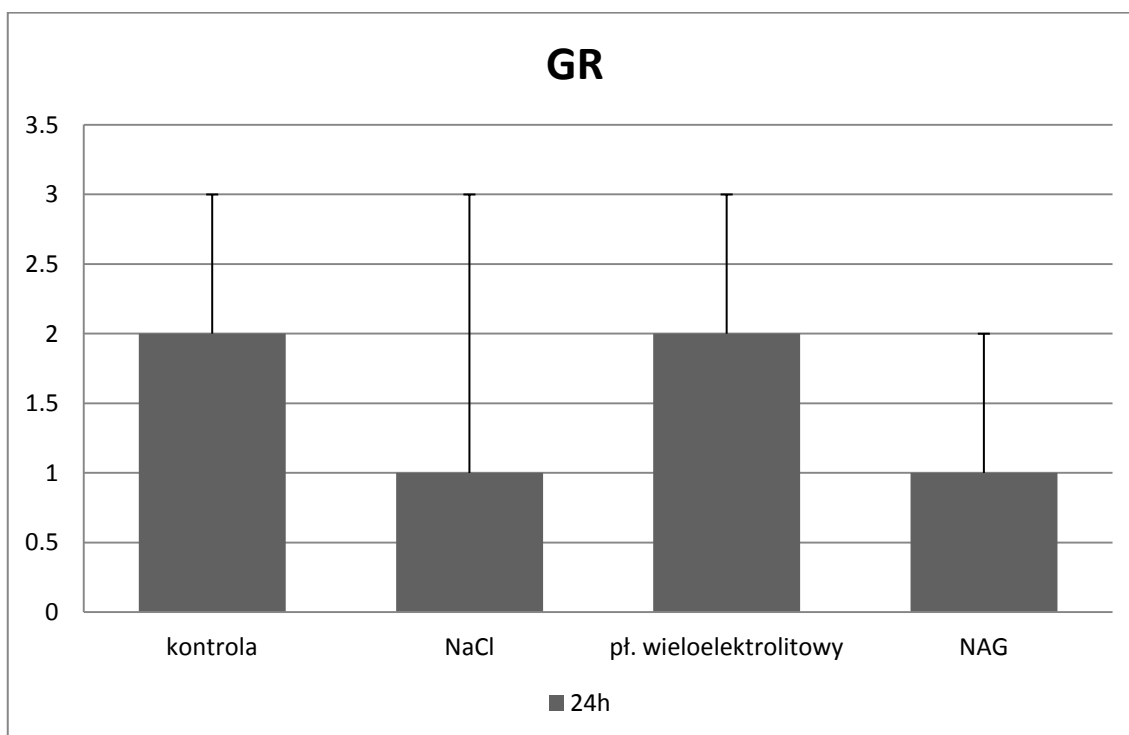
### Punktacja zrostów według klasyfikacji GR

- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej

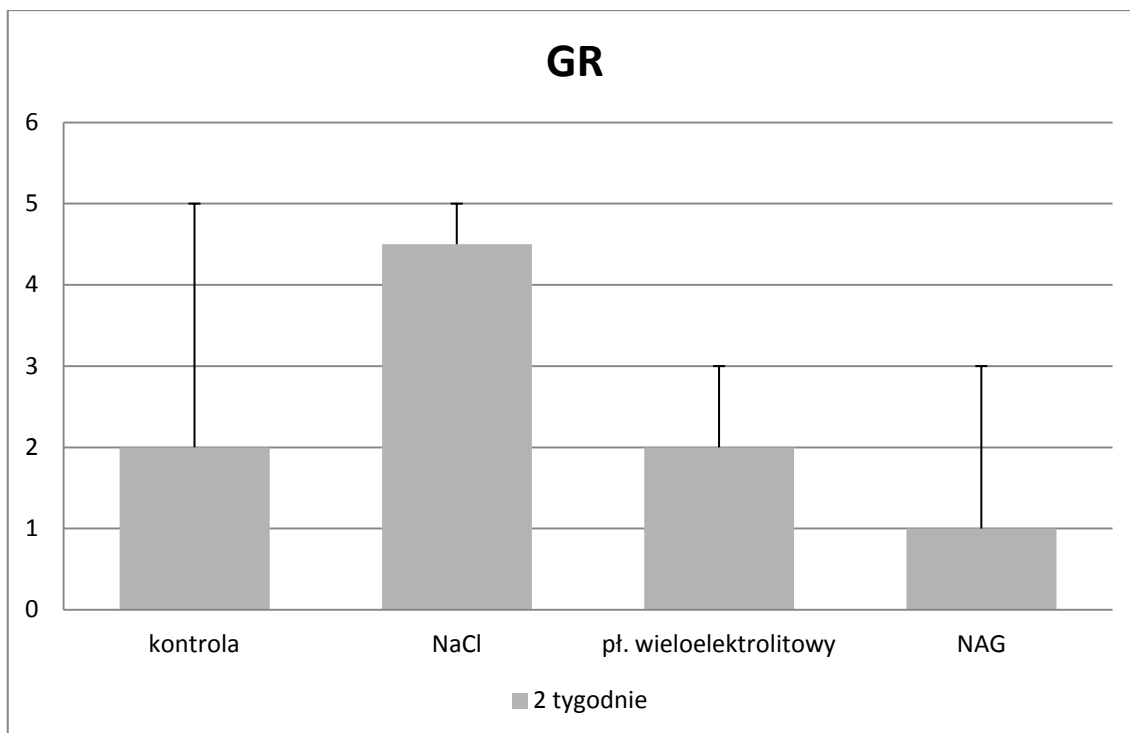
Porównanie nasilenia zrostów ocenianych według skali GR nie przyniosło istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami badanymi zarówno w 2. Dobie (Ryc.14), jak i 2 tygodnie po wykonaniu płukania otrzewnej (Ryc.15).

- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii

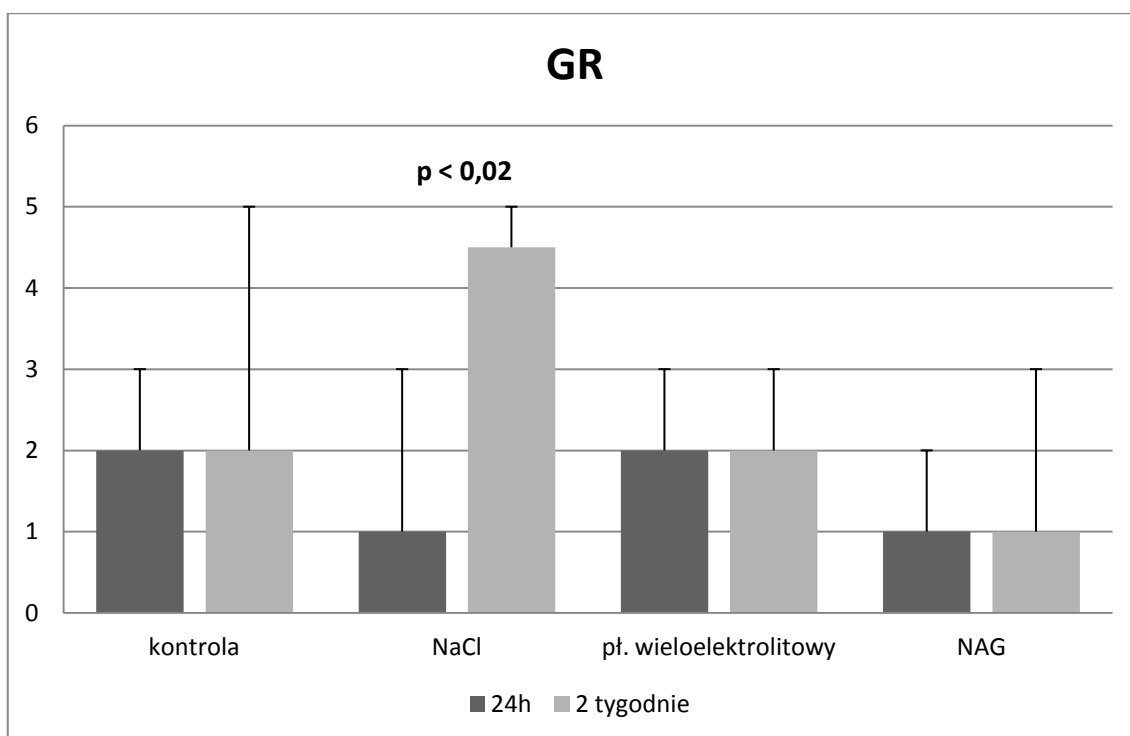
Analiza zmiany nasilenia zrostów w poszczególnych grupach wykazała nasilenie zrostów dla grupy II, w której wykonano płukanie otrzewnej 0,9% NaCl ( $p < 0,02$ ). W pozostałych grupach badanych nie uzyskano istotnie statystycznych różnic w nasileniu zrostów (Ryc.16).



Ryc. 14. Ocena nasilenia zrostów (GR) po 24h od płukania otrzewnej.



Ryc. 15. Ocena nasilenia zrostów (GR) po 14 dniach od płukania otrzewnej.



Ryc.16. Porównanie nasilenia zrostów (GR) po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

### Ocena wzrostów według sumy klasyfikacji GR oraz GA

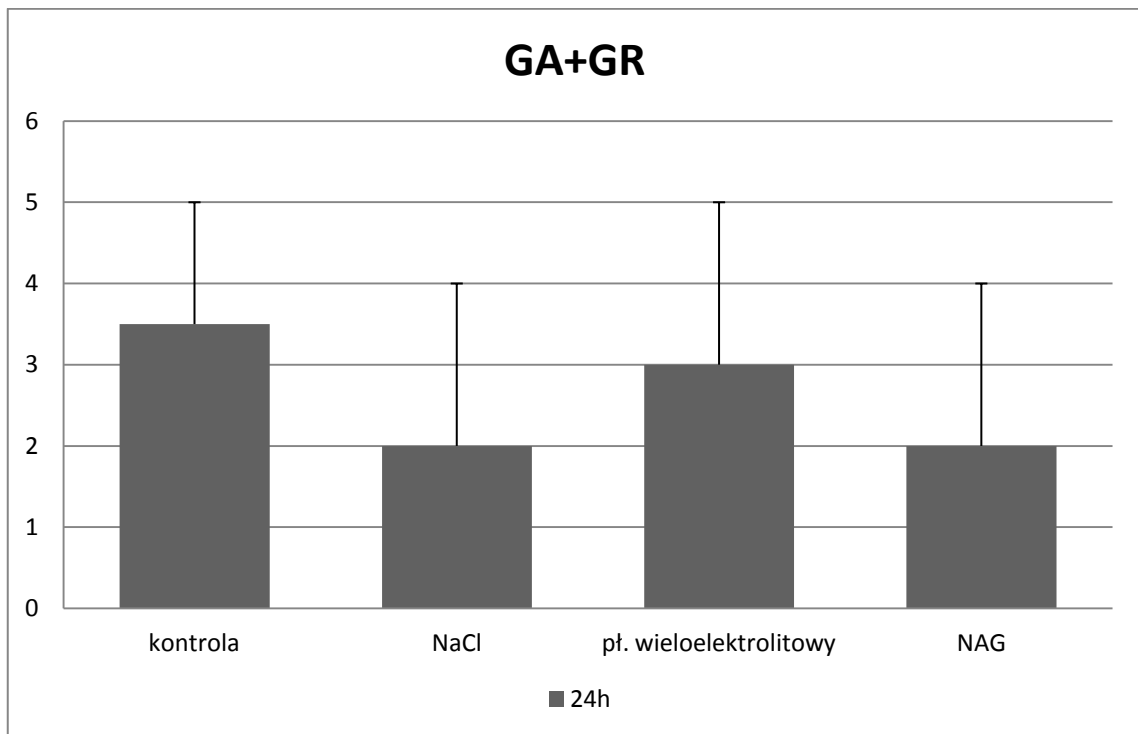
Ze względu na brak różnic pomiędzy badanymi grupami zarówno w ocenie wzrostów według skali GA jak i GR, porównano również wyniki oceniając stopień nasilenia wzrostów według sumy obu wyżej wymienionych skal.

- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej

Analiza statystyczna nie przyniosła istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami badanymi w 2. (Ryc.17) oraz 14. (Ryc.18) dobie po płukaniu otrzewnej.

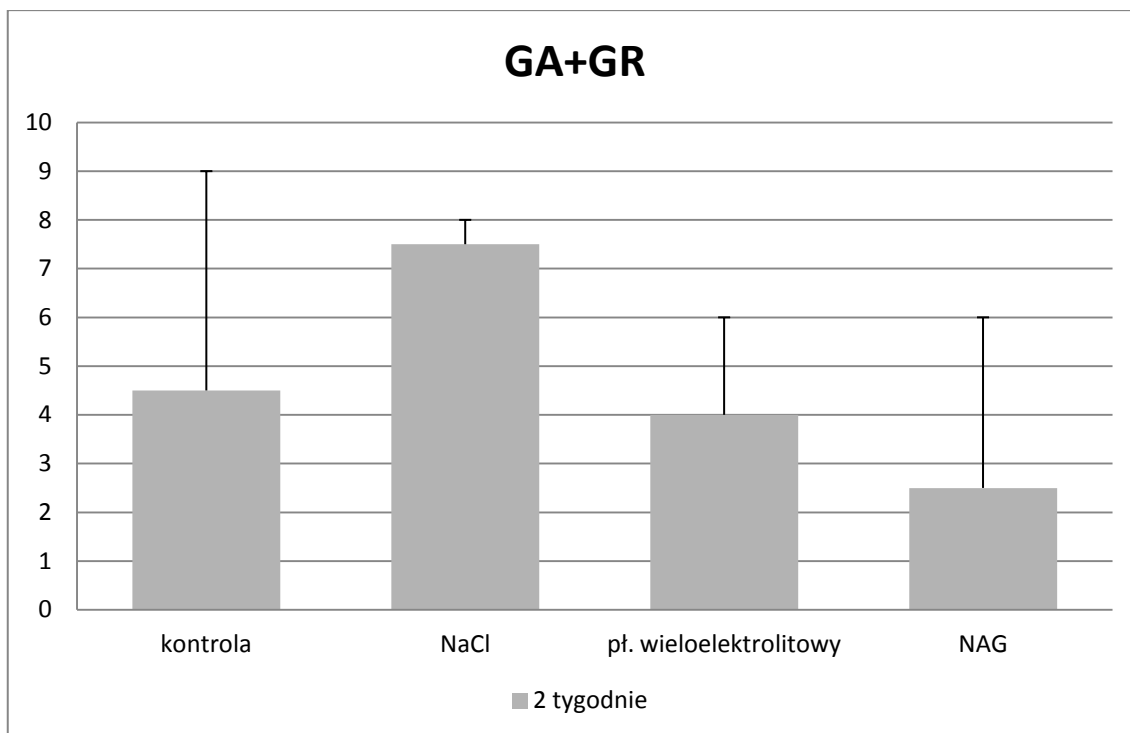
- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii

Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy wzrostami w 2. dobie i po 2 tygodniach bez płukania, po płukaniu płynem wieloelektrolitowym i NAG. Jedynie po płukaniu NaCl istotnie wzrósł poziom wzrostów ( $p < 0,01$ ). (Ryc.19)

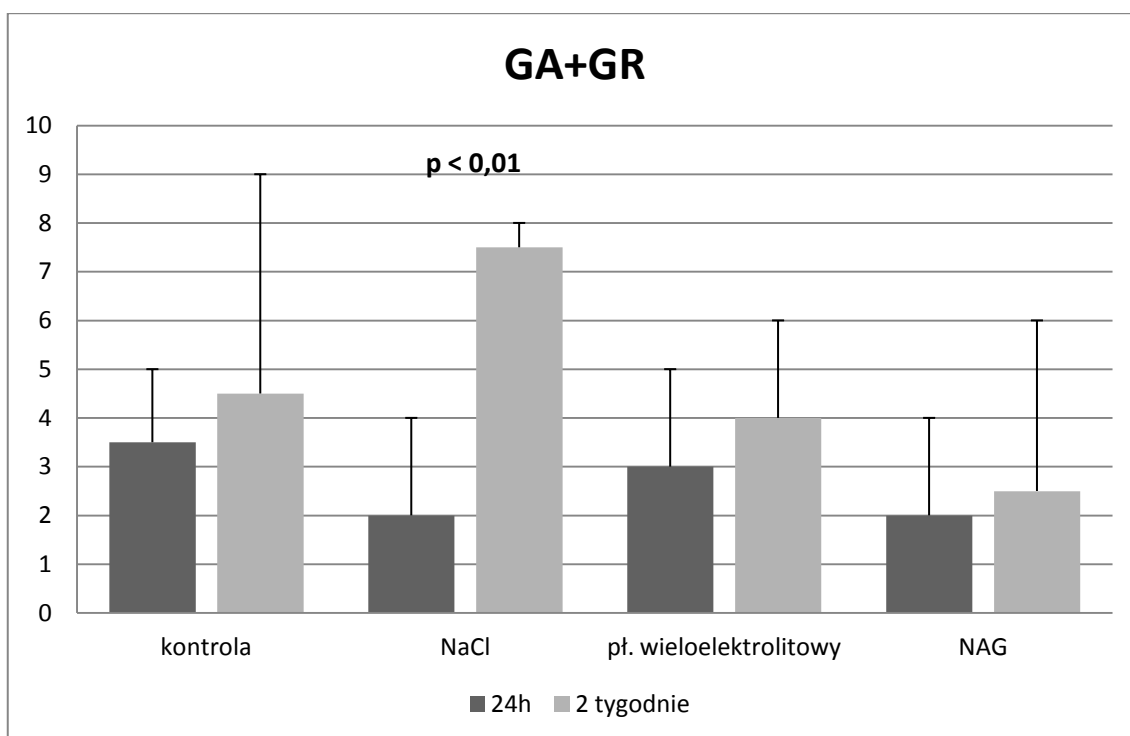


Ryc. 17. Ocena nasilenia wzrostów (GA+GR) po 24h od płukania otrzewnej.





