

Katedra i Zakład Farmakologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

---



**Marcin Bitel**

**Wpływ blokerów receptorów adrenergicznych na pasaż jelitowy w pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów**

# **Rozprawa doktorska**

**Promotor: prof. dr hab. med. Ivan Kocić**

**Praca wykonana w ramach grantu: W-187**

**Gdańsk, 2015**

# Spis treści:

<b>1. WSTĘP</b>	<b>4</b>
1.1. WPROWADZENIE	4
1.2. PATOFIZJOLOGIA POOPERACYJNEJ NIEDROŻNOŚCI JELIT	7
1.3. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA BUDOWY I FUNKCJI UKŁADU WSPÓŁCZULNEGO ORAZ JEGO WPŁYWU NA FUNKCJĘ SKURCZOWĄ PRZEWODU POKARMOWEGO	13
<b>2. CEL PRACY</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b>	<b>22</b>
3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE	22
3.2. OPIS PROCEDUR CHIRURGICZNYCH	23
3.3. PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ	28
3.4. ZWIĄZKI UŻYWANE DO DOŚWIADCZEŃ	34
3.5. ANALIZA STATYSTYCZNA	35
<b>4. WYNIKI</b>	<b>36</b>
<b>5. DYSKUSJA</b>	<b>52</b>
<b>6. WNIOSKI</b>	<b>70</b>
<b>7. PIŚMIENNICTWO</b>	<b>72</b>
<b>8. SCHEMATY, TABELI I WYKRESY</b>	<b>82</b>
<b>9. STRESZCZENIA</b>	<b>95</b>
9.1. STRESZCZENIE	95
9.2. ABSTRACT	100

# 1. Wstęp

## 1.1. Wprowadzenie

Niedrożność jelit (ileus) to stan, w którym z różnych przyczyn dochodzi do upośledzenia, bądź całkowitego zaniku pasażu treści jelitowej do dalszych części przewodu pokarmowego.

Ze względu na przyczynę wyróżnia się niedrożność mechaniczną i czynnościową. W niedrożności mechanicznej dochodzi do upośledzenia pasażu jelitowego poprzez czynnik fizyczny, jak na przykład zwężenie światła jelita, uniemożliwiający przesuwanie treści pokarmowej, a w niedrożności czynnościowej do upośledzenia ruchów perystaltycznych ściany jelita.

Pooperacyjna niedrożność jelit (postoperative ileus) należy do grupy procesów o charakterze czynnościowym i występuje głównie po zabiegach chirurgicznych na jamie brzusznej, ale także czasem po dużych zabiegach poza nią. Charakteryzuje się złożoną patogenezą, a polega na zaniku ruchów perystaltycznych trwającym od 2 do 3 dni od zabiegu operacyjnego.

Objawami towarzyszącymi pooperacyjnej niedrożności jelit mogą być: zatrzymanie eliminacji gazów, wzdęcia, nudności i wymioty oraz ból brzucha. Typowo u ludzi zahamowanie czynności propulsywnej przewodu pokarmowego trwa najkrócej w żołądku oraz jelicie cienkim, a najdłużej, nawet do 72 godzin, w jelicie grubym. Do powrotu czynności perystaltycznej przewodu pokarmowego dochodzi zwykle samoistnie. Objawia się to ustąpieniem bólu, pojawieniem się jelitowych tonów

perystaltycznych oraz eliminacją gazów lub stolca. Niedrożność trwająca dłużej niż 72 godziny od operacji określana jest jako porażenna (Holte *et al.*, 2002 [Drugs]; Livingston *et al.*, 1990).

Pooperacyjna niedrożność jelit jest stanem, który przedłuża czas hospitalizacji a także zwiększa jej koszt, ponieważ wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia powikłań takich jak zachłystowe zapalenie płuc, a także inne zakażenia szpitalne (Behm *et al.*, 2003).

Ze względu na niedostateczne poznanie patomechanizmów powstania pooperacyjnej niedrożności jelit, leczenie tego stanu pozostaje w dużej mierze objawowe. Obejmuje ono odsysanie treści żołądkowej, wyrównywanie gospodarki elektrolitowej oraz żywienie pozajelitowe. Skrócenie czasu trwania pooperacyjnej niedrożności jelit można osiągnąć za pomocą zastosowania znieczulenia przewodowego, zmniejszenie inwazyjności zabiegu poprzez przeprowadzenie go metodą laparoskopową, a także zmniejszenie ilości zastosowanych opioidowych leków przeciwbólowych (Holte *et al.*, 2002 [Drugs]; Livingston *et al.*, 1990; Luckey *et al.*, 2003).

Dodatkowy postęp w leczeniu pooperacyjnej niedrożności jelit osiągnięto poprzez stosowanie złożonych schematów leczenia, a także zastosowanie alvimopanu, obwodowo działającego antagonisty receptorów opioidowych (Marderstein *et al.*, 2008). Lek przeszedł randomizowane badania kliniczne (Lee *et al.*, 2014) i został niedawno zarejestrowany w Stanach Zjednoczonych Ameryki do krótkotrwałego leczenia pooperacyjnej niedrożności jelit u pacjentów leczonych opioidowymi lekami przeciwbólowymi (Rodriguez, 2014). Wykazano także jego skuteczność w łagodzeniu

objawów pooperacyjnej niedrożności jelit u pacjentów po przebytych usunięciu pęcherza moczowego (Vora *et al.*, 2014).

Ważną rolę w patogenezie pooperacyjnej niedrożności jelit odgrywają odruchy współczulne. Pobudzenie układu współczulnego w stanach fizjologicznych, oraz w wyniku procedur chirurgicznych, wywołuje działanie hamujące na perystaltykę przewodu pokarmowego. Analiza piśmiennictwa pozwala na stwierdzenie, iż zastosowanie antagonistów receptorów adrenergicznych, a w szczególności antagonisty receptora alfa2 adrenergicznego może mieć istotny wpływ na przebieg pooperacyjnej niedrożności jelit (Fukuda *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2004). Szczegółowy opis roli układu współczulnego w regulacji funkcji perystaltycznej układu pokarmowego zamieszczono w rozdziale 1.3.

## 1.2. Patofizjologia pooperacyjnej niedrożności jelit

Pooperacyjna niedrożność jelit jest procesem wieloczynnikowym. Jako jej przyczyny opisywane są odruchy neurogenne, odpowiedź zapalna w ścianie przewodu pokarmowego, a także działanie substancji farmakologicznych stosowanych w czasie zabiegu operacyjnego (Bauer *et al.*, 2004).

Przebieg pooperacyjnej niedrożności jelit obejmuje dwie fazy: wczesną, trwającą do 3 godzin i późną, przedłużającą się nawet do 72 godzin. We wczesnej fazie pooperacyjnej niedrożności jelit główną rolę odgrywa pobudzenie mechanoreceptorów i nocycceptorów poprzez laparotomię oraz fizyczny masaż jelit podczas zabiegu operacyjnego. Wykazano, że długość nacięcia powłok brzusznych podczas wykonywania laparotomii u szczurów ma wpływ na stopień nasilenia pooperacyjnej niedrożności jelit (Uemura *et al.*, 2004). Stwierdzono, że również u człowieka czas trwania pooperacyjnej niedrożności jelit koreluje ze stopniem inwazyjności zabiegu, w tym długości nacięcia powłok. Przeprowadzenie operacji laparoskopowego usunięcia jelita grubego, w porównaniu do tradycyjnej laparotomii, pomimo dłuższego czasu trwania zabiegu laparoskopowego, wiązało się z krótszym czasem trwania pooperacyjnej niedrożności jelit zarówno w przypadku raka jelita grubego, jak i pilnej operacji powikłanej choroby uchyłkowej (Letarte *et al.*, 2014; Bedirili *et al.*, 2014). Pobudzenie włókien aferentnych, wywołane fizycznym stymulowaniem receptorów jelita, powoduje powstanie odruchów z układu współczulnego, skutkujących upośledzeniem motoryki przewodu pokarmowego i rozwinięciem fazy wczesnej pooperacyjnej niedrożności jelit. Wykazano także, iż zastosowanie w trakcie zabiegu na

jamie brzusznej guanetydyny (leku hamującego uwalnianie noradrenaliny z zakończeń nerwowych, działającego obwodowo, w dużych dawkach powodującego całkowitą sympatoplegię), johimbiny (antagonisty receptora alfa2 adrenergicznego), a także wcześniejszej sympatektomii, w sposób istotny przyspieszały pasaż jelitowy po 3 godzinach od operacji (Fukuda *et al.*, 2005).

W kilku badaniach opisywano także wpływ podania kapsaicyny (organicznego związku chemicznego odpowiedzialnego za ostry smak papryki, agonisty receptorów VR1 w zwojach czuciowych szczura, klasyfikowanego także jako neurotoksyna) w okolicie zwojów współczulnych, a także wpływ jej podania dootrzewnowo na ograniczenie stopnia zwolnienia pasażu jelitowego. Tego efektu nie obserwowano przy podaniu kapsaicyny w okolicie gałązek nerwu błędnego. Sugeruje to, iż wrażliwe na kapsaicynę aferentne włókna czuciowe zlokalizowane w śluzówce jelit, a także w otrzewnej trzewnej współtowarzyszące nerwom współczulnym jelit odgrywają rolę w rozwoju PI. Podobny efekt jak po podaniu kapsaicyny w okolicie zwojów współczulnych na ograniczenie zwolnienia pasażu obserwowano także po zastosowaniu blokerów peptydu związanego z genem kalcytoniny (calcitonin-gene-related-peptide, CGRP), który jest prawdopodobnie mediatorem we włóknach aferentnych biorących udział w przekazywaniu sygnału związanego z fizyczną stymulacją podczas operacji. (Plourde *et al.*, 1993; Zittel, Rothenhofer *et al.*, 1994; Zittel, Reddy *et al.*, 1994; Zittel *et al.*, 1998; Zittel *et al.*, 2001). Jednakże wpływ kapsaicyny podawanej w okolicie zwojów współczulnych nie powodował przywrócenia perystaltyki do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych (Holzer *et al.*, 1986). Innym mediatorem, który może mieć znaczenie w tym zjawisku jest wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide, VIP) (Boeckxstaens *et al.*, 2000).



Odruchy przewodzone przez układ adrenergiczny nie są jedynymi odruchami wpływającymi na perystaltykę po zabiegu. Okazało się, że blokada adrenergiczna nie powoduje przywrócenia perystaltyki do poziomu uzyskiwanego u zwierząt kontrolnych, u których nie przeprowadzano operacji. Przypuszcza się, że innym odruchem, który ma wpływ na pasaż jelitowy po zabiegu operacyjnym, jest odruch przewodzony przez włókna aferentne nerwów trzewnych, co powoduje niezwiązane z układem adrenergicznym, a przewodzone przez nerw błędny spowolnienie pasażu jelitowego. Wykazano, że zahamowanie przekąźnictwa związanego z tlenkiem azotu powoduje przyspieszenie pasażu w części nieobejmowanej przez blokadę adrenergiczną czy sympatektomię (Boeckxstaens *et al.*, 1999; De Winter *et al.*, 1997[Br J Pharmacol]).

Opisane powyżej odruchy neuronalne zachodzą szybko i są odpowiedzialne za fazę wczesną pooperacyjnej niedrożności jelit. Nie wpływają one jednak na fazę późną, która trwa nawet do 3 dni. Opisano, że mechaniczny masaż jelit powoduje rekrutację obecnych w ścianie jelita makrofagów, które uwalniają liczne substancje aktywne, w tym tlenek azotu i prostaglandyny (Kalff *et al.*, 2000). Dodatkowo uwalniane są liczne cytokiny prozapalne jak TNF- $\alpha$ , interleukina-1 $\beta$  i białko chemotaktyczne monocytów-1, które powodują zwiększenie ilości cząsteczek adhezyjnych na śródbłonku naczyń mięśniówki jelita. Ta lokalna odpowiedź inicjuje rozpoczęcie procesu zapalnego powodującego mobilizację komórek zapalnych z krwiobiegu i dalsze uwalnianie licznych czynników prozapalnych (Kalff *et al.*, 1999). Wpływ prostaglandyn i tlenku azotu był szeroko opisywany w piśmiennictwie i badany również w naszej jednostce (Korolkiewicz *et al.*, 2003, Korolkiewicz *et al.*, 2004).

Innym zagadnieniem jest interakcja pomiędzy odruchami adrenergicznymi a reakcją zapalną w świetle mięśniówki przewodu pokarmowego. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że masaż jelita nie tylko hamuje motorykę samego jelita w miejscu masażu, ale może także powodować trwające 24 godziny upośledzenie nieobjętego masażem żołądka zwierzęcia doświadczalnego (De Jonge *et al.*, 2003). Jednym z mechanizmów, który jest odpowiedzialny za to zjawisko, jest pobudzenie pierwotnego neuronu aferentnego przez stan zapalny w miejscu masażu. Powoduje to powstanie odruchu hamującego do innych części przewodu pokarmowego. Badania scyntygraficzne opróżniania żołądka u myszy wykazały rolę adrenergicznego odruchu hamującego wywołwanego przez nacieki komórkowe w masowanym wcześniej jelicie. Wykazano także, iż efekt ten jest hamowany przez zastosowanie heksametonium (leku blokującego zwoje nerwowe) lub guanetydyny (leku o działaniu sympatykolitycznym) (De Jonge *et al.*, 2003). Mediatorem odpowiedzialnym za pobudzenie włókien aferentnych mogą być między innymi prostaglandyny produkowane w wyniku aktywacji COX-2 w komórkach stanu zapalnego, aktywowanych w miejscu wcześniejszego masażu jelita. Wykazano w badaniach na myszach i szczurach, iż zastosowanie przed zabiegiem DFU (5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl-2(5H)-furanonu), środka blokującego selektywnie aktywność COX-2, lub przeprowadzenie zabiegu u myszy pozbawionych genu kodującego COX-2, powoduje zmniejszenie o około 50% ekspresji protoonkogenu c-fos będącego markerem aktywacji adrenergicznej w rdzeniu kręgowym (Kreiss *et al.*, 2003). Nie wykazano jednakże wpływu selektywnych inhibitorów COX-2 na motorykę jelit i opróżnianie żołądka u zdrowych ochotników (Bouras *et al.*, 2004).

Dodatkowym czynnikiem, powodującym zahamowanie opróżniania żołądka w odpowiedzi na masaż jelita jest prawdopodobnie aktywacja komórek tucznych. Wykazano, że po masażu jelit u myszy dochodzi do aktywacji komórek tucznych, co potwierdzało znacznie podwyższone stężenie proteazy-1 mastocytów w płynie obecnym w jamie otrzewnowej. Obserwowano także opóźnione o ponad 24 h opróżnianie żołądka. Efekty te były hamowane przez wcześniejsze podanie ketotifenu, środka stabilizującego komórki tuczne i zapobiegającego ich degranulacji (De Jonge *et al.*, 2003).

Innym czynnikiem wpływającym na przedłużenie czasu trwania pooperacyjnej niedrożności jelit jest stosowanie leków w trakcie i po zabiegu operacyjnym. Rutynowo, zarówno w trakcie zabiegu, jak i w celu leczenia bólu pooperacyjnego, stosuje się leki z grupy opioidów. Leki z tej grupy poza oczekiwanym działaniem przeciwbólowym mają też wpływ na pasaż jelitowy. Typowo u osób przyjmujących je przewlekłe pojawiają się zaparcia. Opioidy działają na jelito poprzez pobudzenie receptorów opioidowych typu mi ( $\mu$ ) i delta ( $\delta$ ) znajdujących się, poza ośrodkowym układem nerwowym, także w ścianie przewodu pokarmowego. Wykazano silne działanie hamujące egzogennych opioidów będących agonistami receptorów  $\mu$  i  $\delta$  na perystaltykę jelita, zarówno w badaniach na zwierzętach, jak i u ludzi (Bauer, Szurszewski *et al.*, 1991, Bauer, Sarr *et al.*, 1991). Także leki stosowane do indukcji i podtrzymywania znieczulenia ogólnego wpływają hamująco na perystaltykę przewodu pokarmowego. Efekt ten wykazano nawet u osób, które były poddawane znieczuleniu, ale nie wykonywano u nich zabiegów chirurgicznych (Livingston *et al.*, 1999). U zwierząt poddanych znieczuleniu halotanem obserwowano zniesienie lub znaczne zahamowanie fazy III wędrującego kompleksu mioelektrycznego (MMC). MMC

(migrating myoelectric complex) to okresowe pobudzenia powstające i propagowane w mięśniówce jelit w regularnych odstępach czasu (w czasie głodzenia zwykle co 5 – 10 minut), które zapoczątkowują powstanie fali perystaltycznej w przewodzie pokarmowym. Przy zastosowaniu enfluranu obserwowano zahamowanie fazy II MMC, jednakże nie wpływał on na fazę III. Podanie eteru dietylowego, środka, który nie jest już rutynowo stosowany do znieczulenia ogólnego, wiązało się z okresami wzmożonej aktywności MMC, a obserwowany efekt utrzymywał się po odzyskaniu świadomości (Wright *et al.*, 1982). Efekt eteru dietylowego na perystaltykę jelit ogranicza się jednak do około 1 godziny od zakończenia znieczulenia (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol], Bueno *et al.*, 1978).

### **1.3. Krótka charakterystyka budowy i funkcji układu współczulnego oraz jego wpływu na funkcję skurczową przewodu pokarmowego**

Autonomiczny układ nerwowy (AUN) składa się z dwóch głównych części: układu współczulnego, nazywanego od docelowych neuroprzekaźników układem adrenergicznym oraz układu przywspółczulnego. AUN pozostaje pod kontrolą ośrodkowego układu nerwowego, ale pozostaje w głównej mierze poza świadomą wolą jednostki. Jego rolą jest kontrola niezależnych od woli czynności fizjologicznych, do których należą regulacja czynności układów krwionośnego, pokarmowego, oddechowego, potliwości, akomodacji, szerokości źrenicy i innych. Większość narządów posiada podwójne unerwienie, zarówno z włókien układu współczulnego, jak i przywspółczulnego. Działanie tych dwóch układów na narządy i tkanki jest w dużej mierze, choć nie zawsze, przeciwstawne.

Układ współczulny składa się z ośrodków znajdujących się w odcinku piersiowym i lędźwiowym rdzenia kręgowego. Wychodzące z ośrodków rdzeniowych włókna nerwowe dochodzą do zwojów kręgowych, które u człowieka i innych kręgowców łączą się w dwa symetryczne pnie współczulne położone symetrycznie wzdłuż trzonów kręgowych, oraz do zwojów położonych dalej, jak przedkręgowe czy zwój trzewny. W zwojach znajdują się synapsy cholinergiczne, z których włókna nerwowe układu współczulnego zwane zazwojowymi, wydzielające z kolei noradrenalinę docierają do tkanek docelowych. Szczególnym organem jest rdzeń nadnerczy wywodzący się z

neuroektodermy i zawierający charakteryzujące się chromochłonnością komórki serii APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) i wydzielające adrenalinę, oraz w mniejszym stopniu noradrenalinę bezpośrednio do krwiobiegu. Rdzeń nadnerczy unerwiony jest przez przedzwojowe komórki układu współczulnego wydzielające acetylocholinę. Uwalniana przez rdzeń nadnerczy do krwiobiegu adrenalina działa obwodowo na zasadzie humoralnej na tkanki i organy pozbawione unerwienia współczulnego (Berntson *et al.*, 2006).

Układ współczulny ulega pobudzeniu w przypadku bodźców stresowych takich jak wysiłek fizyczny, zagrażające i realne zagrożenia, uraz, krwotok, ból, zabieg chirurgiczny, niedotlenienie, hipoglikemia, wzburzenie psychiczne i inne. Dochodzi w takim przypadku do wyrzutu amin katecholowych, głównie adrenaliny, z rdzenia nadnerczy.

Najważniejszymi efektami wywołanymi przez wyrzut adrenaliny, a także działanie obwodowych nerwów układu współczulnego w układzie krążenia są: zwiększenie akcji serca, siły skurczu mięśnia sercowego i pobudliwości mięśnia sercowego oraz działanie na obwodowe naczynia krwionośne obejmujące skurcz naczyń oporowych i trzewnych, skurcz żylnych naczyń objętościowych, a także rozkurcz naczyń krwionośnych mięśni poprzecznie prążkowanych. Należy pamiętać, iż obserwowany efekt netto na częstość akcji serca i ciśnienie tętnicze *in vivo* jest dodatkowo modyfikowany przez odruchy z baroreceptorów i działanie układu przywspółczulnego. Innymi obserwowanymi efektami są poszerzenie światła oskrzeli, spadek kurczliwości mięśniówki przewodu pokarmowego, skurcz zwieracza pęcherza moczowego, spadek kurczliwości ciężarnej macicy oraz rozszerzenie źrenicy. Metaboliczne efekty pobudzenia układu

współczulnego obejmują wzrost lipolizy w tkance tłuszczowej oraz wzrost glikogenolizy w wątrobie.

Już w 1948 roku Ahlquist zaproponował teorię receptorową podzielił receptory adrenergiczne w oparciu o efekt działania farmakologicznego leków na dwa podtypy: alfa i beta. Dalsze badania doprowadziły do wyróżnienia kolejnych podtypów tych receptorów (Widecka, 2007). Podział receptorów oparty na obserwacji efektów wywoływanych przez selektywnych agonistów i antagonistów poszczególnych ich podtypów potwierdzono ustalając ich lokalizację metodami radioznakowania i ostatecznie metodami inżynierii genetycznej.

Początkowo wśród receptorów beta wyróżniano dwa podtypy receptora. Receptor beta1, który wykazywał podobne powinowactwo do noradrenaliny i adrenaliny zlokalizowany jest w sercu, ośrodkowym układzie nerwowym i tkance tłuszczowej, natomiast receptor beta2, mający małe powinowactwo do noradrenaliny, odpowiada za rozkurcz mięśniówki gładkiej niektórych naczyń, oskrzeli i innych narządów trzewnych (Molinoff, 1984). Ten klasyczny podział został uzupełniony o odkrycie kolejnego podtypu receptora beta określanego symbolem beta3, odpowiedzialnego za efekty niewytłumaczalne działaniem na receptory beta1 i 2 (Emorine *et al.*, 1989). Jego obecność wykazano początkowo w tkance tłuszczowej, a następnie także w sercu, naczyniach, mózgu, jelicie, żołądku, pęcherzu moczowym, gruczole krokowym i innych (Dessy *et al.*, 2010, Coman *et al.*, 2009).

