

Katedra i Zakład Farmakologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Hanna Ługowska-Umer

Rola agonistów i antagonistów receptorów endotelinowych ET_A i ET_B w
patogenezie pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.

The role of ET_A and ET_B endothelin receptors agonists and antagonists in the pathogenesis
of ileus in rats.

Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. med. Konstanty Zbigniew Korolkiewicz

Praca wykonana w ramach grantów:

W- 184

G - 85

SPIS TREŚCI

I.	Wstęp.....	4
	1. Wprowadzenie.....	5
	2. Patofizjologiczne mechanizmy pooperacyjnej niedrożności jelit.....	6
	3. Charakterystyka układu endotelin.....	10
II.	Cel pracy.....	13
III.	Materiał i metody.....	14
	1. Badania <i>in vivo</i>	14
	2. Badania <i>in vitro</i>	18
	3. Pomiar stężenia ET (1-21) w surowicy.....	19
	4. Związki wykorzystywane do przeprowadzenia doświadczeń.....	20
	5. Analiza statystyczna.....	20
IV.	Wyniki.....	21
V.	Dyskusja.....	37
VI.	Wnioski.....	41
VII.	Piśmiennictwo.....	42
VIII.	Wykresy	50
IX.	Streszczenie.....	63

Skróty stosowane w tekście:

CGRP – peptyd pochodny genu kalcytoninowego

E – grupa kontrolna poddana znieczuleniu eterem dietylowym

ET – endoteliny (**ET-1** – endotelina-1; **ET-2** – endotelina-2; **ET-3** – endotelina-3)

IL-interleukiny (**IL-1 β** – interleukina -1 β ; **IL-6** – interleukina-6; **IL-8** – interleukina-8)

I/R – niedokrwienie jelit poprzez nałożenie zacisku na tętnicę kręzkową z następową reperfuzją

L – laparotomia

L+M - laparotomia połączona z chirurgiczną manipulacją jelita cienkiego

NO – tlenek azotu

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PG – prostaglandyny (**PGE2** – prostaglandyna E2)

PNJ – pooperacyjna niedrożność jelit

SI – nacięcie skóry

SIRS – zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej

SO –operacja rzekoma, tzn. manipulacja chirurgiczna polegająca na rozcięciu skóry, warstwy mięśniowej i otrzewnej (*sham operation*)

SP – substancja P

TNF α - czynnik martwicy nowotworu alfa

UN – grupa kontrolna

VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy

I WSTĘP

1. Wprowadzenie

Pooperacyjna niedrożność jelit (PNJ) jest definiowana jako przejściowe, samoistnie odwracalne zatrzymanie ruchu propulsywnego jelit. PNJ jest częstym powikłaniem zabiegów chirurgicznych przeprowadzanych nie tylko w obrębie jamy brzusznej, ale także poza nią [Livingston, Passaro, 1990]. W obrazie klinicznym dominują: zatrzymanie gazów, wzdęcia, wymioty, bóle brzucha oraz utrudnienie przyswajania pokarmów. Powrót czynności motorycznej, zazwyczaj samoistny, następuje najszybciej w żołądku i jelicie cienkim, a najpóźniej w jelicie grubym to znaczy po około 48-72 h. PNJ utrzymująca się dłużej niż 3 dni określana jest jako niedrożność porażenna. PNJ może prowadzić do powikłań, takich jak zapalenie płuc oraz zwiększa ryzyko innych zakażeń szpitalnych, przez co jest przyczyną wydłużenia okresu hospitalizacji, zwiększając koszty terapii [Behm i wsp., 2003].

Z powodu niedostatecznej wiedzy na temat mechanizmów patofizjologicznych PNJ postępowania lekarskie ogranicza się głównie do leczenia objawowego w postaci odsysania zalegającej treści żołądkowej, żywienia pozajelitowego oraz przywracania równowagi elektrolitowej. Skrócenie czasu trwania PNJ można osiągnąć stosując techniki znieczulenia przewodowego, chirurgii laparoskopowej, oraz zmniejszając zużycie opioidowych leków przeciwbólowych [Livingston, Passaro, 1990; Holte, Kehlet, 2002]. W ostatnim czasie pewien postęp osiągnięto stosując złożone programy leczenia PNJ oraz zastosowanie obwodowo działających antagonistów receptorów opioidowych na przykład: almivopanu [Marderstein, Delaney, 2008].

Ważną rolę w regulacji motoryki jelit odgrywają endoteliny, stanowiąc jeden z elementów modulujących czynność przewodu pokarmowego, oraz biorąc udział w percepcji bólu [Wiklund i wsp, 1991].

2. Patofizjologiczne mechanizmy pooperacyjnej niedrożności jelit

Po zabiegu operacyjnym, motoryka przewodu pokarmowego charakteryzuje się dezorganizacją aktywności elektrycznej i brakiem skoordynowanych ruchów propulsywnych [Clevers i wsp, 1991]. Wiadomo obecnie, że w patogenezę pooperacyjnego hamowania perystaltyki oprócz autonomicznego układu nerwowego zaangażowane są substancje endokrynne uwalniane ogólnoustrojowo lub miejscowo oraz mediatory odpowiedzi zapalnej [Luckey i wsp, 2003; Baig i wsp.,2004].

Tabela 1.

Patofizjologia PNJ: proponowane mechanizmy
Rdzeniowe i miejscowe współczulne odruchy nerwowe
Miejscowe i układowe mediatory stanu zapalnego
Czynniki nasilające:
- zastosowanie agonistów receptorów opioidowych
- wyłonienie oraz manipulacja chirurgiczna jelit
- zabiegi wewnątrztrzewnowe
- hipokaliemia

Jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za PNJ jest zaburzona czynność autonomicznego układu nerwowego. Współczulny układ nerwowy bierze udział w zahamowaniu perystaltyki, poprzez włókna aferentne, w reakcji na bodźce z włókien somatycznych umiejscowionych m.in. w skórze (w wyniku nacięcia skóry), oraz z włókien trzewnych w jelitach. Wyniki badań na zwierzętach wykazały, że zablokowanie odruchów współczulnych skutkuje krótszym okresem trwania PNJ [Holzer i wsp., 1986; Douglas. i wsp., 1941]. Doświadczalne obserwacje potwierdziły się częściowo w eksperymentach klinicznych. Zastosowanie znieczulenia przewodowego złagodziło

przebieg PNJ nie wpływając jednak na czas całkowitego pobytu chorych w szpitalu [Jorgensen i wsp., 2000].

W trakcie zabiegu operacyjnego dochodzi do większej aktywacji dośrodkowego zahamowania poprzez nerwy trzewne niż aferentne włókna nerwu błędnego. Podanie kapsaicyny w okolicę zwojów przedkręgowych poprawiło perystaltykę, natomiast podaż kapsaicyny w pobliżu nerwu błędnego nie spowodowała podobnego efektu [Plourde i wsp., 1993].

Rodzaj aktywacji dróg nerwowych jest w dużym stopniu zależny od nasilenia bodźca bólowego. Nacięcie skóry i laparotomia powodują krótkotrwałe zahamowanie perystaltyki, prawdopodobnie dzięki aktywacji niskoprogowych odruchów rdzeniowych [Boeckxstaens i wsp., 1999]. Natomiast wyłonienie i manipulacja chirurgiczna w obrębie trzewi, aktywuje wysokoprogowe drogi ośrodkowego układu nerwowego zawierające neurony podwzgórzowe, co skutkuje przedłużonym czasem trwania PNJ [Barquist i wsp., 1996].

Wiadomo, iż w okresie pooperacyjnym dochodzi do zwiększenia stężenia katecholamin w surowicy prowadząc do zahamowania motoryki przewodu pokarmowego [Smith i wsp., 1977; Bernstein i wsp., 1967]. Pomimo braku wpływu antagonistów receptorów adrenergicznych β na czas trwania doświadczalnej PNJ [Bauer, Boeckxstaens 2004; Uemura i wsp 2004] wykazano, że johimbina wzmacniała perystaltykę jelit, sugerując kluczową rolę receptorów adrenergicznych α_2 w odpowiedzi układu współczulnego na manipulację chirurgiczną trzewi [Uemura i wsp., 2004]. Ponadto, neostygmina wykazywała działanie lecznicze [Bauer, Boeckxstaens 2004].

Wzrost aktywności układu adrenergicznego jest tylko jednym z sugerowanych mechanizmów leżących u podstaw PNJ [Dubois i wsp., 1975]. Wielu badaczy wykazało aktywację innych szlaków niż adrenergiczny i cholinergiczny [Boeckxstaens i wsp., 1999; De Winter i wsp., 1997; Person i wsp., 2006]. W patogenezie PNJ biorą udział: tlenek azotu (NO), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), peptyd pochodny genu kalcytyninowego (CGRP), substancja P (SP) czy endoteliny (ET). NO jest uważany za główny czynnik hamujący w trzewnym układzie nerwowym [Bult i wsp., 1990]. Wykazano, że inhibitory

syntazy NO oraz blokery receptorów adrenergicznych addycyjnie zapobiegają powstawaniu PNJ [Person i wsp., 2006].

Podanie antagonistów VIP i SP [Espat i wsp., 1995-33] powodowało zmniejszenie PNJ. Natomiast łączne podanie powyższych związków w różnych kombinacjach, nie skutkowało dalszą poprawą motoryki jelit [Zittel i wsp., 1998].

Odpowiedź zapalna na interwencję chirurgiczną jest kolejnym potencjalnym czynnikiem biorącym udział w patogenezie PNJ [Kalff i wsp., 1998]. Wiele badań wykazało, że manipulacja chirurgiczna trzewi prowadzi do aktywacji makrofagów wydzielających: NO, prostaglandyny lub prozapalne cytokiny (IL-6, IL-1b, TNF- α) [Kalff i wsp., 1998; Turler i wsp., 2002; Boros i wsp 1998;]. Uruchomiona kaskada immunologiczna wywołuje zwolnienie perystaltyki jelit po zabiegu operacyjnym, natomiast mechanizm tego zjawiska nie został w pełni wyjaśniony [Kalff i wsp., 2003]. Powyższe odkrycie nie tłumaczy jednak rozwoju niedrożności pooperacyjnej po zabiegach wykonywanych poza jamą brzuszną. Jedną z hipotez próbującą wyjaśnić to zjawisko jest teoria, wg której zachodzi interakcja pomiędzy mediatorami stanu zapalnego (PG, NO, cytokiny, endoteliny), a aferentnymi drogami nerwowymi wyzwalającymi odruch hamujący na perystaltykę jelit [Person B i wsp., 2006]. Teoria ta znalazła potwierdzenie w pracach De Jonge i wsp., którzy wykazali iż podanie heksametonium i guanetydyny blokuje hamujący odruch adrenergiczny [De Jonge i wsp., 2003].]. Ponadto wzrost ekspresji białka *c-fos* w rdzeniu kręgowym w trakcie manipulacji chirurgicznej jelit hamuje wcześniejsze podanie przeciwciał przeciwko międzykomórkowej molekuły adhezyjnej -1 (ICAM-1) Ponadto w trakcie zabiegów chirurgicznych w obrębie jamy brzusznej obserwuje się aktywację komórek tucznych, prowadzącą do zwiększenia stężenia histaminy oraz TNF α [De Jonge i wsp., 2003]. Podanie kromoglikanu sodowego, który stabilizuje błony komórek tucznych zmniejsza stan zapalny ściany jelita oraz przyspiesza opróżnianie żołądka.[De Jonge i wsp., 2003].

Cholinergiczny układ nerwowy osłabia produkcję prozapalnych cytokin i hamuje proces zapalny. Pierwotnie uważano, że kluczowy mediator tego procesu, acetylocholina (Ach), hamuje uwalnianie cytokin bezpośrednio poprzez nikotynowy receptor alfa 7 dla

acetylocholino (nAChR) obecny na makrofagach. Natomiast ostatnie dane wskazują na nerw błędny jako na pośredniego modulatora wrodzonej odpowiedzi zapalnej, spełniającego swój przeciwzapalny efekt przez zazwojową modulację komórek immunologicznych w narządach pierwotnej odpowiedzi immunologicznej [Van Der Zenden i wsp., 2009].

Wiele środków farmakologicznych stosowanych rutynowo w opiece przed i pooperacyjnej oraz w czasie zabiegu chirurgicznego odgrywa znacząca rolę w rozwoju PNJ. Agoniści receptorów opioidowych poza silnym działaniem przeciwbólowym hamują perystaltykę przewodu pokarmowego poprzez hamowanie uwalniania acetylocholino oraz działając bezpośrednio na mięśnie gładkie jelit [Cali. i wsp., 1995; Baig, Wexner, 2004; Harms, Heise, 2007].

Halotan, enfluran i eter dietylowy hamują podstawowy rytm elektryczny mięśni gładkich jelit; efekt ten jednak zanika w przeciągu kilku godzin po zabiegu [Schurizek i wsp. 1991]. Wpływ eteru dietylowego na zahamowanie perystaltyki jelit utrzymuje się przez około 60 min po zakończeniu znieczulenia [Bueno i wsp., 1978; De Winter i wsp. 1997].

Żaden z przedstawionych mechanizmów patofizjologicznych nie jest w sposób samodzielny odpowiedzialny za rozwój PNJ [Kasperek i wsp., 2003].

Większość przeprowadzonych badań eksperymentalnych na zwierzętach dotyczyło patofizjologii przemijającej atonii jelit podczas oraz bezpośrednio po zabiegu chirurgicznym w obrębie jamy brzusznej, czyli wczesnej fazy PNJ wynikającej prawdopodobnie z aktywacji mechano- i nocycceptorów wywołanej manipulacją trzewi. Ponieważ aktywacja obu typów receptorów ustaje krótko po zamknięciu rany, mechanizm ten nie może wyjaśnić przewlekłej natury PNJ.

Podczas zabiegów chirurgicznych w obrębie jamy brzusznej wpływ na motorykę przewodu pokarmowego, oprócz mechanicznych bodźców bólowych, może mieć także przemijające niedokrwienie jelit. Do niedokrwienia trzewi dochodzi na skutek zmniejszenia lub redystrybucji przepływu krwi w trzewnym łożysku naczyniowym w przypadku spadku ciśnienia tętniczego, a także przy uwięźniętej przepuklinie, zatorze tętnicy krezkowej, mechanicznej niedrożności jelit [Collard i wsp., 2001]. Przerwanie zaopatrzenia w krew skutkuje uszkodzeniem aktywnych metabolicznie tkanek. Paradoksalnie, reperfuzja

inicjuje kaskadę zdarzeń, które mogą prowadzić do dalszego uszkodzenia komórek [Stallion i wsp., 2002, Kong i wsp., 1998] wolnymi rodnikami, cytokinami zapalnymi, aktywacją komplementu oraz naciekiem neutrocytów obojętnochłonnych [Carden i wsp., 2000]. Jelita są jednym z najbardziej wrażliwych na niedokrwienie organów wewnętrznych [Granger i wsp. 1986]. Błona śluzowa jelit jest miejscem produkcji białek ostrej fazy [Molmenti, 1993], hormonów jelitowych [Zamir i wsp., 1992], cytokin [Mester i wsp., 1993], których wydzielanie przyczynia się do rozwoju SIRS.

Chociaż krótkie okresy ostrego niedokrwienia jelit powodują wzmożoną kurczliwość [Scott i wsp., 1964], dłuższe niedokrwienie powoduje przedłużone zatrzymanie ruchu propulsywnego [Chou i wsp., 1982].

3. Charakterystyka układu endotelin

Endotelina (ET), peptyd złożony z 21 aminokwasów, został po raz pierwszy wyizolowany przez Yanagisawa i wsp. z komórek endotelium aorty świni [Yanagisawa M., i wsp., 1988]. Peptyd kurczył mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, ponad dziesięć razy silniej od angiotensyny II. Białko to nazwane endoteliną-1 należy wraz z endoteliną -2 i endoteliną -3 do rodziny izopeptydów endotelinowych. Wyróżniono trzy geny dla ET kodujące różne sekwencje; odpowiednio: ET-1, ET-2 i ET-3. Te trzy izoformy wykazują rozbieżną i niejednakową dystrybucję w tkankach, co sugeruje, że endoteliny mogą wywierać różne działania, nie ograniczone do układu krążenia. [Inoune i wsp., 1989].