Ryc. 18. Ocena nasilenia zrostów (GA+GR) po 14 dniach od płukania otrzewnej.



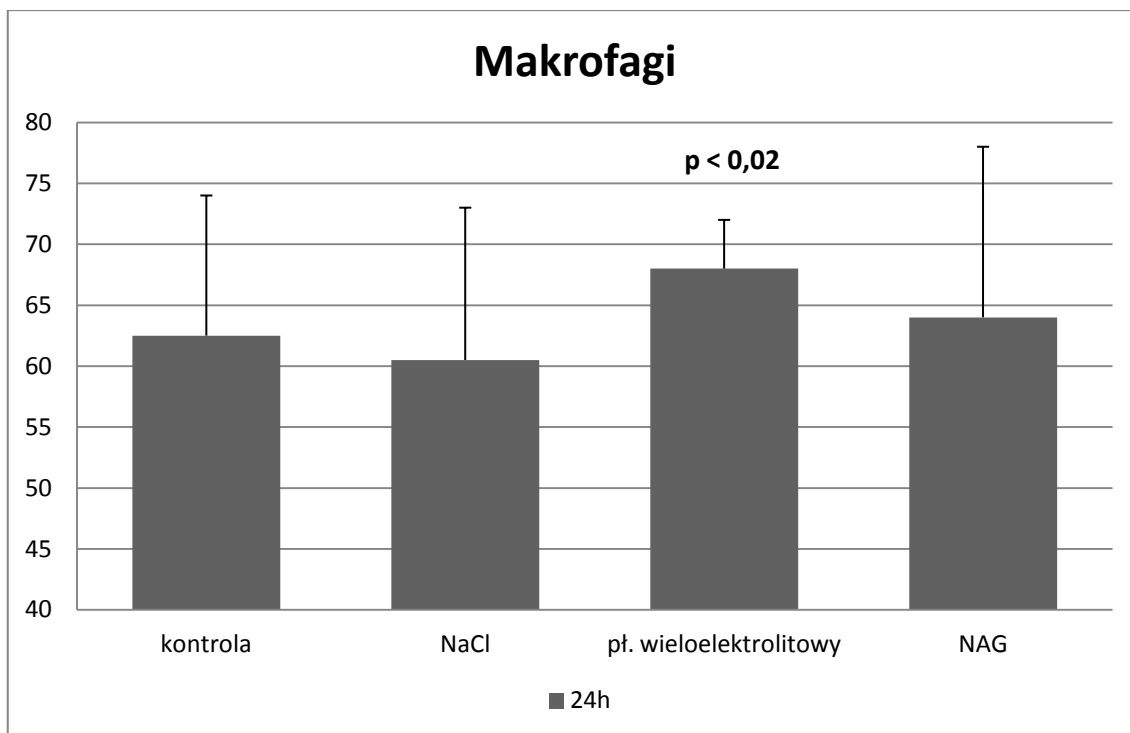
Ryc.19. Porównanie nasilenia zrostów (GA+GR) po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

## IV.2. Ocena odczynu komórkowego w jamie brzusznej

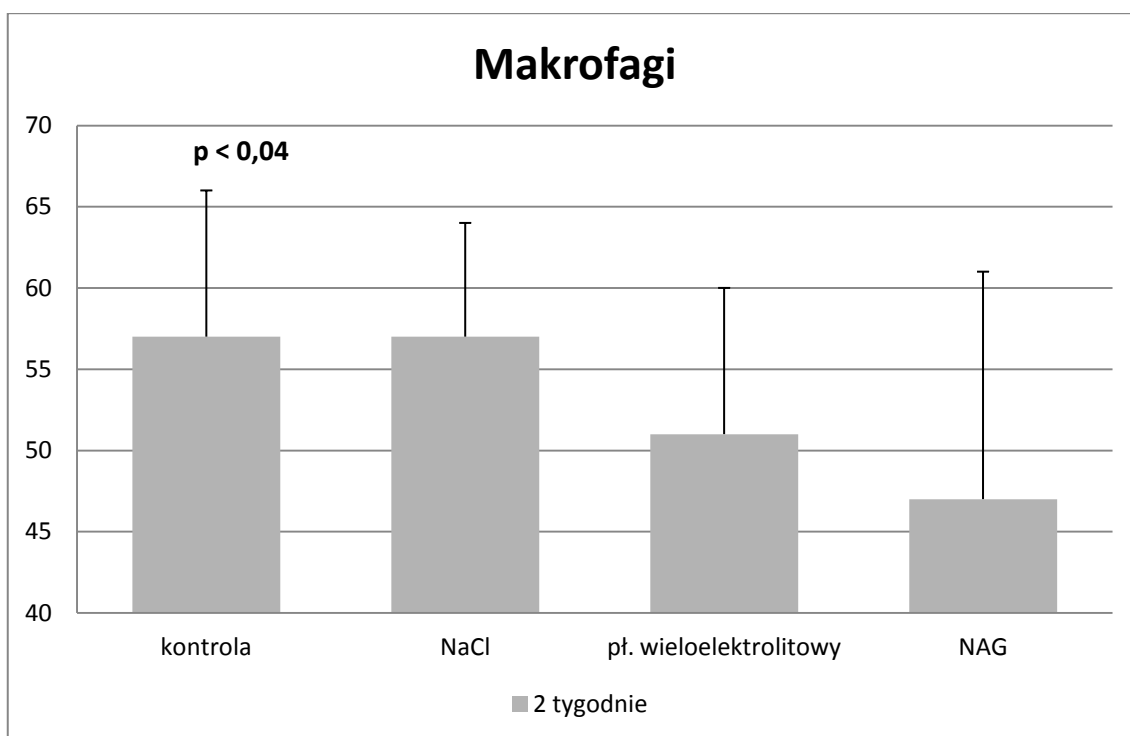
- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami

Porównanie badanych grup pod względem ilości poszczególnych komórek zapalnych w 2. i 14. dobie po płukaniu otrzewnej wykazało istotne statystycznie różnice (Ryc.20-29):

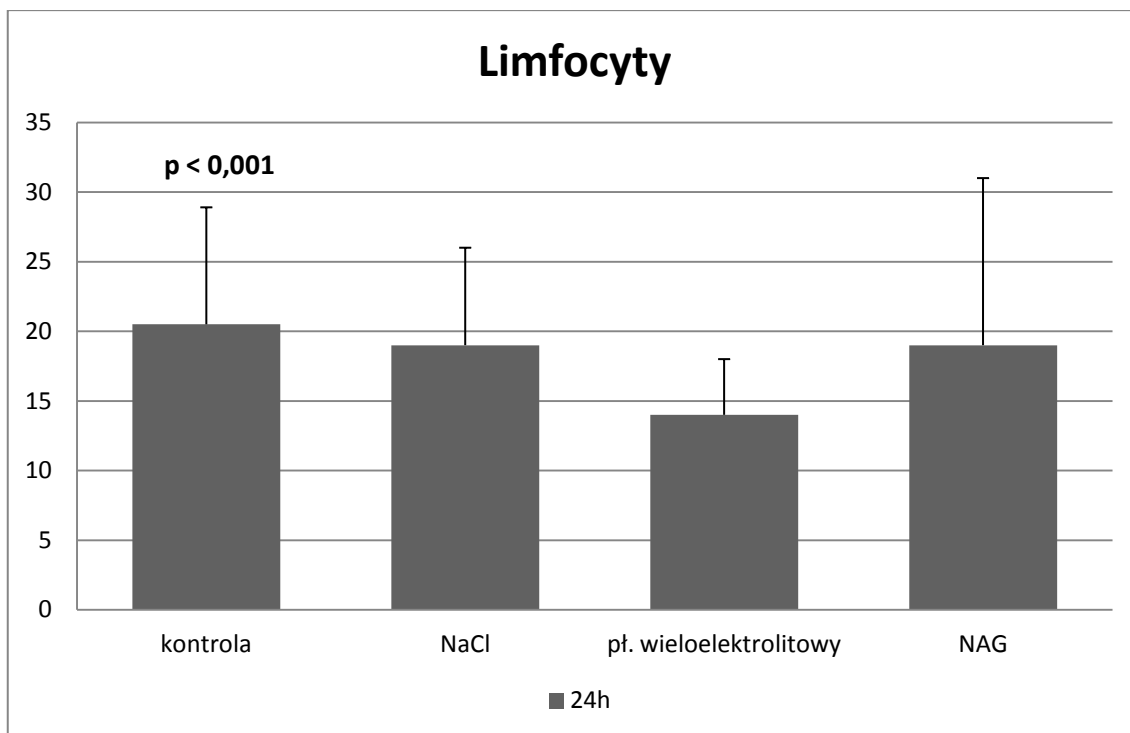
- W 2. dobie po płukaniu otrzewnej:
  - Poziom makrofagów wyższy w grupie III niż w grupie II ( $p < 0,02$ ) (Ryc.20)
  - Poziom limfocytów niższy w grupie III niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ) (Ryc.22)
  - Poziom mastocytów wyższy w grupie III niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,005$ ) (Ryc.28)
  - Poziom mastocytów wyższy w grupie III niż w grupie IV ( $p < 0,005$ ) (Ryc.28)
- Po 14 dniach od płukania otrzewnej:
  - Poziom makrofagów wyższy w grupie kontrolnej niż w grupie IV ( $p < 0,05$ ) (Ryc.21)
  - Poziom limfocytów niższy w grupie II niż w grupie IV ( $p < 0,05$ ) (Ryc.23)
  - Poziom eozynofili niższy w grupie kontrolnej niż w grupie IV ( $p < 0,05$ ) (Ryc.25)
  - Poziom mastocytów niższy w grupie kontrolnej niż w grupie IV ( $p < 0,002$ ) (Ryc.29)
  - Poziom mastocytów niższy w grupie II niż w grupie IV ( $p < 0,005$ ) (Ryc.29)



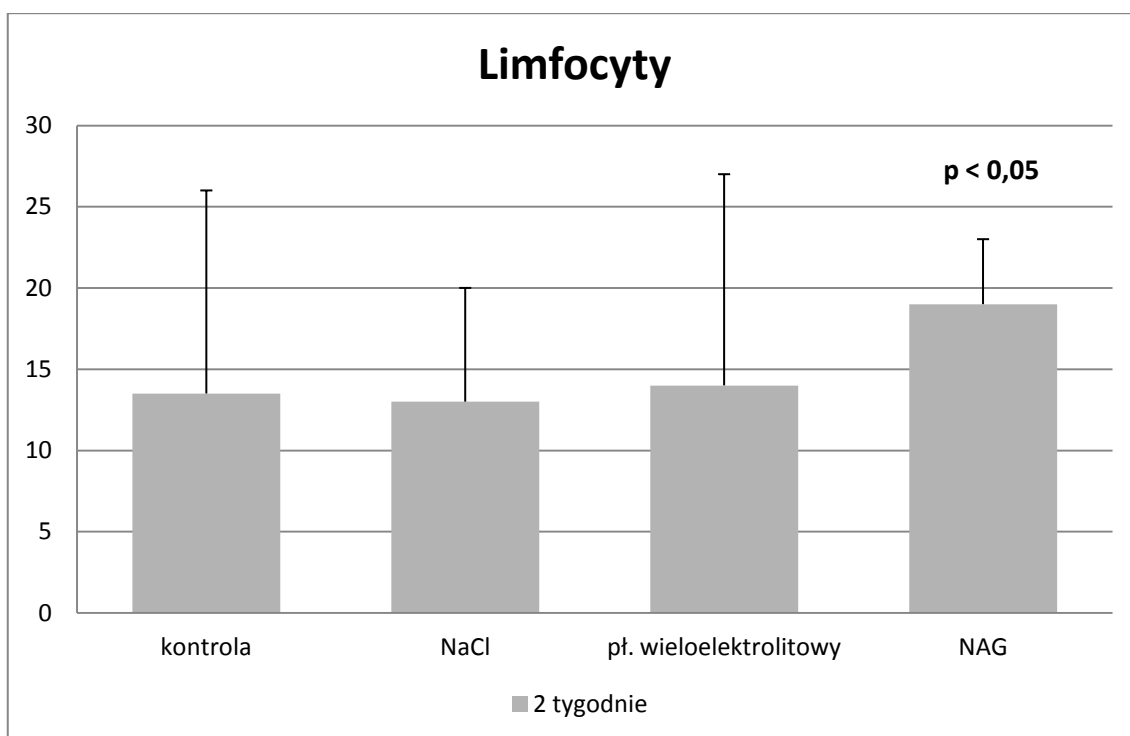
Ryc. 20. Ocena ilości makrofagów po 24h od płukania otrzewnej.



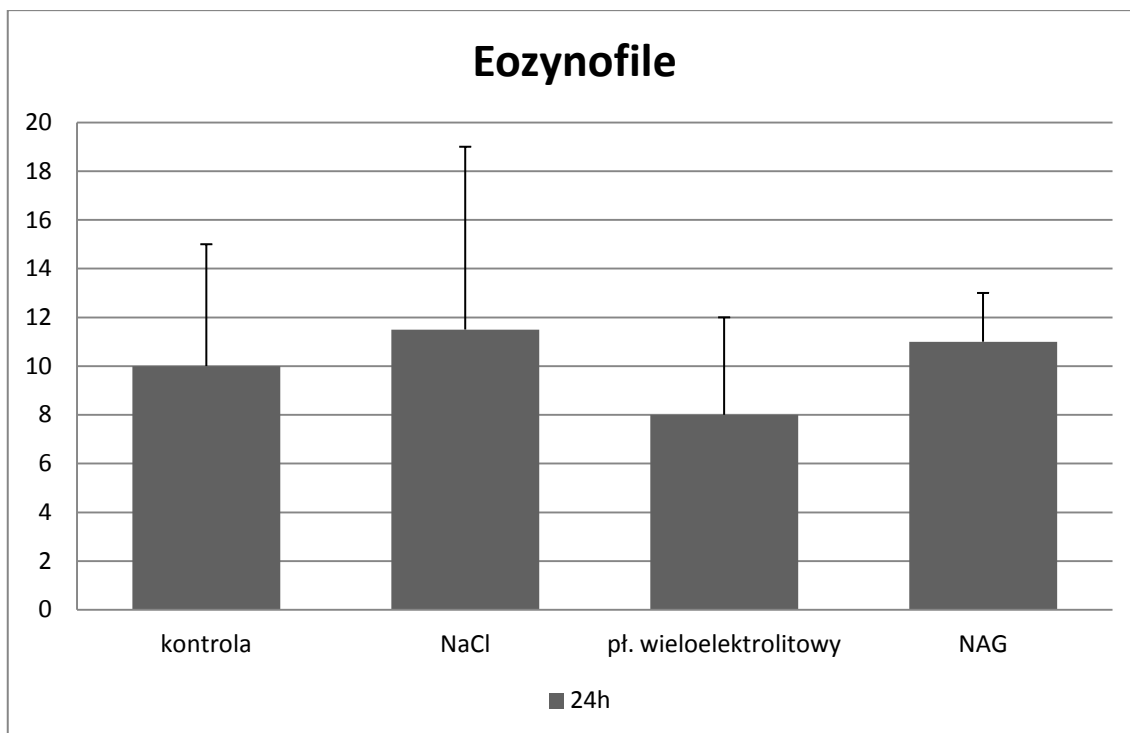
Ryc. 21. Ocena ilości makrofagów po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.