Klasyczny podział receptorów alfa obejmuje dwa ich główne podtypy. Receptor alfa1 jest zlokalizowany postsynaptycznie zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i poza nim, gdzie odpowiada za wiele obwodowych działań katecholamin, w tym skurcz

naczyń obwodowych. Natomiast receptor alfa 2 zlokalizowany jest presynaptycznie i reguluje wydzielanie noradrenaliny z zakończeń nerwowych i synaps adrenergicznych (Molinoff, 1984). Stwierdzono, iż receptory alfa1 mają dalsze podtypy określane symbolami alfa1A, 1B i 1D, różniące się powinowactwem do stosowanych antagonistów i agonistów oraz lokalizacją w tkankach (Graham *et al.*, 1996). Podobnie receptory alfa 2 posiadają kilka dalszych podtypów określanymi symbolami alfa2A, 2B i 2C. Z uwagi na trudności w uzyskaniu selektywnych antagonistów poszczególnych podtypów polimorfizm receptorów alfa 2 opisano stosunkowo niedawno w oparciu o badania na myszach „knock-out” pozbawionych genów dla poszczególnych podtypów receptora. Ich obecność potwierdzono w wielu tkankach, w tym w mózgu, płytkach krwi, adipocytach, makrofagach, a także w mięśniówce gładkiej. (Philipp *et al.*, 2002).

Szczególnością częścią autonomicznego układu nerwowego jest ta, kontrolująca funkcję przewodu pokarmowego. Jest ona nazywana jelitowym układem nerwowym (enteric nervous system, ENS) i przez niektórych autorów jest uważana za trzecią, poza współczulnym i przywspółczulnym część AUN (Wood, Alpers *et al.*, 1999, Katzung *et al.*, 2012). ENS składa się z neuronów położonych bezpośrednio w ścianie przewodu pokarmowego od przełyku, aż po końcową część odbytnicy, łączących się w tak zwane splety mięśniówkowe (splot Auerbacha) i splety podśluzówkowe (splot Meissnera). W jego skład wchodzi pierwotne włókna aferentne wrażliwe na stymulację mechaniczną i chemiczną, łączące je interneurony oraz neurony wykonawcze wpływające na wszystkie struktury przewodu pokarmowego, to jest: mięśniówkę gładką, komórki rozrusznikowe, naczynia krwionośne, gruczoły wydzielnicze, śluzówkę, komórki odpowiedzialne za odpowiedź immunologiczną oraz komórki spełniające funkcje endokrynne i parakrynne (Costa *et al.*, 2000). ENS pozostaje pod kontrolą ośrodków



wyższych, które pełnią jednak głównie funkcję modulacyjną. Jelitowe sploty nerwowe otrzymują impulsację z zazwojowych włókien układu współczulnego i przywspółczulnego. Ośrodki tych układów reagują w sposób odruchowy, w odpowiedzi na impulsację z włókien czuciowych przebiegających razem z włóknami autonomicznymi, a dodatkowo pozostają pod kontrolą wyższych ośrodków nerwowych OUN (Wood, Alpers *et al.*, 1999).

Perystaltyka przewodu pokarmowego jest regulowana głównie przez neurony położone w splocie mięśniówkowym (Auerbacha) otrzymujące bezpośrednią impulsację z czuciowych włókien śluzówkowych. Mięśniówka gładka przewodu pokarmowego składa się z dużych zbiorów komórek mięśni gładkich, połączonych elektrycznie za pośrednictwem połączeń szczelinowych, funkcjonujących jako większe jednostki elektromechaniczne. Potencjał błonowy mięśni gładkich jest modyfikowany przez sieć spontanicznie depolaryzujących się komórek rozrusznikowych (komórek śródmiąższowych Cajala). Potencjał czynnościowy wywołany przez komórki rozrusznikowe, a wraz z nim skurcze mięśniówki gładkiej, nie mogą być propagowane na większe odległości, powodując powstawanie fali perystaltycznej na niewielkich odcinkach przewodu pokarmowego, na przykład we wpuście czy dwunastnicy. Jednak to właśnie ta spontaniczna aktywność mięśniówki pozwala komórkom splotów nerwowych na kontrolowanie różnych form czynności skurczowej (Costa *et al.*, 2000).

Komórki motoryczne zlokalizowane w ENS obejmują neurony pobudzające i hamujące. Neurony pobudzające powodują nasilenie ruchów perystaltycznych i zwiększenie wydzielania w gruczołach jelitowych. Neuroprzekaźnikami powodującymi nasilenie skurczów mięśniówki gładkiej są acetylocholina, substancja P i neurokinina A (Maggi *et*

*al.*, 1997). Natomiast neurony hamujące zwoju Auerbacha powodują upośledzenie kurczliwości mięśniówki gładkiej. Wśród neuroprzekaźników uznawanych jako hamujące wymienia się trójfosforan adenozy (ATP), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), przysadkowy peptyd aktywujący cyklazę adenylnową (PACAP) i tlenek azotu (Burnstock, 2008; Jin *et al.*, 1996).

ENS funkcjonuje odmiennie, niż inne części autonomicznego układu nerwowego, przekazujące i realizujące sygnały pochodzące z ośrodkowego układu nerwowego. Zawiera on połączenia wewnętrzne umożliwiające integrację i przetwarzanie sygnałów, podobnie jak to ma miejsce w rdzeniu kręgowym czy mózgowiu, pozwalające mu na prawidłowe pełnienie swojej funkcji bez jakiegokolwiek zewnętrznej impulsacji nerwowej z innych części AUN. Dlatego czasem określa się ENS jako „jelitowy minimózg” (Wood, Alpers *et al.*, 1999). Oznacza to, iż także po całkowitym odnerwieniu ENS jest w stanie zapewnić prawidłową perystaltykę i wydzielanie w przewodzie pokarmowym.

Kontrola perystaltyki przez ośrodki AUN wydaje się pełnić jedynie funkcję modulacyjną. Od dawna zakładano, iż to nerw błędny jest główną drogą transmisji z OUN impulsacji kontrolującej perystaltykę przewodu pokarmowego, jednak szczegółowe mechanizmy neurofizjologiczne tego wpływu poznano stosunkowo niedawno. Uważano, iż włókna nerwu błędnego tworzą synapsy bezpośrednio z komórkami zwojów mięśniówkowych, które z kolei bezpośrednio zaopatrują komórki efektorowe. Zakładano przy tym, iż perystaltyka pozostaje pod bezpośrednią kontrolą OUN, co okazało się jednak nieprecyzyjne. Okazało się, iż zakończenia synaptyczne nerwu błędnego znajdują się na interneuronach ENS, a nie komórkach motoneuronalnych. Tłumaczy to, dlaczego

impulsacja ze stosunkowo nielicznych włókien nerwu błędnego wpływa na szerokie grupy komórek efektorowych, a także, w jaki sposób odnerwione jelito może zachować swoją prawidłową funkcję oraz szybko odpowiadać na zmiany z zakończeń czuciowych mechanoreceptorów zlokalizowanych w śluzówce (Wood, Alpers *et al.*, 1999).

Układ współczulny również wpływa na funkcję perystaltyczną przewodu pokarmowego. Zazwojowe włókna układu współczulnego tworzą synapsy z neuronami ENS a także unerwiają naczynia krwionośne, śluzówkę i wyspecjalizowane regiony mięśniówki. Wpływ układu współczulnego na układ pokarmowy jest obserwowany w trakcie wysiłku fizycznego, fizycznych czynników stresowych, jak i stresu psychologicznego. W odpowiedzi na pobudzenie z układu współczulnego dochodzi do przekierowania krwi z naczyń trzewnych do krążenia systemowego. Innym efektem jest zmniejszenie perystaltyki i wydzielania w przewodzie pokarmowym. Głównym neuromediatorem odpowiedzialnym za te efekty jest noradrenalina. Stwierdzono, iż oddziałuje ona między innymi bezpośrednio na zwieracze, powodując ich skurcz w trakcie zmniejszenia perystaltyki. To jednak jej działanie na neurony ENS jest odpowiedzialne za zmniejszenie perystaltyki i wydzielania w przewodzie pokarmowym (Wood, 1999).

Co więcej stwierdzono także, iż wpływ na czynność przewodu pokarmowego w czasie stresu nie jest jedyną rolą układu współczulnego w tym układzie. Zwoje przedrdzeniowe funkcjonują także jako drogi przekazujące sygnały pomiędzy odległymi częściami przewodu pokarmowego. Składają się one z włókien aferentnych przekazujących do zwojów przedrdzeniowych sygnały z receptorów w ścianie jelita oraz eferentnych włókien adrenergicznych przekazujących informację z powrotem do

ENS. Zaobserwowano, iż w dwóch fizycznie rozdzielonych częściach jelita grubego świnki morskiej połączonych tylko nerwem międzykręzkowym i zwojami kręgowymi górnym i dolnym rozszerzenie jednej z części powoduje zmniejszenie perystaltyki drugiego odcinka. Ten efekt nazywany jest hamującym odruchem jelitowo-jelitowym (Szurszewski *et al.*, 1983).

Stwierdzono, iż głównym działaniem noradrenaliny na komórki ENS jest tak zwane hamowanie presynaptyczne. Efekt ten polega na ograniczaniu transmisji pobudzającej w połączeniach nerwowo mięśniowych jelit poprzez wpływ na receptory alfa 2 adrenergiczne (Shen, Barajas-Lopez *et al.*, 1990; Shen, Surprenant, 1990). Noradrenalina w sposób presynaptyczny redukuje uwalnianie serotoniny i substancji P z izolowanych fragmentów jelita (Bartho *et al.*, 1983; Jonakait *et al.*, 1979). W wielu badaniach potwierdzono także wpływ hamujący pobudzenia presynaptycznych receptorów alfa2-adrenergicznych na wydzielanie acetylocholiny (Del Tacca *et al.*, 1970; Fuder *et al.*, 1995). W ten sposób noradrenalina zmniejszając wydzielanie acetylocholiny i innych neuroprzekaźników pobudzających perystaltykę wywołuje zahamowanie perystaltyki przewodu pokarmowego.

## 2. Cel pracy

W wielu pracach wykazano poza wszelką wątpliwość wpływ odruchów z układu adrenergicznego na przebieg pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów, ale nie udokumentowano dotąd szczegółowo roli poszczególnych podtypów receptorów adrenergicznych na przebieg tego schorzenia. Istnieją również liczne badania określające rolę niektórych antagonistów receptorów adrenergicznych na pasaż jelitowy po zabiegu operacyjnym, jednakże brak jest systematycznej oceny wszystkich antagonistów na jednym modelu biologicznym. Dodatkowo w piśmiennictwie brakuje oceny jednoczesnego stosowania antagonistów różnych typów receptorów adrenergicznych w pooperacyjnej niedrożności jelit.

Celem tej pracy było:

1. Usystematyzowanie wpływu antagonistów poszczególnych podtypów receptorów alfa i beta-adrenergicznych na pasaż jelitowy u szczurów poddanych standaryzowanym procedurom chirurgicznym w modelu *in vivo*.
2. Ocena stężeń leku potrzebnych do wywołania działania ochronnego na perystaltykę w pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.
3. Próba oceny mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowany efekt ochronny na perystaltykę.
4. Ocena ewentualnej możliwości zastosowania antagonistów receptorów adrenergicznych w leczeniu pooperacyjnej niedrożności jelit u ludzi.

## **3. Materiały i metody**

### **3.1. Zwierzęta doświadczalne**

Badania przeprowadzono na samcach szczurów rasy Albino Wistar o masie ciała od 160 do 280 g. Szczury po odebraniu od dostawcy były przetrzymywane w warunkach kontrolowanej temperatury, wilgotności i oświetlenia. Zwierzęta były żywione przy użyciu standardowej, komercyjnej paszy zwierzęcej. Na 24 godziny przed rozpoczęciem procedur chirurgicznych zwierzęta doświadczalne nie miały dostępu do paszy. Zapewniano im natomiast nieograniczony dostęp do wody pitnej.

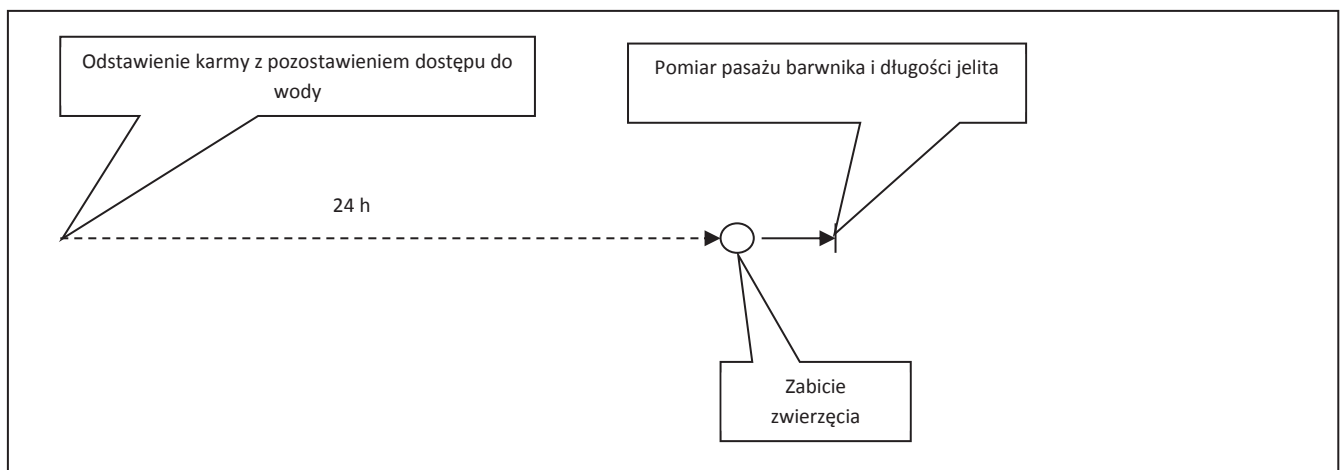
### 3.2. Opis procedur chirurgicznych

Wszystkie doświadczenia wykonane w celu realizacji niniejszej pracy zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Wszystkie doświadczenia wykonywane były w znieczuleniu eterem dietylowym. W trakcie zabiegów operacyjnych używano jałowych narzędzi i postępowano zgodnie z zasadami aseptyki.

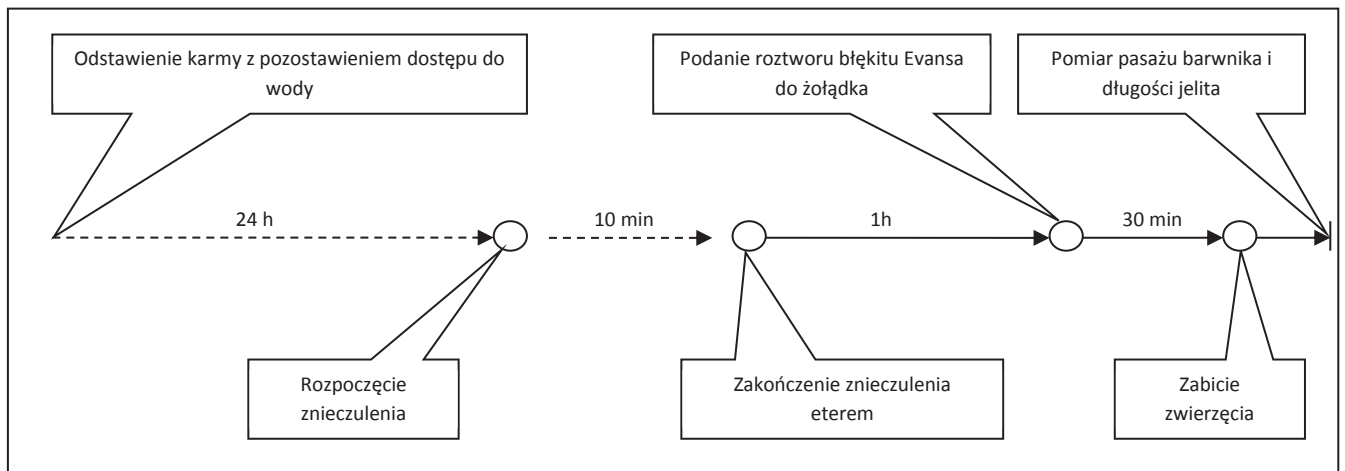
W fazie wstępnej zwierzęta były losowo przydzielane do jednej z pięciu grup. W grupie pierwszej, która była grupą kontrolną, nie wykonywano żadnych procedur chirurgicznych (Grupa UT).

**Schemat 1.** Przebieg procedur w grupie niepoddanej żadnym doświadczeniom (UT).



W grupie drugiej, przeprowadzono jedynie znieczulenie eterem (E), bez przeprowadzania procedur chirurgicznych.

**Schemat 2.** Przebieg procedur w grupie poddanej jedynie znieczuleniu eterowemu (E)



W kolejnych trzech grupach stanowiących podstawę modelu pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów przeprowadzono właściwe procedury chirurgiczne: nacięcie skóry o standaryzowanej długości 3 cm (Grupa SI), pełną laparotomię o standaryzowanej długości 3 cm (Grupa LT) oraz standaryzowaną laparotomię o długości 3 cm i dodatkowo masaż jelit (Grupa L+M).

W celu wykonania interwencji manualnej, jelito delikatnie wyciągano z jamy brzusznej układając na jałowym i zwilżonym gaziku. Następnie dodatkowo zwilżano jelito solą fizjologiczną, aby zapobiec wysychaniu ściany trzewi. W trakcie zabiegu utrzymywano w polu operacyjnym temperaturę zapobiegającą wychłodzeniu. Następnie dokonywano masażu całej długości jelita od dwunastnicy aż do kątnicy przy użyciu opuszek palców w jałowych rękawicach. Procedurę tą przeprowadzano sześciokrotnie

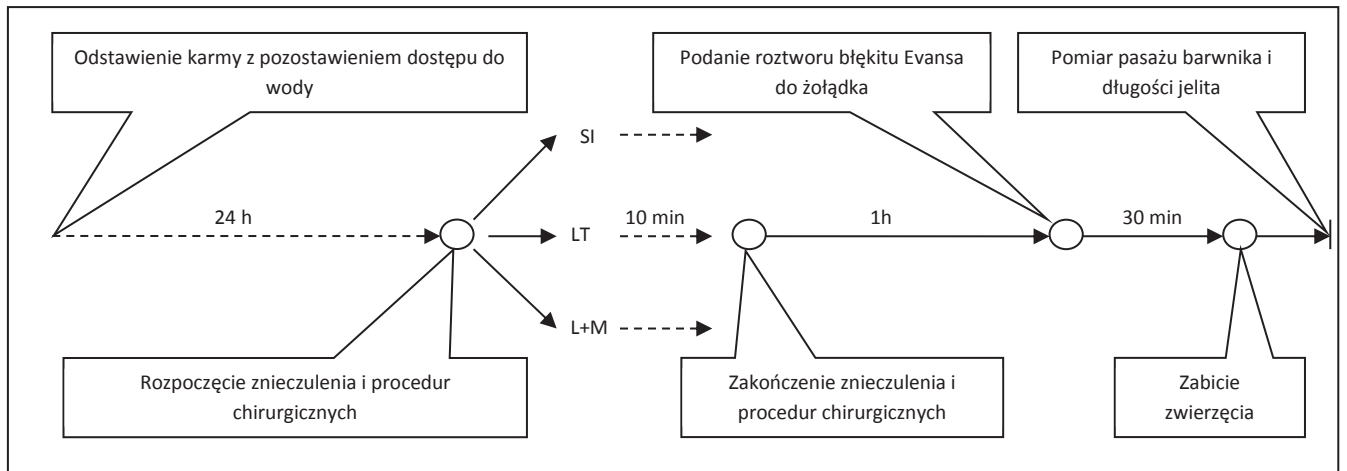


w ciągu 6 minut, po czym jelito delikatnie wprowadzano z powrotem do jamy brzusznej, a powłoki zszywano szwem warstwowym używając nici chirurgicznej. U każdego szczura zakładano 3 szwy na mięsień z otrzewną i 3 szwy na skórę.

Kolejne procedury wykonywano po upływie godziny, ze względu na czas, który według literatury jest niezbędny do wyeliminowania wpływu eteru na perystaltykę przewodu pokarmowego (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol]; Bueno *et al.*, 1978). Po upływie tego czasu podawano osobnikom badanym dożołądkowo, przez zagłęblik, 0,15 ml roztworu błękitu Evansa (Evans blue).

Dokładnie po 30 minutach szczury były zabijane przez dyssekcję rdzenia kręgowego. Następnie jamę brzuszną rozcinano szerokim cięciem i zakładano klemę na widoczne najdalsze miejsce penetracji barwnika w jelicie. Po zabezpieczeniu mającym zapobiegać pasywnemu przesuwaniu barwnika w jelicie w trakcie jego dotykania, delikatnie wyciągano jelita z jamy otrzewnowej przecinając kreskę, unikając przy tym rozciągania tkanek. Jelito rozkładano na stole operacyjnym w sposób umożliwiający jego pomiar. Następnie mierzono przy pomocy linijki odległość od odźwiernika do zaklemowanego wcześniej miejsca najdalszej penetracji barwnika w jelicie cienkim. Dodatkowo mierzono także całkowitą długość jelita.

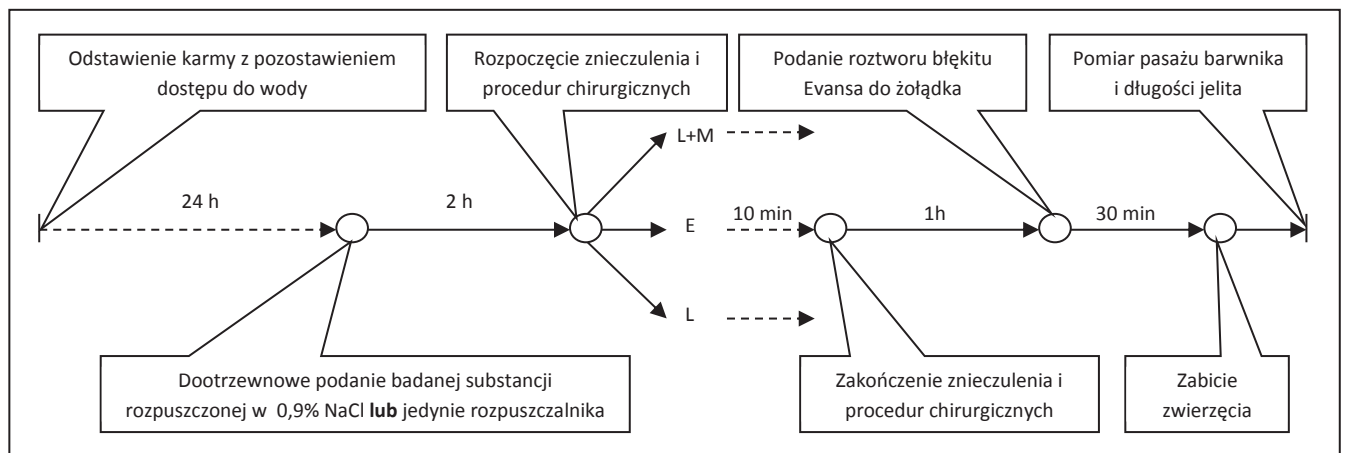
**Schemat 3.** Przebieg procedur w grupach modelowych, w których wykonywano nacięcie skóry (SI), laparotomię (L) i laparotomię z masażem jelit (L+M).