Endotelinę-1 (ET-1) produkuje i konstytutywnie wydziela śródbłonek naczyń uczestnicząc w regulacji napięcia ściany naczynia [Weitzberg i wsp., 1994]. ET-1 znajduje się też w mięśniach gładkich [Resink i wsp., 1990], rdzeniu nerki [Endo. i wsp, 1992], komórkach Kupffera wątroby [Liu i wsp., 1997], błonie śluzowej jelit [Takahashi i wsp., 1990], neuronach [Giaid i wsp., 1989], oraz w makrofagach [Ehrenreich i wsp., 1990] i kardiomiocytach [Suzuki i wsp., 1993]. Natomiast ET-2 znajduje się w nerkach i jelitach, a

ET-3 występuje w płucach, ośrodkowym układzie nerwowym i przewodzie pokarmowym [Rubanyi i wsp., 1994].

Endoteliny uważane są za mediatory parakrynne, wykazujące działanie poprzez co najmniej dwa typy receptorów endotelinowych ET_A i ET_B . Oba receptory są receptorami metabotropowymi sprzężonymi z białkiem G; [Arai, i wsp., 1990; Sakurai, i wsp., 1990]. Receptory ET_A głównie pobudza ET-1. mRNA dla receptorów ET_A podlega ekspresji w wielu tkankach włączając mięśnie gładkie naczyń, serce, płuca i nerki. Natomiast nie dochodzi do jego ekspresji w śródbłonku. Receptory ET_B są pobudzane w podobnym stopniu przez każdą z trzech izoform ET. mRNA dla receptora ET_B podlega ekspresji głównie w mózgu oraz w mniejszym stopniu w aorcie, sercu, płucach, nerkach i nadnerczach. W przeciwieństwie do receptora ET_A , receptor ET_B podlega silnej ekspresji w śródbłonku, ale również występuje w mięśniach gładkich naczyń [Wanecek i wsp., 2000].

O roli endotelin w przewodzie pokarmowym może świadczyć obecność receptorów ET_A i ET_B w ścianie przewodu pokarmowego oraz zdolność agonistów tych receptorów do modyfikowania napięcia mięśni gładkich jelit [Shahbazian i wsp., 2000]. Receptory ET_A i ET_B znajdują się w neuronach mięśniowego i podśluzówkowego spłotu nerwowego, komórkach pnia błony śluzowej i naczyń krwionośnych, blaszce mięśniowej błony śluzowej, oraz okrężnej i podłużnej warstwie błony mięśniowej. Endoteliny mogą zarówno pobudzać jak i hamować nerwy trzewne lub mięśnie gładkie przewodu pokarmowego. Wydaje się, że rolę pobudzającą w pierwszym rzędzie odgrywa receptor ET_A , natomiast rolę hamującą odgrywa ET_B [Shahbazian A. i wsp., 2000].

Do aktywacji układu endotelinowego dochodzi w wielu stanach patologicznych takich jak wstrząs septyczny, ostra niewydolność oddechowa, niewydolność serca, rozsiane wykrzepianie wewnątrznacyniowe, a także w stanach hipoperfuzji trzewnej [Wanecek, i wsp., 2000]. Ponadto, obserwowano podwyższenie stężenia ET-1 w błonie śluzowej jelit pacjentów w ciężkim stanie; w szczególności u chorych narażonych na niedotlenienie [Michida i wsp., 1997]. Przeciwciała przeciw endotelinom poprawiają przepływ krwi w trzewiach w warunkach wstrząsu eksperymentalnego [Wanecek i wsp., 2000]. ET hamowały pasaż jelitowy w stanach niedokrwienia i reperfuzji [Alican i wsp., 1998].

Endoteliny zwiększają produkcję wielu cytokin prowadząc do leukocytozy, aktywacji neutrofilii oraz generacji nadtlenków, co prowadzi do przesieku naczyniowego [Boros i wsp., 1998, Huribal i wsp., 1994]. ET-1 zwiększa stężenie śródkomórkowego wapnia zjonizowanego w ludzkich monocytach, co wyzwała produkcję TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów oraz PGE-2 [McMillen i wsp, 1996]. Dlatego ET-1, poprzez zaburzenie funkcji monocytów i neutrofilii, wydaje się być mediatorem wielonarządowej dysfunkcji.

II. Cel pracy

Wykonane badania miały dostarczyć odpowiedzi na następujące pytania:

- 1) Czy antagoniści receptorów ET_A i/lub ET_B zapobiegają rozwojowi wczesnej oraz późnej fazy PNJ wywołanej niedokrwieniem/reperfuzją lub manipulacją chirurgiczną trzewi w doświadczeniach przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro*?
- 2) Czy farmakologiczne działanie tezosentanu, BQ-123 and BQ-788 spełnia wymogi zależności opisywanej krzywą dawka-czas-odpowieź?
- 3) Czy działanie protekcyjne tezosentanu znajduje odzwierciedlenie w zmianach stężenia ET w surowicy krwi?
- 4) Czy niedokrwienie hamuje odpowiedź mięśni gładkich jelita cienkiego na działanie ET(ET-1, ET-2 oraz ET-3)?

III. Materiał i metody

1. Badania „in vivo”

Postępowanie chirurgiczne

Wszystkie procedury doświadczalne przeprowadzone były po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej d.s. Doświadczeń na Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Gdańsku, nr 20/04 . Badania przeprowadzono na samcach szczurów Albino Wistar (180-250g), przetrzymywanych w kontrolowanych warunkach temperatury: 21°C, oświetlenia- w 12 h cyklach światła i zaciemnienia przez minimum 7 dni . Zwierzęta 18 h przed planowanym postępowaniem chirurgicznym, nie miały dostępu do standardowej paszy, miały zapewniony natomiast dostęp do wody *ad libitum*. Wszystkie zabiegi operacyjne wykonywano w znieczuleniu eterem dietylowym zgodnie z zasadami aseptyki, przy użyciu jałowego sprzętu.

Model I

Zwierzęta zostały w sposób randomizowany podzielone na 5 grup: grupa pierwsza – kontrolna (UN), grupa druga – poddana znieczuleniu eterem dietylowym (E) oraz trzy grupy poddane zabiegowi chirurgicznemu, w nieznacznym sposób modyfikując protokół opisany przez De Winter i wsp. (1998) [De Winter i wsp.1998]. Znieczulone zwierzęta po uprzednim wygoleniu sierści na brzuchu oraz zdezynfekowaniu skóry 70% etanolem poddano działaniu bodźca bólowego o wzrastającym natężeniu: standaryzowanemu nacięciu skóry brzucha (SI-grupa trzecia), laparotomii, obejmującej rozcięcie skóry, warstwy mięśniowej i otrzewnej (L-grupa czwarta), laparotomii oraz chirurgicznej manipulacji trzewi (L+M-grupa piąta). Jelito cienkie wraz z kątnicą wyłoniono z jamy brzusznej i układano między dwa jałowe wilgotne gaziki. Następnie ścianę jelita cienkiego na całej długości od dwunastnicy do kątnicy równomiernie, masowano wilgotnymi gazikami. Czynność tę powtarzano 6-krotnie w ciągu 10 minut, po czym jelito wprowadzono z powrotem do jamy otrzewnej, a powłoki brzuszne zaszywano szwem ciągłym. Dalsze zabiegi wykonywano po upływie 1 godziny, tj. czasie potrzebnym na wyeliminowanie działania eteru dietylowego na perystaltykę przewodu pokarmowego

[Bueno i wsp., 1978]. Następnie zwierzętom podawano 0.15 ml roztworu błękitu Evansa przez sondę żołądkową. Zwierzęta uśmiercano 30 min później podając dootrzewnowo tiopental w dawce 100mg/kg. Następnie wyłaniano z jamy otrzewnej jelito cienkie układano na korkowej podkładce w sposób umożliwiający wyznaczenie dystalnego punktu jelita, idąc od odźwiernika, do którego przesunięty został błękit Evansa. Dokonując pomiaru odcinka jelita, w obrębie którego doszło do przemieszczenia znacznika, oceniano czynność motoryczną przewodu pokarmowego. Pasaż jelitowy wyrażano w centymetrach jako długość jelita wypełnionego barwnikiem.

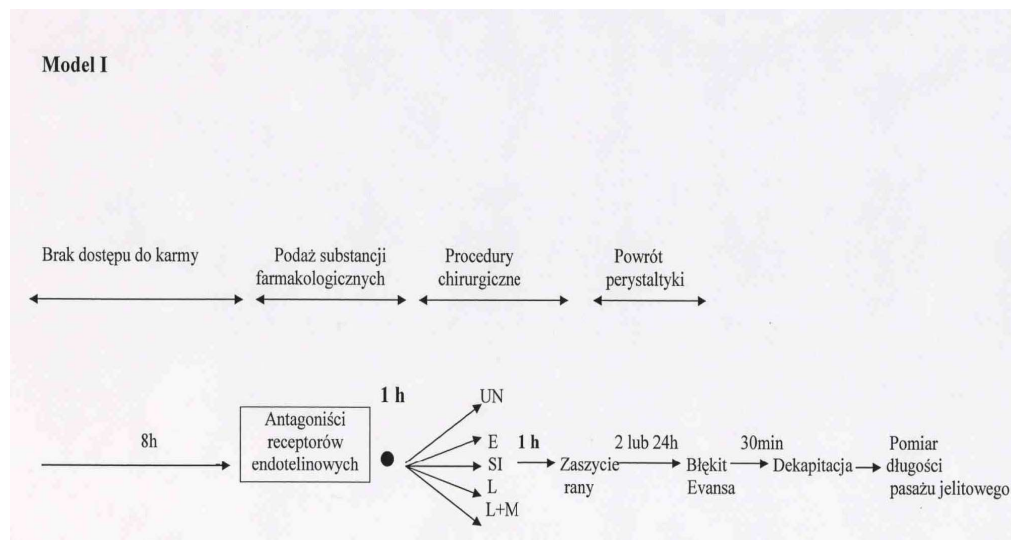
Przebieg doświadczenia

Przed przystąpieniem do realizacji projektu badawczego we wstępnych doświadczeniach oceniono wpływ eteru dietylowego na motorykę przewodu pokarmowego w porównaniu do zwierząt, u których nie wykonano zabiegów chirurgicznych (E).

Następnie pomiary migracji barwnika zostały przeprowadzone u zwierząt poddanych bodźcom nocyceptywnym o wzrastającym natężeniu: SI, L, L+M.

W drugiej serii doświadczeń zbadano wpływ antagonistów receptorów endotelinowych – tezosentanu antagonisty receptorów ET_A i ET_B lub wybiórczych antagonistów receptora ET_A – BQ123 oraz ET_B – BQ 788 . Każdą z substancji podawano dootrzewnowo 60 min przed zabiegiem chirurgicznym. Tezosentan podawano we wzrastających dawkach od 3 do 30 mg/kg m.c., oraz odpowiednio BQ-123 - 300 μ g do 1 mg/kg oraz BQ-788– 300 μ g – 1 mg/kg. W grupie kontrolnej zwierzęta zamiast substancji farmakologicznej otrzymywały odpowiednią objętość rozpuszczalnika. Procedury zabiegu przedstawiono na schemacie 1.

Schemat 1

**Model II**

Zwierzęta zostały w sposób zrandomizowany podzielone na trzy grupy, grupę kontrolną (UN), grupę poddaną pozornej operacji (SO) oraz grupę poddaną niedokrwieniu-reperfuzji (I/R) przez czasowe zamknięcie tętnicy kręzkowej górnej. Znieczulone zwierzęta po uprzednim wygoleniu sierści na brzuchu oraz zdezynfekowaniu skóry 70% etanolem poddano kolejnym procedurom chirurgicznym. W grupie drugiej przeprowadzono laparotomię, obejmującą rozcięcie skóry, warstwy mięśniowej i otrzewnej (SO). W grupie trzeciej po nacięciu powłok brzusznych w linii pośrodkowej jelita zostały wyłonię z jamy brzusznej a tętnica kręzkowa górna została uwidoczniiona po przełożeniu jelit na lewo. Następnie tętnicę zaciśnięto przy użyciu atraumatycznego zacisku naczyniowego na czas 60 minut (okres niedokrwienia). Po usunięciu zacisku jelita umieszczono w jamie otrzewnej, powłoki brzuszne zaszyto szwem pojedynczym ciągłym. Zwierzęta pozostawiono na czas 2 h (okres wczesnej reperfuzji) lub 24h (późna reperfuzja) z

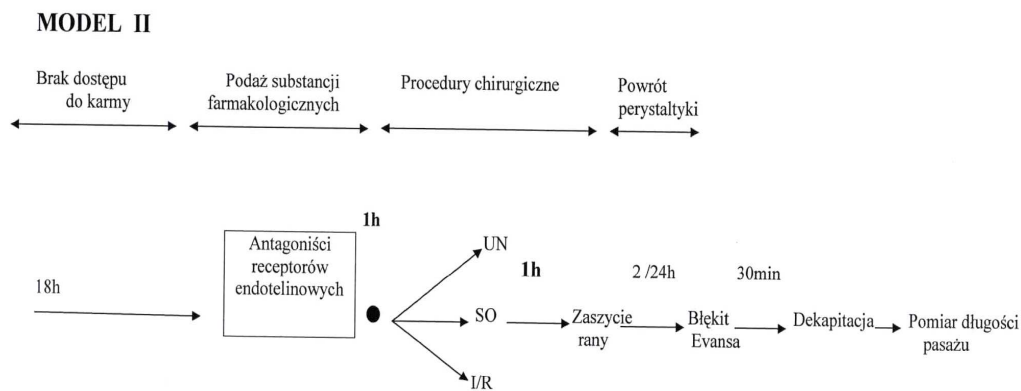
wolnym dostępem do wody. Na 30 min przed zabiciem podawano 0.15 ml roztworu błękitu Evansa.

Przebieg doświadczenia

Przed przystąpieniem do realizacji projektu badawczego we wstępnych doświadczeniach oceniono wpływ eteru dietylowego na motorykę przewodu pokarmowego w porównaniu do zwierząt, których nie poddano interwencji chirurgicznej (UN). Następnie pomiary migracji barwnika przeprowadzono w grupie SO oraz I/R.

W drugiej serii doświadczeń zbadano wpływ tezosentan, BQ123 oraz BQ 788 na pasaż jelitowy w poszczególnych grupach. Każdą z substancji podawano dootrzewnowo 60 minut przed zabiegiem chirurgicznym. Tezosentan podawano we wzrastających dawkach od 3 do 30 mg/kg, BQ-123 i BQ-788 w dawkach od 0.3 do 1 mg/kg m.c. W grupie kontrolnej zwierzęta zamiast antagonisty otrzymywały odpowiednią objętość rozpuszczalnika badanych substancji – DMSO. Procedury zabiegu przedstawiono na schemacie 2.

Schemat 2



2. Badania in vitro

Doświadczenia wykonywano na izolowanych skrawkach mięśni gładkich jelita cienkiego szczurów.

Przed wykonaniem doświadczeń szczury były pozbawiane jedzenia przez okres 18 h, z utrzymanym stałym dostępem do wody *ad libitum*.

Model I

Zwierzęta podzielono na trzy grupy: UN, L+M oraz grupę L+M po wcześniejszym podaniu tezosentanu. Po zabiegu chirurgicznym zwierzęta były ponownie dzielone na dwie podgrupy. Zwierzęta z pierwszej podgrupy zostały pozostawione na 2h, natomiast z drugiej podgrupy na 24h. Tezosentan (10 mg/kg , i.p.) lub sól fizjologiczną podano 1 h przed zabiegiem operacyjnym.

Model II

Zwierzęta podzielono na trzy grupy: grupę poddaną pozorowanej operacji, grupę poddaną niedokrwieniu/reperfuzji oraz grupę poddaną niedokrwieniu/reperfuzji po wcześniejszym podaniu tezosentanu (niedokrwienie trwało 1 h, reperfuzja 24h). Tezosentan (10 mg/kg , i.p.) lub sól fizjologiczną podano 1 h przed niedokrwieniem/reperfuzją (I/R).