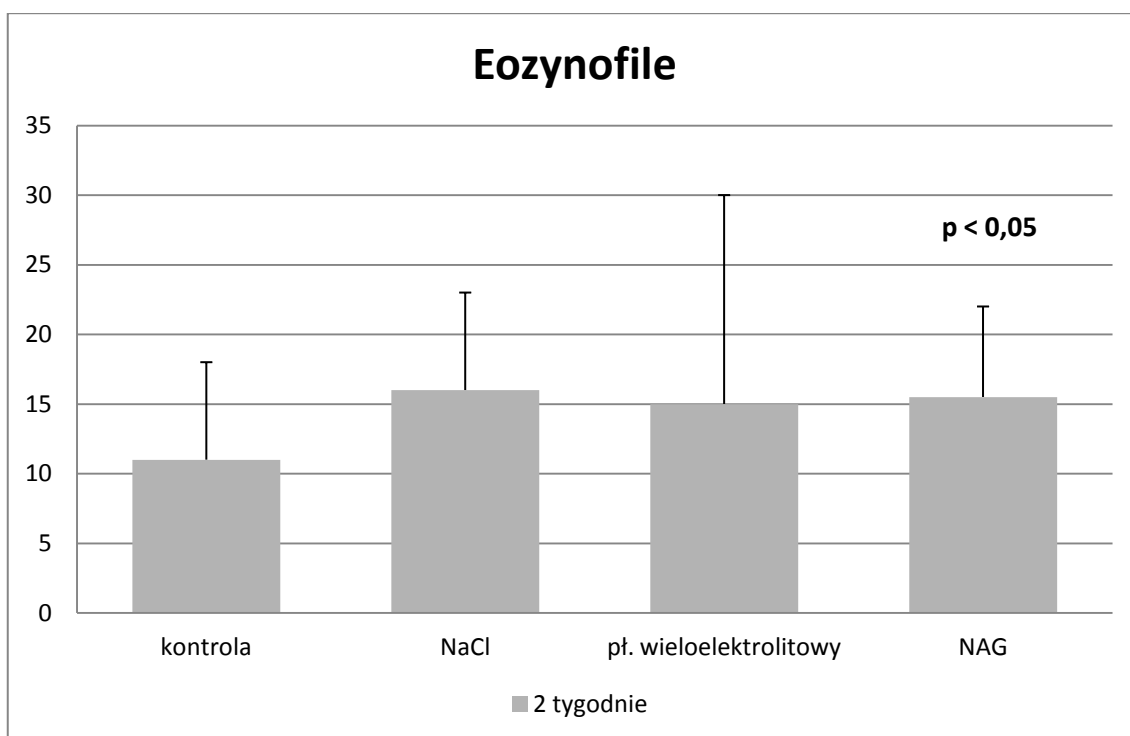
Ryc. 22. Ocena ilości limfocytów po 24h od płukania otrzewnej.



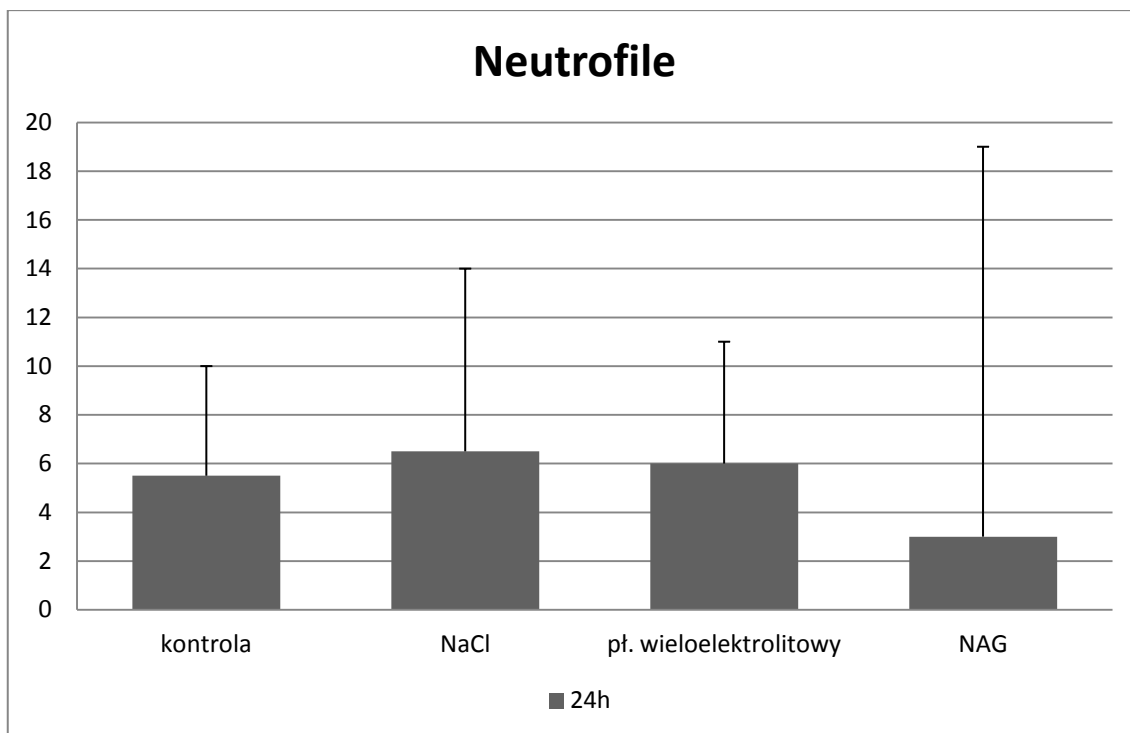
Ryc. 23. Ocena ilości limfocytów po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.



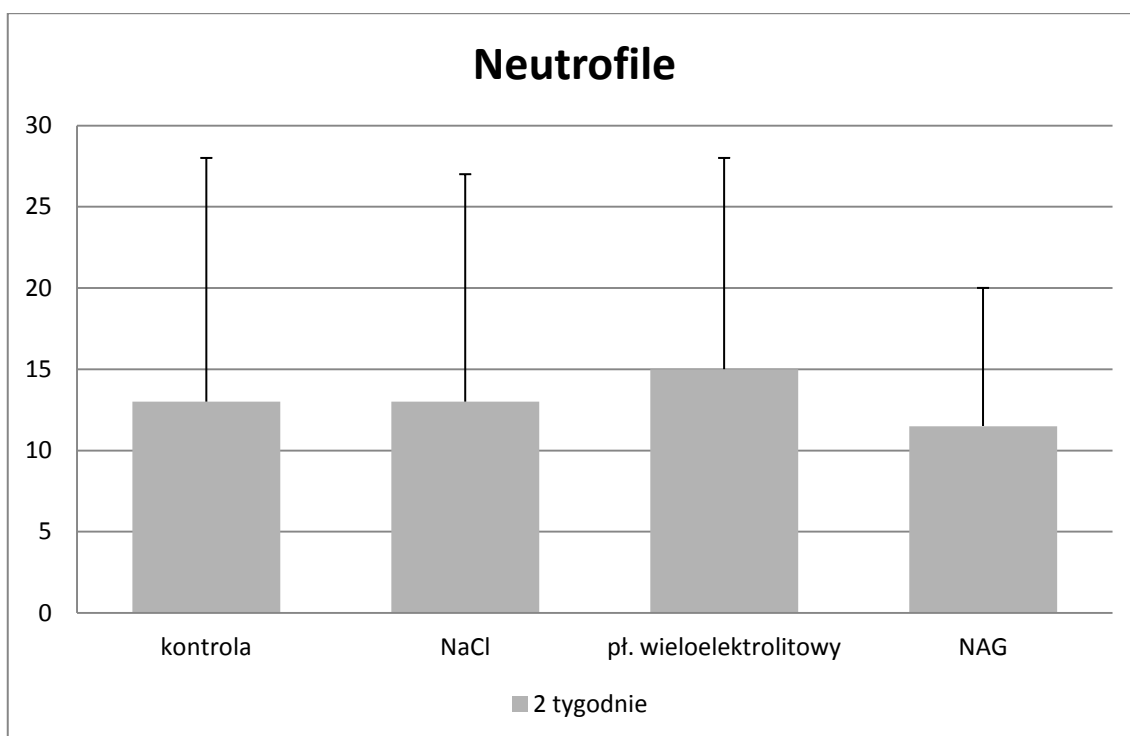
Ryc. 24. Ocena ilości eozynofili po 24h od płukania otrzewnej.



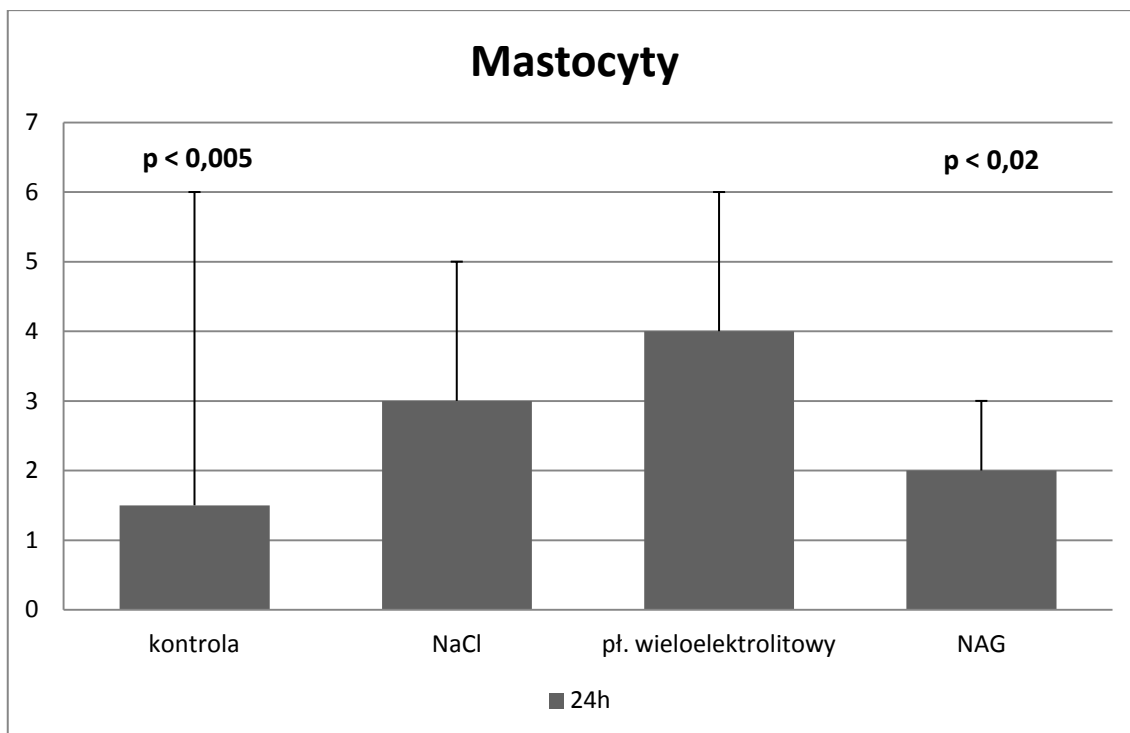
Ryc. 25. Ocena ilości eozynofili po 2 tygodnie od płukania otrzewnej.



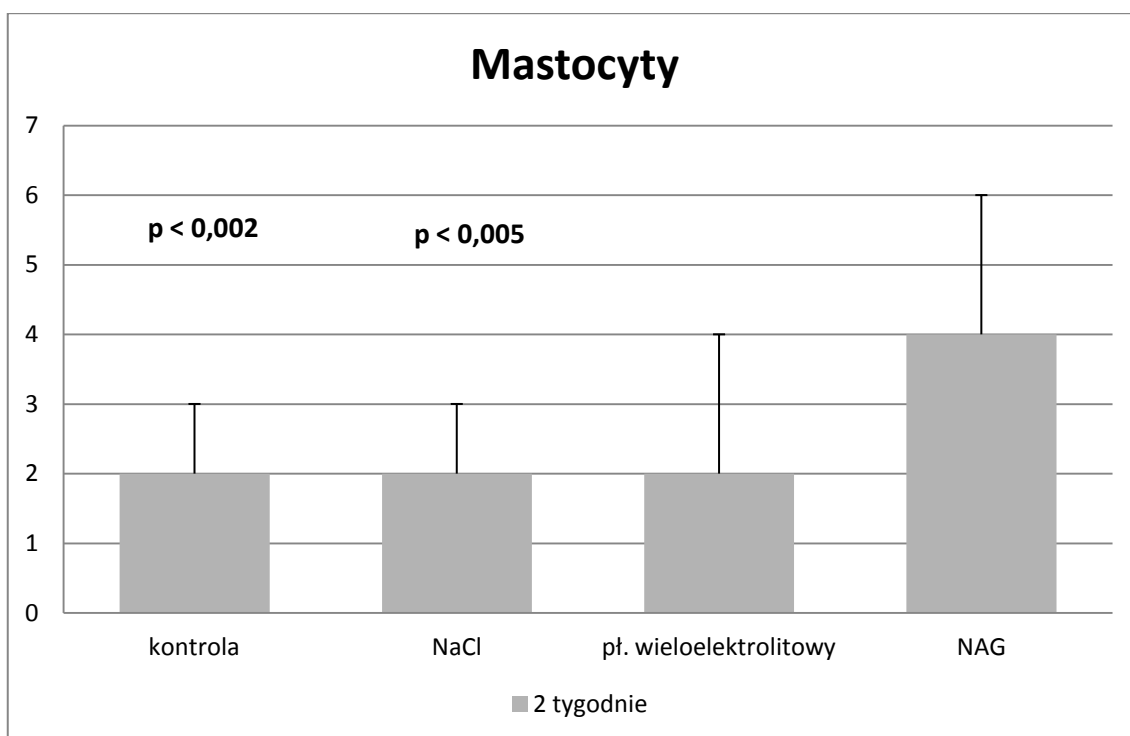
Ryc. 26. Ocena ilości neutrofilii 24h od płukania otrzewnej.



Ryc. 27. Ocena ilości neutrofilii 2 tygodnie od płukania otrzewnej.



Ryc. 28. Ocena ilości mastocytów 24h po płukaniu otrzewnej.

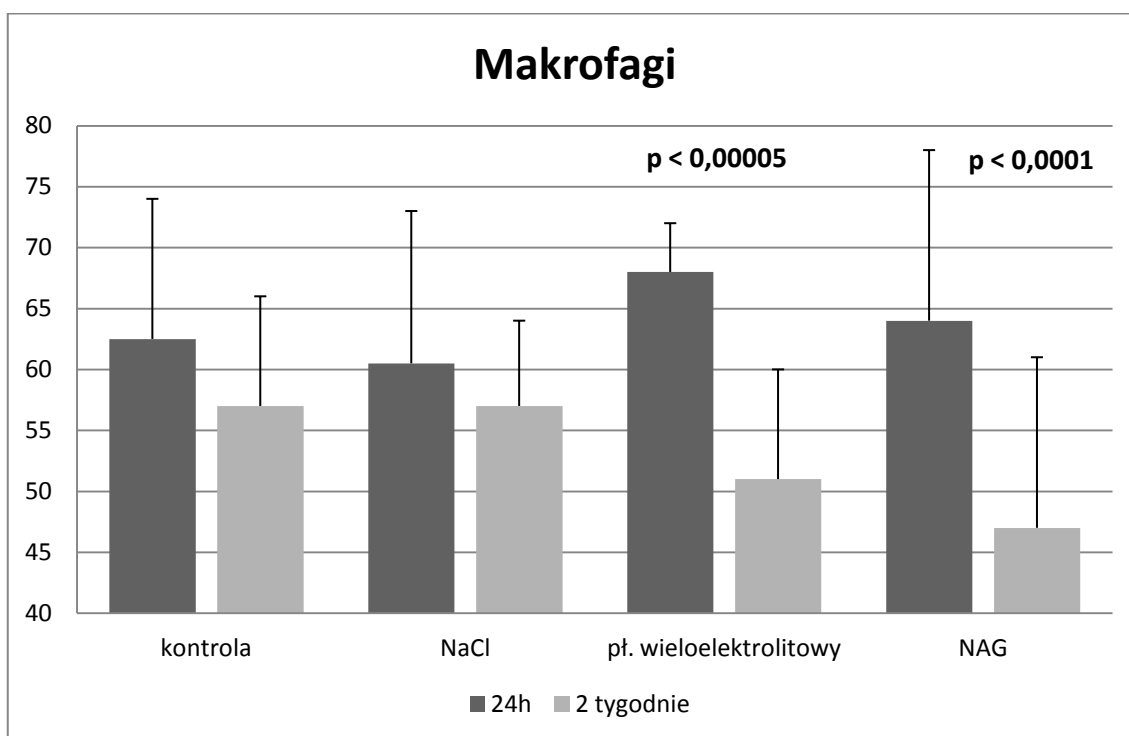


Ryc. 29. Ocena ilości mastocytów 2 tygodnie po płukaniu otrzewnej.

- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii

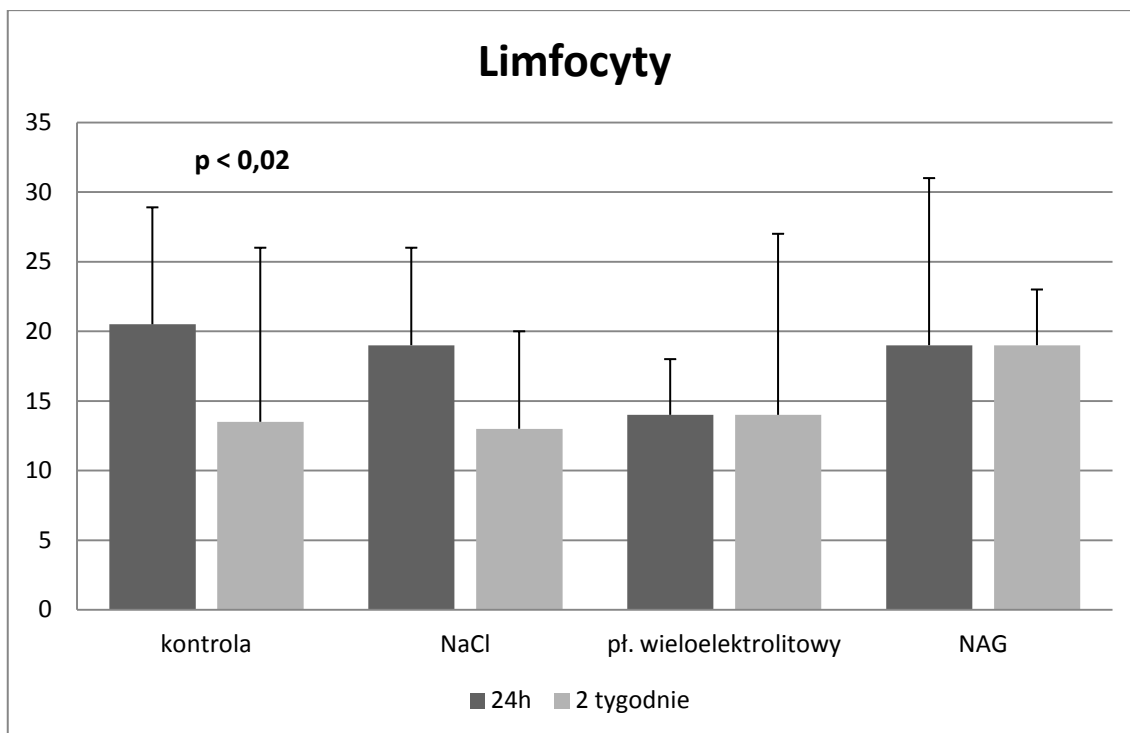
Wykonano analizę zmian ilościowych poszczególnych komórek zapalnych w każdej z badanych grup (Ryc.30-34). Uzyskane wyniki istotne statystycznie:

- Grupa kontrolna: zmniejszenie poziomu limfocytów ( $p < 0,02$ ) (Ryc.31) oraz wzrost poziomu neutrofilii ( $p < 0,0005$ ) (Ryc.33)
- Grupa III: spadek poziomu makrofagów ( $p < 0,00005$ ) (Ryc.30), wzrost poziomu eozynofili ( $p < 0,02$ ) (Ryc.32), wzrost poziomu neutrofilii ( $p < 0,0005$ ) (Ryc.33), wzrost poziomu mastocytów ( $p < 0,005$ ) (Ryc.34)
- Grupa IV: zmniejszenie poziomu makrofagów ( $p < 0,0001$ ) (Ryc.30), wzrost poziomu eozynofili ( $p < 0,005$ ) (Ryc.32), wzrost poziomu neutrofilii ( $p < 0,005$ ) (Ryc.33), wzrost poziomu mastocytów ( $p < 0,005$ ) (Ryc.34)

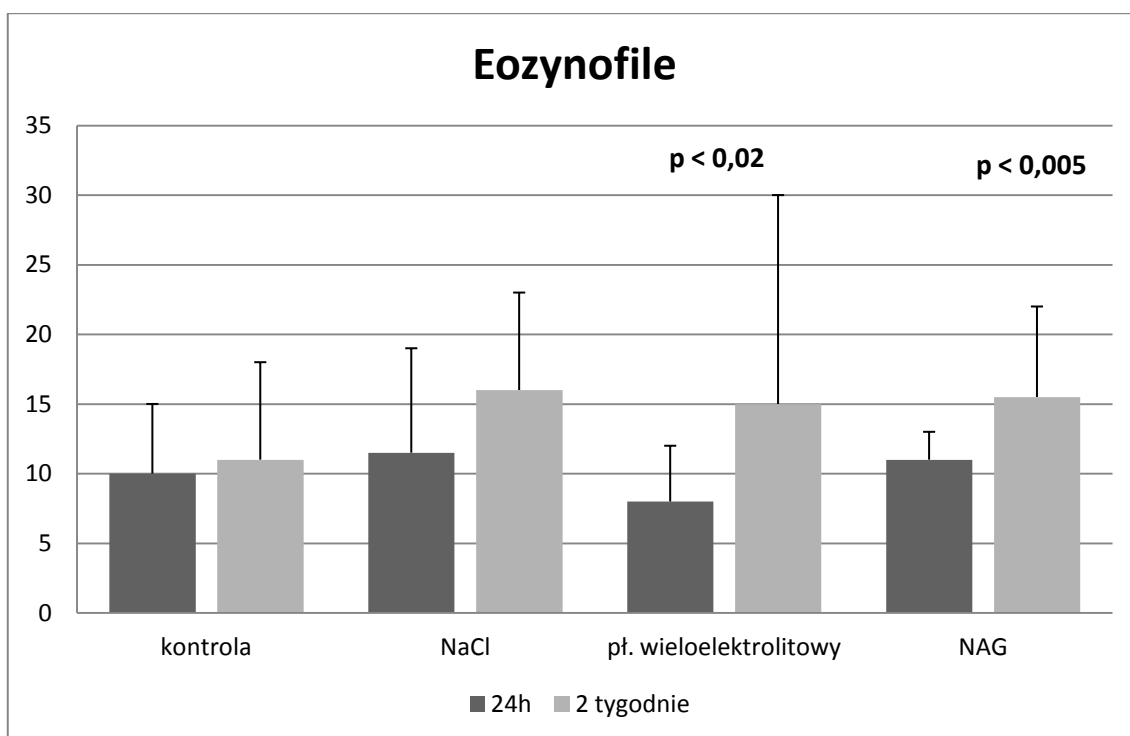


Ryc. 30. Porównanie ilości makrofagów po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

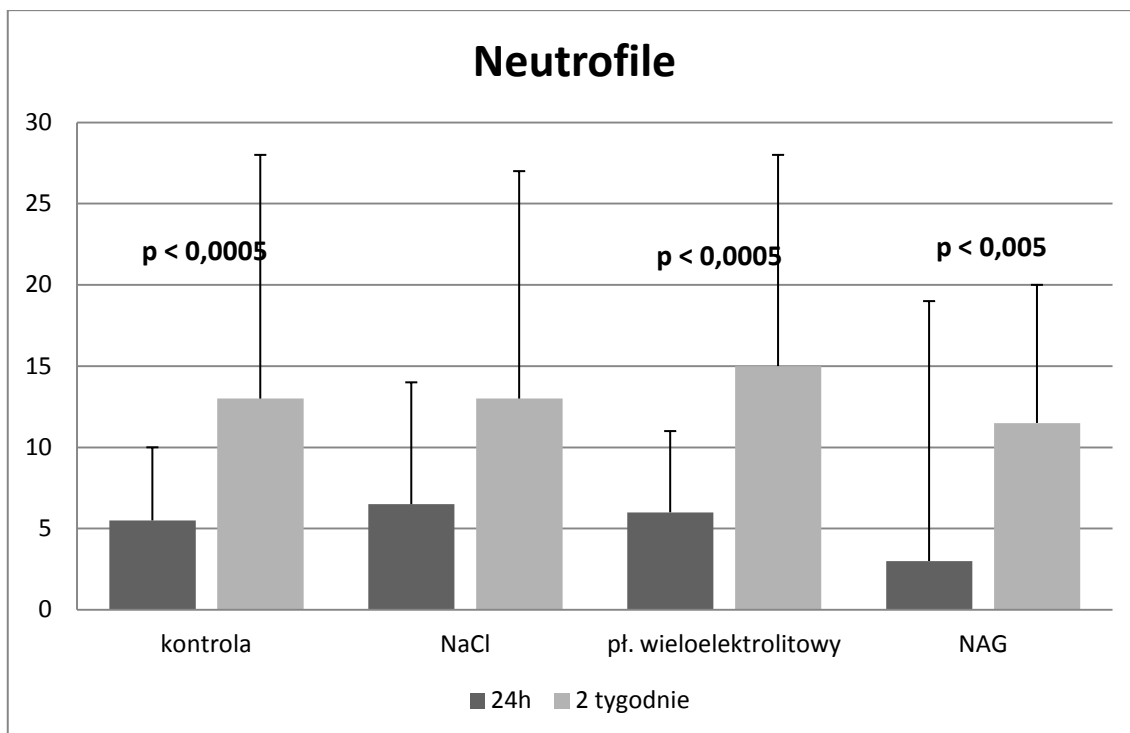




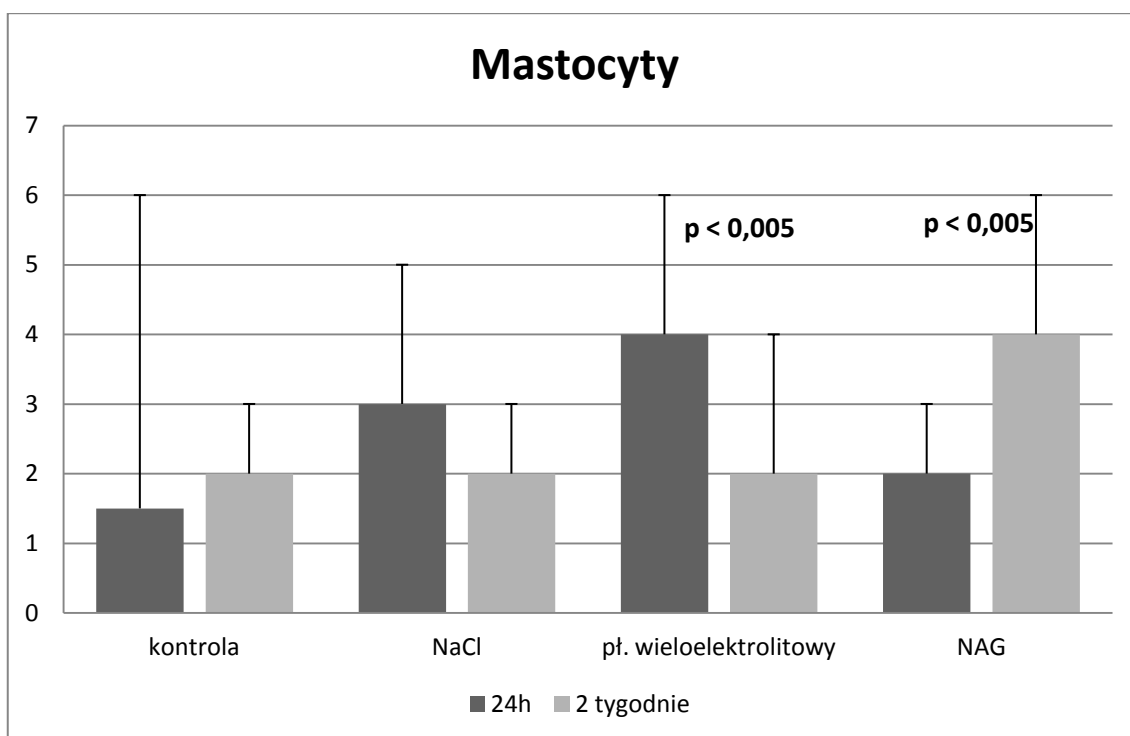
Ryc. 31. Porównanie ilości limfocytów po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.



Ryc. 32. Porównanie ilości eozynofili po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.



Ryc. 33. Porównanie ilości neutrofilii po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

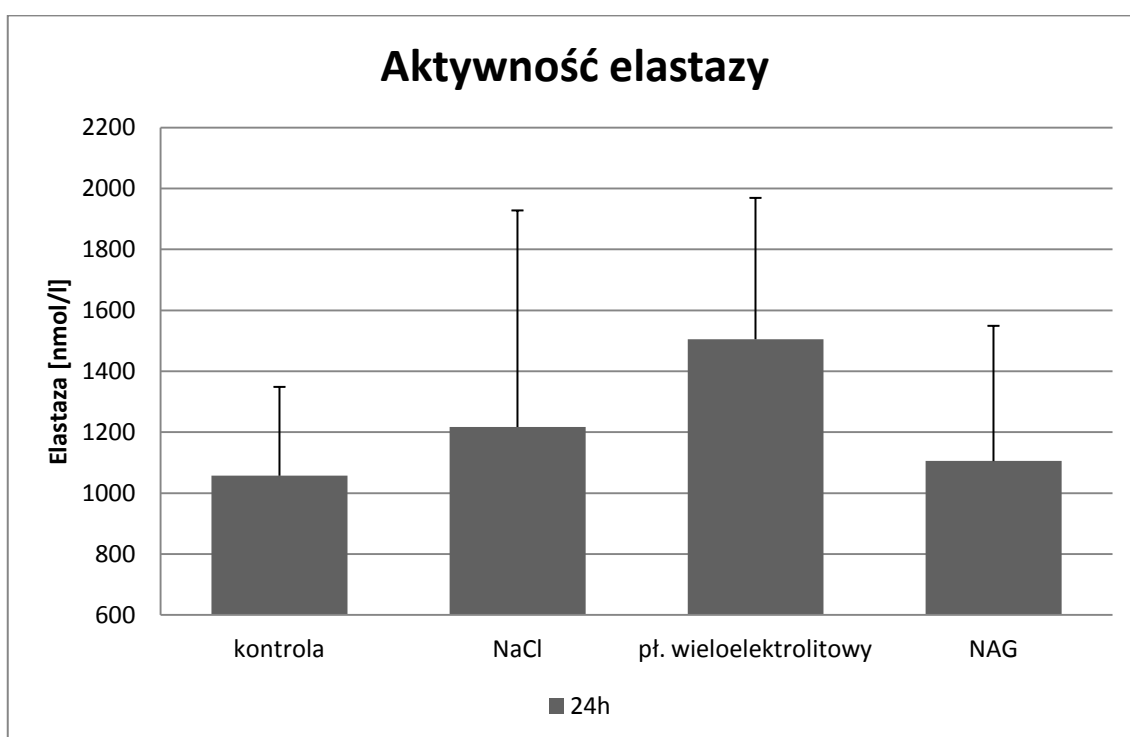


Ryc. 34. Porównanie ilości mastocytów po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

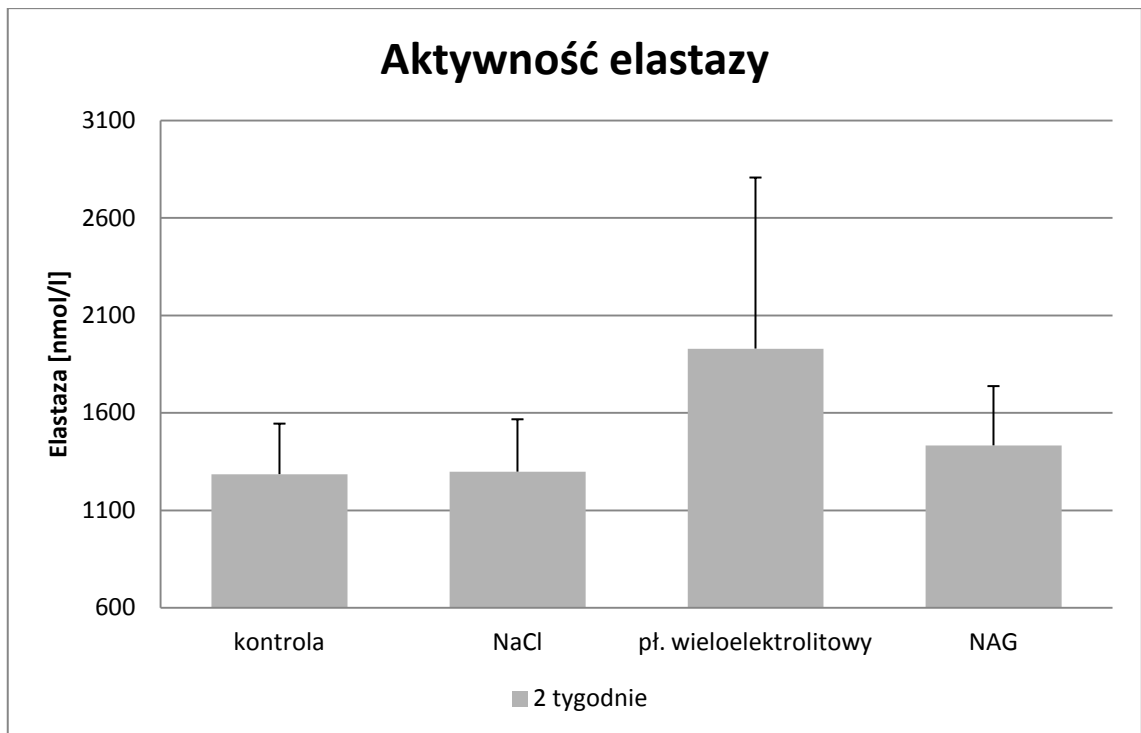
### IV.3. Ocena aktywności elastazy

- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami

Test badający różnice aktywności elastazy pomiędzy badanymi grupami, nie wykazał różnic istotnych statystycznie zarówno w 2. (Ryc.35) jak i 14. (Ryc.36) dobie po płukaniu otrzewnej