Kolejne etapy doświadczeń miały na celu ocenę wpływu dootrzewnowego podania rozpuszczalnika (CG) oraz badanych substancji na pasaż jelitowy barwnika Evansa u szczurów poddanych laparotomii z manipulacją jelit (L+M). W tym celu na 2 godziny przed planowanym zabiegiem podawano badanemu zwierzęciu dootrzewnowo badaną substancję. Pozostałe procedury wykonywano analogicznie jak w fazie przygotowawczej.

Ponadto dla wybranych antagonistów, to jest propranololu i johimbiny pasaż jelitowy oceniono także po wykonaniu jedynie laparotomii (L) lub jedynie trwającego 10 minut znieczulenia eterem (E). W tym celu podobnie jak w poprzednich grupach, podawano badane substancje dootrzewnowo na 2 godziny przed planowanym zabiegiem.

**Schemat 4.** Przebieg procedur chirurgicznych oraz interwencje farmakologiczne we właściwym etapie badania wpływu antagonistów receptorów adrenergicznych i L-NAME na pasaż jelitowy barwnika Evansa w modelu pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.



### 3.3. Przebieg doświadczeń

Pierwszy etap doświadczeń miał na celu ocenę wpływu na pasaż jelitowy eteru dietylowego, a także procedur chirurgicznych o stopniowo zwiększanej inwazyjności jak nacięcie skóry, wykonanie jedynie laparotomii oraz wykonanie laparotomii i następnego masażu jelit. Podstawowym celem etapu wstępnego była ocena, w jakim zakresie zastosowanie eteru dietylowego wpływa na pasaż jelitowy oraz ocena czy, podobnie jak w przytoczonym wcześniej piśmiennictwie, zwiększenie nasilenia inwazyjności zabiegu będzie się wiązało z większym upośledzeniem aktywności propulsywnej jelit, a co za tym idzie z odpowiednim zmniejszeniem pasażu barwnika w jelicie cienkim w okresie pooperacyjnym.

W tym celu na pierwszym etapie doświadczeń porównywano pasaż jelitowy w grupie szczurów, u których nie wykonano żadnych procedur chirurgicznych, ale poddano znieczuleniu eterem trwającemu około 10 minut (E), do grupy szczurów niepoddanych znieczuleniu eterem, ani żadnym procedurom chirurgicznym (UT).

Następnie oceniono pasaż jelitowy u szczurów poddanych procedurom o kolejno zwiększającej się inwazyjności: nacięciu skóry (SI), laparotomii (L) i laparotomii ze standaryzowanym masażem jelit (L+M).

**Tabela 1.** Doświadczenia wstępne oceniające pasaż jelitowy w grupach kontrolnych.

Nazwa grupy	Symbol grupy
Szczury niepoddane żadnym procedurom	UT
Szczury poddane jedynie znieczuleniu eterem	E
Szczury poddane nacięciu skóry	SI
Szczury poddane laparotomii	L
Szczury poddane laparotomii oraz masażowi jelit	L+M

Drugi etap doświadczeń miał na celu ocenę wpływu antagonistów receptorów adrenergicznych na pasaż jelitowy.

Szczury z grupy kontrolnej otrzymywały 2 godziny przed zabiegiem, dootrzewnowo, wstrzyknięcie z 0,9 % NaCl, (będącej rozpuszczalnikiem podawanych w grupach badanych leków), w objętości odpowiadającej podanej w grupie badanej.

Szczurom z grupy badanej podawano dootrzewnowo 2 godziny przed zabiegiem kolejne leki: nioselektywnego antagonistę receptora beta-adrenergicznego, propranolol oraz wybiórczych antagonistów receptora beta1-, beta2- i beta3 adrenergicznego, odpowiednio metoprololu, ICI 118,551 oraz SR 58894A

**Tabela 2.** Przebieg doświadczeń w grupach zwierząt badanych z zastosowaniem antagonistów receptorów beta-adrenergicznych.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Propranolol	10 - 45	P 10 – P 45
Metoprolol	2 - 100	M 2 – M 100
ICI 118551	0,3 - 10	I 0,3 – I 10
SR59230A	1 - 10	SR 1 – SR 10

Następnie badano pasaż barwnika po podaniu nieselektywnego antagonisty receptora alfa-adrenergicznego, fentolaminy oraz antagonistów wybiórczych receptora alfa1- i alfa2-adrenergicznego, prazosynę i johimbinę.

**Tabela 3.** Przebieg doświadczeń w grupach zwierząt badanych z zastosowaniem antagonistów receptorów alfa-adrenergicznych.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Fentolamina	3 - 30	F 3 – P 30
Prazosyna	1 - 10	Pra 1 – Pra 10
Johimbina	3 - 30	J 3 – J 30

Trzeci etap doświadczeń miał na celu ocenę czy substancje, w których przypadku substancji, po zastosowaniu których obserwowano korzystny wpływ na perystaltykę, tj. propranolol i johimbina w dawkach najbardziej skutecznych mają wpływ na pasaż jelitowy u szczurów, u których wykonano jedynie znieczulenie eterem oraz laparotomię bez masażu jelit.

**Tabela 4.** Ocena wpływu najskuteczniejszych dawek propranololu i johimbiny po zastosowaniu znieczulenia eterem oraz laparotomii.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Znieczulenie eterem		E
Znieczulenie eterem i johimbina	10	E + J 10
Znieczulenie eterem i propranolol	30	E + P 30
Laparotomia		L
Laparotomia i johimbina	10	L + J 10
Laparotomia i propranolol	30	L + P 30

W kolejnej serii doświadczeń badano wpływ jednoczesnego podania najskuteczniejszych dawek propranololu i johimbiny na pasaż jelitowy u szczurów, u których wykonano laparotomię i masaż jelit.

**Tabela 5.** Badanie wpływu łącznego podania johimbiny i propranololu na pasaż jelitowy u szczurów, u których wykonano laparotomię i masaż jelit w porównaniu do szczurówz grupy kontrolnej oraz szczurów, u których podano johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Johimbina	10	J 10
Johimbina i propranolol	10 i 30	J 10 + P 30

Następnie badano wpływ L-NAME, proleku będącego prekursorem inhibitora neuronalnego i endotelialnego enzymu NOS na pasaż jelitowy po wykonaniu laparotomii z masażem jelit, po czym oceniono wpływ łącznego podania najskuteczniejszej dawki johimbiny i L-NAME.



**Tabela 6.** Badanie wpływu łącznego podania johimbiny i propranololu, oraz badanie wpływu L-NAME oraz łącznego podania L-NAME i johimbiny po wykonaniu laparotomii z masażem jelit.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Johimbina	10	J 10
L-NAME	10	LN 10
L-NAME	30	LN 30
L-NAME	100	LN 100
L-NAME i Johimbina	30 i 10	LN 30 + J 10

### 3.4. Związki używane do doświadczeń

Do doświadczeń używano związków zakupionych w tym celu u następujących dostawców:

- Fentolamina, propranolol, prazosyna, johimbina, metoprolol, ICI 118,551 oraz SR 58894A oraz L-NAME zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich.
- Eter dietylowy zakupiono w Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice.
- Roztwór 0,9% NaCl zakupiono w firmie Frasenius Kabi, Kutno.
- Błękit Evansa zakupiono w firmie Sigma-Aldrich i przygotowywano w następujący sposób: 50 mg barwnika rozpuszczano w 1 ml roztworu 0,9% NaCl. Procedurę wykonano w sposób opisany przez Tanila i wsp. (Tanila *et al.*, 1993) i użyty podczas doświadczeń w naszej jednostce w toku poprzednich prac (Ciechanowicz *et al.*, 2002).

### 3.5. Analiza statystyczna

Podczas badań mierzono całkowitą długość jelita badanego zwierzęcia od odźwiernika do kątnicy, oraz odległość od odźwiernika do najdalszego miejsca penetracji barwnika. Pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt nie wykryto istotnych statystycznie różnic w długości jelita cienkiego, dlatego wyniki analizy statystycznej przedstawiono w postaci ilości centymetrów od odźwiernika do najdalszego miejsca pasażu Błękitu Evansa w jelicie w centymetrach  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując program StatSoft, Inc. (2011) STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com) z licencją on-site dla Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Do analizy statystycznej użyto metody jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu *post hoc* Bonferoniego zastosowanego po teście ANOVA. Wyniki uznano za znamienne statystycznie dla wartości prawdopodobieństwa testowego  $p$  mniejszego od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

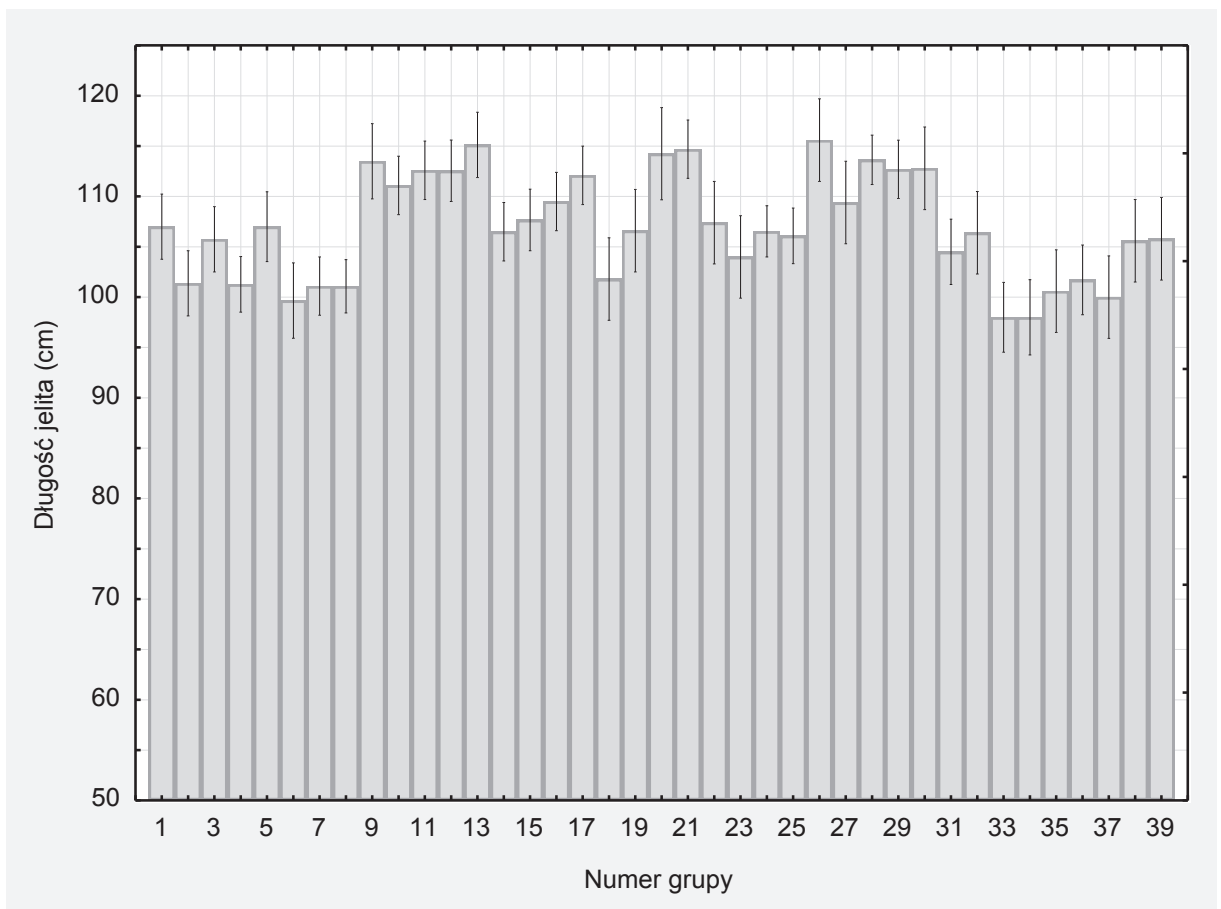
## 4. Wyniki

### Ocena długości jelita w grupach badanych.

W badanych grupach średnia długość jelita we wszystkich grupach wyniosła 106,94 cm  $\pm$  3,43 cm. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w długości jelita cienkiego pomiędzy grupami zwierząt użytymi do doświadczeń. Średnie długości jelit w poszczególnych grupach przedstawiono na Wykresie 1.

Wobec braku różnic w długości jelit wśród badanych szczurów uznano, iż dopuszczalne będzie przedstawienie wyników pracy w postaci odległości pasażu barwnika w jelicie od odźwiernika, do najdalszego miejsca, w którym widoczny był Błękit Evansa wyrażonego w centymetrach  $\pm$  błąd standardowy (SEM), pomijając przy tym długość jelit.

**Wykres 1.** Długość jelita cienkiego mierzona od odźwiernika do kątnicy we wszystkich grupach szczurów użytych do doświadczeń. Wyniki w grupach o liczebności  $n = 4 - 14$  przedstawiono jako długość jelita w  $\text{cm} \pm$  błąd standardowy (SEM). Przy użyciu testu jednoczynnikowego ANOVA i testu post hoc Bonferoniego nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.

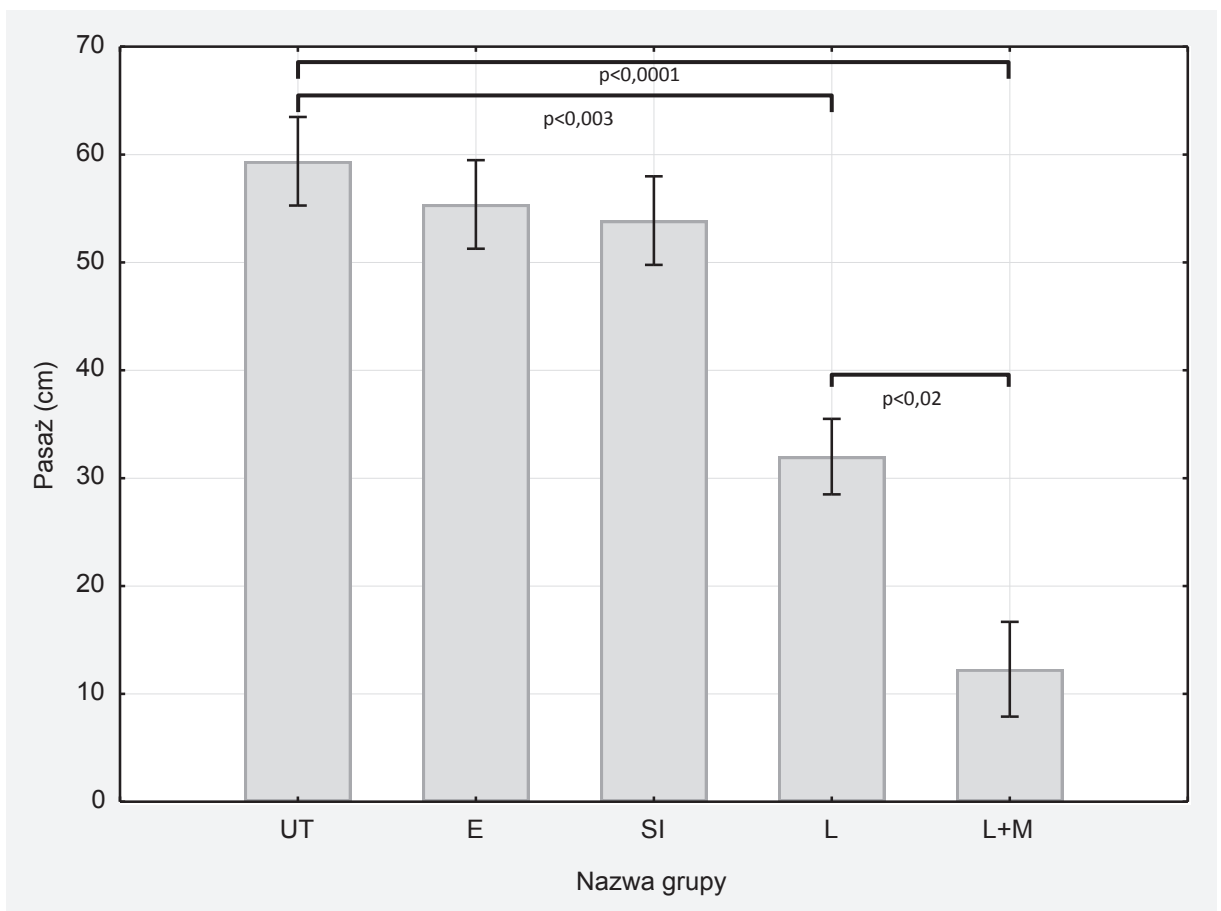


## **Wpływ eteru dietylowego i zastosowanych procedur chirurgicznych na pasaż jelitowy.**

W grupie kontrolnej zwierząt niepoddanych żadnym procedurom ani znieczuleniu eterem (grupa UT) pasaż Błękitu Evansa wynosił  $59,37 \pm 4,10$  cm. W grupie, w której nie wykonano żadnych procedur chirurgicznych, a jedynie znieczulono eterem dietylowym (E) pasaż jelitowy barwnika wyniósł  $55,37 \pm 4,10$  cm. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą, którą poddano znieczuleniu eterem (E) w porównaniu do grupy kontrolnej (UT).

W grupach poddanych procedurom chirurgicznym obserwowano następujące rezultaty: wśród szczurów poddanych standaryzowanemu nacięciu skóry (SI) pasaż jelitowy mierzony odległością przesunięcia barwnika w jelicie wynosił  $53,87 \pm 4,10$  cm; w grupie poddanej laparotomii (L) pasaż barwnika wynosił  $32,00 \pm 3,50$  cm, natomiast w grupie poddanej laparotomii i standaryzowanemu masażowi jelit (L+M) pasaż barwnika wynosił  $12,28 \pm 4,38$  cm. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w pasażu jelitowym barwnika Evansa pomiędzy szczurami w grupie kontrolnej a szczurami poddanymi nacięciu skóry. Wykazano natomiast różnice statystycznie na założonym poziomie istotności pomiędzy grupą kontrolną, a grupą poddaną laparotomii i grupą poddaną laparotomii oraz masażowi jelit. Obserwowane różnice w pasażu jelitowym barwnika po poszczególnych procedurach kontrolnych przedstawiono na wykresie 2.

**Wykres 2.** Uzyskane wartości pasaży jelitowego barwnika w doświadczeniach wstępnych w grupie niepoddanej żadnym procedurom (UT) i grupach poddanych: znieczuleniu eterem (E), nacięciu skóry (SI), laparotomii (L) i laparotomii z masażem jelit (L + M). Wyniki przedstawiono w cm pasaży barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 7 - 11$  uzyskano: UT, E i SI vs L ( $p < 0,003$ ), UT, E i SI vs L + M ( $p < 0,0001$ ), a także pomiędzy L vs L + M ( $p < 0,02$ ).



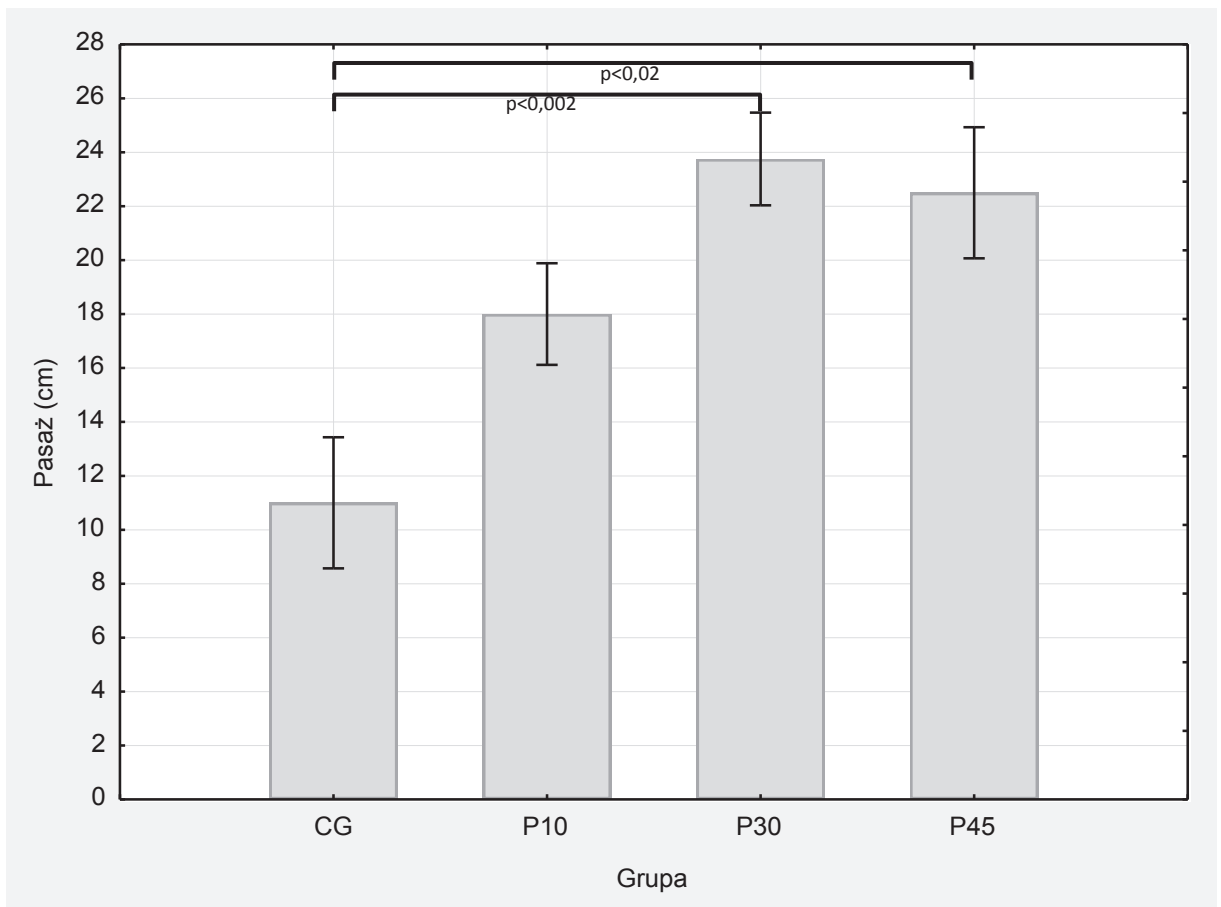
### **Wpływ antagonistów receptorów beta-adrenergicznych na pasaż jelitowy barwnika po laparotomii i masażu jelit.**

Grupą kontrolną były szczury, u których przed zabiegiem laparotomii i masażu jelit podano dootrzewnowo 3 ml 0,9% NaCl na 2 godziny przed zabiegiem operacyjnym (CG). W grupie tej obserwowano pasaż jelitowy, oznaczony jako ilość cm od odźwiernika, na które przesunięty został barwnik Evansa wynoszący  $11,0 \pm 2,43$  cm.