Bezpośrednio przed doświadczeniem zwierzęta uśmiercano poprzez przemieszczenie kręgów szyjnych z przerwaniem rdzenia kręgowego. Następnie cięciem w linii środkowej otwierano jamę brzuszną i odpreparowywano jelito cienkie. Zaczynając od odźwiernika oddzielano jelito cienkie od tkanki łącznej sieci, aż do kątnicy. Z części środkowej jelita cienkiego odcinano 7 cm odcinek , który umieszczano w zlewce z buforem Tyroda poddanym wcześniej natlenieniu mieszaniną 95% CO₂ i 5% CO₂ przez okres ok.10min. Zlewkę z wypreparowanym odcinkiem jelita cienkiego pokrywano parafilmem i przechowywano przez okres 4h w temperaturze 4°C w celu zminimalizowania skurczów spontanicznych jelita cienkiego [Greenwood-Van Meerveld B

i wsp. 2001]. Po tym czasie odcinano 4 cm odcinek jelita cienkiego, przecinano jelito wzdłuż osi długiej, otrzymując skrawek mięśniowy jelita cienkiego w kształcie prostokąta o długości 4 cm i szerokości 0,5cm. Preparat zawieszano w naczynkach inkubacyjnych do narządów izolowanych o pojemności 15 ml. Naczynko było wypełnione płynem Tyroda o następującym składzie [mM]: NaCl – 136,9; KCl – 3,35; CaCl₂ – 1,46; MgCl₂ x 6 H₂O – 1,1; NaHCO₃ – 11,9; NaH₂PO₄ – 0,48; glukoza – 5,0. Przez czas trwania doświadczenia płyn znajdujący się w naczynku nasycano karbogenem (95% O₂ + 5% CO₂), a temperaturę przepływającego przez naczynie buforu utrzymano na poziomie 37°C. Skurcz badano metodą izotoniczną przy pomocy przetwornika PIT 212 (C.O.T.M. Białystok) i zapisywano przy użyciu rejestratora liniowego TZ 4200 (Laboratorni Pistroje Praha, Republika Czeska). Zawieszony skrawek mięśniowy był poddany ok. 30 min inkubacji wstępnej aż do osiągnięcia pełnej stabilizacji. Celem sprawdzenia reaktywności użytego do doświadczenia skrawka mięśniowego zamykano przepływ i podawano karbachol w stężeniu 10⁻⁵ M. Po wystąpieniu skurczu wykonywano 30 min płukanie. Następnie zamykano przepływ i przystępowano do właściwego eksperymentu. Karbachol (1nM -10 uM) bądź ET-1, ET-3 (0.1 nM – 10 uM) były podawane we wzrastających stężeniach w 15 minutowych odstępach czasowych, bufor wymieniany był co 5 minut. Jak tylko osiągnięto maksymalny skurcz, jelito płukano przed powrotem długości początkowej skrawka. Przy użyciu jednego skrawka powstawały tylko dwie niekumulacyjne krzywe stężenie-skurcz.

3. Pomiary stężenia ET (1-21) w surowicy

Pomiary wykonano za pomocą standardowego testu immunoenzymatycznego (ELISA No. BI-20052. Biomedica GmbH Vienna, Austria). Próbkę krwi pobrano z aorty uśpionych eterem szczurów do oziębionych probówek. Następnie probówki wirowano przez 10 min przy 3000g. Próbkę surowicy przechowywano w temperaturze -70⁰C do czasu dalszej obróbki zgodnie z zaleceniami producenta.

4. Związki wykorzystywane do przeprowadzenia doświadczeń

Tezosentan otrzymano od firmy Actelion (Szwajcaria). BQ123, BQ788, błękit Evansa, karbachol, ET-1, ET-2 i ET-3 zakupiono od Sigma-Aldrich, Poznań (Polska). Tezosentan, BQ123, BQ788 rozrabiano używając kilku kropel DMSO (dimetylosulfotlenek) a następnie uzupełniano objętość zawiesiny solą fizjologiczną uzyskując odpowiednie stężenie (Fresenius Kabi, Kutno). Eter dietylowy zakupiono od Polskich Odczynników Chemicznych w Gliwicach. Roztwór błękitu Evansa przygotowywano w sposób opisany przez Tanila i wsp., 50 mg barwnika rozpuszczano w 1 ml 0.9% NaCl (Fresenius Kabi, Kutno) [Tanila H i wsp. 1993].

5. Analiza statystyczna

Nie wykryto istotnych z punktu widzenia statystycznego różnic w długości jelita cienkiego pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt, dlatego zdecydowano się przedstawić uzyskane wyniki jako pasaż błękitu Evansa w jelicie cienkim w centymetrach \pm średni błąd standardowy (SEM). Wartości EC_{50} przedstawiono jako średnie ze wszystkich eksperymentów \pm średni błąd standardowy uzyskanych wyników (SEM). Wartości EC_{50} obliczono na podstawie programu komputerowego: Pharmacological Calculation System-Pharm/PCS wersja 4.0.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroniego zastosowanym po teście ANOVA. Wyniki oceniano jako statystycznie znamienne dla p mniejszego od 0,05 ($p < 0,05$).

IV. Wyniki

1. Badania *in vivo*

Wpływ eteru dietylowego oraz zabiegów chirurgicznych na perystaltykę jelit u szczurów.

W doświadczeniach pilotowych pasaż jelitowy zwierząt nie poddawanych zabiegom operacyjnym wynosił $62,62 \pm 5,89$ cm przy całkowitej długości jelita cienkiego $116 \pm 3,4$ cm ($n=7$). Znieczulenie eterem ani nacięcie skóry nie wpłynęło w sposób znaczący na długość pasażu barwnika Evansa w jelicie cienkim, który wynosił odpowiednio $57,88 \pm 2,49$ cm przy całkowitej długości $125 \pm 8,99$ cm oraz $66,80 \pm 10,25$ cm przy długości $118 \pm 10,11$ cm ($n=8-10$). Długość jelita cienkiego nie różniła się statystycznie pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

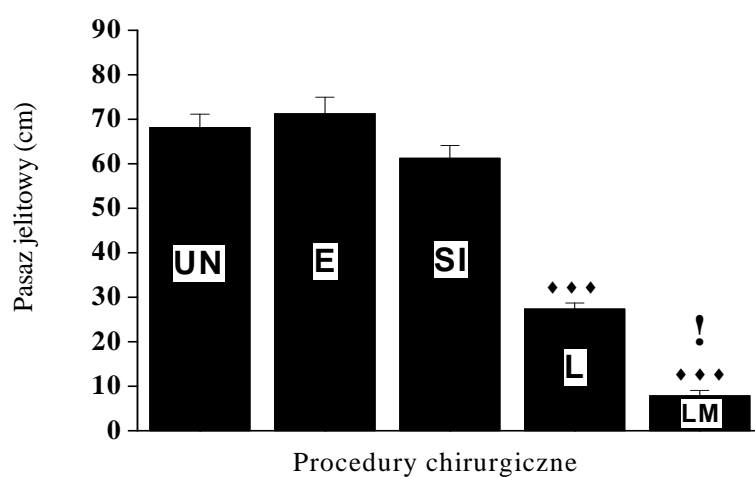
Model I

Pasaż jelitowy w grupach zwierząt poddawanych zabiegom chirurgicznym we wczesnej oraz późnej fazie PNJ (odpowiednio 2 i 24 h od czasu przeprowadzenia zabiegu operacyjnego).

We wczesnej i późnych fazach PNJ laparotomia oraz laparotomia połączona z chirurgiczną manipulacją trzewi (L+M) znamiennie hamowała czynność propulsywną jelit w porównaniu z grupą kontrolną, zwierząt poddanych wyłącznie znieczuleniu eterem dietylowym czy nacięciu skóry (Wykres 1).

Wykres 1

Wyniki pomiaru długości jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem Evansa u zwierząt: w grupie kontrolnej (UN), poddanych znieczuleniu eterem dietylowym (E), nacięciu skóry (SI), laparotomii (L), oraz laparotomii z mechaniczną manipulacją trzewi (L+M). Wyniki w każdej grupie zwierząt (n=5-12) przedstawiono w centymetrach jako średnią \pm średni błąd standardowy (SEM). $***$ UN, E lub SI vs. L lub LM ($p < 0.001$); † L vs. LM ($p < 0.05$).



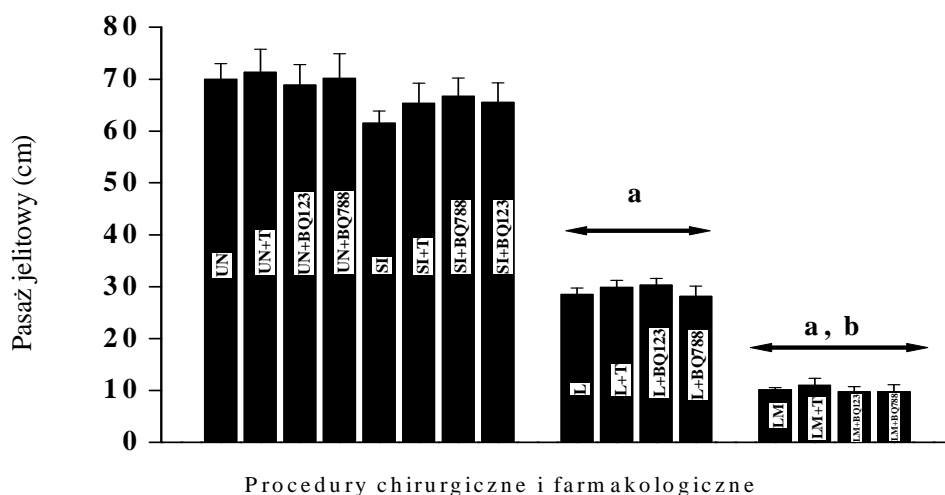
Działanie antagonistów receptorów endotelinowych na rozwój fazy wczesnej i późnej PNJ (odpowiednio 2 i 24 h po zabiegu chirurgicznym):

Tezosentan, BQ-123 oraz BQ-788 nie wywierały wpływu na perystaltykę trzewi w grupach szczurów poddanych laparotomii oraz nacięciu skóry. We wczesnej fazie PNJ, po 2 godzinach od zabiegów chirurgicznych, tezosentan (10mg/kg), BQ-123 (1mg/kg) oraz BQ-788 (1mg/kg) nie wpłynęły na perystaltykę w żadnej z badanych grup zwierząt (Wykres 2).

Natomiast tezosentan, BQ123 oraz BQ-788 (0,1mg/kg) odwracały hamujący wpływ manipulacji chirurgicznej trzewi na perystaltykę po 24 h od zabiegu chirurgicznego (Wykres 3).

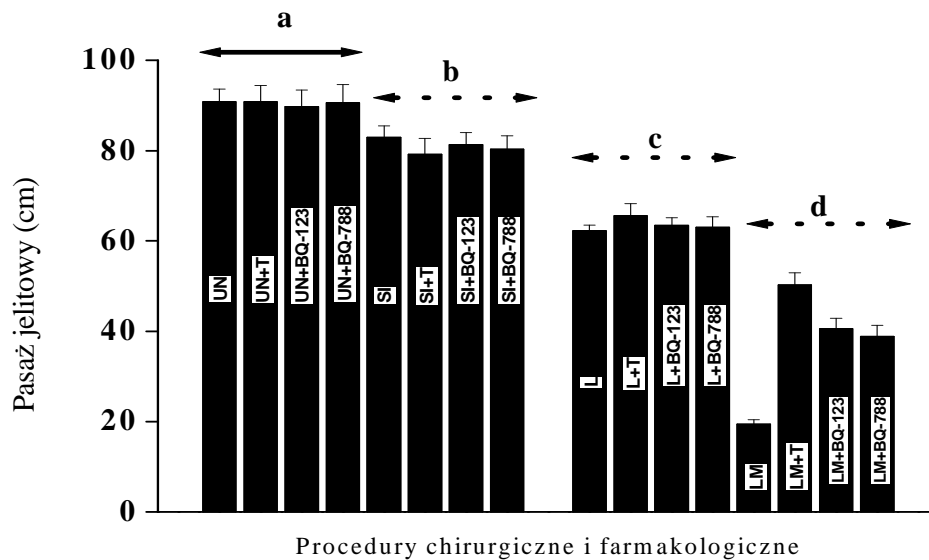
Wykres 2

Efekt działania tezosentanu (T – 10mg/kg, i.p.), BQ-123 lub BQ-788 (1 mg/kg, i.p.) na długość odcinka jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem Evansa w grupie zwierząt: kontrolnej (UN), poddanej nacięciu skóry (SI), poddanej laparotomii (L), oraz laparotomii z następującą manipulacją trzewi (LM). Doświadczenia zostały przeprowadzone 2h po zakończeniu procedur chirurgicznych. Wyniki w każdej grupie zwierząt (n=5-12) przedstawiono w centymetrach jako średnią \pm średni błąd standardowy (SEM). Wyniki zostały porównane z odpowiednimi grupami kontrolnymi a zależności statystyczne zostały obliczone metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroni zastosowanym po teście ANOVA. Po 2h: ^aUN, UN+(T lub BQ123 lub BQ788), SI, SI+(T lub BQ123 lub BQ788) vs. LAP, LAP+(T lub BQ123 lub BQ788) LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.001); ^bL, L+(T lub BQ123 lub BQ788) vs. LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.01).



Wykres 3

Efekt działania tezosentanu (T – 10mg/kg, i.p.), BQ-123 lub BQ-788 (1 mg/kg, i.p.) na długość odcinka jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem Evansa w grupie zwierząt kontrolnej (UN), poddanej nacięciu skóry (SI), poddanej laparotomii (L), oraz laparotomii z następową manipulacją trzewi (LM). Doświadczenia zostały przeprowadzone 24h po zakończeniu procedur chirurgicznych. Wyniki w każdej grupie zwierząt (n=7-20) przedstawiono w centymetrach jako średnią \pm średni błąd standardowy (SEM). Wyniki zostały porównane z odpowiedni grupami kontrolnymi a zależności statystyczne zostały obliczone metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroniego zastosowanym po teście ANOVA. ^aUN, UN+(T lub BQ123 lub BQ788), vs. L, L+(T lub BQ123 lub BQ788) L+M, L+M+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.001); ^bSI, SI+(T lub BQ123 lub BQ788) vs L, L+ (T lub BQ123 lub BQ788), LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.05); ^cL, L+(T lub BQ123 lub BQ788) vs LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.05); ^dLM vs LM+(T lub BQ123 lub BQ788), p<0.001.



Model II

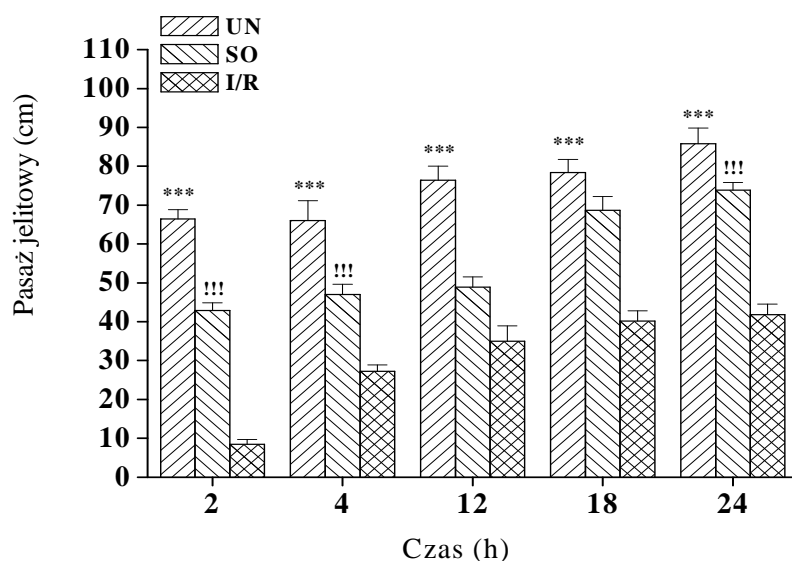
PNJ w przebiegu I/R:

W okresie od 2 do 24 h po wywołaniu niedokrwienia/reperfuzji, pasaż uległ znacznemu spowolnieniu (Wykres 4). Anagoniści receptorów endotelinowych: tezosentan, BQ-123 oraz BQ-788 nie wpłynęli na perystaltykę jelit w grupie UN, w grupie poddanej znieczuleniu eterem ani SO.