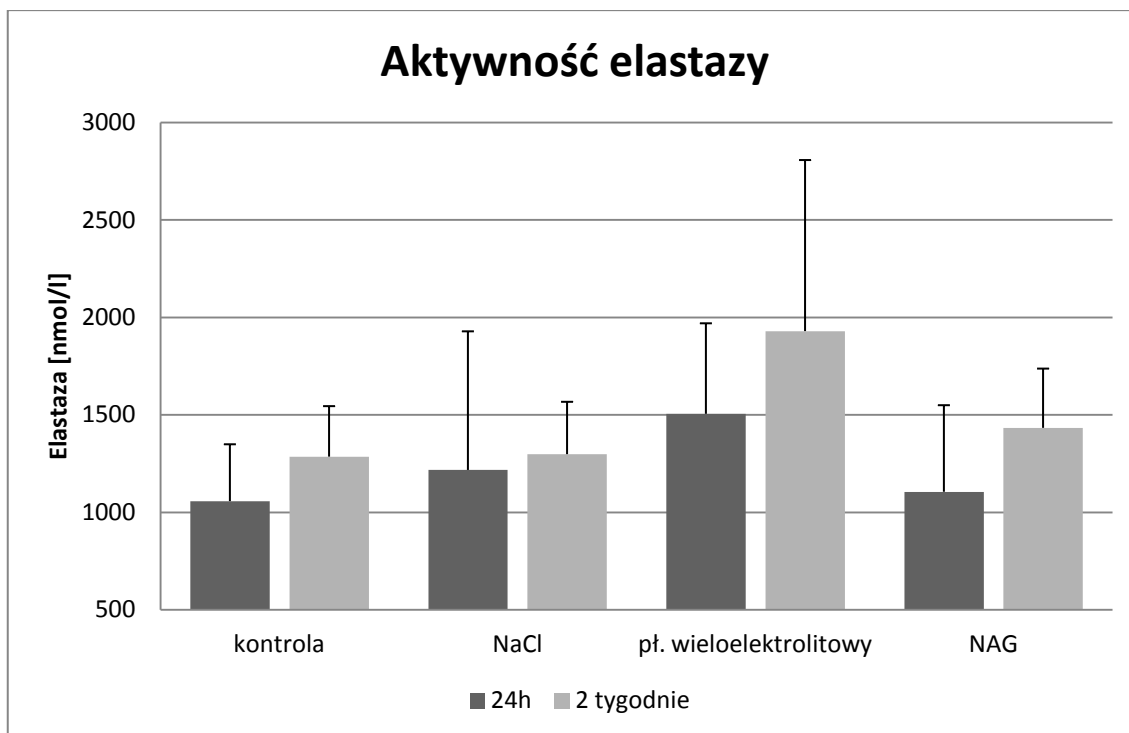
Ryc. 35. Ocena aktywności elastazy 24h po płukaniu otrzewnej.



Ryc. 36. Ocena aktywności elastazy 2 tygodnie od płukania otrzewnej.

- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między aktywnością elastazy w 24. godzinie i po 2 tygodniach w żadnej z grup, jednakże po płukaniu NAG obserwowaną tendencję do wzrostu aktywności elastazy ( $p=0,074287$ ). (Ryc.37)



Ryc. 37. Porównanie aktywności elastazy po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

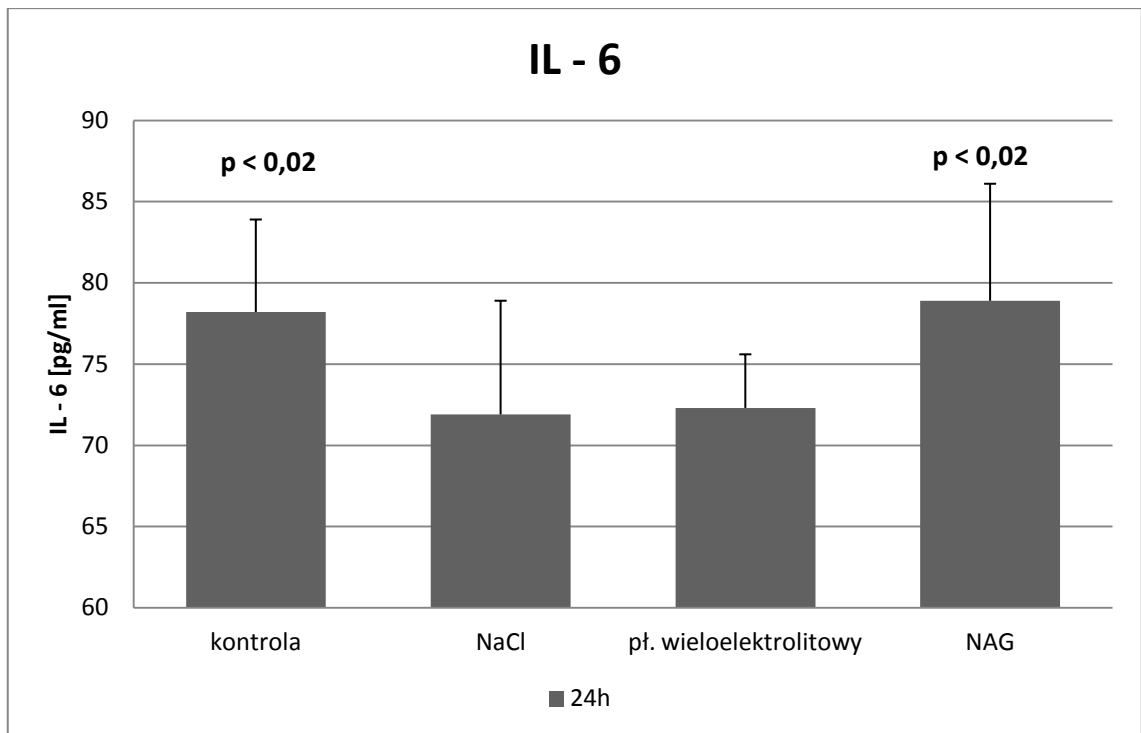
#### IV.4. Ocena nasilenia procesu zapalnego.

##### Poziom IL-6

- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami

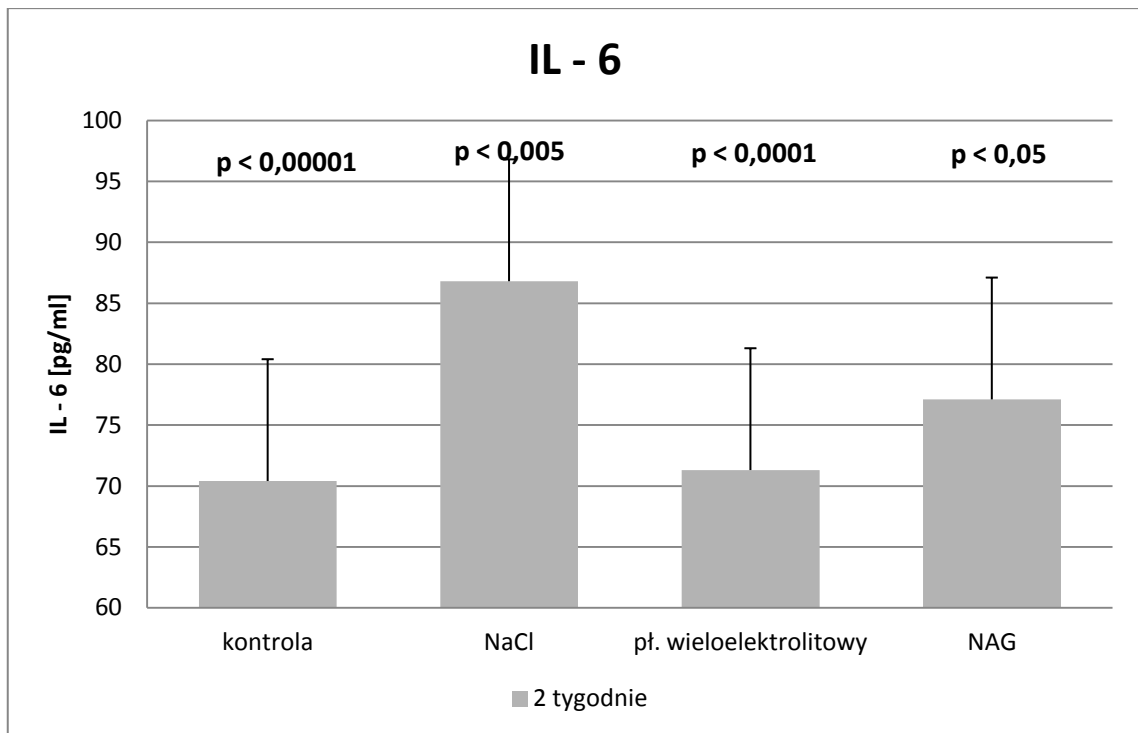
Test statystyczny wykazał istotne różnice między badanymi grupami pod względem poziomu IL-6 w 24. godzinie ( $p < 0,05$ ) (Ryc.38) oraz w 14. dobie po płukaniu otrzewnej ( $p < 0,0001$ ) (Ryc.39):

- po 24 godzinach (Ryc.38):
  - niższy poziom w grupie III (płyn wieloelektrolitowy) w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,02$ )
  - niższy poziom w grupie III w stosunku do grupy IV (NAG) ( $p < 0,02$ )



Ryc. 38. Ocena poziomu IL-6 po 24h od płukania otrzewnej.

- po 2 tygodniach (Ryc.39):
  - wyższy poziom w grupie II (0,9%NaCl) niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,00001$ )
  - wyższy poziom w grupie IV (NAG) niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,05$ )
  - niższy poziom w grupie IV (NAG) niż w grupie II (0,9%NaCl) ( $p < 0,005$ )
  - niższy poziom w grupie III (płyn wieloelektrolitowy) niż w grupie II (0,9%NaCl) ( $p < 0,0001$ )



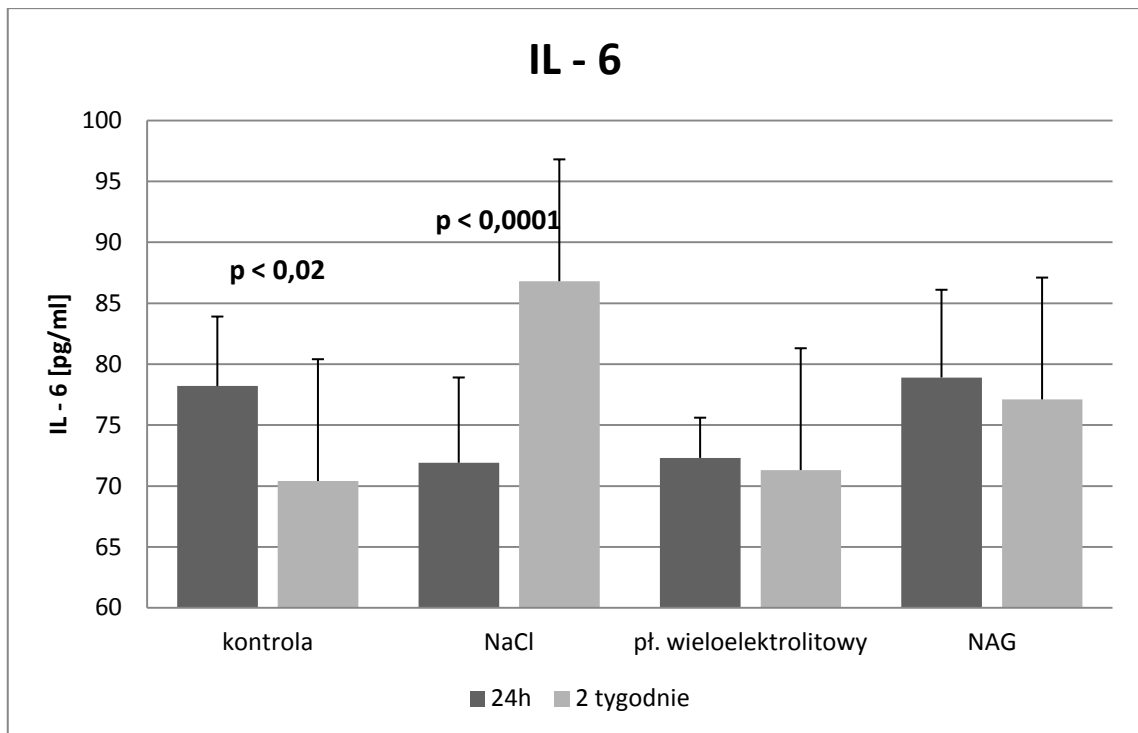
Ryc. 39. Ocena poziomu IL-6 po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii (Ryc.40)

Analiza statystyczna oceniająca zmianę poziomu IL-6 w okresie 2 tygodni w każdej z badanych grup wykazała następujące zależności istotne statystycznie:

- spadek poziomu IL-6 w grupie kontrolnej ( $p < 0,02$ ),
- wzrost poziomu IL-6 w grupie II (płukanie 0,9% NaCl) ( $p < 0,0001$ ).

W pozostałych grupach nie uzyskano wyników istotnych statystycznie.



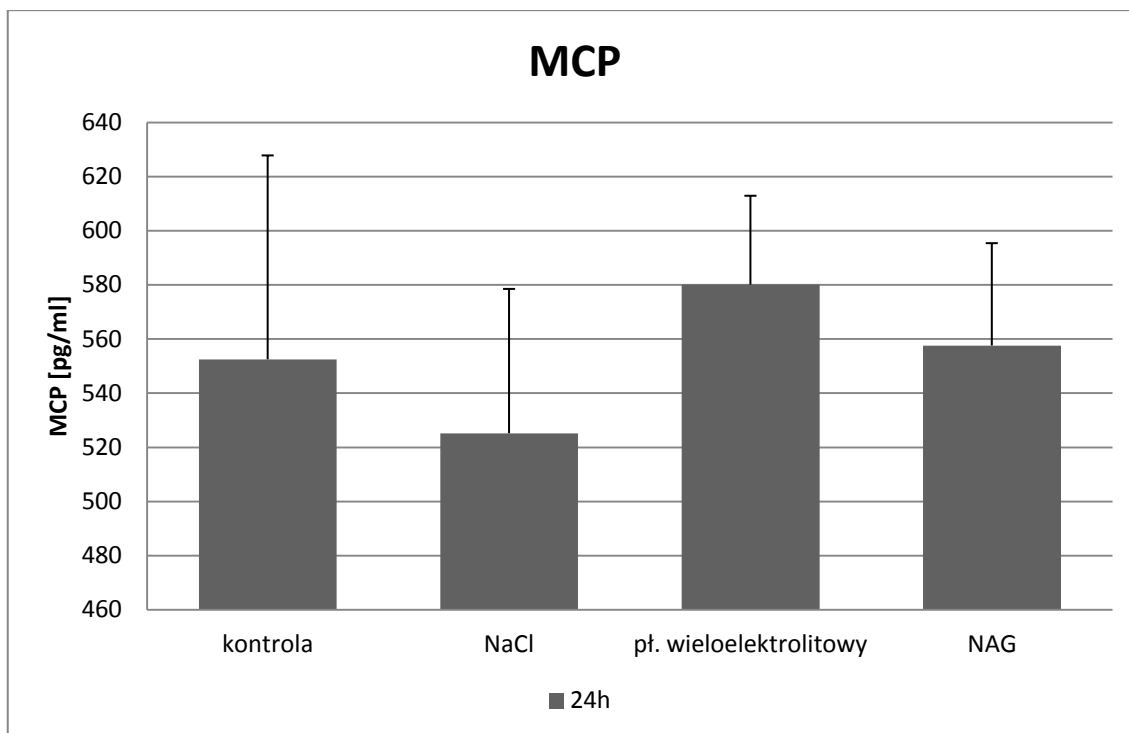
Ryc. 40. Porównanie poziomu IL-6 po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

### Poziom MCP

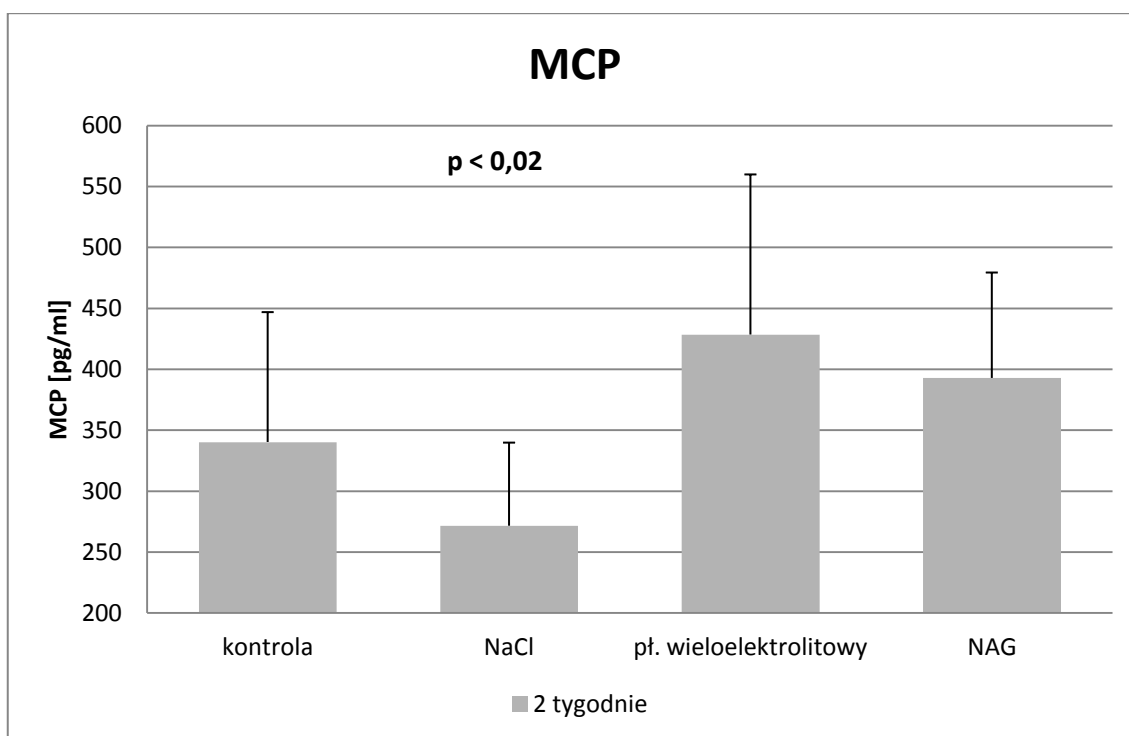
- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami

Test statystyczny nie wykazał istotnych różnic między poziomem MCP w badanych grupach w 24. godzinie (Ryc.41). Natomiast analiza wyników uzyskanych w 14. dobie po płukaniu wykazała istotnie niższy poziom MCP w grupie płukanej 0,9% NaCl ( $p < 0,02$ ) (Ryc.42).