W grupie, w której podano propranolol (P 30 i P 45) w dawce 30 i 45 mg/kg m.c. stwierdzono zwiększenie pasażu jelitowego barwnika do odpowiednio  $23,75 \pm 1,71$  cm i  $22,5 \pm 2,43$  cm, stwierdzono przy tym istotność statystyczną na założonym poziomie istotności. W grupie, w której zastosowano propranolol w dawce 10 mg/kg (P 10) stwierdzono przyspieszenie pasażu barwnika do  $18,00 \pm 1,88$  cm, jednakże nie stwierdzono w tym przypadku istotnej statystycznie różnicy z grupą kontrolną. W grupie, w której podano propranolol w dawce 60 i 100 mg/kg m.c. obserwowano zgon zwierząt badawczych przed zakończeniem eksperymentu.



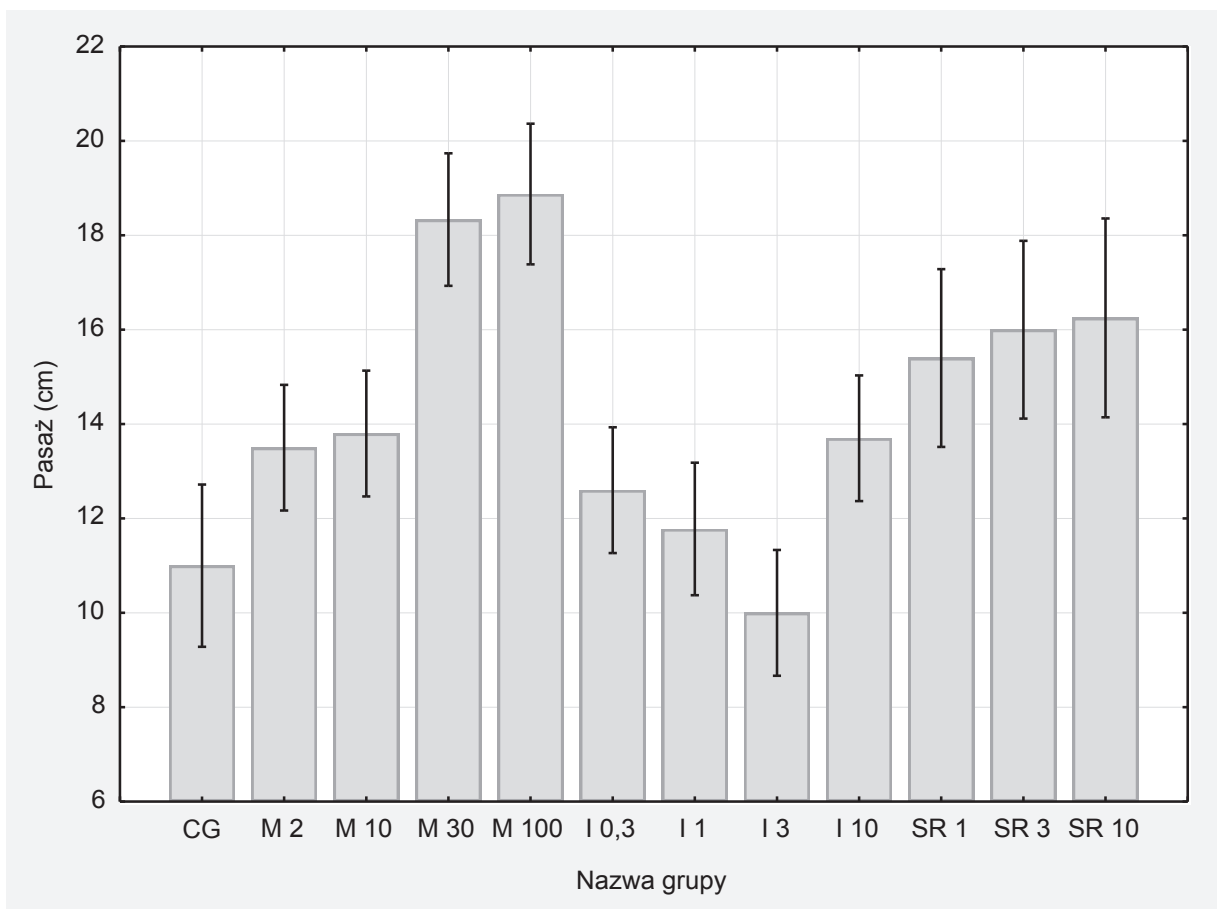
**Wykres 3.** Wpływ zastosowania propranololu w dawkach 10 – 45 mg/kg m.c. (P 10 – 45) na pasaż jelitowy barwnika w grupie poddanej laparotomii i masażowi jelit w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 6 - 12$  uzyskano: P 30 vs CG ( $p < 0,002$ ) i P 45 vs CG ( $p < 0,02$ ).



W grupach szczurów, w których podawano przed zabiegiem operacyjnym metoprolol w dawkach 2, 10, 30 i 100 mg/kg m.c., ICI 118,551 w dawkach 0,3, 1, 3 i 10 mg/kg m.c. oraz SR 58894A w dawkach 1, 3 i 10 mg/kg m.c. nie zaobserwowano istotnego statystycznie przyspieszenia pasażu jelitowego barwnika w porównaniu do grupy

kontrolnej. Zwiększenie pasażu barwnika Evansa w porównaniu do grupy kontrolnej na granicy istotności statystycznej ( $p=0,055$ ) osiągnięto dla grupy metoprololu 100 mg/kg m.c., jednakże dalsze zwiększanie dawki okazało się niemożliwe ze względu na wywoływanie bradykardii i hipotonii powodujących śmierć zwierząt testowych.

**Wykres 4.** Wpływ zastosowania metoprololu w dawkach 2 – 100 mg/kg m.c (M 2 – M 100), ICI 118,551 w dawkach 0,3 – 3 mg/kg m.c. (I 0,3 – I 3), SR 58894A w dawkach 1 – 10 mg/kg m.c. (SR 1 – SR 10) na pasaż jelitowy barwnika Evansa w grupie poddanej laparotomii i masażu jelit w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami o liczebności n = 4 – 10 na założonym poziomie wartości prawdopodobieństwa testowego  $p < 0,05$ .

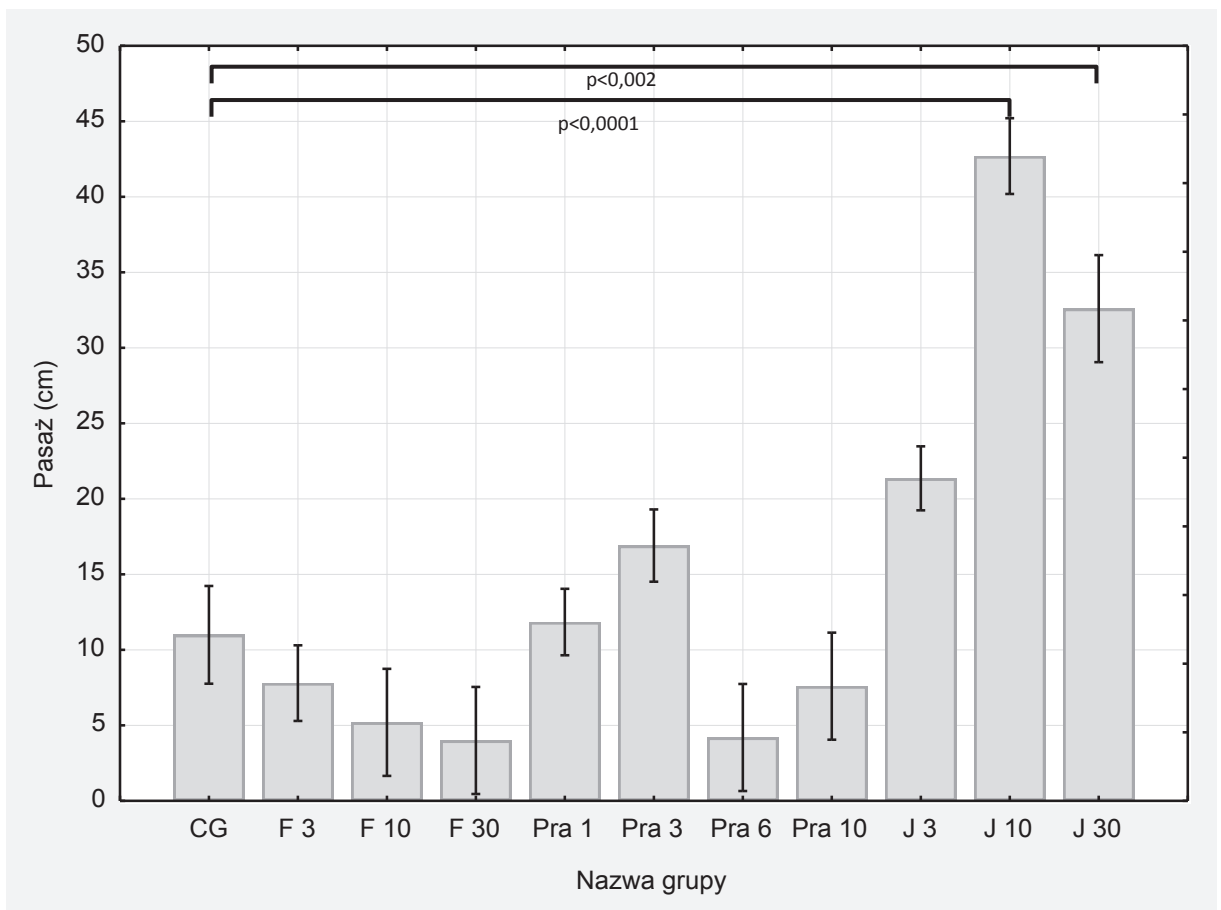


## **Wpływ antagonistów receptorów alfa-adrenergicznych na pasaż jelitowy barwnika Evansa po laparotomii i masażu jelit.**

W grupach szczurów, w których podawano przed zabiegiem operacyjnym fentolaminę w dawkach 3, 10 i 30 mg/kg m.c., prazosynę w dawkach 1, 3, 6 i 10 mg/kg m.c. nie zaobserwowano istotnego statystycznie przyspieszenia pasażu jelitowego barwnika w porównaniu do grupy kontrolnej.

W grupie, w której zastosowano johimbinę w dawkach leku 10 i 30 mg/kg m.c. (J 10 i J 30) obserwowano istotne statystycznie przyspieszenie pasażu barwnika w porównaniu do grupy kontrolnej. Największe przyspieszenie pasażu barwnika Evansa obserwowano po dawce 10 mg/kg m.c.: pasaż barwnika w tej grupie wynosił  $42,70 \pm 2,50$  cm. W grupie, w której zastosowano dawkę 30 mg/kg m.c. obserwowano odpowiednio pasaż barwnika Evansa wynoszący  $32,60 \pm 3,54$  cm. Obserwowano także przyspieszenie pasażu barwnika, wynoszące  $21,35 \pm 2,11$  cm, w porównaniu do grupy kontrolnej, w grupie, w której zastosowano 3 mg/kg m.c. johimbiny (J 3), jednakże nie odnotowano istotności statystycznej na założonym poziomie  $p < 0,05$ .

**Wykres 5.** Ocena wpływu antagonistów receptora alfa-adrenergicznego na pasaż jelitowy barwnika po wykonaniu laparotomii i masażu jelita w grupach, w których podano fentolaminę w dawkach 3 – 30 mg/kg m.c. (F 3 – F 30), prazosynę w dawkach 1 – 10 mg/kg m.c. (Pra 1 – Pra 10) i johimbinę w dawkach 3 – 30 mg/kg m.c. (J 3 – J 30) w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 5 - 14$  uzyskano: J 10 vs CG ( $p < 0,0001$ ) i J 30 vs CG ( $p < 0,002$ ).

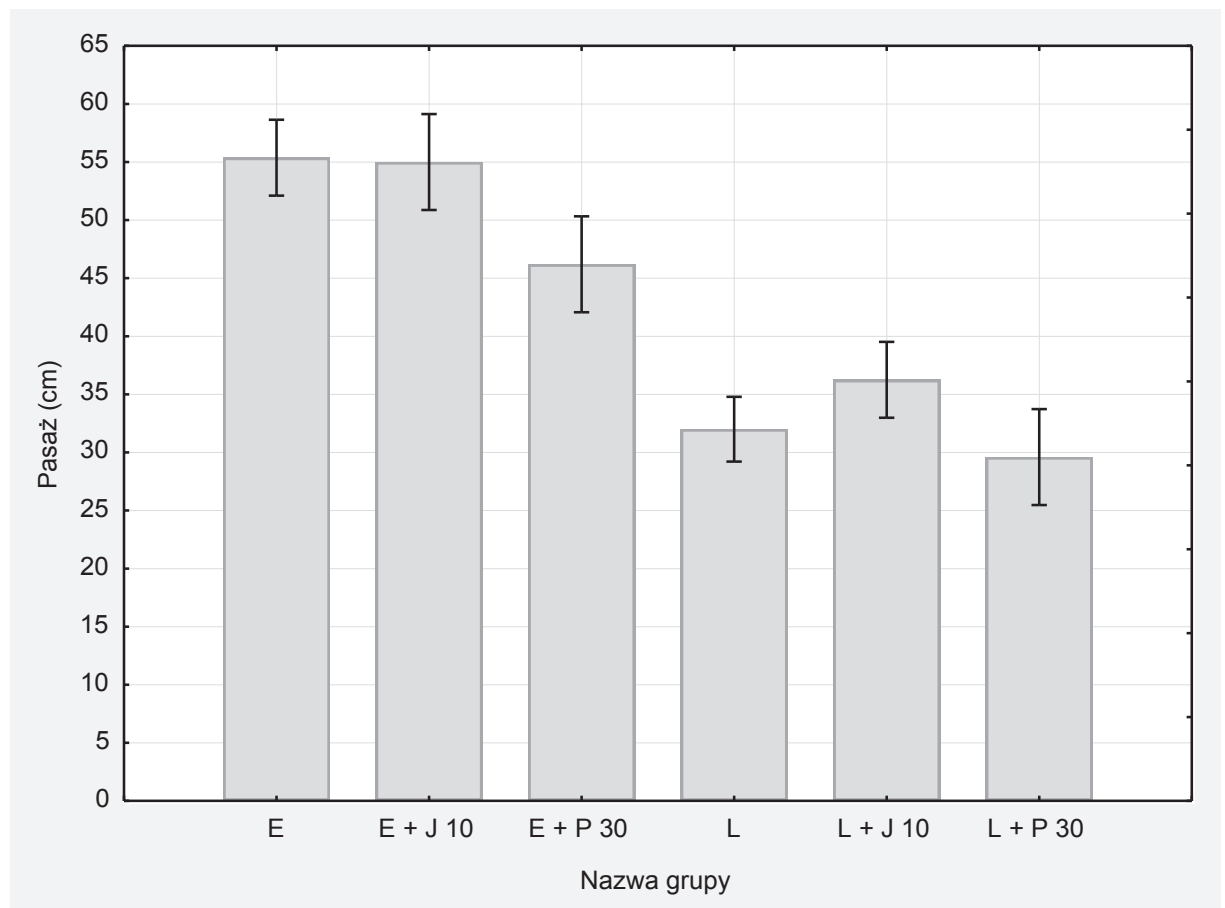


**Ocena wpływu podania johimbiny i propranololu na pasaż jelitowy barwnika Evansa u szczurów poddanych jedynie znieczuleniu eterowemu, oraz szczurów poddanych laparotomii.**

U szczurów, u których wykonano jedynie znieczulenie eterem (E) podanie johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c. i propranololu w dawce 30 mg/kg m.c., t.j. w dawkach, w których optymalnie zwiększały one pasaż jelitowy barwnika po laparotomii i masażu jelit nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w pasażu jelitowym barwnika pomiędzy grupami E a E + J 10 oraz E + P 30.

Podobnie u szczurów, u których wykonano jedynie laparotomię (L) podanie johimbiny w dawce, w której optymalnie zwiększała ona pasaż jelitowy barwnika po laparotomii i masażu jelit, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w pasażu jelitowym barwnika pomiędzy grupami.

**Wykres 6.** Wpływ podania johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c. i propranololu w dawce 30 mg/kg m.c. u szczurów poddanych znieczuleniu eterem (E + J 10 oraz E + P 30) lub laparotomii (L + J 10 oraz L + P 30) w porównaniu do grup, w których wykonano odpowiednio jedynie znieczulenie eterem (E) lub laparotomię (L). Wyniki przedstawiono w cm pasaży barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Podanie leków nie spowodowało istotnego statystycznie zwiększenia pasaży barwnika po znieczuleniu eterem ani laparotomii na założonym poziomie wartości prawdopodobieństwa testowego  $p < 0,05$ . Grupy miały liczebność  $n = 5 - 11$ .

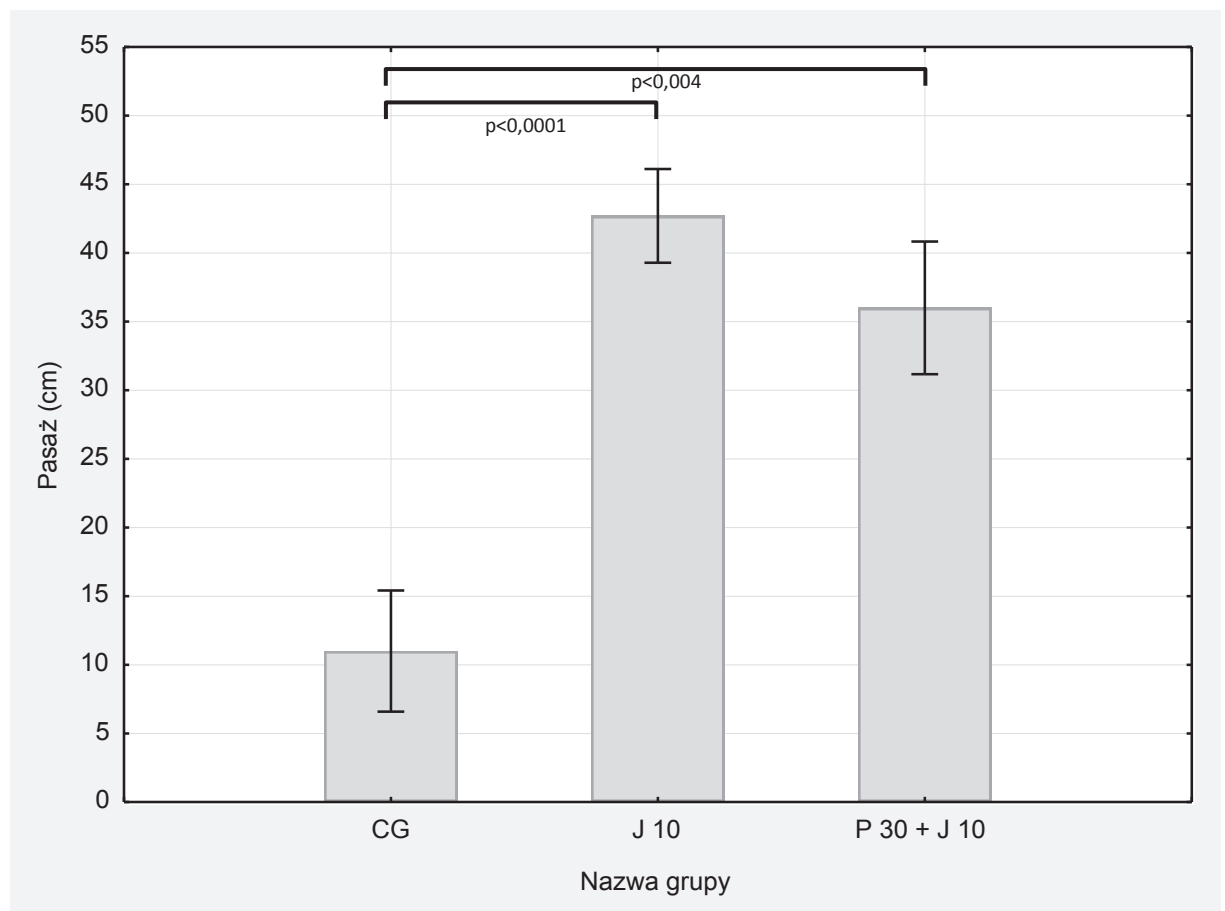


**Ocena synergistycznego działania optymalnych dawek propranololu i johimbiny na pasaż jelitowy barwnika Evansa.**

W grupie zwierząt, którym przed zabiegiem L+M podano jednocześnie optymalną dawkę johimbiny wynoszącą 10 mg/kg m.c i propranololu wynoszącą 30 mg/kg m.c. obserwowano zwiększenie pasażu jelitowego barwnika do  $36 \pm 4,83$  cm, stwierdzono przy tym istotną statystycznie różnicę w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) na założonym poziomie wartości prawdopodobieństwa testowego p mniejszego od 0,05 ( $p < 0,05$ ). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy przyspieszeniem pasażu barwnika obserwowanym po zastosowaniu wyłącznie johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c., a łącznym zastosowaniem optymalnych dawek propranololu i johimbiny.



**Wykres 7.** Porównanie skuteczności łącznego podania johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c. i propranololu w dawce 30 mg/kg m.c. (J 10 + P 30) na przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika po wykonaniu laparotomii i masażu jelit w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) i grupy, w której podano wyłącznie johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c. (J 10). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 5 - 10$  uzyskano w przypadku J 10 + P 30 vs CG ( $p < 0,004$ ) i J 10 vs CG ( $p < 0,0001$ ). Brak synergistycznego działania obu leków w porównaniu do grupy J 10 ( $p > 0,05$ ).