Tezosentan, BQ-123 oraz BQ-788 w sposób zależny od czasu oraz podanej dawki zapobiegał częściowo rozwojowi fazy wczesnej oraz późnej PNJ w grupie zwierząt poddanych I/R w przebiegu zabiegu chirurgicznego (Wykresy 5-9).

Wykres 4

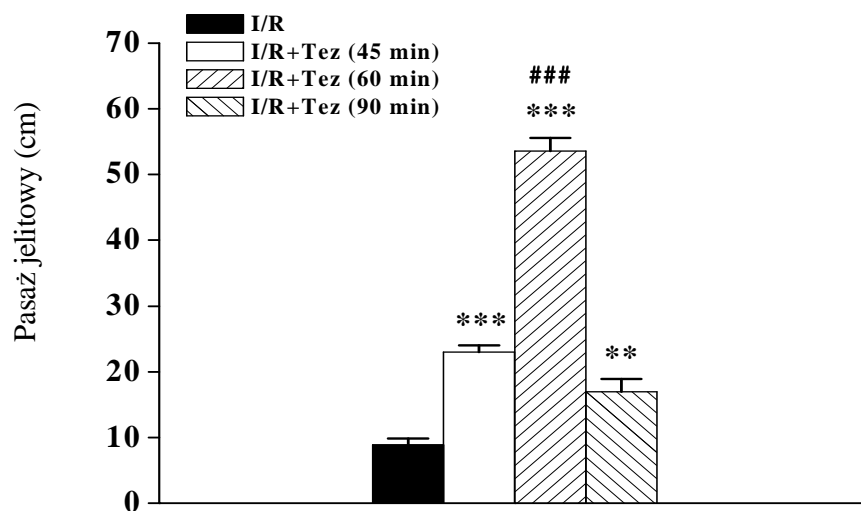
Wyniki wielkości pasażu jelitowego w grupie kontrolnej zwierząt (UN), oraz w grupach SO, i I/R (60min niedokrwienia z następującą 2-24h reperfuzją). Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-10). ***UN vs. SO or I/R (P<0.001); !!!SO vs. I/R (p<0.001).



Wykres 5

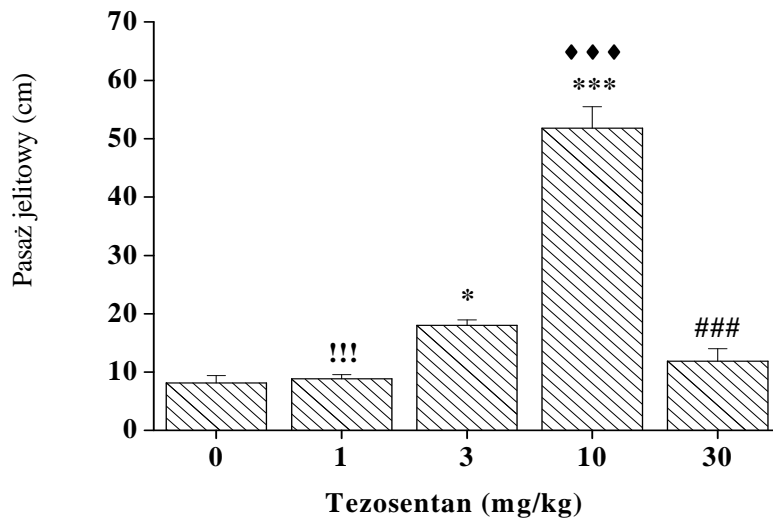
Krzywa zależności ochronnego działania tezosentanu od czasu u szczurów poddanych 1 h niedokrwieniu z następującą 2 h reperfuzyją (I/R).

Tezosentan (Tez) został podany w dawce 10 mg/kg, i.p., 45-90 min przed indukcją niedokrwienia. Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-9). *** I/R vs. I/R+Tez (podany 45 i 60 min przed I/R, $p < 0.001$); ** I/R vs. I/R+Tez (podany 90 min przed I/R, $p < 0.01$); ### I/R+Tez (60 min przed I/R) vs. I/R+Tez (podany 45 i 90 min przed I/R, $p < 0.001$).



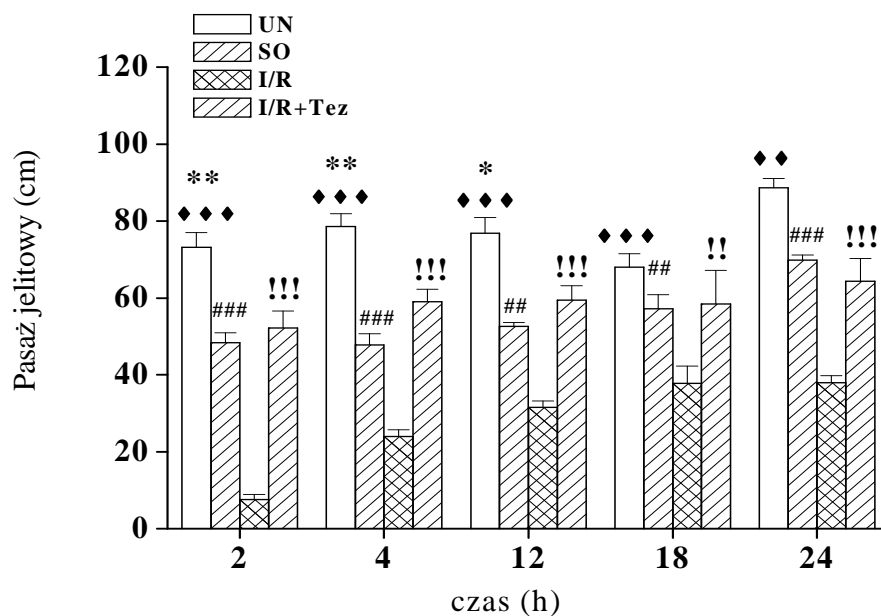
Wykres 6

Krzywa zależności dawka-efekt dotycząca dobroczynnego efektu tezosentanu (1-30mg/kg, i.p. podanego 1h przed I/R) na szybkość pasażu jelitowego u zwierząt poddanych 1 h niedokrwieniu z następową 2 h reperfuzyją (I/R). Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-12). * I/R vs. I/R+Tez (3 mg/kg, $p<0.05$); *** I/R vs. I/R+Tez (10 mg/kg, $p<0.001$); !!!I/R+Tez (1 mg/kg) vs. I/R+Tez (10 mg/kg, $p<0.001$); ♦♦♦I/R+Tez (3 mg/kg) vs. I/R+Tez (10 mg/kg); ###I/R+Tez (10 mg/kg) vs. I/R+Tez (30 mg/kg, $p<0.001$).



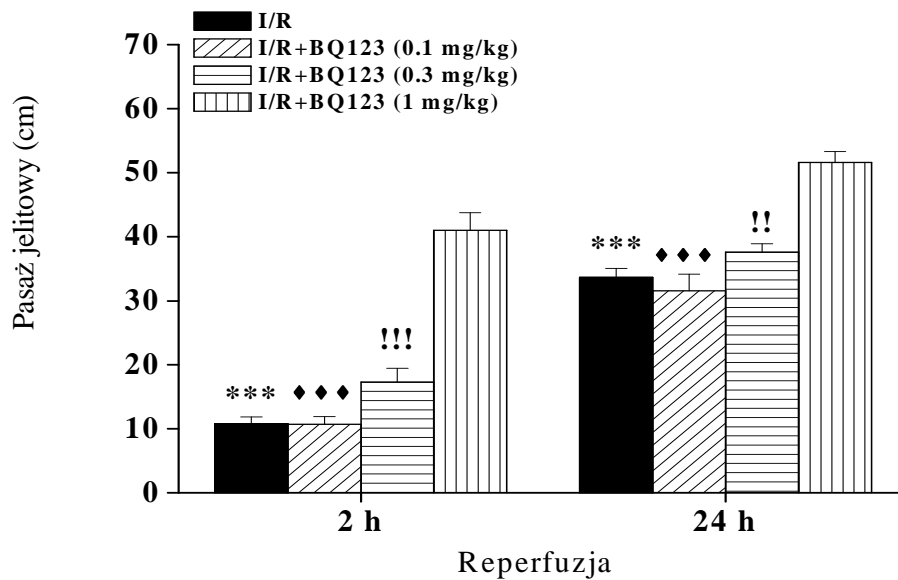
Wykres 7

Działanie tezosentanu (Tez) (10mg/kg, podanego 1 h przed I/R) na szybkość pasażu jelitowego u szczurów poddanych I/R (1 h niedokrwienie z następującą 2-24h reperfuzyją). Zwierzęta zostały podzielone w sposób zrandomizowany na cztery grupy: kontrolną (UN), poddaną pozorowanej operacji (SO) oraz poddaną I/R. Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-12). $\diamond\diamond$ UN-24 vs. SO-24 ($p<0.01$); $\diamond\diamond\diamond$ UN-2; -4; -12; -18; -24 vs. SO-2; -4; -12; I/R-2; -4; -12; -18; -24 ($p<0.001$); \ast UN-12 vs. I/R+Tez-12 ($p<0.05$); $\ast\ast$ UN-2, -4, -18 vs. I/R+Tez-2; -4 ($p<0.01$); $\#\#\text{SO-12; -18 vs. I/R-12; -18}$ ($p<0.01$); $\#\#\#\text{SO-2; -4; -24 vs. I/R-2; -4; -24}$ ($p<0.001$); I/R-18 vs. I/R+Tez-18 ($p<0.01$); $\text{!!!I/R-2; -4; -24 vs. I/R+Tez-2; I/R+Tez-4; I/R+Tez-24}$ ($p<0.001$).



Wykres 8

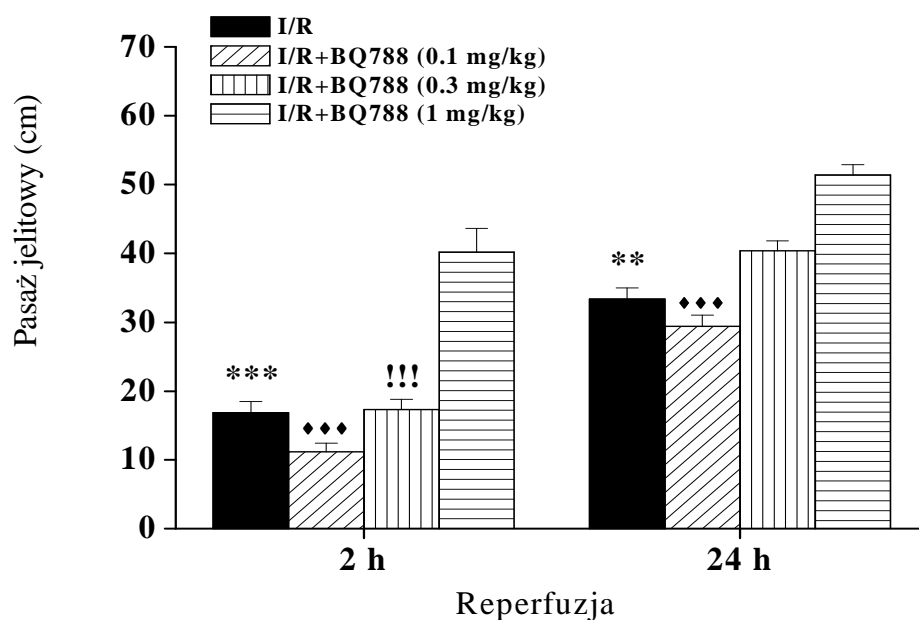
Działania BQ-123 (0.1-1 mg/kg i.p., podanego 1 h przed I/R). Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego błękitem Evansa u zwierząt poddanych 1 h niedokrwieniu z następową 2 bądź 24 h reperfuzją. Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia±średni błąd standardowy (SEM); n=6-12) . Przy 2 bądź 24 h reperfuzji: ***I/R vs. I/R+BQ-123 (1mg/kg, p<0.001); ♦♦♦I/R+BQ-123 (0.1 mg/kg) lub !!I/R+BQ-123 lub !!!I/R+BQ-123 (0.3 mg/kg) vs. I/R+BQ-123 (1 mg/kg, p<0.01 lub p<0.001 odpowiednio).



Wykres 9

Działanie BQ-788 (0.1-1 mg/kg i.p., podanego 1 h przed I/R) Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego błękitem Evansa u zwierząt poddanych 1 h niedokrwieniu z następową 2 bądź 24 h reperfuzją. Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-12).

Po 2 h reperfuzji: *** I/R vs. I/R+BQ-788 (1mg/kg, $p<0.001$); **** I/R+BQ-788 (0.1 mg/kg) lub !!! I/R+BQ-788 (0.3 mg/kg) vs. I/R+BQ-788 (1 mg/kg, $p<0.001$). Po 24 h reperfuzji: ** I/R vs. I/R+BQ-788 (1mg/kg, $p<0.01$); **** I/R+BQ-788 (0.1 mg/kg) vs. I/R+BQ-788 (1 mg/kg, $p<0.001$).



2. Badania *in vitro*

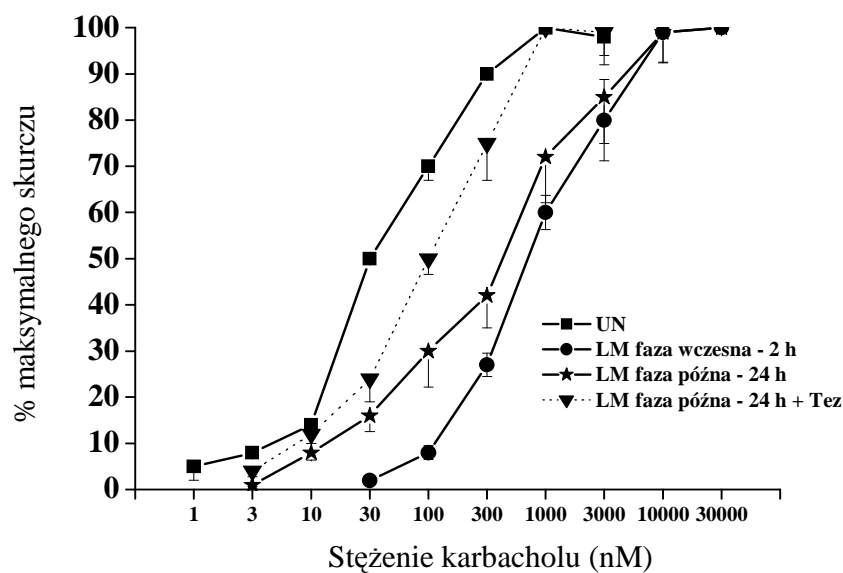
Krzywa zależności efektu skurczowego izolowanych odcinków jelita cienkiego od stężenia karbacholu [0.1nM – 3 μM].

Model I

Karbachol wywołał zależny od stężenia skurcz mięśni gładkich pod postacią typowych krzywych dawka-efekt w zakresie od 1-300 nM w grupie kontrolnej. EC₅₀ wynosiło 34.90±7.86 nM (n=8). L+M spowodowała znaczące zahamowanie motoryki przewodu pokarmowego powodując przesunięcie krzywej w prawo zwiększając EC₅₀ do wartości 776±31.26 nM i 299 ±14.92 nM odpowiednio po 2 i 24h od zabiegu chirurgicznego (p<0.01). Podanie tezosentanu przed chirurgiczną manipulacją trzewi spowodowało przesunięcie krzywej odpowiedzi na karbachol w lewo obniżając EC₅₀ do wartości 77.15±10.62 w fazie późnej PNJ (24h) (n=15, p<0.05; wykres 10).

Wykres 10

Nie kumulacyjne krzywe stężenie-skurcz dotyczące ekspozycji skrawków mięśni gładkich jelit na karbachol. Wyniki są przedstawione jako procent maksymalnego skurczu jako odpowiedzi na podanie karbacholu w wzrastających stężeniach. Dane przedstawione są jako średnie \pm SEM dla 11-15 różnych skrawków mięśni izolowanych w grupach zwierząt poddawanych zabiegom chirurgicznym o różnym stopniu inwazyjności .