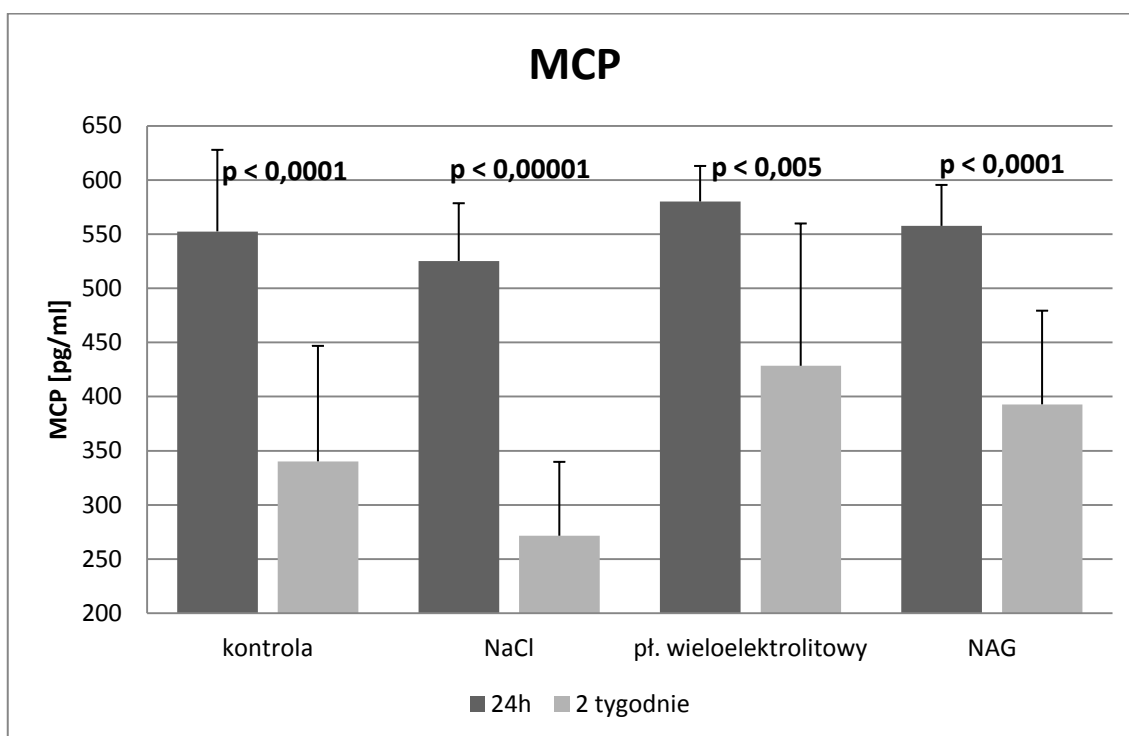
Ryc. 41. Ocena poziomu MCP po 24h od płukania otrzewnej.



Ryc. 42. Ocena poziomu MCP po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

- Porównanie wyników pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii (Ryc.43)

Analiza statystyczna zmiany poziomu MCP w ciągu 2 tygodni wykazała istotnie statystyczny spadek poziomu we wszystkich badanych grupach. Uzyskano następujące wartości: grupa kontrolna –  $p < 0,0001$ , grupa II (NaCl) –  $p < 0,000001$ , , grupa III (płyn wieloelektrolitowy) –  $p < 0,005$ , grupa IV (NAG) –  $p < 0,0001$ )

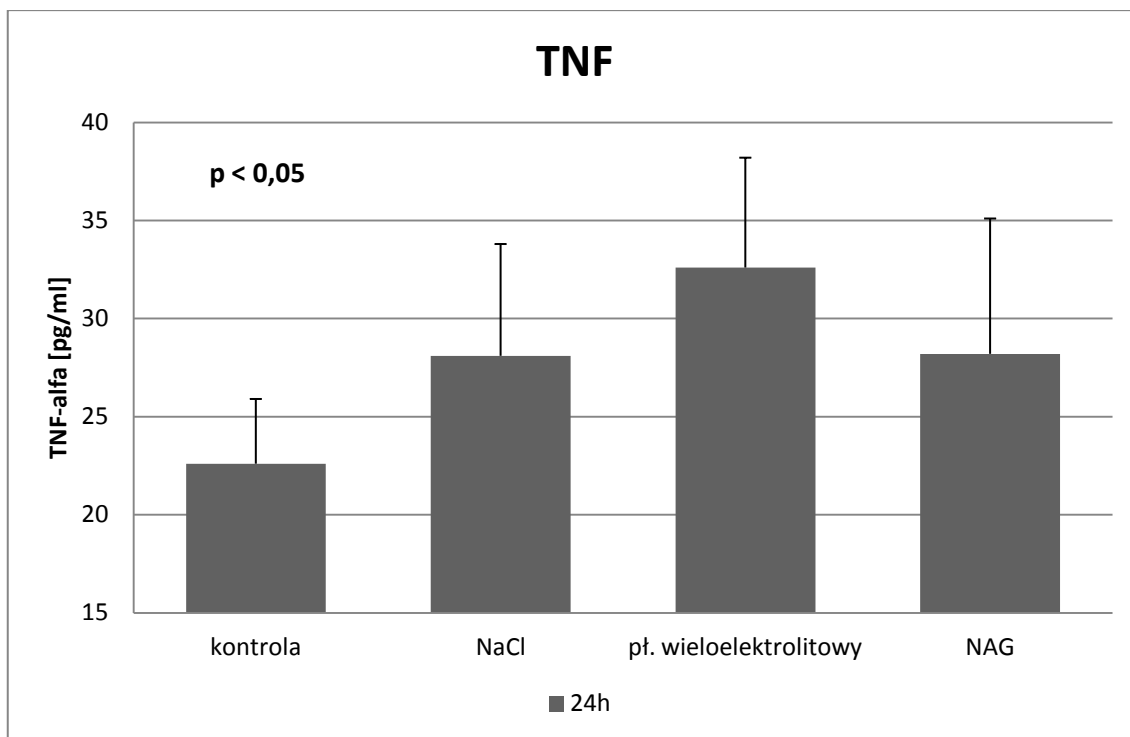


Ryc. 43. Porównanie poziomu MCP po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

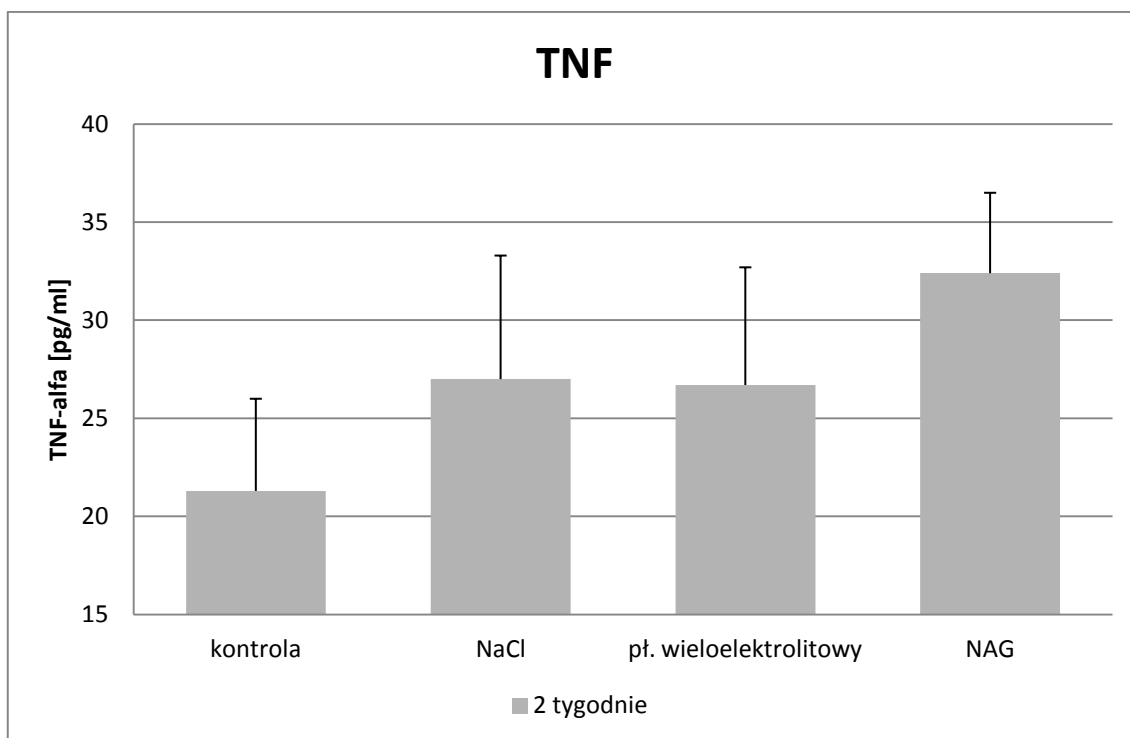
### Poziom TNF

- Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi grupami

Test statystyczny sprawdzający różnice pomiędzy poszczególnymi grupami w 2. dobie po płukaniu otrzewnej wykazał istotnie niższy poziom TNF w grupie kontrolnej ( $p < 0,05$ ) (Ryc.44) Natomiast po 2 tygodniach od płukania otrzewnej nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami (Ryc.45).



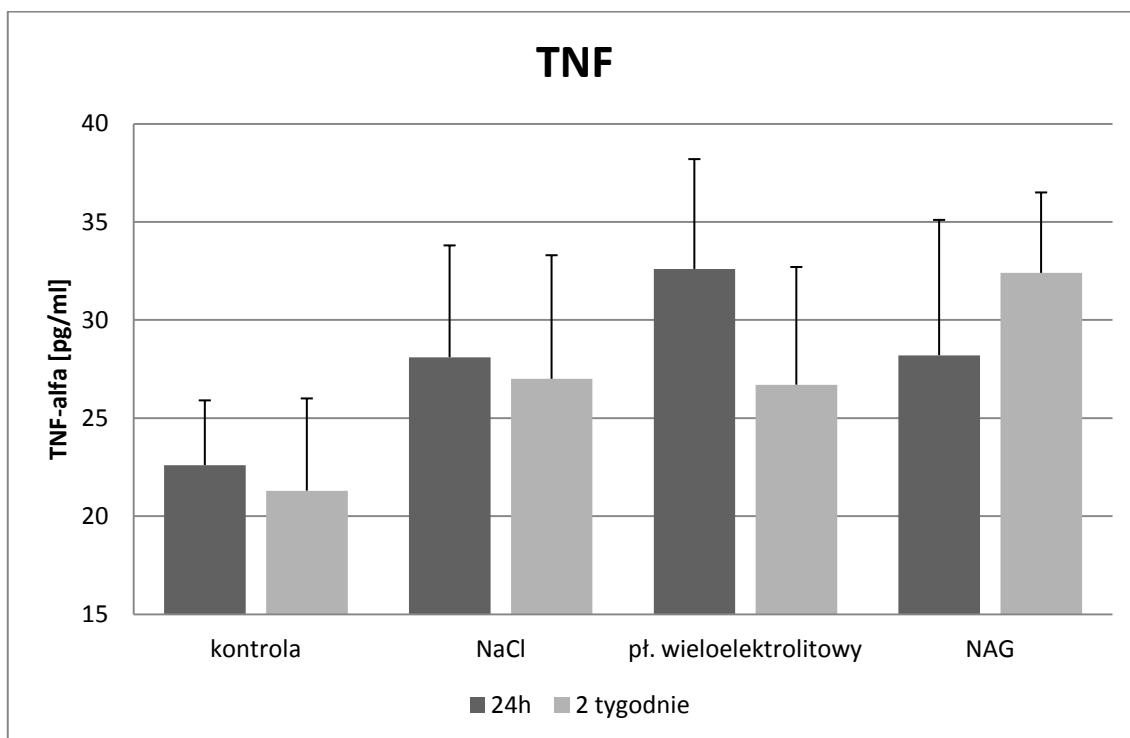
Ryc. 44. Ocena poziomu TNF po 24h od płukania otrzewnej.



Ryc. 45. Ocena poziomu TNF po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

- Porównanie różnic pomiędzy 2. a 14. dobą po laparotomii (Ryc.46)

Analiza statystyczna sprawdzająca różnice poziomów TNF w każdej z grup pomiędzy poziomem po 14 dniach i 24 godzinach od płukania otrzewnej nie wykazała żadnych istotnie statystycznych różnic.



Rycina 46. Porównanie poziomu TNF po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

## V. DYSKUSJA

Płukanie jamy otrzewnowej jest szeroko stosowaną procedurą i ma dowiedzione korzyści, zapewniając między innymi mechaniczne oczyszczenie z toksyn czy bakterii. Nie są jednak w pełni poznane jego konsekwencje na podłożu komórkowym. Dotychczasowe badania *in vitro* wskazują wręcz, że mogą mieć one niekorzystny wpływ na komórki mezotelium, pobudzając powstawanie zrostów [66-68]. Do tej pory brakuje pewnych, opartych na powtarzalnej metodyce badań dotyczących wpływu płukania otrzewnej poszczególnymi substancjami w warunkach *in vivo*.

Głównym zadaniem śródoperacyjnego płukania otrzewnej jest toaleta jamy brzusznej oraz mechaniczne oczyszczenie z depozytów tkankowych, bakterii oraz toksyn. Dodatkowo pozwala ono na nawilżanie komórek mezotelium, co zapobiega wysychaniu otrzewnej, które jest jednym z czynników predysponujących do późniejszego powstawania zrostów otrzewnej [68]. Potencjalnie jest więc procedurą o korzystnym działaniu. Nie należy jednak zapominać o tym, że płyny stosowane powszechnie do tej procedury mają udowodniony niekorzystny wpływ na metabolizm i mechanizmy obronne komórek mezotelium. Badania Winckiewicza potwierdziły wiele wątpliwości dotyczących stosowania powszechnie używanych do płukania jamy otrzewnowej płynów. Według badań przez niego przeprowadzonych w warunkach *in vitro* sól fizjologiczna oraz płyny dializacyjne (zwłaszcza wzbogacone o glukozę) niekorzystnie wpływają na strukturę i metabolizm komórek mezotelium otrzewnowego, jak również zaburzają równowagę układu fibrynogenetycznego i fibrynolitycznego. [66] Aby w pełni ocenić działanie powyższych płynów celowe było wykonanie badań w warunkach *in vivo*. Doświadczenie takie wykonał Cwaliński, wykazując, że 0,9% NaCl podczas wewnątrzotrzewnowej inkubacji *in vivo* nabiera cech roztworu o działaniu prozapalnym i cytotoksycznym do komórek mezotelium. Udowodnił on, że sól fizjologiczna nie jest w rzeczywistości substancją fizjologiczną. Wprowadzenie jej do przestrzeni wewnątrzotrzewnowej wywiera wpływ na zmianę lokalnego środowiska, ponieważ zwiększa potencjał hiperosmotyczny, i zmniejsza pH, tym samym pobudzając stres komórkowy oraz depresję funkcjonalną komórek mezotelialnych. Dopiero w kolejnym etapie zachodzi proces wyrównania gradientu

stężeń i odzyskanie pierwotnych właściwości płynu wewnątrztrzewnowego. Jednak w czasie tego procesu wewnątrz komórek mezotelium rozwija się proces zapalny i cytotoksyczny [69].