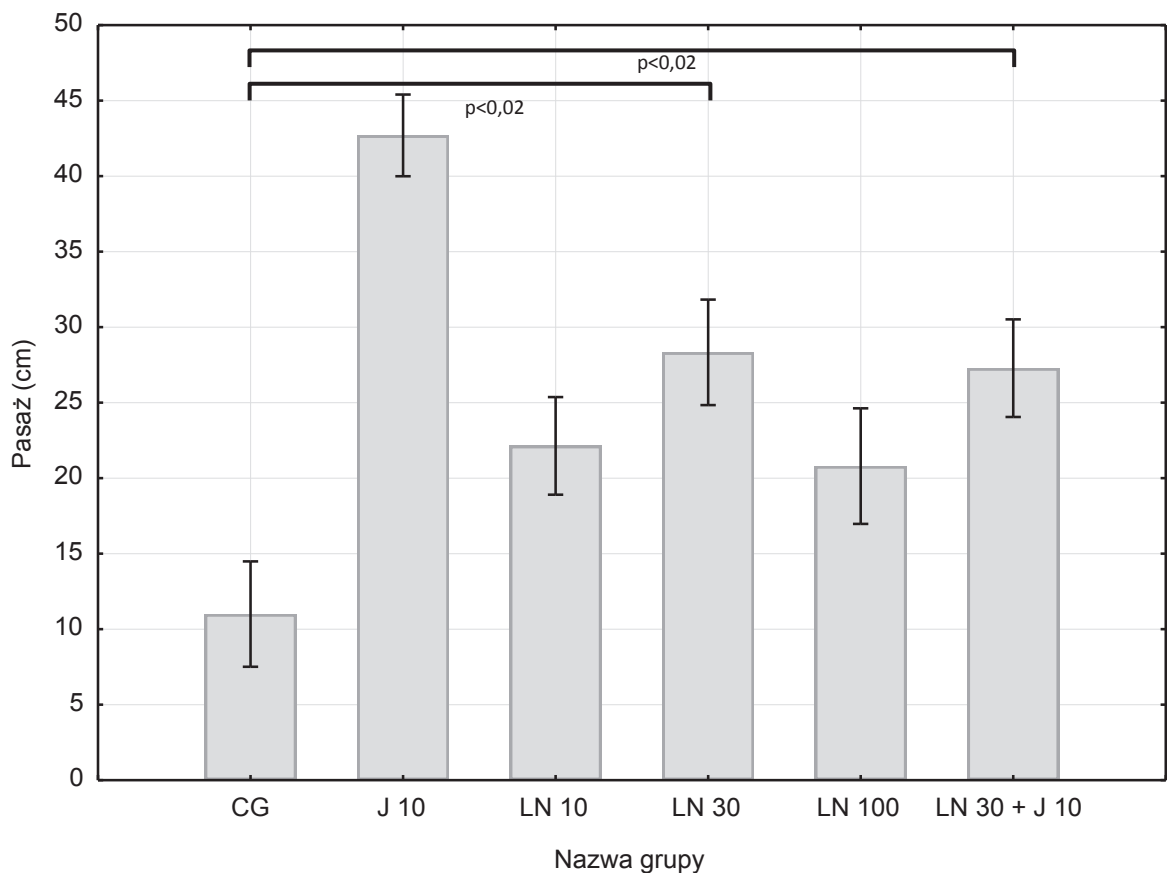


**Ocena wpływu L-NAME oraz wspólnego podania L-NAME i johimbiny na pasaż jelitowy barwnika Evansa po laparotomii i masażu jelit.**

W grupach, w których podano L-NAME w dawkach 10, 30 i 100 mg/kg m.c. obserwowano odpowiednio przyspieszenie pasażu barwnika do  $22,14 \pm 3,15$  cm,  $28,33 \pm 3,41$  cm i  $20,8 \pm 3,73$  cm. W przypadku dawki 30 mg/kg m.c. obserwowano istotne statystycznie przyspieszenie pasażu barwnika w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Jednakże przyspieszenie pasażu barwnika po zastosowaniu L-NAME w dawce 30 mg/kg m.c. było mniejsze niż po zastosowaniu johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c., po zastosowaniu której pasaż barwnika wynosił  $42,7 \pm 2,70$  cm w grupie laparotomii i masażu jelit. Różnica ta była istotna statystycznie.

Po jednoczesnym podaniu przed zabiegiem L-NAME w dawce 30 mg/kg m.c. i johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c. obserwowano istotne statystycznie przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika do  $27,28 \pm 3,23$  cm w grupie laparotomii i masażu jelit w porównaniu do grupy kontrolnej. W porównaniu do grupy, w której podano wyłącznie johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c. przyspieszenie pasażu barwnika Evansa było istotnie statystycznie mniejsze.

**Wykres 8.** Przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika Evansa po wykonaniu laparotomii i masażu jelit w grupach, w których podano L-NAME w dawkach 10 -100 mg/kg m.c. (LN 10 – 100) oraz L-NAME w dawce 30 mg/kg m.c. łącznie z johimbiną w dawce 10 mg/kg m.c. (LN 30 + J 10) w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) i grupy, w której podano wyłącznie johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c. (J 10). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotnie statystycznie zwiększenie pasażu uzyskano w grupach LN 30 vs CG ( $p < 0,02$ ) i LN 30 + J 10 vs CG ( $p < 0,02$ ). Zwiększenie pasażu barwnika było istotnie statystycznie mniejsze w grupach LN 30 vs J 10 ( $p < 0,04$ ) oraz LN 30 + J 10 vs J 10 ( $p < 0,03$ ). Liczebność grup wynosiła  $n = 5 - 10$ .



## 5. Dyskusja

Rola układu współczulnego w regulacji perystaltyki jelit była już przedmiotem wielu badań. W tej pracy dokonano analizy udziału poszczególnych typów i podtypów receptorów adrenergicznych w modelu biologicznym pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.

Zastosowana w tej pracy metodyka jest zgodna z dobrą praktyką laboratoryjną i była już wcześniej stosowana (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol]; Korolkiewicz *et al.*, 2003; Ciechanowicz *et al.*, 2006). Zwierzęta użyte do doświadczeń były traktowane w sposób humanitarny, a ich uśmiercenie przeprowadzano w sposób szybki i ograniczający do niezbędnego minimum ich cierpienia, w sposób zgodny z zezwoleniem wydanym przez lokalną Komisję Bioetyczną.

Wszystkie procedury przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym eterem dietylowym. Niewątpliwą zaletą tego związku jest fakt, iż w przeciwieństwie do innych związków jak halotan czy izofluran, ma on niewielki i ograniczony w czasie do 1 godziny wpływ na perystaltykę przewodu pokarmowego u szczurów (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol]; Bueno *et al.*, 1978) co potwierdzono w również w przeprowadzonych doświadczeniach. Wadą eteru dietylowego jest fakt, iż znieczulenie nim jest trudne do prowadzenia w praktyce, a dawka stosowanego leku nie jest standaryzowana. Głębokość uzyskanego znieczulenia ocenia się na podstawie odpowiedzi na bodziec bólowy oraz głębokość oddechów badanego zwierzęcia. Przedawkowanie eteru dietylowego prowadzi do zahamowania ośrodków rdzenia przedłużonego

wywołującego zapaść krążeniową i zatrzymanie oddechu. W toku badań zdarzyło się pięć przypadków przedawkowania eteru prowadzących do śmierci zwierzęcia, były to jednak przypadki incydentalne. Zwierzęta te wyłączono z badania i analizy statystycznej. Inną wadą zastosowanego znieczulenia jest fakt, iż indukcja znieczulenia zachodzi stosunkowo wolno, w porównaniu do izofluranu czy nawet halotanu. Wynika to z faktu, iż eter dietylowy ma wysoki współczynnik rozpuszczalności krew:gaz wynoszący 12,1. Dla porównania współczynnik ten dla izofluranu wynosi 1,4, a dla halotanu 2,3. W praktyce oznacza to, iż znieczulane zwierzę przechodzi przez klasyczne fazy znieczulenia wg Guedela, tj. fazę pierwszą obejmującą analgezję, fazę drugą obejmującą pobudzenie, przechodząc do fazy trzeciej właściwego znieczulenia chirurgicznego. W czasie prowadzenia znieczulenia najbardziej niepożądana jest faza druga, z uwagi na fakt, iż dochodzi w niej do pobudzenia zwierzęcia, a także przyspieszenia oddechu i akcji serca oraz podwyższenia ciśnienia tętniczego krwi wynikające z pobudzenia układu współczulnego. Charakterystyczne jest ponadto wywoływanie w tej fazie całkowitej niepamięci. Czas trwania fazy drugiej można skrócić poprzez szybkie zwiększanie stężenia eteru dietylowego w mieszaninie oddechowej (Katzung *et al.*, 2012) i tak właśnie postępowano w toku badań wykonanych do tej pracy. W czasie wykonywania badań czas znieczulenia był jednakowy dla wszystkich grup, niezależnie od rodzaju przeprowadzanego zabiegu i wynosił 10 min. W doświadczeniach kontrolnych wykonanych w ramach tej pracy wykazano, iż zmniejszenie pasażu barwnika w grupie szczurów znieczulonych eterem dietylowym, ale niepoddanych zabiegom operacyjnym wynosiło jedynie 6,8%, w porównaniu do pasażu barwnika obserwowanego u szczurów niepoddanych żadnym procedurom, przy czym różnica ta nie była istotna statystycznie. Pozwala to na

stwierdzenie, iż zastosowany do znieczulenia ogólnego eter dietylowy nie wpływa w istotny sposób na perystaltykę jelit w zaproponowanym modelu pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.

Wybrany model badawczy pooperacyjnej niedrożności jelit opiera się na obserwacji, iż stopień zahamowania perystaltyki przewodu pokarmowego jest uzależniony od siły i rodzaju bodźca bólowego zastosowanego podczas zabiegu operacyjnego. Obejmuje on wykonanie nacięcia skóry, laparotomii i laparotomii z masażem jelit w celu wywołania odpowiedniego stopnia pooperacyjnego spowolnienia perystaltyki jelit. Zarówno nacięcie skóry, jak i laparotomia wykonywana w ramach tego badania miały standaryzowaną długość 3 cm. Wykazano bowiem, iż długość wykonanego cięcia, szczególnie w zakresie mięśniówki, wpływała na stopień spowolnienia perystaltyki jelit (Uemura *et al.*, 2004). Masaż jelit przeprowadzano po wyciągnięciu ich poza obręb jamy brzusznej, układając je na jałowej gazie. Trudność tego zabiegu polega na fakcie, iż jelito szczura zawieszane jest na delikatnej krezce. Zbyt gwałtowne lub silne pociąganie wywołuje uszkodzenie samej krezki, jak i przebiegających w niej naczyń krezkowych. Wiąże się to z dodatkowymi uszkodzeniami mogącymi mieć wpływ na wyniki eksperymentu. Dlatego podczas przeprowadzania badań przykładano jak największą staranność do delikatnej manipulacji jelitem, aby nie dopuścić do uszkodzeń krezki czy jej naczyń. Przypadki widocznego dużego uszkodzenia odnotowano w ośmiu przypadkach, a zwierzęta te zostały wyłączone z badania i analizy statystycznej. Masaż jelita cienkiego przeprowadzano w sposób standaryzowany opuszkami palców w jałowych rękawicach, 6 krotnie od odźwiernika do kątnicy. Czas trwania masażu był zbliżony dla wszystkich zwierząt poddanych badaniom i wynosił około 6 minut. Czas trwania całego zabiegu operacyjnego od

rozpoczęcia cięcia chirurgicznego do założenia ostatniego szwu był również standaryzowany i wynosił 10 minut. W trakcie zabiegu masażu jelit, a także innych przeprowadzanych procedur, utrzymywano stałą temperaturę  $38\pm 1$  stopni Celcjusza w polu operacyjnym stosując promiennik ciepła, a temperaturę kontrolowano przy użyciu termometru z sondą umieszczoną w bezpośrednim sąsiedztwie pola operacyjnego. Pozwoliło to na zapobieganie wychładzania zwierzęcia w trakcie zabiegu i utrzymanie standardowych warunków zabiegu. Stosowanie promiennika ciepła wiązało się z koniecznością stałego zwilżania jelit jałowym roztworem 0,9 % chlorku sodu w celu zapobiegania ich wysychaniu.

Model ten, pomimo swoich niewątpliwych zalet, posiada również pewne ograniczenia. Pierwszą, i być może najważniejszą wadą wybranego modelu, jest fakt, iż u ludzi główną częścią jelita narażoną na porażenie jest jelito grube, podczas gdy u szczurów w czasie trwania pooperacyjnej niedrożności jelit zatrzymanie perystaltyki jest najbardziej znamienne w jelicie cienkim (Holte, *et al.*, 2002 [Minerva Anesthesiol]). Dodatkowo, wybrany model ocenia jedynie wczesną fazę pooperacyjnej niedrożności jelit u szczura, pomijając fazę opóźnioną występującą po niedokrwieniu-reperfuzji związanej z zabiegami operacyjnymi na jelitach (Ługowska-Umer, 2009). Może to utrudnić aplikację praktyczną wyników tej pracy u ludzi.

Pomiar pasażu jelitowego w toku badań oceniano poprzez pomiar odległości od odźwiernika do najdalszego punktu migracji niebieskiego barwnika Evansa podanego przez sondę do żołądka. Wszystkim zwierzętom poddanym badaniom podawano standaryzowaną ilość barwnika wynoszącą 0,15 ml. Pomiar przeprowadzano bezpośrednio po uśmierceniu zwierzęcia, a na jelito zakładano klemę uniemożliwiającą

pasywne przesuwanie barwnika w jelicie podczas jego wyciągania i preparacji. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż niektórzy autorzy poddają w wątpliwość korelację pasażu jelitowego barwnika mierzonego u szczurów bezpośrednio w jelicie cienkim z nasileniem pooperacyjnej niedrożności jelit, wskazując, iż badanie radiologiczne przy użyciu barytu pozwala na lepszą ocenę nasilenia PI (Lee *et al.*, 2002). Z drugiej strony, zdaniem innego autora, zmniejszenie penetracji barwnika w jelicie cienkim wydaje się dobrze korelować ze stopniem zahamowania aktywności elektrycznej jelita oraz wędrującego kompleksu mioelektrycznego MMC (Kelley *et al.*, 1993; Ruwart *et al.*, 1980). Kolejnym ograniczeniem, na które należy zwrócić uwagę jest fakt, iż pasaż jelitowy barwnika Evansa mierzony przy użyciu znacznika podanego przez sondę do żołądka odzwierciedla nie tylko czynność propulsywną jelit, ale także czas opróżniania żołądka. Z drugiej jednak strony, wyniki pomiarów pasażu błękitu Evansa w jelicie cienkim szczurów uzyskane w fazie przygotowawczej niniejszej pracy wykazały powtarzalność wyników i korelację ze stopniem inwazyjności przeprowadzonego zabiegu, co pozwala stwierdzić, iż wybrany sposób pomiaru pasażu w zadowalający sposób odzwierciedla fazę wczesną pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.

Należy podkreślić, iż wszystkie alternatywne modele badawcze, którymi można byłoby zastąpić model wybrany do niniejszej pracy, posiadają swoje wady oraz zalety. Wybrany model jest stosunkowo prosty i powtarzalny, co wykazano w toku badań, a ponadto bada pasaż jelitowy barwnika w sposób nieinwazyjny w układzie *in vivo*, co niewątpliwie jest jego zaletą. Model był już wielokrotnie z powodzeniem używany zarówno w naszym, jak i innych ośrodkach (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol]; Ciechanowicz *et al.*, 2006; De Winter *et al.*, 1997 [Eur J Pharmacol]).



W badaniach wstępnych, przeprowadzony w celu oceny czy przeprowadzenie standaryzowanych zabiegów ma wpływ na pasaż jelitowy barwnika obserwowano, iż zwiększenie inwazyjności bodźca zastosowanego podczas operacji ma proporcjonalny wpływ na spowolnienie pasażu substancji znacznikowej. W grupie szczurów, u których wykonano jedynie nacięcie skóry, obserwowano spowolnienie pasażu barwnika o 9,2 % w porównaniu do szczurów, u których nie wykonano żadnych procedur (grupa UT). Analiza statystyczna nie wykazała istotności statystycznej tego spowolnienia. W kolejnych grupach obserwowano natomiast bardziej nasilone i statystycznie istotne spowolnienie pasażu błękitu Evansa w jelicie. W grupie, w której zastosowano laparotomię obserwowano zmniejszenie pasażu jelitowego barwnika Evansa o 46,2 % w porównaniu do grupy UT, natomiast w grupie, w której dodatkowo wykonano masaż jelit zmniejszenie pasażu barwnika wynosiło 79,3 %, w porównaniu do grupy UT. Podobne efekty obserwowali inni badacze używający wybranego modelu (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol]; Korolkiewicz *et al.*, 2003; Ciechanowicz *et al.*, 2006). Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż zarówno wykonana w sposób standaryzowany laparotomia, jak i masaż jelit, wywołuje istotne statystycznie spowolnienie perystaltyki, podobne do tego, które obserwuje się w pooperacyjnej niedrożności jelit. Szybkość powrotu perystaltyki, oraz nasilenie pasażu jelitowego barwnika badane jest w wybranym modelu w sposób powtarzalny, co pozwoliło przeprowadzić kolejne etapy eksperymentów z użyciem badanych substancji.

Badane w toku tej pracy substancje podawano dootrzewnowo na 2 godziny przed planowanym zabiegiem przy użyciu cienkiej igły, w sposób jak najmniej traumatyczny. Wadą tej drogi podania jest fakt, iż aby lek podawany dootrzewnowo przeszedł do krwiobiegu, musi najpierw zostać wchłonięty z powierzchni otrzewnej. Część leku

wchłaniana przez otrzewną trzewną przechodzi przez krążenie wrotne do wątroby, podlegając efektowi pierwszego przejścia. W przypadku żadnego z użytych związków efekt ten nie ma jednak większego znaczenia. Z drugiej strony, powierzchnia otrzewnej jest duża, co zapewnia dobre wchłanianie, a podanie leku na 2 godziny przed zabiegiem zapewnia odpowiednią ilość czasu na prawidłowe jego wchłanianie. Inną wadą tej drogi podania jest fakt, iż ewentualna niewchłonięta część podanego leku znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie organu badanego, tj. jelita cienkiego. Rozważano też alternatywne drogi podania, jednakże każda z nich posiadała ograniczenia uniemożliwiające jej użycie. Droga dożylna jest trudna technicznie, ponieważ dostępne naczynia szczura są niewielkie, a precyzja niezbędna do prawidłowego nakłucia naczynia i podania leku wymagałby wstępnego znieczulenia ogólnego. Ponadto po podaniu drogą dożylną substancje takie jak propranolol czy metoprolol mogłyby spowodować hipotonię, nasiloną bradykardię, czy nawet wywołać przejściowy blok serca. Inne substancje jak fentolamina czy prazosyna, mogłyby spowodować nasiloną hipotonię wywołaną rozkurczem naczyń. Z kolei podanie domięśniowe zostało zdyskwalifikowane ze względu na objętość rozpuszczalnika niezbędną do przygotowania podawanych leków.

Rozpoczynając ocenę znaczenia uzyskanych wyników należy zwrócić uwagę na efekt obserwowany po zastosowaniu nioselektywnego antagonisty receptorów beta-adrenergicznych, propranololu. W toku badań zaobserwowano istotne statystycznie przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika po podaniu dawek 30 i 45 mg/kg m.c. propranololu. Dalsze zwiększanie dawek do 60 i 100 mg/kg m.c. powodowało śmierć większości badanych zwierząt ze względu na działanie na receptory beta1 adrenergiczne w sercu i wywoływane efekty krążeniowe. Zwiększenie pasażu barwnika

w jelicie po zastosowaniu propranololu było niewielkie i osiągało dla dawek 30 i 45 mg/kg m.c. odpowiednio 40% i 38,3 % pasażu obserwowanego w grupie UT.

W kolejnych badaniach stwierdzono, iż propranolol nie wykazywał efektu przyspieszającego na pasaż barwnika po zastosowaniu go u szczurów, u których wykonano jedynie znieczulenie eterem lub jedynie laparotomię.

Propranolol jest antagonistą nieselektywnym, blokującym zarówno receptory beta1, jak i beta2 adrenergiczne. Kolejne badania miały na celu próbę oceny czy selektywna blokada poszczególnych podtypów receptorów beta1, 2 i 3-adrenergicznych wywoła podobny efekt na perystaltykę jak propranolol. Uzyskane wyniki badań wskazują jednak na brak istotnego statystycznie wpływu zastosowania metoprololu, ICI-118,551 oraz SR58894A na przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika. Powyższe wyniki mogą wskazywać na fakt, iż to nie działanie receptorowe propranololu stoi za zwiększeniem pasażu barwnika po jego zastosowaniu przed operacją.

W piśmiennictwie można znaleźć sprzeczne informacje na temat wpływu propranololu na pasaż jelitowy w pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów. W badaniu przeprowadzonym u pacjentów poddanych resekcji jelita grubego stwierdzono, iż dożylnie podawanie propranololu skraca czas do wystąpienia stolca (Hallerbäck *et al.*, 1987). W innym badaniu stwierdzono, iż podawanie doustne propranololu rozpoczęte przed i kontynuowane po zabiegu operacyjnym nie skraca czasu trwania niedrożności, oraz pozostaje bez wpływu na aktywność elektryczną jelita grubego (Ferraz *et al.*, 2001). W obu przypadkach podawano dawki znacznie niższe niż zastosowane w niniejszej pracy.

Do próby wyjaśnienia wpływu propranololu na przyspieszenie pasażu barwnika w zastosowanym modelu pooperacyjnej niedrożności jelit należy rozważyć jego dodatkowe własności farmakodynamiczne. Lek ten jest nie tylko modelowym, nieselektywnym antagonistą receptorów beta1 i beta 2-adrenergicznych. W dużych dawkach przypisuje się mu także działanie stabilizujące błony komórkowe podobne do lidokainy. Ustalono, iż efekt ten jest niezależny od blokady receptorów adrenergicznych, ponieważ występuje również po zastosowaniu stereoizomeru R(+) (dawniej określanego jako d-propranolol), który ma około 100 razy słabsze powinowactwo do receptora beta od stereoizomeru S(-) propranololu (Mehvar *et al.*, 2001). Ponadto efekt ten nie był obserwowany po zastosowaniu metoprololu. Stwierdzono, iż działanie to oparte jest na hamowaniu aktywności zależnych od napięcia kanałów sodowych (Wang *et al.*, 2010). Wpływ na kanały sodowe może wywoływać działanie znieczulające miejscowo. Co więcej, w badaniach *in vitro* obserwowano także działanie anty-oksydacyjne propranololu stosowanego w dużych dawkach. Działanie to polegało na zmniejszeniu produkcji rodników tlenowych związanym z neutralizowaniem przez propranolol działania na błonę komórkową neutrofilii człowieka takich cytokin prozapalnych jak: fosfolipidy, LPC, PAF czy LPAF. Podobnie jak w przypadku poprzedniej cytowanej pracy, w tym badaniu obserwowano jednakową skuteczność obu stereoizomerów propranololu, a także nie obserwowano go po zastosowaniu innych beta-blokerów, w tym metoprololu (Anderson *et al.*, 1996). Inni autorzy obserwowali obecność na powierzchni makrofagów receptorów beta2-adrenergicznych. Po zastosowaniu propranololu obserwowano zmniejszenie produkcji wolnych rodników tlenowych w makrofagach, co wiązano z blokowaniem przez ten lek receptorów beta2-adrenergicznych. Nie stosowano jednak w tym badaniu żadnego z

selektywnych antagonistów receptorów beta-adrenergicznych, co nie pozwala potwierdzić, iż to właśnie antagonizm względem receptora beta-2 adrenergicznego, a nie działanie stabilizujące błony komórkowe, jest odpowiedzialne za ten efekt (Shen *et al.*, 1994).