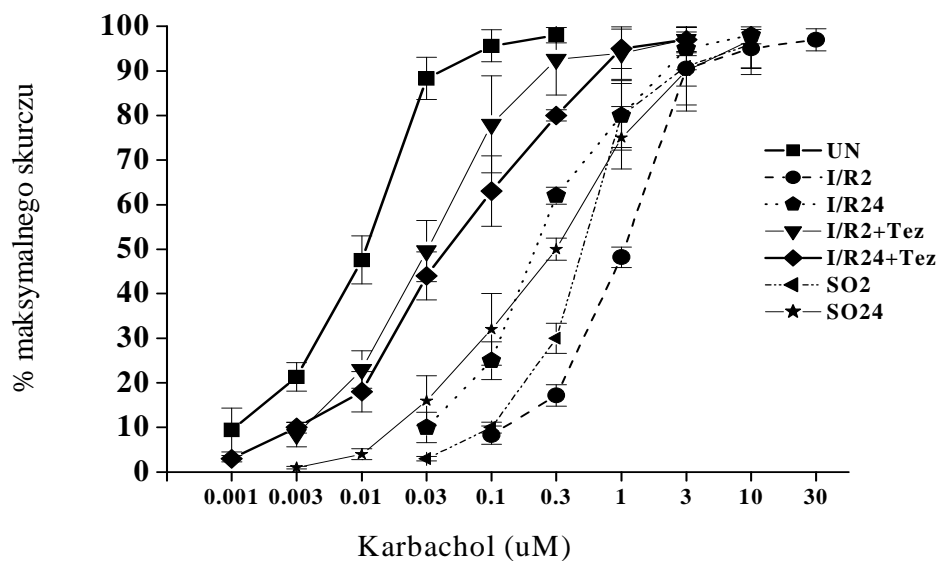
Model II

Karbachol wywołał zależne od stężenia skurcze mięśni gładkich pod postacią typowych krzywych dawka-efekt w zakresie od 1-300 nM w grupie kontrolnej. EC_{50} wynosiło 9.69 ± 1.23 nM ($n=11$). I/R spowodowało znaczące przesunięcie krzywej w prawo zwiększając EC_{50} do wartości 0.86 ± 0.03 μ M po 2 h ($n=12$) od reperfuzji oraz 0.27 ± 0.04 μ M po 24h ($n=15$). Oba rezultaty różniły się od uzyskanych w grupie kontrolnej zwierząt ($p < 0.001$). Podanie tezosentanu przed I/R spowodowało przesunięcie krzywej odpowiedzi na karbachol w lewo obniżając EC_{50} do 34.83 ± 4.20 nM po 2h reperfuzji ($n=12$) i do 49.44 ± 10.72 nM po 24 h reperfuzji ($n=10$) (Wykres 11).

Wykres 11

Nie kumulacyjne krzywe stężenie-skurcz dotyczące ekspozycji skrawków mięśni gładkich jelit na karbachol. Wyniki są przedstawione jako procent maksymalnej odpowiedzi izolowanych skrawków mięśni gładkich na podawany karbachol.

Dane przedstawione są jako średnie \pm SEM dla 11-15 różnych skrawków mięśni.



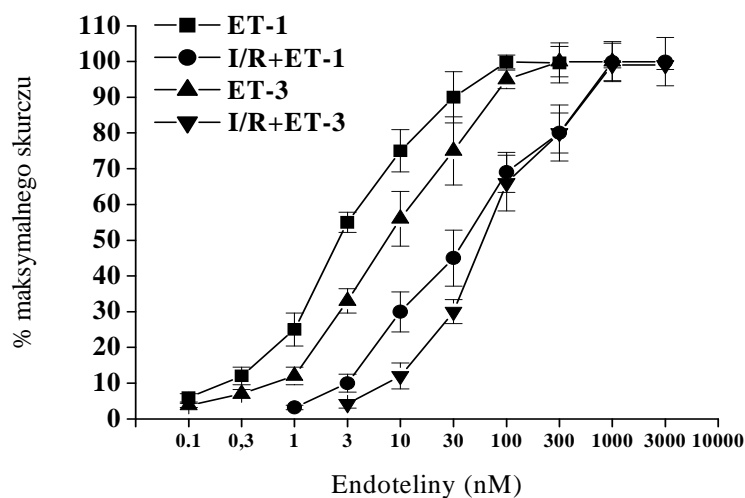
Działanie ET-1 oraz ET-3 na kurczliwość izolowanych fragmentów jelita cienkiego.

Wykazano osłabienie siły skurczu jelita przez ET-1 jak i ET-3 we fragmentach jelita wcześniej poddanych niedokrwieniu w porównaniu do jelita wypreparowanego z grupy zwierząt kontrolnych obserwując przy tym istotne zwiększenie EC_{50} . EC_{50} dla skrawków poddanych działaniu ET-1 wynosiło $2,74 \pm 0,21$, dla fragmentów jelita wcześniej poddanych niedokrwieniu z następową reperfuzją, a następnie poddanych działaniu ET-1 EC_{50} wynosiło $35,00 \pm 1,24$ nM; w grupie skrawków poddanych działaniu ET-3 EC_{50} wynosiło $6,46 \pm 0,35$ nM, natomiast w grupie poddanej niedokrwieniu/reperfuzji a następnie działaniu ET-3 EC_{50} wynosiło $36,55 \pm 4,56$ (Wykres 12).

Wykres 12

Niekumulacyjne krzywe stężenie-skurcz dotyczące ekspozycji skrawków mięśni gładkich jelit na działanie ET-1 oraz ET-3. Wyniki są przedstawione jako procent maksymalnej odpowiedzi izolowanych skrawków mięśni gładkich zwierząt kontrolnych oraz poddanych niedokrwieniu/reperfuzji na podawane izopeptydów endotelinowych.

Dane przedstawione są jako średnie \pm SEM dla 11-15 różnych skrawków mięśni.

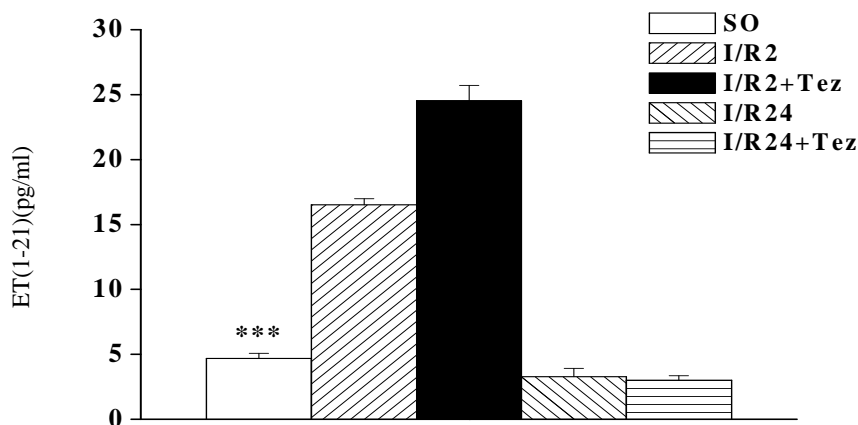


Stężenie ET(1-21) w surowicy

Stężenie ET(1-21) w surowicy 2 h po zakończeniu reperfuzji wzrosło w porównaniu do grupy zwierząt SO. Stężenie to wynosiło odpowiednio 16.51 ± 0.46 pg/ml w pierwszej grupie oraz 4.68 ± 0.40 pg/ml w drugiej grupie; ($p < 0.001$). Stężenie ET(1-21) było wyższe w grupie zwierząt, w której podano tezosentan: 25.53 ± 1.19 pg/ml w porównaniu do grupy której nie premedykowano tezosentanem. Stężenie ET(1-21) powracało do wartości kontrolnych w 24h po reperfuzji (wykres 13).

Wykres 13

Zmiany stężenia ET(1-21) w surowicy u zwierząt poddanych niedokrwieniu oraz premedykowanych tezosentanem. Niedokrwienie trwające 1 h z następującą 2-24 h reperfuzją. Zwierzęta premedykowane tezosentanem otrzymały go w dawce 10 mg/kg i.p., 1 h przed interwencją chirurgiczną. Dane pokazane są jako średnia \pm SEM ($n=5-7$). ***SO vs. I/R2 i I/R2+Tez, ♦♦♦I/R2+Tez vs. I/R2. Skróty: SO-grupa poddana pozorowanej operacji (sham operated), I/R 2 lub I/R 24- próbki krwi pobierane odpowiednio 2-24 h od reperfuzji, I/R 2+Tez lub I/R 24+Tez- próbki krwi pobierane odpowiednio 2-24 h od reperfuzji od zwierząt premedykowanych tezosentanem.



V. Dyskusja

W przeprowadzonych doświadczeniach potwierdzono udział receptorów ET_A oraz ET_B w patogenezie niedrożności jelit wywoływanej zjawiskiem niedokrwienia z następującą reperfuzyją trzewi (I/R) oraz manipulacji chirurgicznej trzewi (L+M).

I/R jest skomplikowanym problemem klinicznym ze względu na trudności diagnostyczne oraz ograniczone możliwości terapeutyczne [Yasuhara, 2005], zaś w przypadku interwencji chirurgicznej znaczącą rolę w rozwoju PNJ odgrywają bodźce nocycyptywne [Alican i wsp., 1998]. W zastosowanych modelach doświadczalnych wykorzystano okresowe zamknięcie przepływu w tętnicy krezkowej górnej z następującą reperfuzyją oraz bodźce nocycyptywne o różnym stopniu nasilenia: nacięcie skóry (SI), laparotomia (L) oraz laparotomia z następującą ewenteracją i manipulacją chirurgiczną trzewi (L+M).

Tezosentan, BQ-123 i BQ-788 nie wpływały na transport znacznika w jelitach w następujących grupach zwierząt doświadczalnych: UN, E, SI, SO lub L. Obserwacje te są zgodne z wcześniej opublikowanymi spostrzeżeniami dotyczącymi braku działania bosentanu, BQ-485, BMS182874, BQ-788 oraz IRL1620 na perystaltykę jelita cienkiego świńek morskich i mysz [Kuwahara i wsp., 2000, Matwyshyn i wsp., 2006]. Ponadto BQ-123; BQ-788 i tezosentan nie wpływały na napięcie spoczynkowe skrawków mięśni gładkich izolowanych z pęcherzyka żółciowego oposów i ludzi [Al.-Jiffry i wsp., 2002]. Zdania są podzielone, jak wykazują inni autorzy, BQ-485 i BQ-788 hamują tranzyt żołądkowo-jelitowy świńek morskich [Kuwahara i wsp., 2000].

Laparotomia, chirurgiczna manipulacja trzewi połączona lub nie połączona z wyłonieniem tętnicy krezkowej górnej prowadzi do znacznego osłabienia znacznika tranzytu jelitowego w porównaniu do zwierząt z grup UN, E czy SI. Efekt hamujący jest nasila I/R, przy czym można go obserwować w okresie 2–24 h reperfuzyji [Udassin i wsp., 1995; Hassoun i wsp., 2001]. Jest to zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi, wykazującymi, że okresowe niedokrwienie powodowało nasilone i długotrwałe zahamowanie perystaltyki przewodu pokarmowego [Udassin i wsp., 1995; Hassoun i wsp., 2001]. Jednak inni autorzy wykazali,

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

że bosentan lub PD156252 odwracały zahamowanie perystaltyki tylko w fazie późnej I/R, to znaczy w okresie 1-3 dni [Alican i wsp., 1998; Unluer i wsp., 2000]. Pozorne niezgodności pomiędzy pracami można prawdopodobnie złożyć na karb różnic metodologicznych.

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Kod pola został zmieniony

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Tezosentan, BQ-123 oraz BQ-788 odwracały zahamowanie pasażu zarówno w fazie wczesnej jak i późnej I/R, w sposób zależny od dawki i czasu podania związku; natomiast zaden z antagonistów receptorów endotelinowych nie okazał się skuteczny w zapobieganiu rozwojowi wczesnej fazy PNJ wywołanej chirurgiczną manipulacją trzewi (L+M). Tezosentan, BQ-123 i BQ-788 hamowały rozwój fazy późnej PNJ po L+M. Tezosentan był związkiem najbardziej skutecznym, jednak różnice siły działania tezosentanu, BQ-123 i BQ-788 nie osiągnęły istotności statystycznej.

W doświadczeniach wstępnych wykazano, że niedokrwienie osłabia kurczliwość skrawków mięśni gładkich jelit na działanie agonistów receptorów endotelinowych oraz karbacholu w doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro*. Zaburzenia zarówno fazy wczesnej oraz późnej w przebiegu I/R łagodziło zastosowanie tezosentanu. W przypadku PNJ spowodowanej L+M działanie tezosentanu widoczne było tylko w czasie fazy późnej, w doświadczeniach *in vitro*.

Nie można podjąć się próby pełnego wyjaśnienia molekularnych podstaw ochronnego mechanizmu działania antagonistów receptorów endotelinowych w przebiegu I/R lub po L+M w oparciu wyłącznie o wyniki powyższych badań. Jedną z hipotez, która może tłumaczyć dobroczynne działanie antagonistów receptorów endotelinowych w przebiegu I/R jest poprawa ukrwienia trzewi, odgrywająca kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej perystaltyki. Działanie takie wykazywały następujące substancje farmakologiczne: TAK-044, BQ-788 oraz BQ-485 [Sunose i wsp., 2001; Oktar i wsp., 2000]. W fazie późnej reperfuzji znaczącą rolę mogą odgrywać właściwości przeciwzapalne antagonistów receptorów ET, które zaobserwowano dla bosentanu, tezosentanu, BQ-123 i BQ-788 [Plusczyk i wsp., 2003; Anthoni i wsp., 2006]. W doświadczeniach obejmujących I/R podwyższone stężenie ET-1 obserwowano w okresie 1-3 h reperfuzji [Sunose i wsp.,

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

2001; Yamanaka i wsp., 1997]. Zjawisko to nasilone było w grupie zwierząt otrzymujących tezosentan. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być mechanizm działania tezosentanu, który blokuje wiązanie ET z receptorami bez wpływu na syntezę ET [Clozel i wsp., 1999; Löffler i wsp., 2003], zaś wzrost stężenia ET(1–21) jest prawdopodobnie spowodowany zahamowaniem wiązania się wydzielanych w sposób ciągły ET z receptorami. Podobne działanie udowodniono dla bosentanu oraz TAK-044 [Sunose i wsp., 2001; Yamanaka i wsp., 1997; Hramoto i wsp., 2007]. Innym, mniej prawdopodobnym wytłumaczeniem mógłby być hamujący efekt tezosentanu na receptory w płucach, które biorą udział w rozkładaniu peptydów z rodziny ET.

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Podobnie w przypadku PNJ po L+M znaczącą rolę zdaje się odgrywać uwalnianie ET towarzyszące L+M. Wykazano, że w czasie rozległych zabiegów chirurgicznych obejmujących znacznego stopnia manipulację trzewi takich jak gastrektomia, ezofagotomia lub hepatektomia w przeciwieństwie do ograniczonych interwencji np. nacięcia skóry dochodziło do znacznego wzrostu stężenia ET w surowicy [Shirakami i wsp., 1995; Goldmann i wsp., 2008]. Wzrost stężenia ET był proporcjonalny do czasu trwania zabiegu [Shirakami i wsp., 1995] co może przynajmniej częściowo wyjaśnić brak skuteczności terapeutycznej antagonistów receptorów ET we wczesnej fazie PNJ wywołanej L+M oraz brak wzrostu stężenia 2 h po L+M. W organizmie ET są substancjami o działaniu auto- lub parakrynnym, a w związku z tym stężenia peptydów mierzone w surowicy krwi obwodowej są znacznie niższe niż stężenie w miejscu działania [Masaki, 2004; Huang, 2005].