Dotychczasowe badania wykazały, że niekorzystne działanie poszczególnych substancji zależy od wielu czynników, między innymi od odczynu stosowanego do płukania roztworu, jego temperatury, osmolarności, ładunku elektrycznego oraz czasu ekspozycji [69,70]. Według doświadczeń przeprowadzonych przez Kappasa najbardziej optymalną do płukania otrzewnej jest temperatura nie większa niż 37°C. Udowodnił on, że płukanie otrzewnej płynami w zakresie 30-40°C powoduje powstawanie nietrwałych zrostów otrzewnej, które ulegają najczęściej resorpcji w ciągu 12 godzin. Natomiast temperatura powyżej 40°C sprzyja powstawaniu bardziej nasilonych i trwałych zrostów wewnątrztrzewnowych [57]. Ochronnym działaniem wobec powstawania zrostów jest jak najniższa temperatura stosowanych do płukania płynów, należy jednak pamiętać o niebezpieczeństwie wychłodzenia organizmu podczas zabiegu operacyjnego i odpowiednio wyważyć ryzyko i korzyści obniżania temperatury stosowanego płynu. Dlatego ogólnie przyjętą, najbardziej bezpieczną, a zarazem wywołującą niewielki efekt wywołujący powstawanie zrostów jest temperatura 37°C. Jest zatem bardzo istotne, aby bardzo dokładnie kontrolować temperaturę płynów stosowanych do śródoperacyjnego płukania otrzewnej. Z tego powodu podczas omawianego doświadczenia temperatura badanych płynów wynosiła standardowo 37°C.

Kolejnym udowodnionym czynnikiem wpływającym na niekorzystny efekt płukania otrzewnej jest obecność w płynie glukozy, co można szczególnie zaobserwować podczas CAPD. Glukoza, oprócz bezpośredniego negatywnego działania na metabolizm komórek mezotelium, powoduje także niekorzystny efekt glikozylacji białek wewnątrztrzewnowych. Również produkty nieenzymatycznego rozpadu glukozy (GPD) wywołują silnie toksyczne działanie wobec komórek mezotelium, zmniejszając ich potencjał proliferacyjny [48,71].

Preparatem, z którym obecnie wiąże się największe nadzieje jest roztwór N-acetyloglukozaminy. Według badań Połubińskiej w warunkach przewlekłej dializy otrzewnowej suplementacja płynu dializacyjnego hialuronianem powoduje zmniejszenie wewnątrztrzewnowego odczynu zapalnego i jednocześnie hamuje

rozrost tkanki łącznej w otrzewnej. [49] Dlatego właśnie w naszych badaniach postanowiliśmy szczególnie skupić się na ocenie wpływu tej substancji na komórki mezotelium w modelu in vivo. Dotychczas wiadomo, że zastąpienie w płynie dializacyjnym glukozy przez NAG powoduje zmniejszenie poziomu glukozy we krwi badanych zwierząt, co jest szczególnie cennym działaniem u pacjentów chorujących na cukrzycę. Ponadto NAG wywiera wpływ przeciwzapalny na komórki mezotelium, co w konsekwencji ogranicza powstawanie zrostów pooperacyjnych. Zastosowanie płukania otrzewnej płynem z dodatkiem NAG wpływa również znacząco na wzrost stężenia kwasu hialuronowego w jamie otrzewnej. Kwas hialuronowy ma natomiast udowodniony wpływ na zapobieganie powstawaniu zrostów wewnątrzotrzewnowych [67].

Dlatego też przedstawione powyżej dostępne w literaturze wyniki aktualnych badań zachęcają do zastąpienia powszechnie stosowanego do płukania otrzewnej roztworu 0,9% NaCl przez inny preparat, o działaniu pozytywnym lub chociaż obojętnym w stosunku do komórek mezotelium. Taką substancją potencjalnie mógłby zostać NAG.

### **Ocena zrostów otrzewnej w klasyfikacji GA i GR**

Przedstawione badania wykazały jedynie istotną zmianę nasilenia zrostów w grupie szczurów, u których wykonywano płukanie otrzewnej za pomocą soli fizjologicznej. W tej grupie płukanie powodowało znaczące nasilenie zrostów ocenianych zarówno w skali GR, jak i GA. Wyniki te stanowią potwierdzenie doniesień innych autorów [58]. Pomimo, że inne badane substancje nie wywierały istotnego wpływu na tworzenie zrostów, można zaobserwować pewne tendencje w wynikach, wskazującego między innymi zmniejszenie nasilenia zrostów w grupie, w której wykonano płukanie roztworem NAG. Takich wyników nie można uznać za wartościowe ze względu na brak istotności statystycznej. Mogą one jednak zachęcać do prowadzenia dalszych badań oceniających wpływ płukania otrzewnej NAG. Szczególnie warto rozważyć przeprowadzenie analogicznych badań w oparciu o większą grupę badaną. Możliwe, że to spowodowałoby, że widoczne tu tendencje zyskałyby istotność statystyczną.

W celu uzyskania silniejszych wyników wykonano również analizę statystyczną opartą na połączeniu wyników uzyskanych w obu skalach zliczeniowych powstałych zrostów. Jednak w tym przypadku również wykazano wpływ jedynie w grupie, w której zastosowano płukanie 0,9% NaCl. Potwierdziły się również powyżej wspomniane tendencje dla grupy, w której wykonano płukanie NAG. Wyniki te zachęcają do przeprowadzenia szerszej zakrojonych badań, opartych na liczniejszych grupach badanych.

### **Ocena ilości komórek zapalnych**

W tej części badań oczekiwano wyników, które mogłyby wykazać wpływ różnych substancji używanych do płukania otrzewnej na rozkład ilościowy poszczególnych komórek zapalnych (limfocytów, makrofagów, eozynofili, neutrofilii). Uzyskane wyniki wykazują jednak bardzo podobne rezultaty we wszystkich badanych grupach. Istotny wzrost poziomu neutrofilii w grupie kontrolnej, III (płyn wieloelektrolitowy) i IV (NAG) oraz podobne tendencje w grupie II (0,9% NaCl) wskazują, iż badane substancje mogą nie wykazywać ochronnego działania w stosunku do otrzewnej. Należy jednak zwrócić uwagę na wyniki dotyczące ilości makrofagów, które mają udowodniony duży wpływ na formowanie się zrostów otrzewnej. Jedynymi substancjami, które powodowały istotne zmniejszenie ilości makrofagów w badanych rozmazach były płyn wieloelektrolitowy i NAG. Potwierdza to spodziewany korzystny efekt płukania otrzewnej preparatami zawierającymi NAG.

### **Ocena poziomu elastazy**

Pomimo, że przedstawione wyniki nie wykazały znaczących zmian poziomu elastazy pod wpływem płukania otrzewnej poszczególnymi płynami, ponownie uzyskano interesujące tendencje. Po płukaniu otrzewnej roztworem NAG poziom elastazy znacznie wzrósł, uzyskując wartość bliską istotności statystycznej ( $p=0,074287$ ). Wynik ten sugeruje, że zwiększenie grupy badanej mogłoby potwierdzić istotność tego testu. Powyższy wynik potwierdza słuszność badań nad NAG, wskazując na to, że związek ten może mieć pozytywny wpływ na komórki mezotelium.



### **Ocena poziomu cytokin zapalnych**

Wyniki uzyskane w tej części doświadczenia wskazują wyraźnie na niekorzystny wpływ soli fizjologicznej, która nasila proces zapalny w obrębie otrzewnej. Stanowi to potwierdzenie danych dostępnych w literaturze [50,58]. Analiza wpływu pozostałych substancji wskazuje na brak ich przewagi nad grupą kontrolną.

Powyższe wyniki wykazują neutralny lub nawet pozytywny wpływ roztworu NAG na komórki mezotelium. Płyn ten nie powoduje nasilenia zrostów oraz reakcji zapalnej badanych popłuczyn jamy otrzewnowej, ponadto wpływa na istotne zmniejszenie poziomu makrofagów, które mają udowodniony wpływ na formowanie się zrostów wewnątrzotrzewnowych. Wyniki uzyskane w przedstawionych badaniach zachęcają do zmiany powszechnie przyjętych zasad procedury płukania otrzewnej. Ze względu na dowiedziony niekorzystny wpływ 0,9% NaCl na nasilenie zrostów pooperacyjnych oraz reakcję zapalną preparat ten powinien zostać zastąpiony przez inną substancję. Powyższe badania wykazały obojętny wpływ roztworu NAG. Dlatego, przy znajomości doniesień na temat korzystnych efektów N-acetyloglukozaminy, zachęcają one do stosowania jej podczas płukania otrzewnej oraz prowadzenia dalszych doświadczeń nad tym preparatem.

## **VI. WNIOSKI**

1. Płukanie jamy brzusznej roztworem soli fizjologicznej powoduje nasilenie pooperacyjnych zrostów wewnątrztrzewnowych.
2. Czysty płyn wieloelektrolitowy lub ten sam płyn z dodatkiem NAG (40mmol/l) wykazuje mniejsze działanie prozrostowe w obrębie jamy otrzewnowej szczurów niż roztwór 0,9% NaCl.

## VII. STRESZCZENIE

Śródoperacyjne płukanie otrzewnej jest powszechnie stosowanym zabiegiem mającym na celu mechaniczne oczyszczenie jamy otrzewnowej. Wykorzystywane są w tym celu różne preparaty, które mogą mieć jednocześnie negatywny wpływ na hemostazę jamy otrzewnowej, powodując nasilenie procesów zapalnych oraz fibrynogenetycznych, a przez to powstawanie zrostów otrzewnej. Dlatego bardzo istotne jest znalezienie preparatu, który nie posiada negatywnego wpływu na równowagę otrzewnej i mógłby być bezpiecznie stosowany do płukania otrzewnej.

W przedstawionym badaniu podjęto próbę oceny wpływu różnych preparatów do płukania otrzewnej na proces powstawania i resorpcji zrostów śródtrzewnowych.

W tym celu porównano przydatność i bezpieczeństwo płukania otrzewnej za pomocą N-acetyloglukozaminy, soli fizjologicznej oraz płynu wieloelektrolitowego.

Materiał biologiczny wykorzystany do badań pobierany był od 80 szczurów, które we wstępnym etapie badania zostały losowo podzielone na 4 grupy. W każdej z grup, po uprzednim mechanicznym urazie otrzewnej ściennej, wykonano płukanie jamy otrzewnowej badanym płynem: grupa I – grupa kontrolna (nie wykonywano płukania otrzewnej), grupa II – płukanie 0,9% NaCl, grupa III – płukanie płynem wieloelektrolitowym, grupa IV – płukanie roztworem N-acetyloglukozaminy w płynie wieloelektrolitowym. W kolejnym etapie spośród każdej z badanych grup wybrano losowo połowę szczurów i po upływie 24 godzin od pierwszego zabiegu operacyjnego wykonano ponowną laparotomię. U pozostałych zwierząt kolejna laparotomia wykonana była po upływie 14 dni od pierwszego zabiegu operacyjnego. Podczas drugiej laparotomii dokonano oceny zrostów w obrębie jamy otrzewnowej wykorzystując skalę zrostów według klasyfikacji Gauwery i Rózgi (GR) oraz Grading of adhesions (GA). W kolejnym etapie badania dokonano oceny procesu zapalnego, fibrynogenetycznego i fibrynolitycznego w popłuczynach uzyskanych z jamy otrzewnowej badanych szczurów.

Analiza wyników oceny zrostów pooperacyjnych nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami. Jednak płukanie otrzewnej za

pomocą 0,9% NaCl spowodowało nasilenie zrostów po 2 tygodniach w skali GA oraz GR.

Ocena ilościowa komórek zapalnych po 2 tygodniach wykazała spadek liczby limfocytów oraz wzrost liczby neutrofilii w grupie kontrolnej, brak istotnych statystycznie zmian po płukaniu 0,9% NaCl, spadek poziomu makrofagów, wzrost liczby eozynofili, neutrofilii oraz mastocytów po płukaniu płynem wieloelektrolitowym oraz po płukaniu NAG. Ocena procesu zapalnego wykazała wyższy niż w innych grupach poziom IL-6 po płukaniu solą fizjologiczną.

Przedstawione badania pozwalają ocenić 0,9% NaCl jako preparat niekorzystnie wpływający na komórki mezotelium, wpływający na wzrost nasilenia zrostów oraz procesu zapalnego w jamie otrzewnowej. Natomiast płyn wieloelektrolitowy oraz NAG nie wykazują wpływu na powyższe procesy. W związku z tym celowe jest zastąpienie w codziennej praktyce 0,9% NaCl płynami o mniejszej toksyczności. Słuszne są również dalsze badania nad NAG jako środkiem, który potencjalnie mógłby stać się preparatem powszechnie stosowanym do śródoperacyjnego płukania otrzewnej.

## SUMMARY

Intraoperative peritoneal lavage is a widely used procedure which aims at mechanical cleansing of the peritoneal cavity. Various substances are available for this purpose. Unfortunately, many of them may also have a negative effect on the hemostasis of the peritoneal cavity. Mechanical lavage may cause a greater intensity of inflammation and fibrinogenesis resulting in peritoneal adhesions. Therefore, it is imperative to find an optimal substance that does not have a negative impact on the peritoneum's balance and can be safely used for peritoneal rinsing.

The study attempts to assess the impact of various fluids for peritoneal lavage on the process of intraperitoneal adhesion formation and resorption. Special focus is placed upon the usefulness and safety of peritoneal rinsing with N-acetylglucosamine (NAG), saline, and dialysis fluid.

Biological sample material used for the tests was collected from 80 rats. The rats were randomly divided into 4 groups during the initial stage of the study. After mechanical injury to the parietal peritoneum, peritoneal lavage was performed using a different fluid type for each study group: Group I - control group (no peritoneal rinsing was performed), Group II - 0.9% NaCl rinse, Group III - dialysis fluid rinse, and Group IV - a solution of N-acetylglucosamine (NAG) and dialysis fluid rinse). Half of the rats were then randomly chosen from each of the study groups and 24 hours post-initial surgery an additional laparotomy was performed. In the remaining rats, a laparotomy was performed 14 days post-initial surgery. During the second laparotomy, adhesions within the peritoneum were assessed using the Gauwerky and Rozgi (GR) and Grading of adhesions (GA) classification scales. The final stage assessed the severity of inflammation, fibrinolysis and fibrinogenesis in lavage fluid obtained from the peritoneal cavity of the rats.

Analysis of post-operative adhesions assessment results did not show any statistically significant differences between the groups. However, peritoneal washing with 0.9% NaCl resulted in an increase of adhesions after 2 weeks on a GA and GR scale.

A quantitative assessment of inflammatory cells after 2 weeks showed a decrease in the number of lymphocytes and an increase in the number of neutrophils

in the control group. There were no statistically significant differences after lavage with 0.9% NaCl, while an increased number of neutrophils, monocytes and eosinophils and a decreased number of macrophages was noted after lavage with NAG solution and dialysis fluid. Severity of inflammation and IL-6 level was observed to be highest in the group where 0.9% NaCl was used.