W trakcie badań wykonanych w ramach tej pracy podawano propranolol drogą dootrzewnową, w stosunkowo dużych dawkach wynoszących 30 i 45 mg/kg m.c. W oparciu o wyniki uzyskane w tej pracy nie można jednoznacznie określić mechanizmu przyspieszenia pasażu barwnika po premedykacji propranololem. Obserwacja, iż efekt działania leku pojawia się w stosunkowo dużych dawkach, oraz brak efektu na pasaż jelitowy barwnika po podaniu selektywnych antagonistów receptorów adrenergicznych beta1, 2 i 3, pozwala na wysunięcie hipotezy, iż obserwowane przyspieszenie pasażu barwnika może być związane z działaniem stabilizującym błony propranololu, wywołującym efekt miejscowo znieczulający oraz anty-oksydacyjny na neutrofile.

Dawki propranololu niezbędne do wywołania tego efektu są tak duże, iż w przypadku zastosowania ich u ludzi doszłoby do nasilonych działań niepożądanych ze strony układu sercowo-naczyniowego, jak hipotonia, bradykardia czy blokada układu bodźcoprzewodzącego serca. Ogranicza to, lub wręcz uniemożliwia, praktyczną aplikację propranololu w takich dawkach, w pooperacyjnej niedrożności jelit u ludzi, ale otwiera drogę do poszukiwania selektywnego związku wpływającego na aktywność elektryczną jelit i wywołującego efekt anty-oksydacyjny, ale pozbawionego niekorzystnych działań na układ krążenia.

Ponadto należy zwrócić uwagę, iż we wspomnianym już wcześniej kontrolowanym badaniu prospektywnym przeprowadzonym na ludziach, w którym oceniano wpływ

akceptowalnych dawek propranololu wynoszących 80-160 mg na dobę, nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w skracaniu objawów pooperacyjnej niedrożności jelit, jak i mierzonej bezpośrednio aktywności elektrycznej jelit po zastosowaniu propranololu w porównaniu z placebo (Farraz *et al.*, 2001). Z tego powodu nie przeprowadzono dalszych badań związanych z wpływem propranololu na kurczliwość jelita w izolowanych preparatach jelita.

Kolejny etap doświadczeń obejmował wpływ antagonistów receptorów alfa-adrenergicznych na pasaż jelitowy barwnika Evansa. Nie obserwowano przyspieszenia pasażu barwnika po zastosowaniu nieselektywnego antagonisty receptorów alfa-adrenergicznych fentolaminy, ani po zastosowaniu antagonisty receptorów alfa1-adrenergicznych prazosyny.

Przyspieszenie pasażu barwnika zaobserwowano natomiast po zastosowaniu johimbiny we wszystkich podanych dawkach. Efekt przyspieszenia pasażu barwnika był zależny od dawki i osiągnął maksymalną wielkość po podaniu 10 mg/kg m.c. Istotność statystyczną na założonym poziomie  $p < 0,05$  uzyskano dla dawek 10 i 30 mg/kg m.c. dla których obserwowany pasaż barwnika wynosił odpowiednio 71,9% i 54,9 % pasażu barwnika osiągniętego w grupie UT.

Aby wyjaśnić ochronne działanie johimbiny na pracę jelit po laparotomii i operacyjnym masażu jelit należy przypomnieć, iż lek ten jest antagonistą receptorów alfa2-adrenergicznych. Są to receptory obecne zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie jako receptory presynaptyczne, a także na obwodzie, w mięśniówce gładkiej, adipocytach, płytkach krwi czy monocytach. I to właśnie obecność receptorów alfa-2 adrenergicznych w mięśniówce przewodu pokarmowego oraz na monocytach wydaje

się odgrywać kluczową rolę w ochronnym działaniu johimbiny w pooperacyjnej niedrożności jelit.

Jak zaznaczono w rozdziale 1 tej pracy pooperacyjna niedrożność jelit składa się z dwóch faz: wczesnej i późnej. Dowiedziono, iż kluczową rolę w ocenianej w tej pracy fazie wczesnej spowalniania pasażu jelitowego u gryzoni po masażu jelit odgrywają odruchy z nocyceptorów i mechanoreceptorów jelita powodujące aktywację układu współczulnego oraz układu określanego jako nieadrenergiczny i nieadrenergiczny (Boeckstaens *et al.*, 1999; Boeckstaens *et al.*, 2000; De Winter *et al.*, 1998). Zastosowanie leków o działaniu sympatykolytycznym, jak rezerpina czy guanetydyna, przed operacją laparotomii i masażu jelit powodowało zmniejszenie hamującego działania zabiegu na pasaż jelitowy (De Winter *et al.*, 1997 [Br J Pharmacol]), czy poprawę opróżniania żołądka u myszy (De Jonge *et al.*, 2003).

Należy podkreślić, rola receptorów alfa-2 adrenergiczne nie ogranicza się jedynie do roli autoreceptorów, regulujących wydzielanie noradrenaliny w zakończeniach neuronów adrenergicznych. Funkcjonują one także jako heteroreceptory w innych komórkach nerwowych, w tym cholinergicznym. Stwierdzono, że u wielu gatunków zwierząt laboratoryjnych pobudzenie receptorów alfa-2 adrenergicznych powoduje zahamowanie wydzielania acetylocholino z cholinergicznym zakończeniach nerwowych. Jest to spowodowane zmniejszeniem napływu jonów wapnia ( $Ca^{2+}$ ) do komórek nerwowych, prawdopodobnie w związku z hiperpolaryzacją błony komórkowej wtórnej do zwiększonej przepuszczalności dla jonów potasu (Langer, 1997). Receptory alfa-2 adrenergiczne są zlokalizowane presynaptycznie między innymi w układzie pokarmowym i regulują jego motorykę. Upośledzenie uwalniania acetylocholino w

odpowiedzi na stymulację adrenoreceptorów powoduje upośledzenie kurczliwości mięśniówki jelita cienkiego (Fuder *et al.*, 1995) i mięśniówki żołądka w warunkach *in vitro* (Yokotani *et al.*, 1993). Należy podkreślić, iż przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika po premedykacji przed zabiegiem johimbina w optymalnej dawce 10 mg/kg m.c. nie przywraca pasażu jelitowego do poziomu obserwowanego u szczurów poddanych jedynie znieczuleniu eterowemu (E) bez przeprowadzania jakichkolwiek zabiegów operacyjnych. Ponadto johimbina nie wpływa na pasaż jelitowy barwnika u szczurów poddanych wyłącznie znieczuleniu eterowemu (E+J10). Wskazuje to na fakt, iż upośledzenie wydzielania acetylocholiny w odpowiedzi na stymulację adrenergiczną jest mało istotnym, a już na pewno nie jest jedynym czynnikiem odpowiadającym za upośledzenie pasażu jelitowego w pooperacyjnej niedrożności jelit.

Potwierdzeniem tej tezy może być ponadto obserwacja, iż johimbina podana przed zabiegiem u szczurów poddanych jedynie laparotomii nie zwiększa statystycznie istotnie pasażu błękitu Evansa w porównaniu do szczurów poddanych laparotomii, u których nie stosowano johimbiny. Podanie johimbiny powodowało migrację barwnika u szczurów poddanych laparotomii do 60 % pasażu barwnika obserwowanego u szczurów UT, podczas gdy u szczurów niepoddanych interwencji farmakologicznej laparotomia powodowała migrację barwnika osiagającą 53,8 % pasażu obserwowanego w grupie UT.

Innym mechanizmem, poprzez który alfa-2 adrenoreceptory wpływają na upośledzenie pasażu jelitowego po masażu jelit jest ich wpływ na komórki zapalne układu fagocytów jednojądrzastych. Efekt ten rozpoczyna się już po kilkudziesięciu minutach od operacji. Potwierdzono, iż w mięśniówce jelit poddanych masażowi dochodzi do znacznej



infiltracji przez leukocyty, co koreluje ze stopniem nasilenia pooperacyjnej niedrożności jelit (Kalff *et al.*, 1998, Kalff *et al.*, 1999). Nie stwierdzono jednak, aby podanie johimbiny zmniejszało infiltrację mięśniówki przewodu pokarmowego poddanego masażowi jelit przez leukocyty (Kreiss *et al.*, 2004), co pozwala sądzić, iż to jej wpływ na funkcję komórek odpornościowych, raczej niż na ich ilość, odpowiada za efekt tego leku w zmniejszaniu nasilenia pooperacyjnej niedrożności jelit. Stwierdzono, iż pobudzenie alfa-2 adrenoreceptorów przez uwalnianą odruchowo w trakcie zabiegu noradrenalinę powoduje zwiększenie ekspresji mRNA indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), co powoduje zwiększenie produkcji tlenu azotu w makrofagach rezydujących w mięśniówce jak i leukocytach infiltrujących ją po masażu jelit u gryzoni. (Kreiss *et al.*, 2004). Należy podkreślić, iż tlenek azotu (NO) jest ważnym transmiterem o działaniu hamującym na perystaltykę przewodu pokarmowego. Wykazano, iż powoduje on hiperpolaryzację w mięśniówce okrężnej jelit i hamuje jej spontaniczną kurczliwość (Stark *et al.*, 1993; Stark *et al.*, 1991; Zyromski *et al.*, 2001). Zahamowanie produkcji NO przez selektywnego antagonistę jego produkcji oraz brak jego syntezy u myszy „knock-out”, nieposiadających genu syntetazy iNOS zmniejszało podatność gryzoni na rozwój pooperacyjnej niedrożności jelit po ich masażu (Kalff *et al.*, 2000; Korolkiewicz *et al.*, 2003).

Stwierdzono także, przy pomocy metody HPLC-ED (High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection), iż makrofagi, jak i inne komórki jednojądrzaste układu odpornościowego mają zdolność do produkcji katecholamin (Cosentino *et al.*, 2000). Wykazano także, iż noradrenalina wydzielana przez makrofagi pobudzając receptory alfa2-adrenergiczne powoduje w sposób autokryny zwiększenie produkcji cytokin prozapalnych takich jak TNF-alfa. Co więcej wykazano, iż

zastosowanie antagonisty receptora alfa2-adrenergicznego powoduje zmniejszenie produkcji TNF-alfa stymulowanej w sposób autokryny przez makrofagi (Spengler *et al.*, 1994). Pozwala to sądzić, iż autostymulacja makrofagów przez wydzielaną przez nie noradrenalinę może stymulować również wydzielanie NO w mięśniówce jelit. Nie wyklucza to jednak wpływu na wydzielanie NO noradrenaliny wydzielanej z zakończeń neuronalnych (Kreiss *et al.*, 2003).

W moich badaniach wykazałem, iż zastosowanie L-NAME, który jest inhibitorem iNOS u gryzoni powodowało w dawce 30 mg/kg istotne przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika Evansa w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) po masażu jelit osiągające 47,7 % pasażu barwnika obserwowanego w grupie UT. Wyniki te były zbieżne z uzyskanymi we wcześniejszych innych badaniach prowadzonych w naszej Katedrze (Korolkiewicz *et al.*, 2004).

W moich badaniach zastosowanie łączne johimbiny w optymalnej dawce 10 mg/kg w połączeniu z L-NAME w dawce 30 mg/kg nie wykazywało efektu synergistycznego, a przyspieszenie pasażu barwnika Evansa, które było istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) osiągnęło 45,94% pasażu barwnika obserwowanego u szczurów niepoddanych żadnym zabiegom (UT). Pozwala to domniemywać, że efekt działania johimbiny, przynajmniej częściowo opiera się na zmniejszeniu indukcji iNOS i produkcji tlenu azotu (NO).

Co więcej, wpływ łącznego zastosowania L-NAME z johimbina na pasaż jelitowy był mniejszy, niż zastosowanie samej johimbiny w dawce 10 mg/kg, gdzie obserwowano pasaż barwnika Evansa osiągający 71,9% pasażu w grupie UT. Wskazuje to na fakt, iż johimbina poza wpływem na receptory alfa2-adrenergiczne układu fagocytów

jednojądrzastych ma również inne mechanizmy ochronnego działania na pasaż jelitowy we wczesnej fazie pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów, a zastosowanie łącznie z L-NAME zmniejsza ten efekt. Nie opisano wcześniej w piśmiennictwie efektu wspólnego zastosowania inhibitora iNOS i antagonisty receptora alfa2-adrenergicznego, wobec czego trudno jest określić, dlaczego łącznie ich stosowanie zmniejsza efekt ochronny johimbiny. Obserwacja ta wymaga dalszych badań.

Ciekawą obserwacją jest fakt, iż johimbina zastosowana w optymalnej dawce 10 mg/kg łącznie z propranololem w dawce 30 mg/kg powodowała nieznacznie mniejsze przyspieszenie pasażu barwnika Evansa w porównaniu do grupy, w której zastosowano samą johimbinę w dawce optymalnej, jednakże bez istotnej statystycznie różnicy (odpowiednio 60,6% i 71,9 % pasażu barwnika obserwowanego w grupie UT). W badaniach przeprowadzonych przez innych badaczy potwierdzono, iż makrofagi posiadają zarówno receptory alfa2-adrenergiczne, jak i beta-2 adrenergiczne. W badaniach *in vitro* zablokowanie receptorów alfa-2 adrenergicznych idazoksanem (który jest antagonistą tych receptorów, a także receptorów imidazolinowych) powodowało zmniejszenie produkcji wolnych rodników tlenowych, a także zmniejszenie stężenia azotynów w makrofagach. Z kolei zastosowanie propranololu, jak opisano powyżej, powodowało w makrofagach jedynie zmniejszenie produkcji wolnych rodników tlenowych. Efekt ten przypisywano blokadzie przez propranolol receptorów beta2-adrenergicznych na powierzchni makrofagów, jednakże nie potwierdzono tego poprzez zastosowanie selektywnego antagonisty receptora beta2-adrenergicznego. Stwierdzono także, iż łącznie zastosowanie idazoksanu i propranololu ma częściowo antagonistyczne działanie względem siebie, co jest spójne z przeprowadzonymi w toku tej pracy badaniami *in vivo* (Shen *et al.*, 1994).

Podsumowując, wykonane badania pozwalają stwierdzić, iż zarówno zastosowanie propranololu, jak i johimbiny przed planowanym zabiegiem operacyjnym w zastosowanym modelu pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów powodowało istotne statystycznie przyspieszenie pasażu barwnika w jelicie w porównaniu do szczurów niepoddanych farmakoterapii. Skuteczniejszym lekiem okazała się johimbina, jednakże nie przywracała ona pasażu jelitowego błękitu Evansa do poziomu obserwowanego w grupie niepoddanej żadnym zabiegom. Jednocześnie łączne zastosowanie optymalnych dawek propranololu i johimbiny nie wpływało synergistycznie na przyspieszenie pasażu barwnika w zastosowanym modelu. Ponadto zaobserwowano, iż jednoczesne podanie johimbiny z L-NAME nie wykazywało działania synergistycznego na zwiększenie zahamowanego masażem jelit pasażu barwnika w jelicie, a pasaż błękitu Evansa w tej grupie był mniejszy, niż w grupie, w której podano jedynie optymalną dawkę johimbiny.

Wykonane badania nie pozwalają jednoznacznie określić mechanizmu działania ochronnego johimbiny i propranololu na pasaż jelitowy u szczurów w modelu pooperacyjnej niedrożności jelit. Wiadomo, iż pooperacyjna niedrożność jelit jest procesem wieloczynnikowym. W jej patogenezie opisano rolę wielu czynników i układów, w tym: rozległości zabiegu operacyjnego, typu zabiegu (laparoskopowy/klasyczny), układu adrenergicznego, mediatorów zapalnych, wolnych rodników tlenowych, tlenku azotu wydzielanego w odpowiedzi na indukcję NOS, tachykinin, opioidów stosowanych w trakcie zabiegu operacyjnego, a także leków stosowanych do znieczulenia ogólnego. Praca ta skupiała się na systematycznej ocenie roli poszczególnych podtypów receptorów adrenergicznych w patogenezie tej jednostki chorobowej. Wykonane badania potwierdziły, iż układ adrenergiczny

aktywowany w trakcie zabiegu na jamie brzusznej i obejmującego masaż jelit ma hamujący wpływ na perystaltykę jelit oraz pasaż jelitowy we wczesnej fazie pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów. Uzyskane wyniki sugerują jednocześnie, iż układ adrenergiczny nie jest jedynym czynnikiem wywołującym porażenie jelit, a patogeneza pooperacyjnej niedrożności jelit jest w istocie wieloczynnikowa, gdyż pasaż jelitowy barwnika Evansa obserwowany *in vivo* po podaniu johimbiny czy propranololu nie był przywracany do poziomu obserwowanego u szczurów niepoddawanych zabiegom operacyjnym.

## 6. Wnioski

1. Wpływ katecholamin wydzielanych w trakcie masażu jelit jest jednym z istotnych czynników w patogenezie pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów
2. Spośród badanych antagonistów receptorów adrenergicznych jedynie zastosowanie propranololu oraz johimbiny powodowało efekt przyspieszający pasaż jelitowy po zabiegu operacyjnym obejmującym masaż jelit, przy czym nie obserwowano synergistycznego efektu przy jednoczesnym zastosowaniu obu leków w optymalnych dawkach
3. W oparciu o przeprowadzone badania nie można jednoznacznie określić mechanizmu ochronnego działania propranololu na pasaż jelitowy. Brak efektu po selektywnych antagonistach poszczególnych podtypów receptorów beta1, 2 i 3-adrenergicznych może sugerować, iż mechanizmem odpowiedzialnym za ten efekt może być obserwowane bardzo przy dużych stężeniach propranololu działanie stabilizujące błony, wywołujące znieczulenie miejscowe oraz efekt anty-oksydacyjny
4. Działanie ochronne johimbiny na pasaż jelitowy w pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów związane jest z blokadą receptora alfa2 adrenergicznego. Uzyskane wyniki wykazujące brak synergistycznego efektu johimbiny z L-NAME sugerują, iż głównym mechanizmem działania johimbiny w pooperacyjnej niedrożności jelit może być jej działanie na receptory alfa-2 adrenergiczne w układzie fagocytów jednojądrzastych rezydujących w mięśniówce jelit,

powodujące zmniejszenie indukcji iNOS i spadek produkcji tlenu azotu oraz wolnych rodników tlenowych

5. Dodatkowym, ale mało istotnym działaniem johimbiny może być oddziaływanie na heteroreceptory alfa-2 adrenergiczne w neuronach cholinergicznym. Ich zablokowanie powoduje zniesienie hamującego działania noradrenaliny na wydzielanie acetylocholiny w cholinergicznym zakończeniach nerwowych układu pokarmowego i nasilenie perystaltyki
6. Przeprowadzone badania pozwalają wysnuć wniosek, iż johimbina mogłaby znaleźć zastosowanie w zapobieganiu rozwojowi lub zmniejszeniu nasilenia pooperacyjnej niedrożności jelit u ludzi. W piśmiennictwie nie ma dotąd prac oceniających jej skuteczność u pacjentów poddawanych zabiegom operacyjnym na jamie brzusznej.

## 7. Piśmiennictwo

- Anderson R, Ramafi G, Theron AJ: Membrane stabilizing, anti-oxidative interactions of propranolol and dexpropranolol with neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 1996 Jul 26;52:341-9.
- Barthó L, Holzer P, Lembeck F: Sympathetic control of substance P releasing enteric neurones in the guinea pig ileum. *Neurosci Lett.* 1983 Aug 8;38:291-6.
- Bauer AJ, Boeckxstaens GE: Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Oct;16 Suppl 2:54-60. Review.
- Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH: Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology.* 1991; 101: 970–6.
- Bauer AJ, Szurszewski JH: Effect of opioid peptides on circular muscle of canine duodenum. *J Physiol.* 1991; 434: 409–22.
- Bedirli A, Salman B, Yuksel O: Laparoscopic versus Open Surgery for Colorectal Cancer: A Retrospective Analysis of 163 Patients in a Single Institution. *Minim Invasive Surg.* 2014; 2014:530314.
- Behm B, Stollman N: Postoperative ileus: Etiologies and Interventions. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003; 1:71-80.
- Berntson G, Sarter M, Cacioppo J: Autonomic Nervous System. *Encyclopedia of Cognitive Science.* Published Online: 15 Jan 2006.
- Boeckxstaens GE, Hirsch DP, Kodde A, Moojen TM, Blackshaw A, Tytgat GN, Blommaert PJ: Activation of an adrenergic and vagally-mediated NANC pathway in



- surgery-induced fundic relaxation in the rat. *Neurogastroenterol Motil.* 1999 Dec;11:467-74.
- Boeckstaens GE, Hollmann M, Heisterkamp SH, Robberecht P, de Jonge WJ, van Den Wijngaard RM, Tytgat GN, Blommaart PJ: Evidence for VIP(1)/PACAP receptors in the afferent pathway mediating surgery-induced fundic relaxation in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000 Oct;131:705-10.
  - Bouras EP, Burton DD, Camilleri M et al.: Effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on gastric emptying and small intestinal transit in humans. *Neurogastroenterol Motil.* 2004, 16, 729.
  - 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.
  - Burnstock G: The journey to establish purinergic signalling in the gut. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 May;20 Suppl 1:8-19.
  - Ciechanowicz R, Sein-Anand J, Chodorowski Z, Bitel M, Petruszewicz J, Korolkiewicz RP: Salutary effects of tachykinin receptor antagonists in a rat model of postoperative ileus. *J Surg Res.* 2006 Jun 15;133:197-202. Epub 2006 Feb 17.
  - Coman OA, Păunescu H, Ghiță I, Coman L, Bădărăru A, Fulga I: Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. *Rom J Morphol Embryol.* 2009;50:169-79.
  - Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Marino F, Rasini E, Maestroni GJ, Conti A, Boveri M, Lecchini S, Frigo G: HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci.* 2000 Dec 8;68:283-95.