Rozważając zalety i wady zastosowanych modeli zwierzęcych niedrożności jelit spowodowanej interwencją chirurgiczną lub zjawiskiem I/R należy stwierdzić, że są one stosunkowo proste technicznie w wykonaniu a jednocześnie dość dobrze ilustrują zachodzące procesy fizjologiczne. Zahamowaniu tranzytu jelitowego towarzyszy osłabienie aktywności elektryczno-mechanicznej mięśni gładkich przewodu pokarmowego brak potencjału iglicowego oraz obecności wędrującego kompleksu mioelektrycznego [Rukebusch I wsp., 1995; Ruwart i wsp., 1980; Kelley i wsp., 1993]. Z drugiej strony czas

trwania pooperacyjnej niedrożności jelit w warunkach klinicznych zależy w głównej mierze od powrotu perystaltyki w obrębie okrężnicy [Person i wsp., 2006], podczas gdy w zastosowanych modelach transfer barwnika posiada dwie komponenty: propulsywne ruchy żołądka i jelita cienkiego. Wzajemne zależności tych dwóch składników są trudne do określenia. Powyższa praca wykazała, że profilaktyczne podanie antagonistów receptorów ET zapobiega rozwojowi niedrożności jelit w przebiegu I/R oraz L+M. Pomimo, że mechanizm działania ochronnego tych związków może być wieloczynnikowy blokada receptorów ET ma pierwszorzędne znaczenie w odpowiedzi organizmu.

VI. Wnioski

1. Endogenne endoteliny uwalniane podczas zabiegów chirurgicznych uczestniczą w powstawaniu zjawiska pooperacyjnej niedrożności jelit. W hamowaniu czynności skurczowej mięśni gładkich jelita biorą udział oba podtypy receptorów endotelinowych: ET_A i ET_B.
2. Zastosowanie antagonistów receptorów endotelinowych w sposób zależny od dawki częściowo pozwala odwrócić hamujący wpływ na perystaltykę późnej fazy przeprowadzonej manipulacji chirurgicznej oraz niedokrwienia trzewi, we wczesnej jak i późnej fazie reperfuzji.
3. Choć mechanizm protekcyjnego działania antagonistów receptorów endotelinowych nie jest w pełni wyjaśniony blokada receptorów endotelinowych może stać się potencjalnym sposobem zapobiegania powstawaniu niedrożności jelit po zabiegach chirurgicznych.

Piśmiennictwo

Alican I, Yegen C, Olcay A, Kurtel H, Yegen B. Ischemia-reperfusion- induced delay in intestinal transit. Role of endothelins. *Digestion* 1998; 59:343-348.

Al-Jiffry BO, Toouli J, Saccone GT. Endothelin-3 induces both human and opossum gallbladder contraction mediated mainly by endothelin-B receptor subtype in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 324-331.

Anthoni C, Mennigen RB, Rijcken EJ, Laukötter MG, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G, Krieglstein CF. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, reduces leucocyte adhesion and inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 409-418.

Arai H, Hori S, Aramor I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732.

Baig MK, Wexner SD. Postoperative ileus: a review. *Dis Colon Rectum* 2004; 47; 516.

Barquist E, Bonaz B, Martinez V, Rivier J, Zinner MJ, Tache Y. Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 2):R888-94.

Bauer, AJ, Boeckxstaens, GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16(Suppl 2):54–60

Behm B, Stollman N. Postoperative ileus: Etiologies and interventions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1:71-80.

Bernstein A, Wright AC, Spencer D. Phaeochromocytoma as a cause of gastrointestinal distension. *Postgrad Med J* 1967; 43(497):180-183.

Boeckxstaens GE, Hirsch DP, Kodde A, Moojen TM, Blackshaw A, Tytgat GN i wsp. Activation of an adrenergic and vagally-mediated NANC pathway in surgery induced fundic relaxation in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:467-474.

Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K. Endothelin-1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114:103-114.

Bueno L, Ferre JP, Ruckebusch Y. Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Am J Dig Dis* 1978; 23: 690.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 24; 345(6273):346-347.

Cali RL, Meade PG, Swanson MS, Freeman C. Effect of morphine and incision length on bowel function after colectomy. *Dis Colon Rectum*. 1995;**43**:163–168.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000; 190; 3:255-266.

Chou CC, Gallavan RH. Blood flow and intestinal motility. *Fed Proc* 1982; 41:2090-2095.

Clevers GJ, Smout AJ, van der Schee EJ, Akkermans LM. Myo-electrical and motor activity of the stomach in the first days after abdominal surgery: evaluation by the electrogastrography and impedance gastrography. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6:253-259.

Clozel M, Ramuz H, Clozel JP, Breu V, Hess P, Löffler BM, Coassolo P, Roux S. Pharmacology of tezosentan, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 840-846.

Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia –reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94(6):1133-1138.

De Jonge WJ, van den Wijngaard RM, Beek ML, Bennink RJ, Tytgat GN. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* 2003; 125:1137-1147.

De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of adrenergic and nitrenergic blockade on experimental ileus in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 120:464-468.

Douglas DM, Mann FC. The effect of peritoneal irritation on the activity of the intestine. *BMJ* 1941; 1:227-231.

Dubois A, Henry DP, Kopin IJ. Plasma catecholamines and postoperative gastric emptying and small intestinal propulsion in the rat. *Gastroenterology* 1975; 68:466-469.

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Kod pola został zmieniony

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Kod pola został zmieniony

Kod pola został zmieniony

Kod pola został zmieniony

Ehrenreich H. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages. *J Exp Med* 1990; 172:1741-1748.

Espat NJ, Cheng G, Kelley MC, Vogel SB, Sninsky CA, Hocking MP. Vasoactive intestinal peptide and substance P receptor antagonists improve postoperative ileus. *J Surg Res* 1995; 58:719-723.

Giaid A, Gibson SJ, Ibrahim BN, Legon S, Bloom SR, Yanagisawa M, Masaki T, Vardell IM, Polak J.M. Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7634-7638.

Goldmann A, Hoehne C, Fritz GA, Unger J, Ahlers O, Nachtigall I, Boemke W. Combined vs. Isoflurane/Fentanyl anaesthesia for major abdominal surgery: Effects on hormones and hemodynamics. *Med Sci Monit.* 2008; 14: CR445-452

Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury. Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986; 548: 47-63.

Greenwood-Van Meerveld B, Gardner CJ, Little PJ, Hicks GA, Dehaven-Hudkins DL. Preclinical studies of opioids and opioid antagonists on gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16(Suppl 2):46-53.

Harms BA; Heise, CP. Pharmacologic Management of Postoperative Ileus; The Next Chapter in Surgery. *Ann Surg.* 2007;245:364–365.

Hassoun HT, Weisbrodt NW, Mercer DW, Kozar RA, Moody FG, Moore FA. Inducible nitric oxide synthase mediates gut ischemia/reperfusion-induced ileus only after severe insults. *J Surg Res* 2001; 97: 150-154.

Hiramoto Y, Shioyama W, Kuroda T, Masaki M, Sugiyama S, Okamoto K, Hirota H, Fujio Y, Hori M, Yamauchi-Takahara K. Effect of bosentan on plasma endothelin-1 concentration in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 2007; 71: 367-369.

Holte K, Kehlet H. Prevention of postoperative ileus. *Minerva Anesthesiol.* 2002; 68-152.

Holzer P. Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans. *Neurosci Lett* 2004; 6;361(1-3):192-195.

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Kod pola został zmieniony

Sformatowano: Kolor czcionki: Automatyczny

Huang SC. Endothelin receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Curr Protein Pept Sci* 2005; 6: 547-557.

Huribal M, McMillan MA: Role of endothelin in ischemia-reperfusion injury. *Ann NY acad Sci* 1994; 82:2226-2230.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989; 86:2863-2867.

Jørgensen H, Wetterslev J, Møiniche S, Dahl JB. Local anaesthetics versus opioid-based analgesic regimens for postoperative gastrointestinal paralysis, PONV and pain after abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;4:CD001893

Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998; 63:683-691.

Kalff JC, Turler A, Schwarz NT, Schraut WH, Lee KK, Tweardy DJ, et al.

Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy. *Ann Surg* 2003; 237:301-315.

Kasperek MS, Kreis ME, Jehle EC, Zittel TT. Postoperativer Ileus Teil (Experimentelle Therapieansätze). *Zentralbl Chir* 2003; 128-313.

Kelley MC, Hocking MP, Marchand SD, Sninsky CA. Ketorolac prevents postoperative small intestinal ileus in rats. *Am J Surg.* 1993; 165:107-111.

Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust NZ J Surg.* 1998; 68; 8:554-561

Kuwahara K, Kitsukawa Y, Suzuki Y, Saito Y. Effects of several endothelin receptor antagonists on gastrointestinal transit of guinea pigs. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 960-966.

Livingston EH, Passaro EP. Postoperative ileus. *Dig Dis Sci.* 1990; 35: 11-32.

Löffler BM, Breu V, Clozel M. Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist Ro 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett* 1993; 333: 108-110.

Luckey A, Livingston E, Tache Y. Mechanisms and treatment of postoperative ileus. *Arch Surg* 2003; 138-206.

- Marderstein EL**, Delaney CP. Management of postoperative ileus: focus on alvimopan. *Ther Clin Risk Manag.* 2008; 4(5):965-73.
- Masaki T**. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 219-224.
- Massberg S**, Boros M, Leiderer R, Baranyi L, Okada H, Messemer K. Endothelin (ET)-1 induced mucosal damage in the rat small intestine: role of ETA receptors. *Shock* 1998; 9:177-183.
- Matwyshyn GA**, Bhalla S, Gulati A. Endothelin ETA receptor blockade potentiates morphine analgesia but does not affect gastrointestinal transit in mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 543: 48-53.
- Mester MD**, Tompkins MD, Gelfand MD, Dinerello MD. Intestinal production of interleukin -1 [alpha] during endotoxemia in the mouse. *J Surg Res* 1993; 54:6:584-591.
- Michida T**, Kawano S, Masuda E. Endothelin -1 in the gastric mucosa in stress ulcers of critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1177-1181.
- Molmenti EP**, Ziambaras T, Perlmutter DH. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1993; 268;19:14116-14124.
- Oktar BK**, Gulpinar MA, Bozkurt MA, Ghandour S, Cetinel S, Moini H, Yegen BC, Bilsel S, Granger DN, Kurtel H. Endothelin receptor blockers reduce I/R-induced intestinal mucosal injury: role of blood flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002, 282:G647-G655.
- Person B**, Wexner SD. The management of Postoperative Ileus. *Curr Probl Surg* 2006; 43:12-65.
- Plusczyk T**, Witzel B, Menger MD, Schilling M. ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G145-153.
- Plourde V**, Wong HC, Walsh JH, Raybould HE, Tache Y. CGRP antagonists and capsaicin on celiac ganglia partly prevent postoperative gastric ileus. *Peptides* 1993;14:1225-1229.
- Resink TJ**, Hahn AW, Burden T, Powell J, Weber E, Buhler FR. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1990; 168:1303-1310.

- Rubanyi G**, Plokoff M.. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev* 1994; 46:325-415.
- Rukebusch M**, Fioramonti J. Electrical spiking activity and propulsion in small intestine in fed and fasted rats. *Gastroenterology* 1975; 68:1500-1508.
- Ruwart MJ**, Klepper MS, Rush BD. Adrenergic and cholinergic contributions to decreased gastric emptying, small intestinal transit, and colonic transit in the postoperative ileus rat. *J Surg Res* 1980; 29: 126-134.
- Sakurai T**, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kiura S, Goto K, Masaki TM. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:732-735.
- Schurizek BA**. The effects of general anaesthesia on antroduodenal motility, gastric pH and gastric emptying in man. *Dan Med Bull* 1991;38:347-65.
- Scott JB**, Dabnci JM. Relation of gut motility to blood flow in the ileum of the dog. *Circ Res* 1964;14:1234-1239.
- Shahbazian A**, Holzer P. Regulation of guinea pig intestinal peristalsis by endogenous endothelin acting at ETB receptors. *Gastroenterology* 2000; 119:80-88.
- Shrakami G**, Magaribuch T, Shingu K, Saito Y, O'higashi T, Nakao K, Mori K. Effects of anaesthesia and surgery on plasma endothelin levels. *Anesth Analg* 1995; 80: 449-453
- Smith J**, Kelly KA, Weinshilboum RM. Pathophysiology of postoperative ileus. *Arch Surg* 1977;112:203-209.
- Stallion A**, Kou TD, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002; 105(2): 145-152.
- Sunose Y**, Ohwada S, Takeyoshi I, Matsumoto K, Tsutsumi H, Tomizawa N, Kawate S, Morishita Y. Effects of endothelin receptor antagonist TAK-044 on small bowel autograft from a controlled non-heart-beating donor model. *Surgery* 2001; 130: 819-825.
- Suzuki T**, Kumazaki T, Mitui, Y. Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1993; 191: 823-830.
- Takahashi K**, Jones PM, Kanse SM, Lam HC, Spokes RA, Ghatei MA, Bloom SR. Endothelin in gastrointestinal tract. Presence of endothelin-like immunoreactivity,

endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology* 1990; 99:1660-1667.

Turler A, Moore BA, Pezzone MA, Overhaus M, Kalff JC, Bauer AJ. Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann Surg* 2002;236:56-66.

Uemura K, Tatewaki M, Harris MB, Ueno T, Mantyh CR, Pappas TN, Takahashi T. Magnitude of abdominal incision affects the duration of postoperative ileus in rats. *Surg Endosc.* 2004;18:606–610

Udassin R, Eimerl D, Schiffman J, Haskel Y. Posts ischemic intestinal motility in rat is inversely correlated to length of ischemia. An in vivo animal model. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1035-1038.

Unluer EE, Alican I, Yegen C, Yegen BC. The delays in intestinal motility and neutrophil infiltration following burn injury in rats involve endogenous endothelins. *Burns* 2000; 26: 335-340.

Van Der Zanden EP, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21(1):6-17.

Weitzberg E, Rudehill A, Modin A, Lundberg JM. Porcine intrinsic pulmonary and systemic vascular tone is endothelin-dependent. Acta Physiol Scand 1994 Dec;152(4):433-4

Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J of Pharmacol* 2000; 407:1-15.

Wiklund NP, Wiklund CU, Cederqvist B, Ohlen A, Hedqvist P, Gustafsson LE. Endothelin modulation of neuroeffector transmission in smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7: 335-339.

Wood JG, Yan ZY, Zhang QA, Cheung LY. Ischemia-reperfusion increases gastric motility and endothelin-1-induced vasoconstriction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1995; 269:G524-G531.

Yamanaka N, Takaya Y, Oriyama T, Furukawa K, Tanaka T, Tanaka W, Ichikawa N, Yasui C, Ando T, Yamanaka J, Kuroda N, Ko M, Takada M, Imakita M, Kitayama Y, Okamoto E, Sasaki S, Nakagaki I, Hori S, Ito T. Hepatoprotective effect of a nonselective

endothelin receptor antagonist (TAK-044) in the transplanted liver. *J Surg Res* 1997; 70:156-160.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.

Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 2005; 35: 185-195.

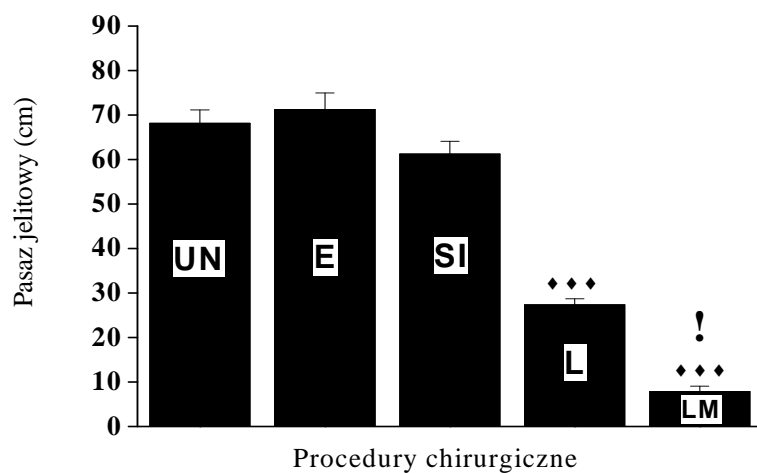
Zamir O, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Frederick JA, Fischer JE. Effect of sepsis or cytokine administration on release of gut peptides. *Am J Surg*. 1992; 163;1:181-185.