Results showed that 0.9% NaCl adversely affects the mesothelial cells by affecting growth through increasing the severity of inflammation and adhesions in the peritoneal cavity. However, the dialysis fluid and NAG had no effect on these processes. Therefore, it is recommended to replace the daily practice of 0.9% NaCl fluids with those that are less toxic, such as NAG solution or dialysis fluid. Further research should be conducted on NAG and assessing its use as a potential standard agent for intraoperative peritoneal lavage.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl.* 1990 Jan;72(1):60-3.
2. Operative Laparoscopy Study Group. Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: evaluation at early second-look procedures. *Fertil. Steril.* 1991; 55: 700-704
3. Ellis H, Moran BJ, Thompson JN, Parker MC, Wilson MS, Menzies D, McGuire A, Lower AM, Hawthorn RJ, O'Brien F, Buchan S, Crowe AM. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet.* 1999 May 1;353(9163):1476-80.
4. Parker MC, Wilson MS, Menzies D, Sunderland G, Clark DN, Knight AD, Crowe AM; Surgical and Clinical Adhesions Research (SCAR) Group. "The SCAR-3 study: 5-year adhesion-related readmission risk following lower abdominal surgical procedures." *Colorectal Dis.* 2005 Nov;7(6):551-8.
5. Lower AM, Hawthorn RJ, Ellis H, O'Brien F, Buchan S, Crowe AM. The impact of adhesions on hospital readmissions over ten years after 8849 open gynaecological operations: an assessment from the Surgical and Clinical Adhesions Research Study. *BJOG.* 2000 Jul;107(7):855-62.
6. Ross JA, Ansell I, Hjelle TJ, Anderson JD, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW. Phenotypic Mapping of Human Mesothelial Cells. *Advances In Peritoneal Dialysis Conference On Peritoneal Dialysis (1998)* Volume: 14, Issue: 1197-8554
7. Stangel JJ, Nisbet JD, Settles H. Formation and prevention of postoperative abdominal adhesions. *J. Reprod. Med.,* 1984, 29, 143-156.
8. Fukatsu K, Saito H, Han I, Yasuhara H, Lin MT, Inoue T, Furukawa S, Inaba T, Hashiguchi Y, Matsuda T, Muto T. The greater omentum is the primary site of neutrophil exudation in peritonitis. *J Am Coll Surg.* 1996; 183: 450-456.
9. Cheong YC, Laird SM, Li TC, Shelton JB, Ledger WL, Cooke ID. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Human Reproduction Update, Vol.7, No.6 pp.* 556-566, 2001
10. Penar J, Weyde W, Krajewska M, Madziarska K, Gołębowski T, Szymczak M, Kłak R, Klinger M. Selected indices of peritoneal fibrosis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Postepy Hig Med Dosw. (online),* 2009; 63: 200-204
11. diZerega GS, Rodgers KE. *The peritoneum.* Springer-Verlag 1992, 29.
12. Dobbie JW, Lloyd JK. Mesothelium secretes lamellar bodies in a similar manner to type II pneumocyte secretion of surfactant. *Perit Dial Int.* 1989; 9: 215-219.
13. Zeillemaker AM, Mul FPJ, A. A. G. M. Hoyneck Van Papendrecht AAGM, Kuijpers TW, Roos D, Leguit P, Verbrugh HA. Polarized secretion of interleukin-8 by human mesothelial cells: a role in neutrophil migration. *Immunology* 1995 84 227-232

14. Agca B, Paksoy M, Polat E, Aksin E, Dirican A, Durgun V, Eren D. Influence of omentectomy on peritoneal defense mechanisms in an experimental model of intra-abdominal infection. *Eur Surg Res.* 2003; 35: 35-40.
15. Holmdahl L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg.* 1997; 577: 24-31.
16. Ivarsson ML, Holmdahl L, Falk P, Molne J, Risberg B. Characterization and fibrinolytic properties of mesothelial cells isolated from peritoneal lavage. *Scand Clin Lab Invest.* 1998; 58: 195-203.
17. Haq NU, Nolph KD: Past, present, and future of quantified peritoneal dialysis. *Semin. Dial.* 2001, 14, 263.
18. Oreopoulos D.G.: A backward look at the first 20 years of CAPD. *Perit. Dial. Int.* 1998, 18, 360.
19. Czyżewska K, Grzelak T, Szary B. Problems of peritoneal dialysis - history and research perspectives. *Przegląd Lekarski* 2009 / 66 / 9
20. Colombi A. Dializa otrzewnowa. PZWL. Warszawa 1984, 9-14.
21. Holmdahl L, Risberg B, Beck DE, Burns JW, Chegini N, diZerega GS, Ellis H. Adhesions: pathogenesis and prevention - panel discussion and summary. *Eur J Surg.* 1997; 577: 56-62.
22. Bręborowicz A, Witowski J, Knapowski J, Serkes KD, Martis L, Oreopoulos DG. Effect of phosphatidylcholine on the function of human mesothelial cells in vitro. *Nephron.* 1993; 63: 15-20
23. Todd AS. The histological localization of fibrynolysis activator. *J Pathol Bacteriol.* 1959; 78:281-283
24. Holmdahl L, Eriksson E, al-Jabreen M, Risberg B. Fibrynolysis in human peritoneum during operation. *Surgery.* 1996; 119:701-705
25. Traczyk Z. Hemostaza. W: *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej.* Pod redakcją WZ Traczyka i A Trzebskiego. PZWL 1995; 439-440
26. Merlo G, Fausone G, Barbero C, Castagna B. Fibrynolytic activity of the human peritoneum. *Eur Surg Res.* 1980; 12: 433-438
27. Sulaiman H, Dawson L, Laurent GJ, Bellingan GJ, Herrick SE. Role of plasminogen activators in peritoneal adhesion formation. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30: 126-131
28. Oreopoulos DG, Ossareh S, Thodis E. Peritoneal Dialysis Past, Present, and Future. *Iranian Journal of Kidney Diseases* Vol. 2 No. 4 October 2008
29. Raftery AT. Regeneration of parietal and visceral peritoneum. A light microscopical study. *Br J Surg.* 1973 Apr;60(4):293-299
30. Mrstik M, Kotseos K, Ma C, Chegini N. Increased expression of interferon-inducible protein-10 during surgically induced peritoneal injury. *Wound Repair Regen.* 2003; 11: 120-126
31. diZerega GS, Campeau JD. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update.* 2001; 7: 547-555.
32. Aube C, Pessaux P, Tuech JJ, du Plessis R, Becker P, Caron C, Arnaud JP. Detection of peritoneal adhesions using ultrasound examination for the evaluation of an innovative intraperitoneal mesh. *Surg Endosc.* 2004; 18: 131-135.



33. Montgomery TC, Sharp JB, Bellina H, Ross LF. Comparative gross and histological study of the effects of scalpel, electric knife and carbon dioxide laser on skin and uterine incisions in dogs. *Lasers Surg Med.* 1983; 3: 9-22.
34. Reed KL, Fruin AB, Bishop-Bartolomei KK, et al. Neurokinin-1 receptor and substance P messenger RNA levels increase during intraabdominal adhesion formation. *J Surg Res.* 2002;108:165–172
35. Cheong YC, Bajekal N, Li TC. Peritoneal closure - to close or not to close. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1548-1552.
36. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with TNF- $\alpha$  agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jul; 49(7):1215-28. Epub 2010 Mar 1.
37. Hodge DR, Hurt EM, Farral WL. The role of Il-6 and STAT-3 in inflammation and cancer. *European journal of cancer.* Volume 41. Issue 16. November 2005. 2502-2512
38. Ramnath RD, Ng SW, Guglielmotti A, Bhatia M. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2008 Jun;8(6):810-8. Epub 2008 Mar 18.
39. Attard JA, MacLean AR. Adhesive small bowel obstruction: epidemiology, biology and prevention. *Can J Surg.* 2007 August; 50(4): 291–300.
40. Schäfer M, Krahenbühl L, Buchler MW. Comparison of adhesion formation in open and laparoscopic surgery. *Dig Surg.* 1998; 15: 148-152.
41. Brüggmann D, Tchartchian G, Wallwiener M, Münstedt K, Tinneberg HR, Hackethal A. Intra-abdominal Adhesions. Definition, Origin, Significance in Surgical Practice, and Treatment Options. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 November; 107(44): 769–775.
42. Dwivedi AJ, Kuwajerwala NK, Silva YJ, Tennenberg SD. Effects of surgical gloves on postoperative peritoneal adhesions and cytokine expression in a rat model. *Am J Surg.* 2004; 188: 491-494.
43. Becker JM, Stucchi AF Intra-abdominal Adhesion Prevention: Are We Getting Any Closer *Ann Surg.* 2004 August; 240(2): 202–204.
44. Kutlay J., Ozer Y., Isik B., Kargici H.: Comparative effectiveness of several agents for preventing postoperative adhesions. *World J. Surg.*, 2004; 28: 662-665
45. Bulbulla N, Ilhan YS, Kirkil C, Cetiner M, Gogebakan O, Ilhan N. Can angiotensin converting enzyme inhibitors prevent postoperative adhesions? *J Surg Res.* 2005; 125: 94-97.
46. Hellebrekers BW, Trimpos-Kemper GC, van Blitterswijk CA, Bakkum EA, Trimpos JB. Effects of five different barrier materials on postsurgical adhesion formation in the rat. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1358-1363.
47. Ialenti A, Di Rosa M. hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. *Agents Actions* 43: 44-47; 1994
48. Połubińska A, Pawlaczyk K, Kuźlan-Pawlaczyk M, Wieczorowska-Tobis K, Chen C, Moberly JB, Martis L, Bręborowicz A, Oreopoulos DG. Dialysis solution containing hyaluronan: effect on peritoneal permeability and inflammation in rats. *Kidney Int* 2000; 57: 1182-1189

49. Breborowicz A, Polubinska A, Wu G, Tam P, Oreopoulos DG. N-Acetylglucosamine Reduces Inflammatory Response during Acute Peritonitis in Uremic Rats. *Blood Purif.* 2006; 24: 274-281.
50. Kudo F.A., Nishibe T., Miyazaki K. i wsp.: Use of bioabsorbable membrane to prevent postoperative bowel obstruction in transabdominal aortic aneurysm surgery. *Surg. Today*, 2004; 34: 648-651
51. Tang C.-L., Seow-Chen F., Fook-Chong S., Eu K.-W.: Bioresorbable adhesion barrier facilitates early closure of the defunctioning ileostomy after rectal excision. *Dis. Colon Rectum*, 2003; 46: 1200-1207
52. Diamond MP. Reduction of de novo postsurgical adhesions by intraoperative precoating with Sepracoat (HAL-C) solution: a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled multicenter study. The Sepracoat Adhesion Study Group. *Fertil Steril.* 1998; 69:1067-1074.
53. Hellebrekers BW, Trimbo-Kemper GC, van Blitterswijk CA, Bakkum EA, Trimbo JB. Effects of five different barrier materials on postsurgical adhesion formation in the rat. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1358-1363.
54. Yaacobi Y, Goldberg EP, Habal MB. Effect of Ringer's lactate irrigation on the formation of postoperative abdominal adhesions. *J Invest Surg.* 1991; 4: 31-36
55. van Westreenen M, van den Tol PM, Pronk A, Marquet RL, Jeekel J, Leguit P. Perioperative lavage promotes intraperitoneal adhesion in the rat. *Eur. Surg. Res.* 1999; 31: 196-201
56. Cwaliński J. Ocena biogodności 0,9% roztworu NaCl jako płynu stosowanego do płukania jamy brzusznej podczas zabiegów chirurgicznych. Rozprawa doktorska. Poznań 2012. 53-64
57. Tamura M, Osajima A, Nakayamada S, Anai H, Kabashima N, Kanegae K, Ota T, Tanaka Y, Nakashima Y. High glucose levels inhibit focal adhesion kinase-mediated wound healing of rat peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2003; 63: 722-731.
58. Simoni RD, Hill RL, Vaughan M, Hascall V. The Discovery of Hyaluronan by Karl Meyer. *The Journal of Biological Chemistry* September 27, 2002 *The Journal of Biological Chemistry*, 277, e27.
59. Ciszewicz M, Wu G, Tam P, Bręborowicz A. Changes In peritoneal mesothelial cells phenotype after chronic exposure to glucose or N-acetylglucosamine; *Translational Research* 2007; 6: 337-342
60. Bręborowicz A, Pawlaczyk-Kuzlan M, Pawlaczyk K, Baum E, Tam P, Wu G. Replacement of glucose with N-acetylglucosamine In peritoneal dialysis fluid – experimental study In rats. *Perit Dial Int.* 2001;21 Suppl 3:S365-7
61. Chen,JK, Shen CR, Liu CL. N-acetylglucosamine: production and application. *Mar Drugs.* 2010; 8(9): 2493–2516
62. Bręborowicz A, Połubińska A, Pawlaczyk K, Kuźlan-Pawlaczyk M, Moberly J, Martis L, Oreopoulos. Intraperitoneal hyaluronan administration In conscious rats: absorption, metabolism and effects on peritoneal fluid Dynamics. *Perit Dial Int.* 2001; vol.21, 2: 130-137
63. Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, Fukui T, Takagi M, Imanaka TA. Unique Chitinase with Dual Active Sites and Triple Substrate Binding Sites from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:5338–5344

64. Krasieński R, Tchorzewski H. Hyaluronan-mediated regulation of inflammation. *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 2007; 61: 683-689 e-ISSN 1732-2693
65. Olczyk P, Komosińska-Vassev K, Winsz-Szczotka K, Kuźnik-Trocha K, Olczyk K. Hyaluronan: Structure, metabolism, functions, and role in wound healing. *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 2008; 62: 651-659 e-ISSN 1732-2693
66. Winckiewicz M, Połubińska A, Staniszewski R, Bręborowicz A. Effects of saline and other peritoneal lavage solutions on morphology and function of in vitro mesothelial cells. *Pol Przegl Chir* 2007; 79 (8): 540-547
67. Połubińska A., Bręborowicz A., Staniszewski R., Oreopoulos DG: Normal saline induces oxidative stress in peritoneal mesothelial cells *J Pediatr Surg.* 43(10):1821-6, 2008
68. Roberts LM, Sanfilippo JS, Raab S. Effects of laparoscopic lavage on adhesion formation and peritoneum in an animal model of pelvic inflammatory disease. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2002; 9: 503-507.
69. Bozer M, Turkcapar N, Bayar S, Kocaoglu H. Intraperitoneal hyperthermic perfusion may induce bacterial translocation. *Hepatogastroenterology.* 2005; 52: 111-114.
70. Witowski J, Korybalska K, Wisniewska J, Breborowicz A, Gahl GM, Frei U, Passlick-Deetjen J, Jorres A. Effect of glucose degradation products on human peritoneal mesothelial cell function. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 729-739.
71. Bręborowicz A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wieczorowska-Tobis K, Wisniewska J, Tam P, French I, Wu G. The effect of N-acetylglucosamine as a substrate for in vitro synthesis of glycosaminoglycans by human peritoneal mesothelial cells and fibroblasts. *Adv Perit Dial.* 1998; 14: 31-35.

## **IX. SPIS TABEL I RYCIN**

Rycina 1. Szczury rasy Wistar biorące udział w eksperymencie.

Rycina 2. Otwarcie jamy brzusznej.

Rycina 3. Wycięcie fragmentu otrzewnej ściennej o średnicy 6mm.

Rycina 4. Płukanie jamy otrzewnowej badanym roztworem.

Rycina 5. Jednowarstwowe zeszyte powłok brzusznych za pomocą szwu ciągłego.

Rycina 6. Przed pierwszą i drugą laparotomią dokonano oceny masy ciała badanych szczurów.

Rycina 7. Brak zrostów (0 wg klasyfikacji GA oraz GR)

Rycina 8. Cienkie, nieliczne zrosty z raną otrzewnej ściennej lub raną główną, obejmujące mniej niż 50% długości rany (2 w skali GR oraz GA).

Rycina 9. Płyn Hanksa wlewany do jamy otrzewnowej.

Rycina 10. Komora Burkera służąca do zliczenia ilości komórek zapalnych.

Rycina 11. Ocena nasilenia zrostów (GA) po 24h od płukania otrzewnej.

Rycina 12. Ocena nasilenia zrostów (GA) po 14 dobach od płukania otrzewnej.

Rycina 13. Porównanie nasilenia zrostów (GA) po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

Rycina 14. Ocena nasilenia zrostów (GR) po 24h od płukania otrzewnej.

Rycina 15. Ocena nasilenia zrostów (GR) po 14 dniach od płukania otrzewnej.

Rycina 16. Porównanie nasilenia zrostów (GR) po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

Rycina 17. Ocena nasilenia zrostów (GA+GR) po 24h od płukania otrzewnej.

Rycina 18. Ocena nasilenia zrostów (GA+GR) po 14 dniach od płukania otrzewnej.

Rycina 19. Porównanie nasilenia zrostów (GA+GR) po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

Rycina 20. Ocena ilości makrofagów po 24h od płukania otrzewnej.

Rycina 21. Ocena ilości makrofagów po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

Rycina 22. Ocena ilości limfocytów po 24h od płukania otrzewnej.

Rycina 23. Ocena ilości limfocytów po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

Rycina 24. Ocena ilości eozynofili po 24h od płukania otrzewnej.

Rycina 25. Ocena ilości eozynofili po 2 tygodnie od płukania otrzewnej.

- Rycina 26. Ocena ilości neutrofilii 24h od płukania otrzewnej.
- Rycina 27. Ocena ilości neutrofilii 2 tygodnie od płukania otrzewnej.
- Rycina 28. Ocena ilości mastocytów 24h po płukaniu otrzewnej.
- Rycina 29. Ocena ilości mastocytów 2 tygodnie po płukaniu otrzewnej.
- Rycina 30. Porównanie ilości makrofagów po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 31. Porównanie ilości limfocytów po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 32. Porównanie ilości eozynofili po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 33. Porównanie ilości neutrofilii po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 34. Porównanie ilości mastocytów po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 35. Ocena aktywności elastazy 24h po płukaniu otrzewnej.
- Rycina 36. Ocena aktywności elastazy 2 tygodnie od płukania otrzewnej.
- Rycina 37. Porównanie aktywności elastazy po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 38. Ocena poziomu IL-6 po 24h od płukania otrzewnej.
- Rycina 39. Ocena poziomu IL-6 po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 40. Porównanie poziomu IL-6 po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 41. Ocena poziomu MCP po 24h od płukania otrzewnej.
- Rycina 42. Ocena poziomu MCP po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 43. Porównanie poziomu MCP po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 44. Ocena poziomu TNF po 24h od płukania otrzewnej.
- Rycina 45. Ocena poziomu TNF po 2 tygodniach od płukania otrzewnej.
- Rycina 46. Porównanie poziomu TNF po 24h i 2 tygodniach od płukania otrzewnej.

Tabela 1. Skład płynu wieloelektrolitowego Gambrosol trio 10.