- Costa M, Brookes SJH, Hennig GW: Anatomy and physiology of the enteric nervous system, *Gut*. 2000;47: Chapter 2.
- De Jonge WJ, Van Den Wijngaard RM, The FO et al.: Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology*. 2003; 125: 1137–47.
- De Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE: Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005 Aug;6:844-51. Epub 2005 Jul 17. Erratum in: *Nat Immunol*. 2005 Sep;6:954.
- De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA: Effects of mu- and kappa-opioid receptors on postoperative ileus in rats. *Eur J Pharmacol*. 1997 Nov 19;339:63-7.
- 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 Feb;120:464-8.
- De Winter BY, Robberecht P, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA: Role of VIP1/PACAP receptors in postoperative ileus in rats. *Br J Pharmacol*. 1998 Jul;124:1181-6.
- Del Tacca M, Soldani G, Selli M, Crema A: Action of catecholamines on release of acetylcholine from human taenia coli. *Eur J Pharmacol*. 1970 Jan;9:80-4.
- Dessy C, Balligand JL: Beta3-adrenergic receptors in cardiac and vascular tissues emerging concepts and therapeutic perspectives. *Adv Pharmacol*. 2010;59:135-63.

- Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD: Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*. 1989 Sep 8;245:1118-21.
- Ferraz AA, Wanderley GJ, Santos MA Jr, Mathias CA, Araújo JG Jr, Ferraz EM: Effects of propranolol on human postoperative ileus. *Dig Surg*. 2001;18(4):305-10.
- Fuder H, Muscholl E: Heteroreceptor-mediated modulation of noradrenaline and acetylcholine release from peripheral nerves. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1995;126:265-412.
- Fukuda H, Tsuchida D, Koda K, Miyazaki M, Pappas TN, Takahashi T: Impaired gastric motor activity after abdominal surgery in rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Apr;17:245-50.
- Fukuda H, Tsuchida D, Koda K, Miyazaki M, Pappas TN, Takahashi T: Inhibition of sympathetic pathways restores postoperative ileus in the upper and lower gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2007 Aug;22:1293-9.
- Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT: Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res*. 1996 May;78:737-49.
- Hallerbäck B, Carlsen E, Carlsson K, Enkvist C, Glise H, Haffner J, Innes R, Kirnö K: Beta-adrenoceptor blockade in the treatment of postoperative adynamic ileus. *Scan J Gastroenterol*. 1987 Mar;22:149-55
- Holte K, Kehlet H: Postoperative ileus; progress towards effective management. *Drugs*. 2002, 62, 2603.
- Holte K, Kehlet H: Prevention of postoperative ileus. *Minerva Anesthesiol*. 2002, 68, 152.

- Holzer P, Lippe IT, Holzer-Petsche U: Inhibition of gastrointestinal transit due to surgical trauma or peritoneal irritation is reduced in capsaicin-treated rats. *Gastroenterology*. 1986, 91, 360.
- Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM: Stoichiometry of neurally induced VIP release, NO formation, and relaxation in rabbit and rat gastric muscle. *Am J Physiol*. 1996 Aug;271:G357-69.
- Jonakait GM, Tamir H, Gintzler AR, Gershon MD: Release of [3H]serotonin and its binding protein from enteric neurons. *Brain Res*. 1979 Sep 28;174:55-69.
- Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ: Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology*. 1999 Aug;117:378-87.
- Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ: Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology*. 2000 Feb;118:316-27.
- Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ: Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg*. 1998 Nov;228:652-63.
- Katzung BG, Masters S, Trevor A: *Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition*. Lange. 2012.
- Kelley MC, Hocking MP, Marchand SD, Sninsky CA: Ketorolac prevents postoperative small intestinal ileus in rats. *Am J Surg*. 1993, 165, 107.
- Korolkiewicz RP, Sein-Anand J, Ruczyński J, Rekowski P, Bieniaszewski L, Chodorowski Z, Petruszewicz J, Ujda M, Dabkowski J, Bitel M, Kato S, Takeuchi K: The role and interactions of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and

prostanoids in the pathogenesis of postoperative ileus in rats. *J Gastrointest Surg.* 2004 Mar-Apr;8:346-57.

- Korolkiewicz RP, Ujda M, Dabkowski J, Ruczyński J, Rekowski P, Petruszewicz J: Differential salutary effects of nonselective and selective COX-2 inhibitors in postoperative ileus in rats. *J Surg Res.* 2003 Feb;109:161-9.
- Kreiss C, Birder LA, Kiss S, VanBibber MM, Bauer AJ: COX-2 dependent inflammation increases spinal Fos expression during rodent postoperative ileus. *Gut.* 2003; 52: 527–34.
- Kreiss C, Toegel S, Bauer AJ: Alpha2-adrenergic regulation of NO production alters postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Sep;287:G658-66.
- Langer SZ: 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Mar;18:95-9. Review.
- Lee HT, Chung SJ, Shim CK: Small intestinal transit does not adequately represent postoperative paralytic ileus in rats. *Arch Pharm Res.* 2002, 25, 978.
- Lee CT, Chang SS, Kamat AM, Amiel G, Beard TL, Fergany A, Karnes RJ, Kurz A, Menon V, Sexton WJ, Slaton JW, Svatek RS, Wilson SS, Techner L, Bihrlé R, Steinberg GD, Koch M: Alvimopan accelerates gastrointestinal recovery after radical cystectomy: a multicenter randomized placebo-controlled trial. *Eur Urol.* 2014 Aug;66:265-72.
- Letarte F, Hallet J, Drolet S, Boulanger-Gobeil C, Bouchard A, Grégoire RC, Gagné JP, Thibault C, Bouchard P: Laparoscopic versus open colonic resection for

complicated diverticular disease in the emergency setting: a safe choice? A retrospective comparative cohort study. *Am J Surg.* 2014 Oct 12.

- Livingston E, Passaro E Jr: Postoperative ileus. *Dig Dis Sci.* 1990, 35, 121.
- Luckey A, Livingston E, Tache Y: Mechanisms and treatment of postoperative ileus. *Arch Surg.* 2003, 138, 206.
- Ługowska-Umer, H: Rola agonistów i antagonistów receptorów endotelinowych ETA i ETB w patogenezie pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów. Rozprawa doktorska. Gdańsk. 2009.
- Maggi CA, Catalioto RM, Criscuoli M, Cucchi P, Giuliani S, Lecci A, Lippi A, Meini S, Patacchini R, Renzetti AR, Santicioli P, Tramontana M, Zagorodnyuk V, Giachetti A: Tachykinin receptors and intestinal motility. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 Jun;75:696-703.
- Marderstein E., Delaney C. Management of postoperative ileus: focus on alvimopan. *Ther Clin Risk Manag.* 2008; 4:965-73.
- Mehvar R, Brocks DR: Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *J Pharm Pharm Sci.* 2001 May-Aug;4:185-200.
- Molinoff PB: Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs.* 1984;28 Suppl 2:1-15.
- Philipp M, Brede M, Hein L: Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Aug;283:R287-95.
- 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: 1225–9.

- Rodriguez RW: Off-label uses of alvimopan and methylnaltrexone. *Am J Health Syst Pharm.* 2014 Sep 1;71:1450-5.
- 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.
- Schwarz NT, Kalff JC, Türler A et al.: Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology.* 2001; 121: 1354–71.
- Shen HM, Sha LX, Kennedy JL, Ou DW: Adrenergic receptors regulate macrophage secretion. *Int J Immunopharmacol.* 1994 Nov;16:905-10.
- Shen KZ, Barajas-Lopez C, Surprenant A: Functional characterization of neuronal pre and postsynaptic alpha 2-adrenoceptor subtypes in guinea-pig submucosal plexus. *Br J Pharmacol.* 1990 Dec;101:925-31.
- Shen KZ, Surprenant A: Mechanisms underlying presynaptic inhibition through alpha 2-adrenoceptors in guinea-pig submucosal neurones, *J Physiol.* 1990 Dec;431:609-28.
- Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL: Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol.* 1994 Mar 15;152:3024-31.
- Stark ME, Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH: Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. *Gastroenterology.* 1993 Feb;104:398-409.
- Stark ME, Bauer AJ, Szurszewski JH: Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *J Physiol.* 1991 Dec;444:743-61.
- Szurszewski JH, Krier J: Thoracic and lumbar sympathetic neural pathways to the gastrointestinal tract. *Peripheral Neuropathy.* 1983, p. 265-284.

- Tanila H, Kauppila T, Taira T: Inhibition of intestinal motility and reversal of postlaparotomy ileus by selective  $\alpha_2$ -adrenergic drugs in rat. *Gastroenterology*. 1993, 104, 819.
- Uemura K, Tatewaki M, Harris MB, Ueno T, Mantyh CR, Pappas TN et al.: Magnitude of abdominal incision affects the duration of postoperative ileus in rats. *Surg Endosc*. 2004; 18: 606–10.
- Vora A, Marchalik D, Nissim H, Kowalczyk K, Bandi G, McGeagh K, Lynch J, Venkatesan K, Ghasemian R, Hwang J, Hwang MV: Multi-institutional outcomes and cost effectiveness of using alvimopan to lower gastrointestinal morbidity after cystectomy and urinary diversion. *Can J Urol*. 2014 Apr;21:7222-7.
- Wang DW, Mistry AM, Kahlig KM, Kearney JA, Xiang J, George AL Jr: Propranolol blocks cardiac and neuronal voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol*. 2010 Dec 31;1:144.
- Widecka K: Leki alfa-adrenolityczne i działające centralnie. *Nadciśnienie Tętnicze*. 2007, suplement A.
- Wood JD, Alpers D, Andrews P: Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut Sep*. 1999; 45(Suppl 2): II6–II16.
- Wood JD: Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system. *Chin J Physiol*. 1999 Dec 31;42:201-10.
- Wright JW, Healy TEJ, Balfour TW, Hardcastle JD: Effects of inhalation anaesthetic agents on the electrical and mechanical activity of the rat duodenum. *Br J Anaesth*. 1982, 54, 1223.
- Yokotani K, Okuma Y, Nakamura K, Osumi Y: Release of endogenous acetylcholine from a vascularly perfused rat stomach in vitro; inhibition by M3 muscarinic

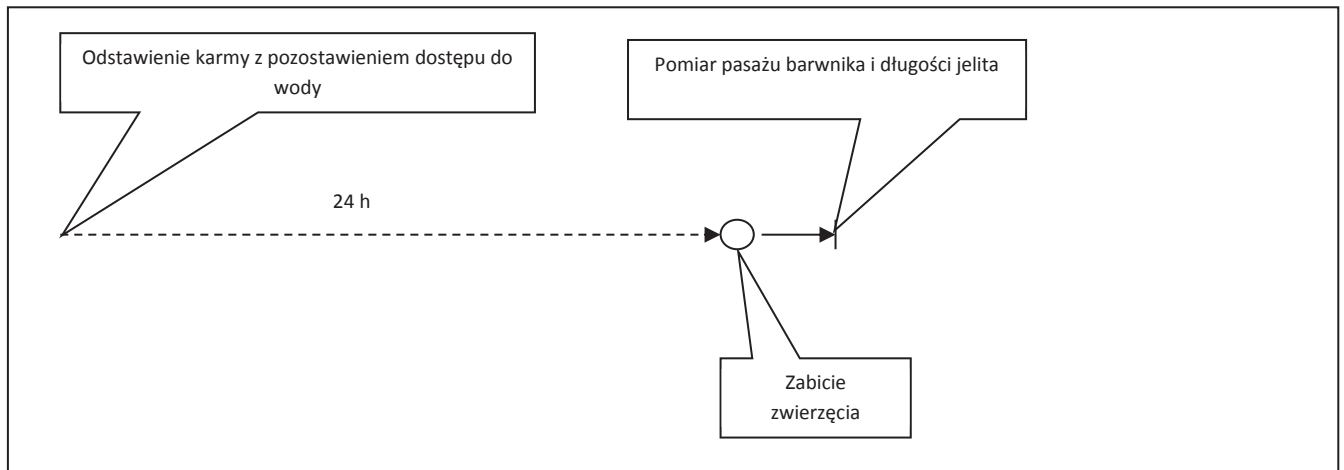


autoreceptors and alpha-2 adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Sep;266:1190-5.

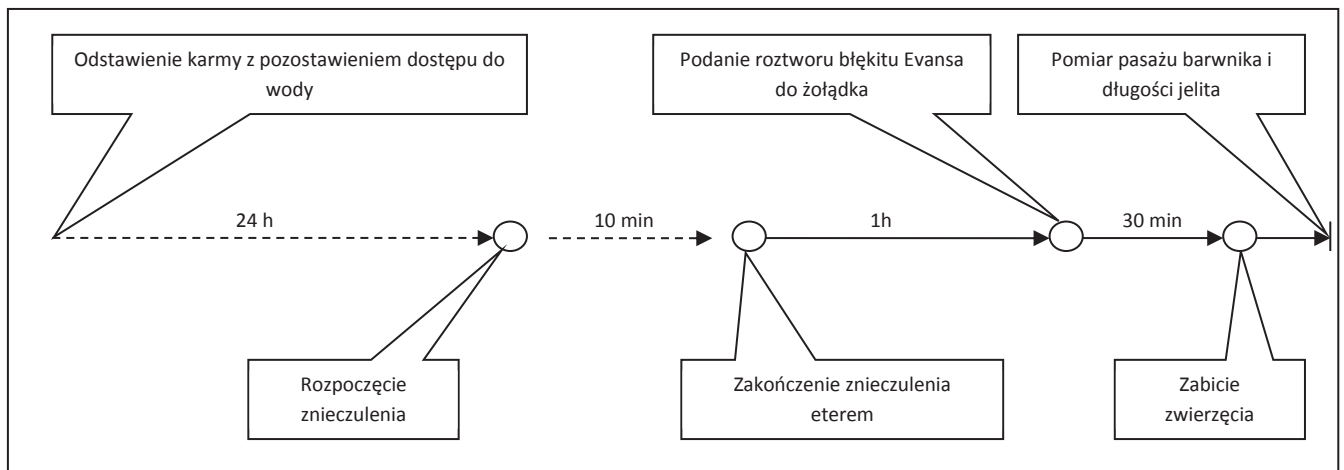
- Zittel TT, Lloyd KC, Rothenhofer I, Wong H, Walsh JH, Raybould HE: Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery.* 1998; 123: 518–27.
- Zittel TT, Meile T, Jehle EC, Becker HD: Intraperitoneal capsaicin treatment reduces postoperative gastric ileus in awake rats. *Langenbecks Arch Surg.* 2001 Apr;386:204-11.
- Zittel TT, Reddy SN, Plourde V, Raybould HE: Role of spinal afferents and calcitonin gene-related peptide in the postoperative gastric ileus in anesthetized rats. *Ann Surg.* 1994; 219: 79–87.
- Zittel TT, Rothenhofer I, Meyer JH, Raybould HE: Small intestinal capsaicin-sensitive afferents mediate feedback inhibition of gastric emptying in rats. *Am J Physiol.* 1994; 267: G1142–5.
- Zyromski NJ, Duenes JA, Kendrick ML, Balsiger BM, Farrugia G, Sarr MG: Mechanism mediating nitric oxide-induced inhibition in human jejunal longitudinal smooth muscle. *Surgery.* 2001 Sep;130:489-96.

## 8. Schematy, tabele i wykresy

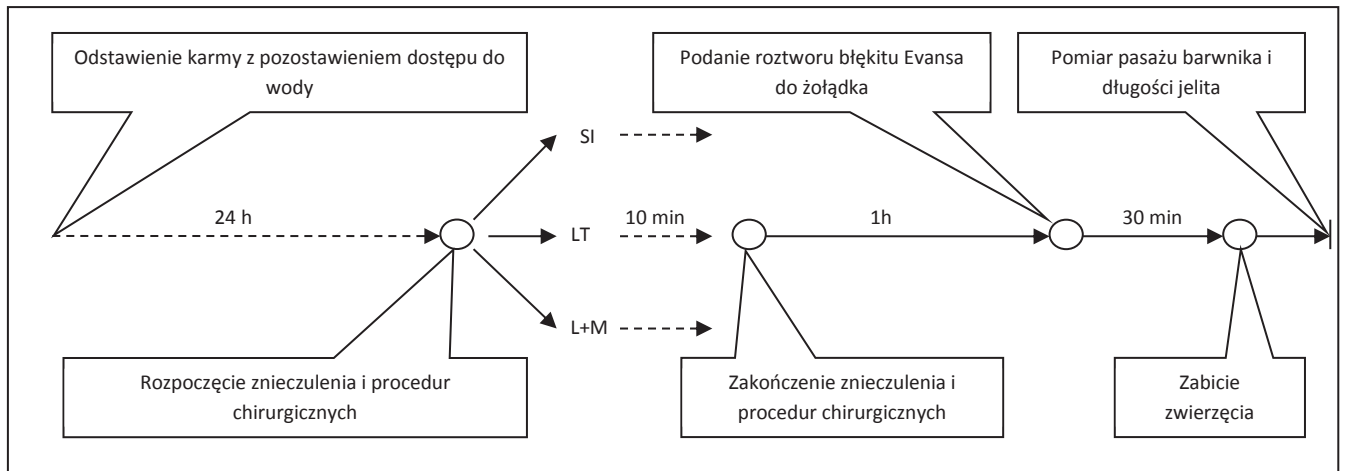
**Schemat 1.** Przebieg procedur w grupie niepoddanej żadnym doświadczeniom (UT).



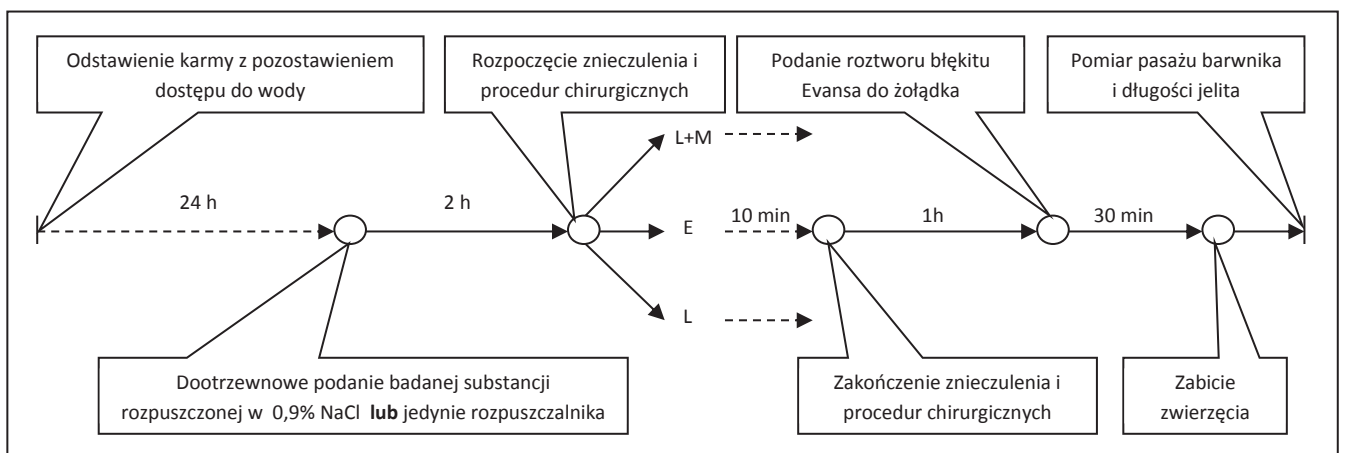
**Schemat 2.** Przebieg procedur w grupie poddanej jedynie znieczuleniu eterowemu (E)



**Schemat 3.** Przebieg procedur w grupach modelowych, w których wykonywano nacięcie skóry (SI), laparotomię (L) i laparotomię z masażem jelit (L+M).



**Schemat 4.** Przebieg procedur chirurgicznych oraz interwencje farmakologiczne we właściwym etapie badania wpływu antagonistów receptorów adrenergicznych i L-NAME na pasaż jelitowy barwnika Evansa w modelu pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów.