Zittel TT, Lloyd KC, Rothenhofer I, Wong H, Walsh JH, Raybould HE. Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery* 1998;123:518-527.

VII. Wykresy

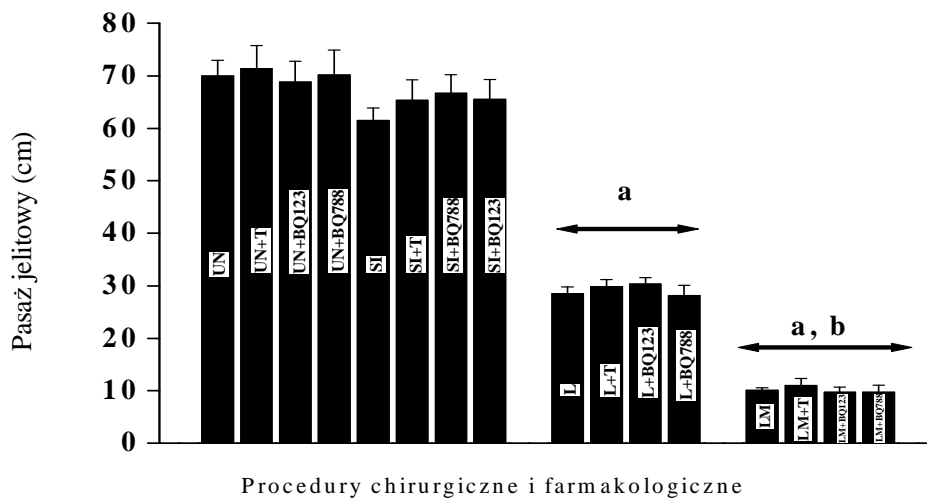
Wykres 1

Wyniki pomiaru długości jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem Evansa u zwierząt: w grupie kontrolnej (UN), poddanych znieczuleniu eterem dietylowym (E), nacięciu skóry (SI), laparotomii (L), oraz laparotomii z mechaniczną manipulacją trzewi (L+M). Wyniki w każdej grupie zwierząt (n=5-12) przedstawiono w centymetrach jako średnią \pm średni błąd standardowy (SEM). $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ UN, E lub SI vs. L lub LM ($p < 0.001$); 1 L vs. LM ($p < 0.05$).



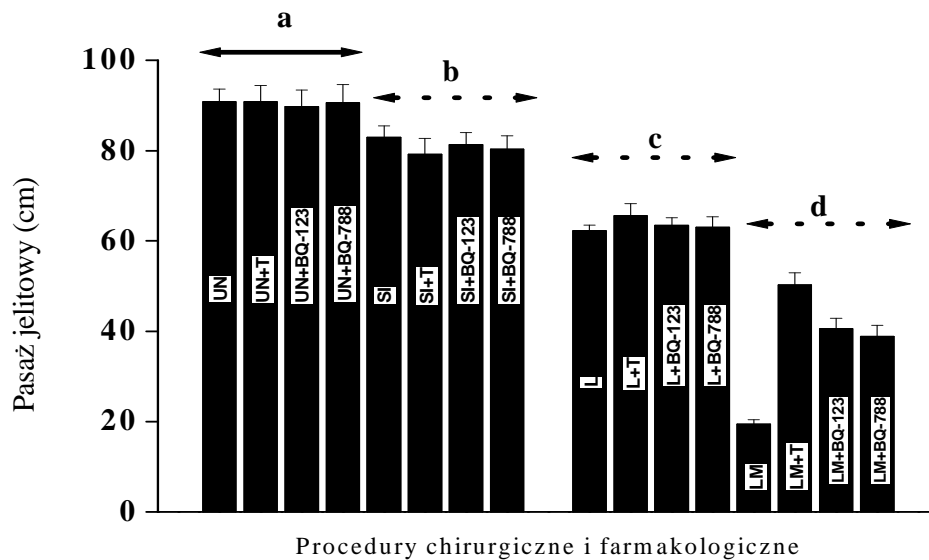
Wykres 2

Działanie tezosentanu (T – 10mg/kg, i.p.), BQ-123 lub BQ-788 (1 mg/kg, i.p.) na długość odcinka jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem Evansa w grupie zwierząt: kontrolnej (UN), poddanej nacięciu skóry (SI), poddanej laparotomii (L), oraz laparotomii z następową manipulacją trzewi (LM). Doświadczenia zostały przeprowadzone 2h po zakończeniu procedur chirurgicznych. Wyniki w każdej grupie zwierząt (n=5-12) przedstawiono w centymetrach jako średnią \pm średni błąd standardowy (SEM). Wyniki zostały porównane z odpowiednimi grupami kontrolnymi a zależności statystyczne zostały obliczone metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroni zastosowanym po teście ANOVA. Po 2h: ^aUN, UN+(T lub BQ123 lub BQ788), SI, SI+(T lub BQ123 lub BQ788) vs. LAP, LAP+(, T lub BQ123 lub BQ788) LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.001); ^bL, L+(T lub BQ123 lub BQ788) vs. LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.01).



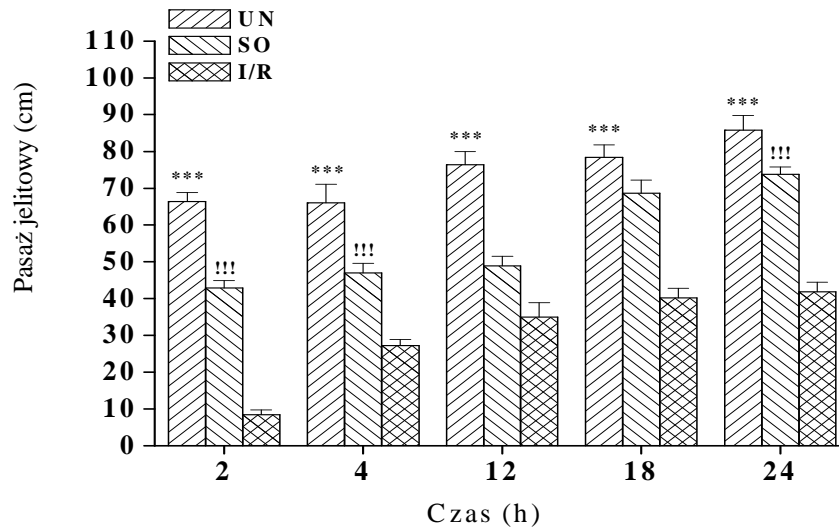
Wykres 3

Działanie tezosentanu (T – 10mg/kg, i.p.), BQ-123 lub BQ-788 (1 mg/kg, i.p.) na długość odcinka jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem Evansa w grupie zwierząt: kontrolnej (UN), poddanej nacięciu skóry (SI), poddanej laparotomii (L), oraz laparotomii z następową manipulacją trzewi (LM). Doświadczenia zostały przeprowadzone 24h po zakończeniu procedur chirurgicznych. Wyniki w każdej grupie zwierząt (n=7-20) przedstawiono w centymetrach jako średnią \pm średni błąd standardowy (SEM). Wyniki zostały porównane z odpowiedni grupami kontrolnymi a zależności statystyczne zostały obliczone metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz testem Bonferroniego zastosowanym po teście ANOVA. ^aUN, UN+(T lub BQ123 lub BQ788), vs. L, L+(T lub BQ123 lub BQ788) L+M, L+M+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.001); ^bSI, SI+(T lub BQ123 lub BQ788) vs L, L+ (T lub BQ123 lub BQ788), LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.05); ^cL, L+(T lub BQ123 lub BQ788) vs LM, LM+(T lub BQ123 lub BQ788) (p<0.05); ^dLM vs LM+(T lub BQ123 lub BQ788), p<0.001.



Wykres 4

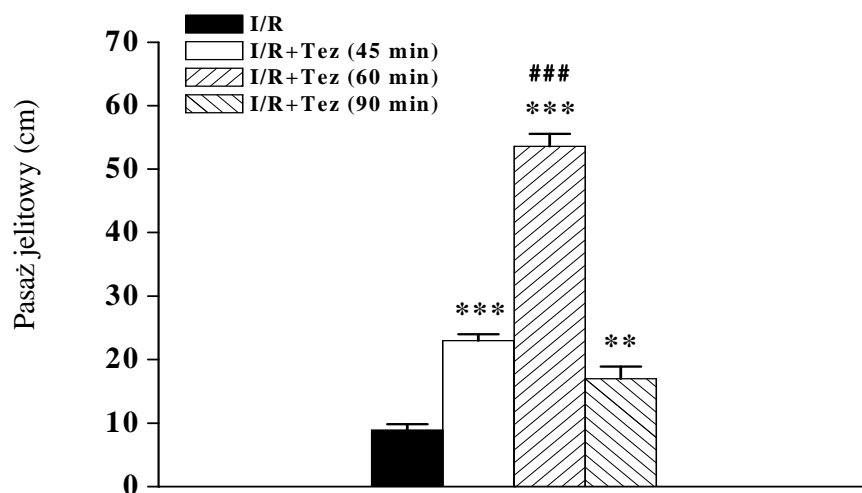
Wyniki wielkości pasaży jelitowej w grupie kontrolnej zwierząt (UN), oraz w grupach SO, i I/R (60min niedokrwienia z następującą 2-24h reperfuzyją. Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-10). ***UN vs. SO or I/R (P<0.001); !!!SO vs. I/R (p<0.001).



Wykres 5

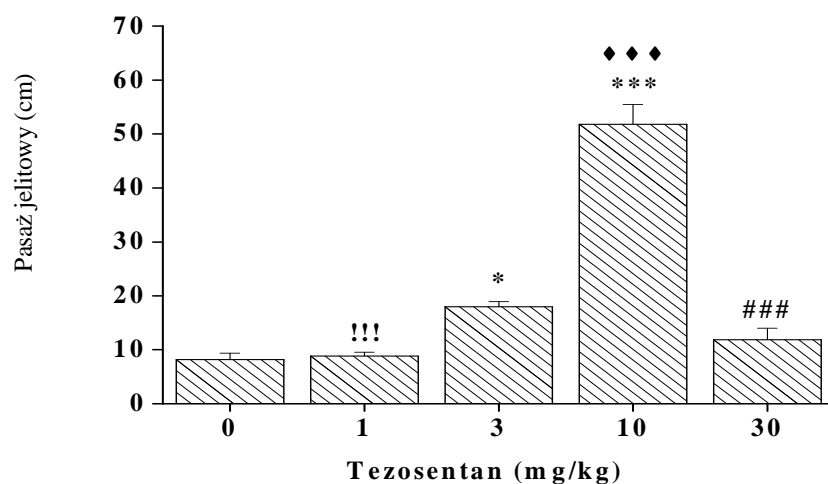
Krzywa zależności protekcyjnego działania tezosentanu od czasu u szczurów poddanych 1 h niedokrwieniu z następującą 2 h reperfuzyją (I/R).

Tezosentan (Tez) został podany w dawce 10 mg/kg, i.p., 45-90 min przed indukcją niedokrwienia. Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-9). *** I/R vs. I/R+Tez (podany 45 i 60 min przed I/R, $p<0.001$); ** I/R vs. I/R+Tez (podany 90 min przed I/R, $p<0.01$); ### I/R+Tez (60 min przed I/R) vs. I/R+Tez (podany 45 i 90 min przed I/R, $p<0.001$).



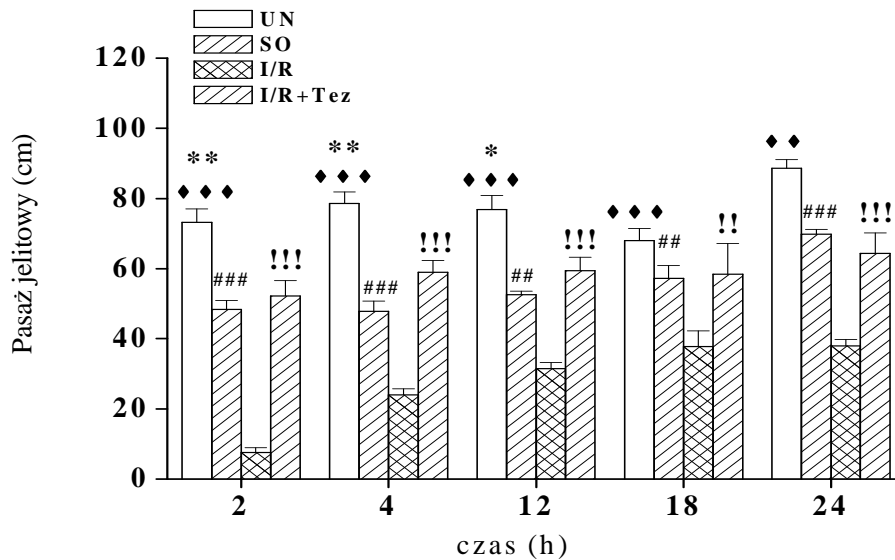
Wykres 6

Krzywa zależności dawka-efekt dotycząca dobroczynnego efektu tezosentanu (1-30 mg/kg, i.p. podanego 1 h przed I/R) na szybkość pasażu jelitowego u zwierząt poddanych 1 h niedokrwieniu z następującą 2 h reperfuzyją (I/R). Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-12). * I/R vs. I/R+Tez (3 mg/kg, $p < 0.05$); *** I/R vs. I/R+Tez (10 mg/kg, $p < 0.001$); !!! I/R+Tez (1 mg/kg) vs. I/R+Tez (10 mg/kg, $p < 0.001$); *** I/R+Tez (3 mg/kg) vs. I/R+Tez (10 mg/kg); ### I/R+Tez (10 mg/kg) vs. I/R+Tez (30 mg/kg, $p < 0.001$).



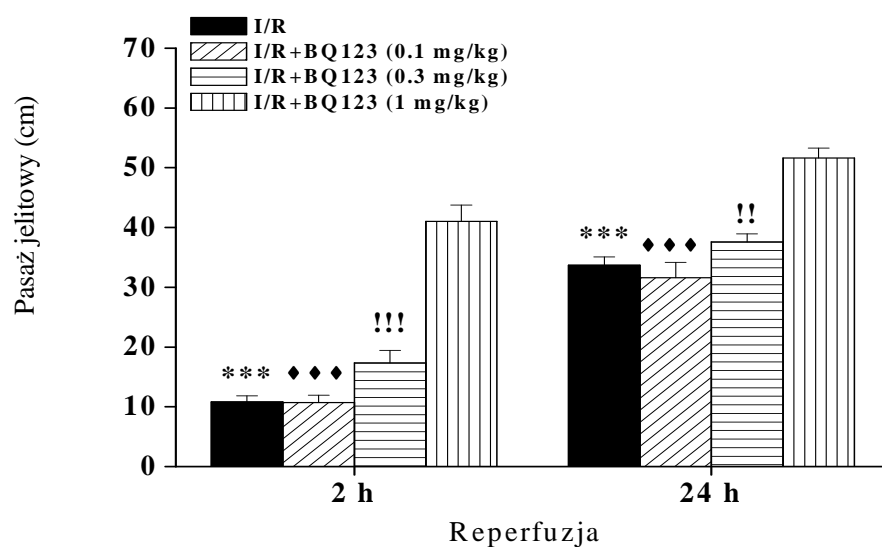
Wykres 7

Działanie tezosentanu (Tez) (10mg/kg, podanego 1 h przed I/R) na szybkość pasażu jelitowego u szczurów poddanych I/R (1 h niedokrwienie z następującą 2-24h reperfuzyją). Zwierzęta zostały podzielone w sposób zrandomizowany na cztery grupy: kontrolną (UN), poddaną pozorowanej operacji (SO) oraz poddaną I/R. Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-12). **UN-24 vs. SO-24 (p<0.01); ***UN-2; -4; -12; -18; -24 vs. SO-2; -4; -12; I/R-2; -4; -12; -18; -24 (p<0.001); *UN-12 vs. I/R+Tez-12 (p<0.05); **UN-2, -4, -18 vs. I/R+Tez-2; -4 (p<0.01); ##SO-12; -18 vs. I/R-12; -18 (p<0.01); ###SO-2; -4; -24 vs. I/R-2; -4; -24 (p<0.001); I/R-18 vs. I/R+Tez-18 (p<0.01); !!!I/R-2; -4; -24 vs. I/R+Tez-2; I/R+Tez-4; I/R+Tez-24 (p<0.001).



Wykres 8

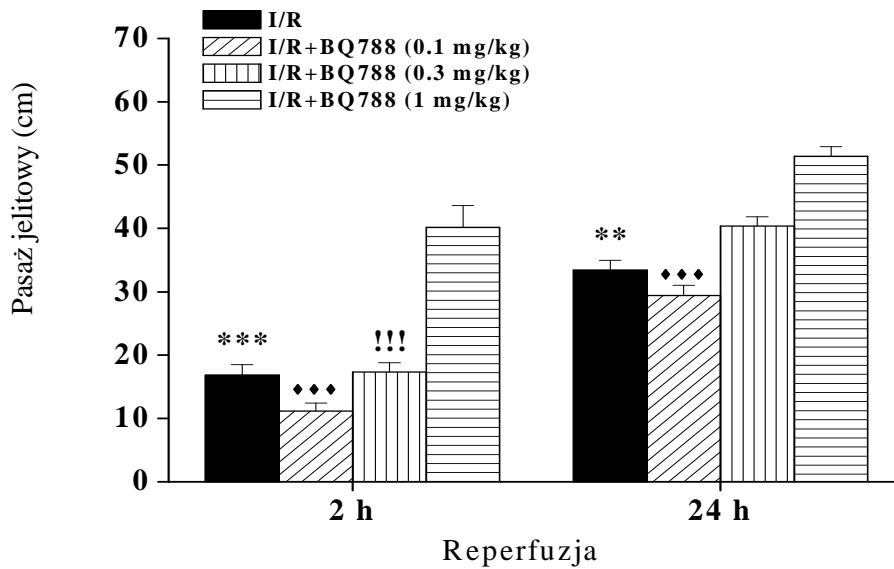
Działanie BQ-123 (0.1-1 mg/kg i.p., podanego 1 h przed I/R). Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego błękitem Evansa u zwierząt poddanych 1 h niedokrwieniu z następującą 2 bądź 24 h reperfuzją. Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia±średni błąd standardowy (SEM); n=6-12) . Przy 2 bądź 24 h reperfuzji: ***I/R vs. I/R+BQ-123 (1mg/kg, p<0.001); ♦♦♦I/R+BQ-123 (0.1 mg/kg) lub !!I/R+BQ-123 lub !!!I/R+BQ-123 (0.3 mg/kg) vs. I/R+BQ-123 (1 mg/kg, p<0.01 lub p<0.001 odpowiednio).



Wykres 9

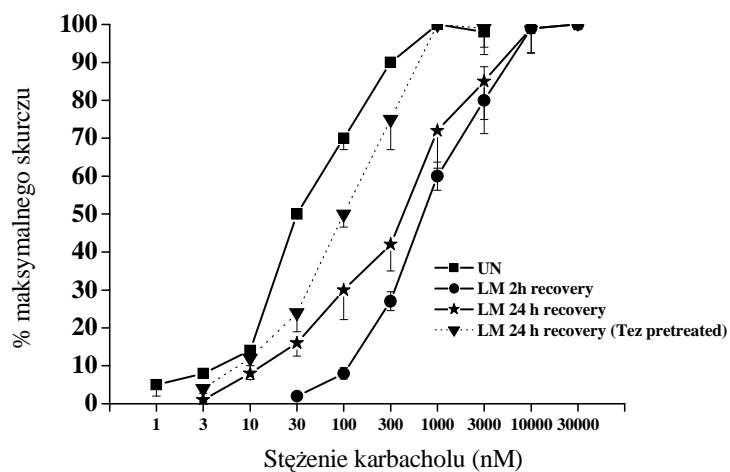
Działanie BQ-788 (0.1-1 mg/kg i.p., podanego 1 h przed I/R) Wyniki przedstawione są jako długość jelita cienkiego wypełnionego błękitem Evansa u zwierząt poddanych 1 h niedokrwieniu z następową 2 bądź 24 h reperfuzją. Wyniki prezentowane są jako długość jelita cienkiego wypełnionego barwnikiem w centymetrach (średnia \pm średni błąd standardowy (SEM); n=6-12).

Po 2 h reperfuzji: *** I/R vs. I/R+BQ-788 (1mg/kg, $p<0.001$); *** I/R+BQ-788 (0.1 mg/kg) lub !!! I/R+BQ-788 (0.3 mg/kg) vs. I/R+BQ-788 (1 mg/kg, $p<0.001$). Po 24 h reperfuzji: ** I/R vs. I/R+BQ-788 (1mg/kg, $p<0.01$); *** I/R+BQ-788 (0.1 mg/kg) vs. I/R+BQ-788 (1 mg/kg, $p<0.001$).



Wykres 10

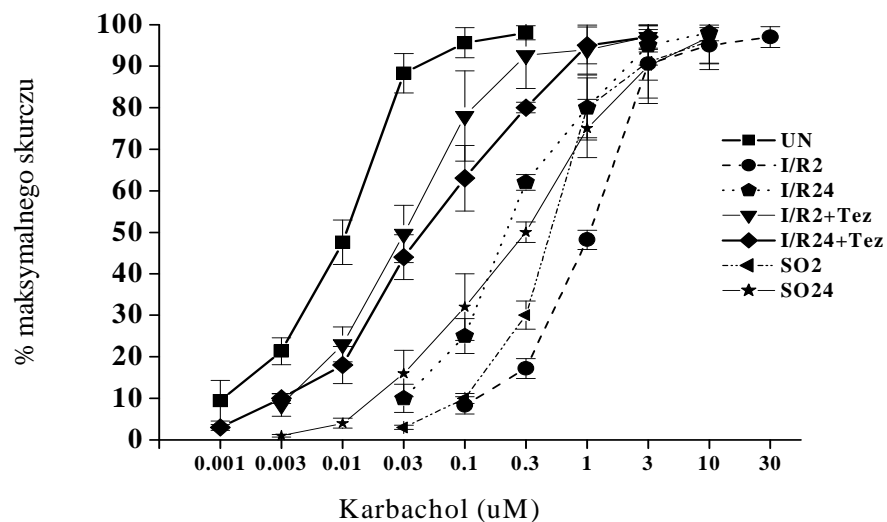
Nie kumulacyjne krzywe stężenie-skurcz dotyczące ekspozycji skrawków mięśni gładkich jelit na karbachol. Wyniki są przedstawione jako procent maksymalnego skurczu jako odpowiedzi na podanie karbacholu w wzrastających stężeniach. Dane przedstawione są jako średnie \pm SEM dla 11-15 różnych skrawków mięśni izolowanych w grupach zwierząt poddawanych zabiegom chirurgicznym o różnym stopniu inwazyjności .



Wykres 11

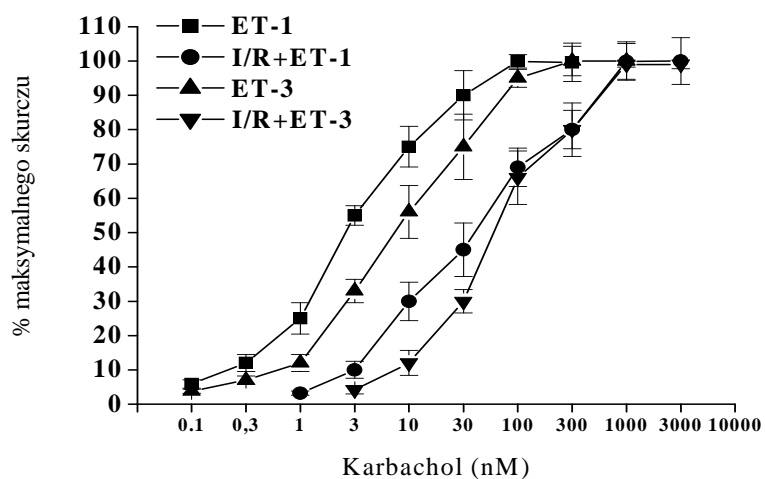
Nie kumulacyjne krzywe stężenie-skurcz dotyczące ekspozycji skrawków mięśni gładkich jelit na karbachol. Wyniki są przedstawione jako procent maksymalnej odpowiedzi izolowanych skrawków mięśni gładkich na podawany karbachol.

Dane przedstawione są jako średnie \pm SEM dla 11-15 różnych skrawków mięśni.



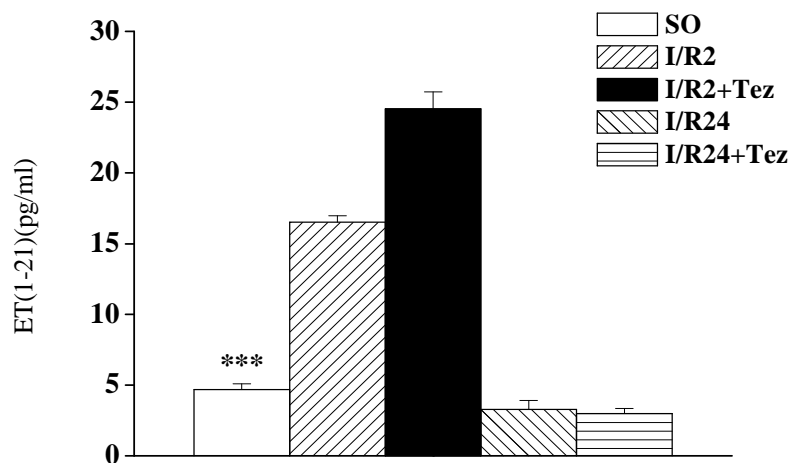
Wykres 12

Nie kumulacyjne krzywe stężenie-skurcz dotyczące ekspozycji skrawków mięśni gładkich jelit na działanie ET-1 oraz ET-3. Wyniki są przedstawione jako procent maksymalnej odpowiedzi izolowanych skrawków mięśni gładkich zwierząt kontrolnych oraz poddanych niedokrwieniu/reperfuzji na podawane izopeptydów endotelinowych. Dane przedstawione są jako średnie \pm SEM dla 11-15 różnych skrawków mięśni.



Wykres 13

Zmiany stężenia ET(1-21) w surowicy u zwierząt poddanych niedokrwieniu oraz premedykowanych tezosentanem. Niedokrwienie trwające 1 h z następującą 2-24 h reperfuzyją. Zwierzęta premedykowane tezosentanem otrzymały go w dawce 10 mg/kg i.p., 1 h przed interwencją chirurgiczną. Dane pokazane są jako średnia±SEM (n=5-7). ***SO vs. I/R2 i I/R2+Tez, **I/R2+Tez vs. I/R2. Skróty: SO-grupa poddana pozorowanej operacji (sham operated), I/R 2 lub I/R 24- próbki krwi pobierane odpowiednio 2-24 h od reperfuzyji, I/R 2+Tez lub I/R 24+Tez- próbki krwi pobierane odpowiednio 2-24 h od reperfuzyji od zwierząt premedykowanych tezosentanem.



IX. Streszczenie

Pooperacyjna niedrożność jelit jest to zahamowanie czynności motorycznej przewodu pokarmowego trwające do 3 dni. PNJ najczęściej występuje po zabiegach chirurgicznych dotyczących jamy brzusznej, a w szczególności przewodu pokarmowego. Zaburzenie prowadzi do wydłużenia okresu hospitalizacji chorych oraz zwiększa koszty leczenia. Z powodu niejasnej etiologii, dostępne metody lecznicze dotyczą jedynie postępowania objawowego, takiego jak odżywianie pozajelitowe czy wspomagająca rehabilitacja.

W kontroli prawidłowej pracy przewodu pokarmowego bierze udział autonomiczny układ nerwowy, a także wiele hormonów i transmiterów takich jak NO, VIP, substancja P czy endoteliny. Endoteliny są szeroko obecne w całym przewodzie pokarmowym, a wpływ ich na motorykę jelit zależy od gatunku zwierząt, segmentu jelita, rodzaju aktywowanego receptora oraz interakcji z innymi mediatorami. Receptory endotelinowe ET_A i ET_B są zaangażowane w patogenezę zaburzeń czynności ruchu motorycznego, jelit do której dochodzi w stanach przejściowego niedokrwienia, w ciężkich oparzeniach czy w ostrym zapaleniu trzustki. Przedmiotem pracy było wykazanie czy antagoniści receptorów ET_A i ET_B osłabiają rozwój PNJ wywołanej manipulacją chirurgiczną jelita bądź niedokrwieniem z następującą reperfuzyją.

W pracy badawczej zostały wykorzystane dwa modele doświadczalne. Badania wykonywano w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Dodatkowo oznaczano też poziom ET-1 w surowicy.

W modelu pierwszym badano czy antagoniści receptorów endotelinowych: BQ-123 (ET_A), BQ-788 (ET_B) oraz tezosentan (ET_A i ET_B) mogą osłabić zahamowanie perystaltyki wywołane manipulacją chirurgiczną jelit. Pasaż jelitowy był mierzony przez pomiar długości jelita wypełnionego substancją znacznikową, po nacięciu skóry (SI), laparotomii (L) oraz laparotomii z manipulacją trzewi (L+M). Zwierzęta znieczulano eterem dietylowym.

Zwierzęta losowo podzielono na dwie podgrupy w zależności od czasu, na który pozostawiono je po manipulacji chirurgicznej: 2 h (faza wczesna PNJ) lub 24 h (faza późna PNJ). Znieczulenie etrem dietylowym oraz nacięcie skóry (SI) nie wpłynęło na perystaltykę jelit. Natomiast, zarówno laparotomia (L) jak i laparotomia z manipulacją jelita (L+M) osłabiły pasaż jelitowy w porównaniu do grupy kontrolnej (UN). Tezosentan (10mg/kg), BQ-123 and BQ-788 (10mg/kg) zmniejszyły zahamowanie motoryki jelit w fazie późnej PNJ; nie miały jednak wpływu na rozwój PNJ w fazie wczesnej.

W drugim modelu doświadczalnym badano protekcyjny wpływ antagonistów receptorów endotelinowych: BQ-123 (ET_A), BQ-788 (ET_B); tezosentan (ET_A i ET_B) na PNJ wywołaną przejściowym niedokrwieniem jelita cienkiego. Niedokrwienie uzyskano poprzez założenie zacisku chirurgicznego na tętnicę krezkową górną na czas 1 h. Pasaż jelitowy, oznaczany analogicznie jak w modelu pierwszym, mierzony był w grupie kontrolnej (UN) oraz w grupach zwierząt poddanych nacięciu skóry (SI), niedokrwieniu z następującą reperfuzyją (I/R, reperfuzyja 2 bądź 24 h), oraz grupie poddanej pozorowanej operacji (SO). Znieczulenie eterem dietylowym ani nacięcie skóry nie wpłynęło na szybkość przesuwania się barwnika w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast, zarówno w grupie poddanej pozorowanej operacji jak i u zwierząt poddanych przemijającemu niedokrwieniu jelita obserwowano znaczące zahamowanie pasażu w porównaniu do grupy kontrolnej. Podanie tezosentanu (1-10 mg/kg), BQ123 oraz BQ788 (0.1-1 mg/kg) zadziało ochronnie na wywołane przejściowym niedokrwieniem zahamowanie perystaltyki jelit; w sposób zależny od dawki i czasu, zarówno w fazie wczesnej (2 h) jak i późnej (24 h)reperfuzyji. Poziom ET(1-21) w surowicy był zwiększony 2 h po reperfuzyji w porównaniu do grupy SO. Udział endotelin w kontrolowaniu kurczliwości mięśni przewodu pokarmowego potwierdziły też przeprowadzone badania *in vitro*.

W niniejszej pracy wykazano, iż oba typy receptorów endotelinowych biorą udział w patogenezie PNJ, a zastosowanie antagonistów tych receptorów częściowo pozwala odwrócić hamujący wpływ na perystaltykę niedokrwienia trzewi, zarówno we wczesnej jak i późnej fazie reperfuzyji, oraz fazy późnej przeprowadzonej manipulacji chirurgicznej.