**Tabela 1.** Doświadczenia wstępne oceniające pasaż jelitowy w grupach kontrolnych.

Nazwa grupy	Symbol grupy
Szczury niepoddane żadnym procedurom	UT
Szczury poddane jedynie znieczuleniu eterem	E
Szczury poddane nacięciu skóry	SI
Szczury poddane laparotomii	L
Szczury poddane laparotomii oraz masażowi jelit	L+M

**Tabela 2.** Przebieg doświadczeń w grupach zwierząt badanych z zastosowaniem antagonistów receptorów beta-adrenergicznych.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Propranolol	10 - 45	P 10 – P 45
Metoprolol	2 - 100	M 2 – M 100
ICI 118551	0,3 - 10	I 0,3 – I 10
SR59230A	1 - 10	SR 1 – SR 10

**Tabela 3.** Przebieg doświadczeń w grupach zwierząt badanych z zastosowaniem antagonistów receptorów alfa-adrenergicznych.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Fentolamina	3 - 30	F 3 – P 30
Prazosyna	1 - 10	Pra 1 – Pra 10
Johimbina	3 - 30	J 3 – J 30

**Tabela 4.** Ocena wpływu najskuteczniejszych dawek propranololu i johimbiny po zastosowaniu znieczulenia eterem oraz laparotomii.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Znieczulenie eterem		E
Znieczulenie eterem i johimbina	10	E + J 10
Znieczulenie eterem i propranolol	30	E + P 30
Laparotomia		L
Laparotomia i johimbina	10	L + J 10
Laparotomia i propranolol	30	L + P 30

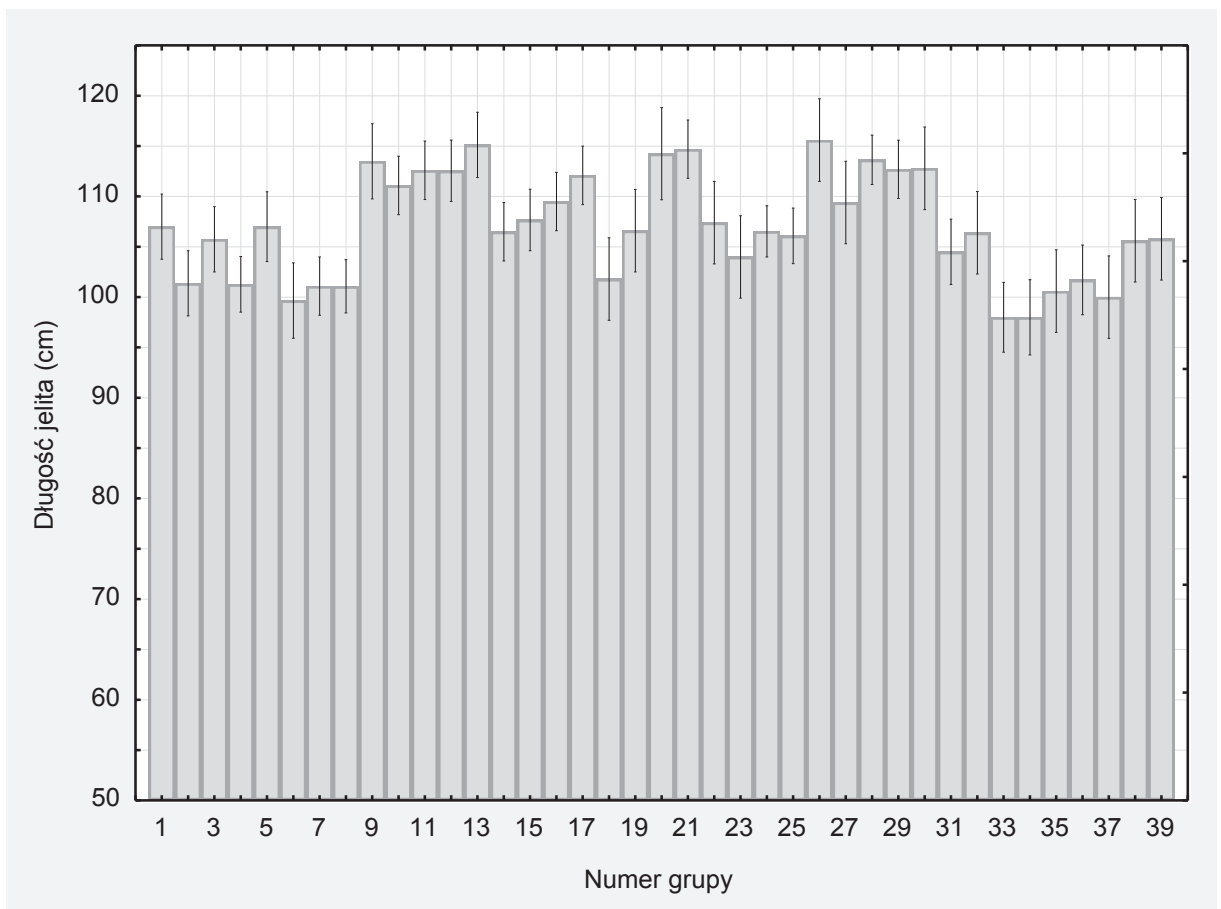
**Tabela 5.** Badanie wpływu łącznego podania johimbiny i propranololu na pasaż jelitowy u szczurów, u których wykonano laparotomię i masaż jelit w porównaniu do szczurów z grupy kontrolnej oraz szczurów, u których podano johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Johimbina	10	J 10
Johimbina i propranolol	10 i 30	J 10 + P 30

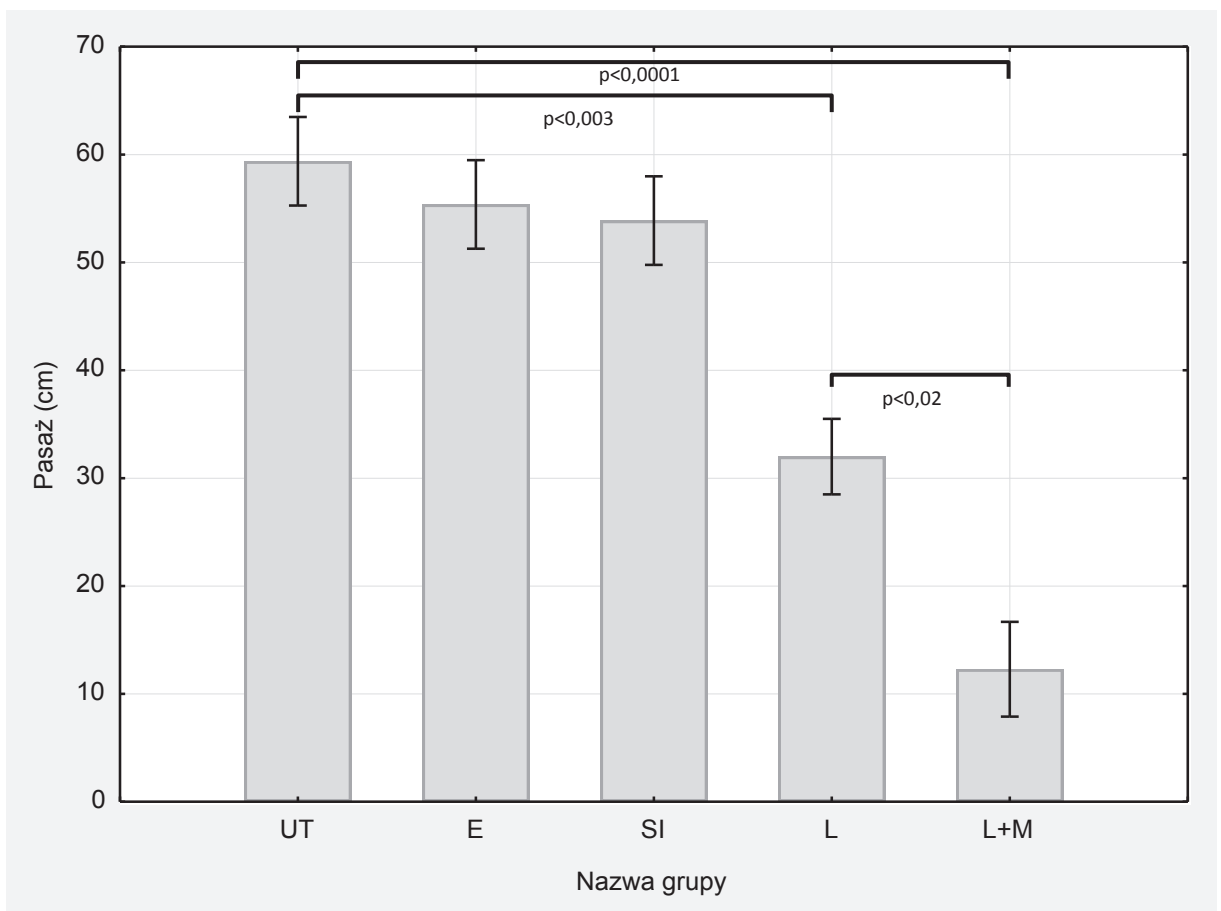
**Tabela 6.** Badanie wpływu łącznego podania johimbiny i propranololu, oraz badanie wpływu L-NAME oraz łącznego podania L-NAME i johimbiny po wykonaniu laparotomii z masażem jelit.

Nazwa grupy	Dawka mg/kg m.c.	Symbol grupy
Grupa kontrolna (podano 0,9% NaCl)		CG
Johimbina	10	J 10
L-NAME	10	LN 10
L-NAME	30	LN 30
L-NAME	100	LN 100
L-NAME i Johimbina	30 i 10	LN 30 + J 10

**Wykres 1.** Długość jelita cienkiego mierzona od odźwiernika do kątnicy we wszystkich grupach szczurów użytych do doświadczeń. Wyniki w grupach o liczebności  $n = 4 - 14$  przedstawiono jako długość jelita w  $\text{cm} \pm$  błąd standardowy (SEM). Przy użyciu testu jednoczynnikowego ANOVA i testu post hoc Bonferoniego nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.

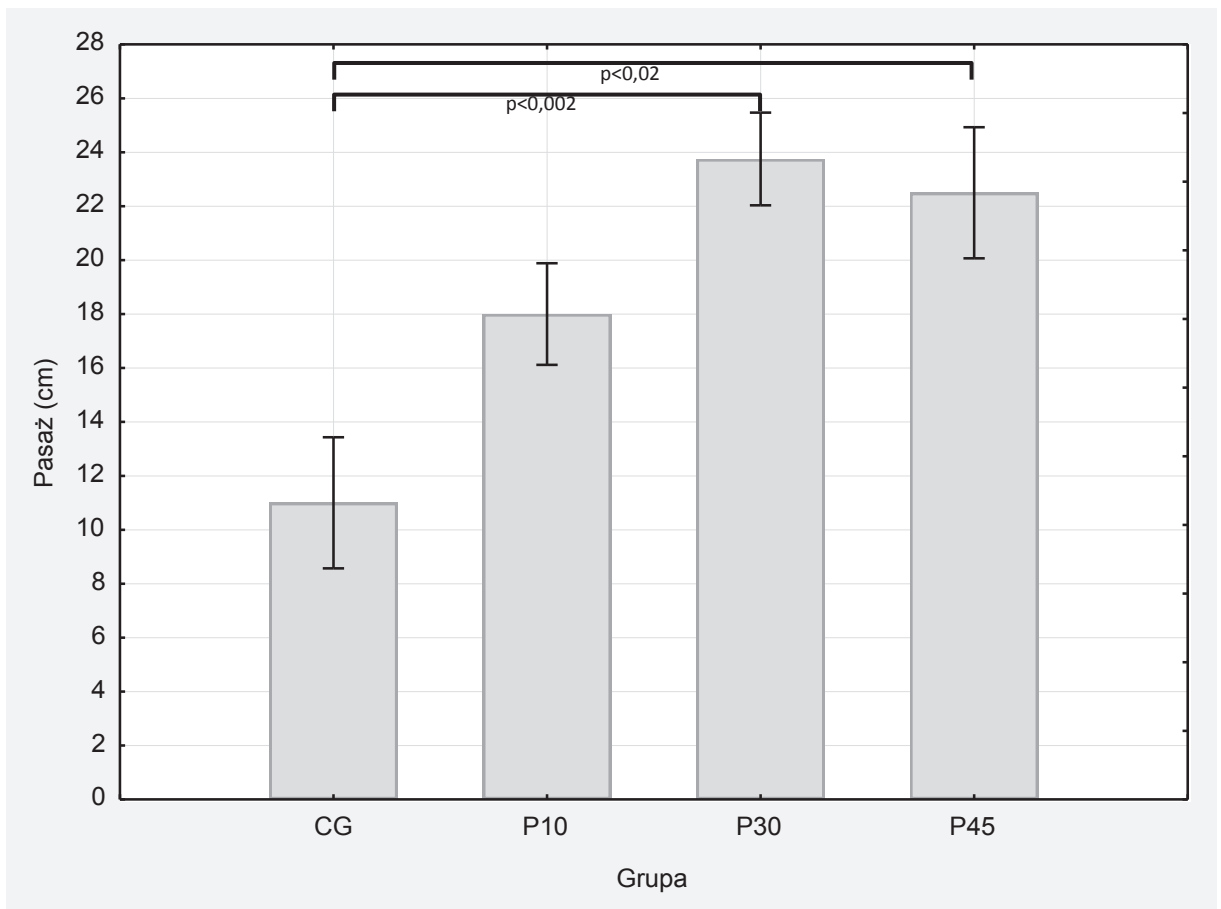


**Wykres 2.** Uzyskane wartości pasaży jelitowego barwnika w doświadczeniach wstępnych w grupie niepoddanej żadnym procedurom (UT) i grupach poddanych: znieczuleniu eterem (E), nacięciu skóry (SI), laparotomii (L) i laparotomii z masażem jelit (L + M). Wyniki przedstawiono w cm pasaży barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 7 - 11$  uzyskano: UT, E i SI vs L ( $p < 0,003$ ), UT, E i SI vs L + M ( $p < 0,0001$ ), a także pomiędzy L vs L + M ( $p < 0,02$ ).

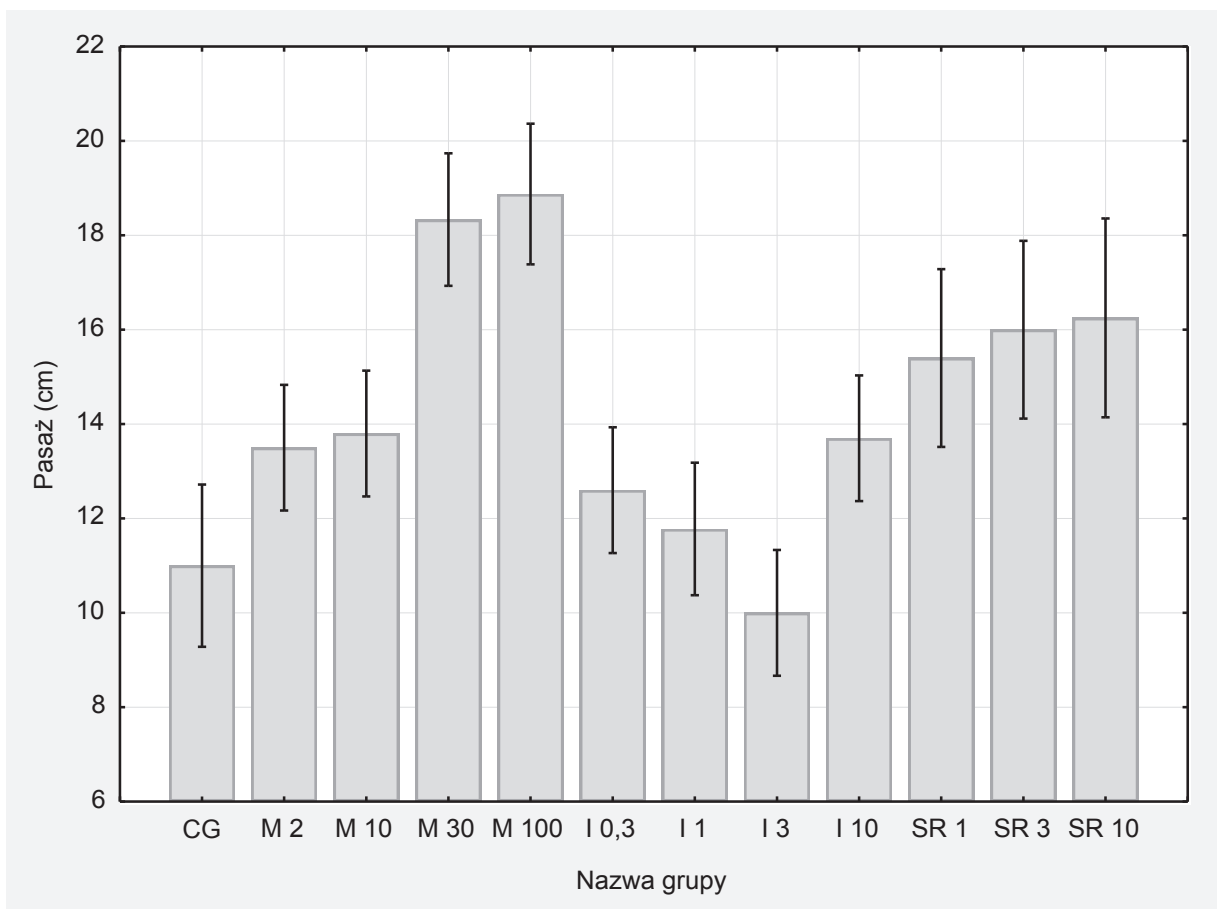




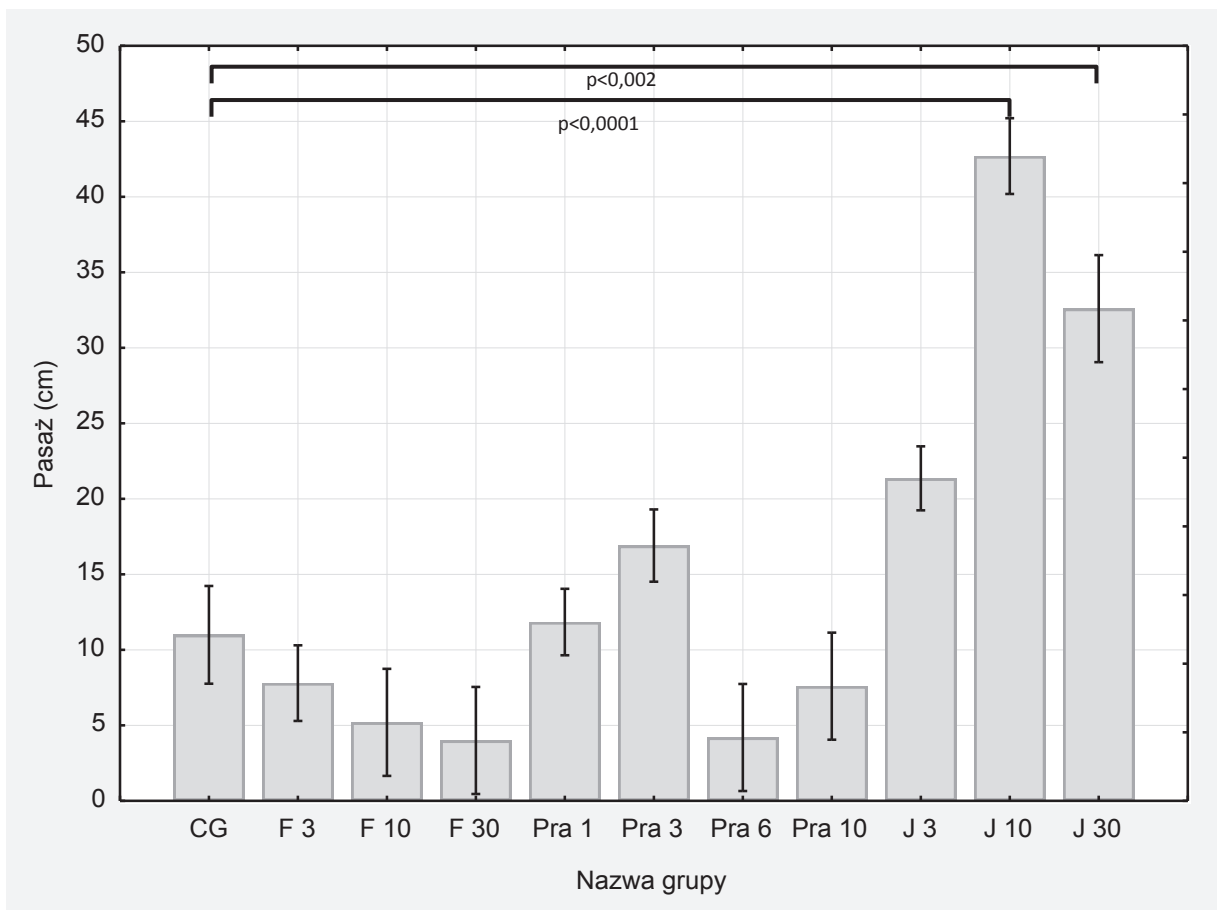
**Wykres 3.** Wpływ zastosowania propranololu w dawkach 10 – 45 mg/kg m.c. (P 10 – 45) na pasaż jelitowy barwnika w grupie poddanej laparotomii i masażowi jelit w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 6 - 12$  uzyskano: P 30 vs CG ( $p < 0,002$ ) i P 45 vs CG ( $p < 0,02$ ).



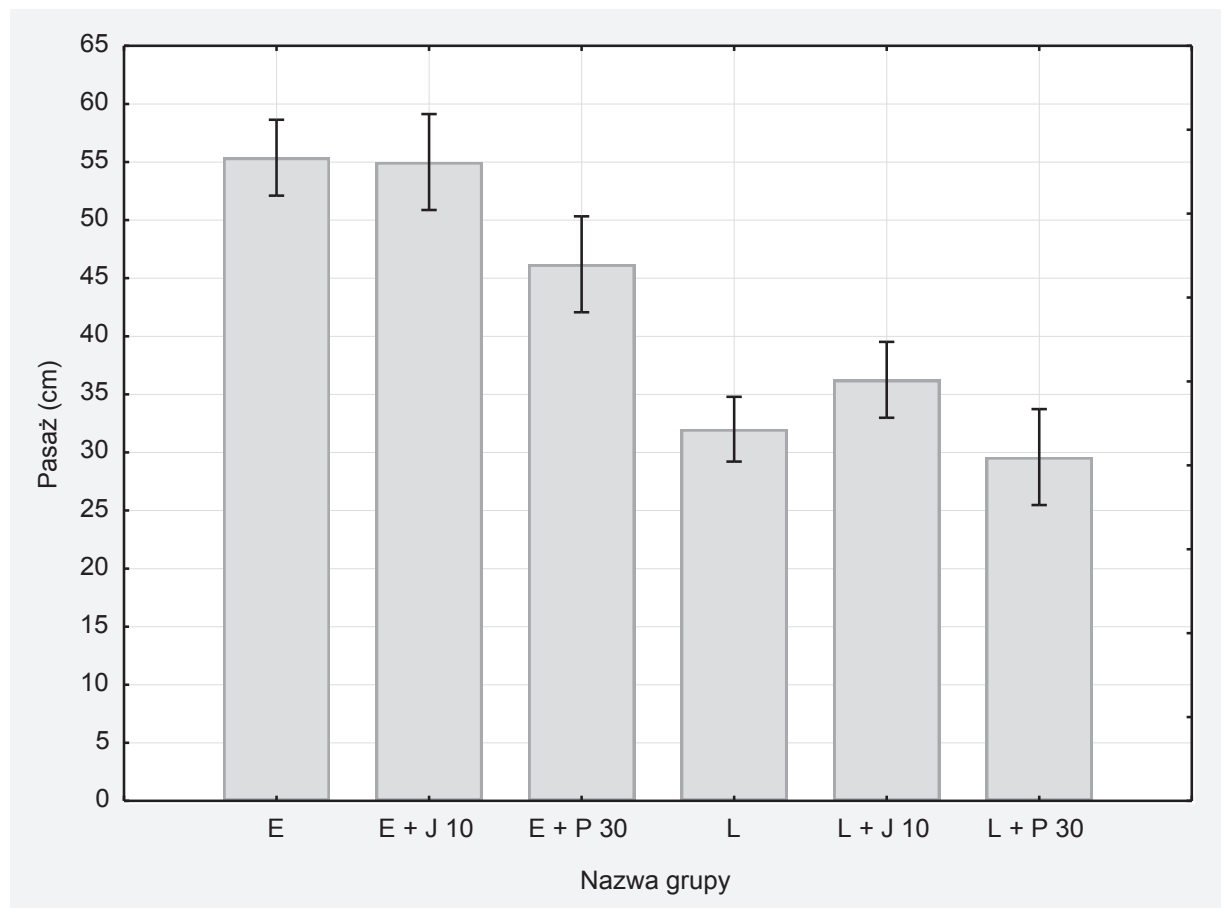
**Wykres 4.** Wpływ zastosowania metoprololu w dawkach 2 – 100 mg/kg m.c (M 2 – M 100), ICI 118,551 w dawkach 0,3 – 3 mg/kg m.c. (I 0,3 – I 3), SR 58894A w dawkach 1 – 10 mg/kg m.c. (SR 1 – SR 10) na pasaż jelitowy barwnika Evansa w grupie poddanej laparotomii i masażu jelit w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami o liczebności  $n = 4 - 10$  na założonym poziomie wartości prawdopodobieństwa testowego  $p < 0,05$ .



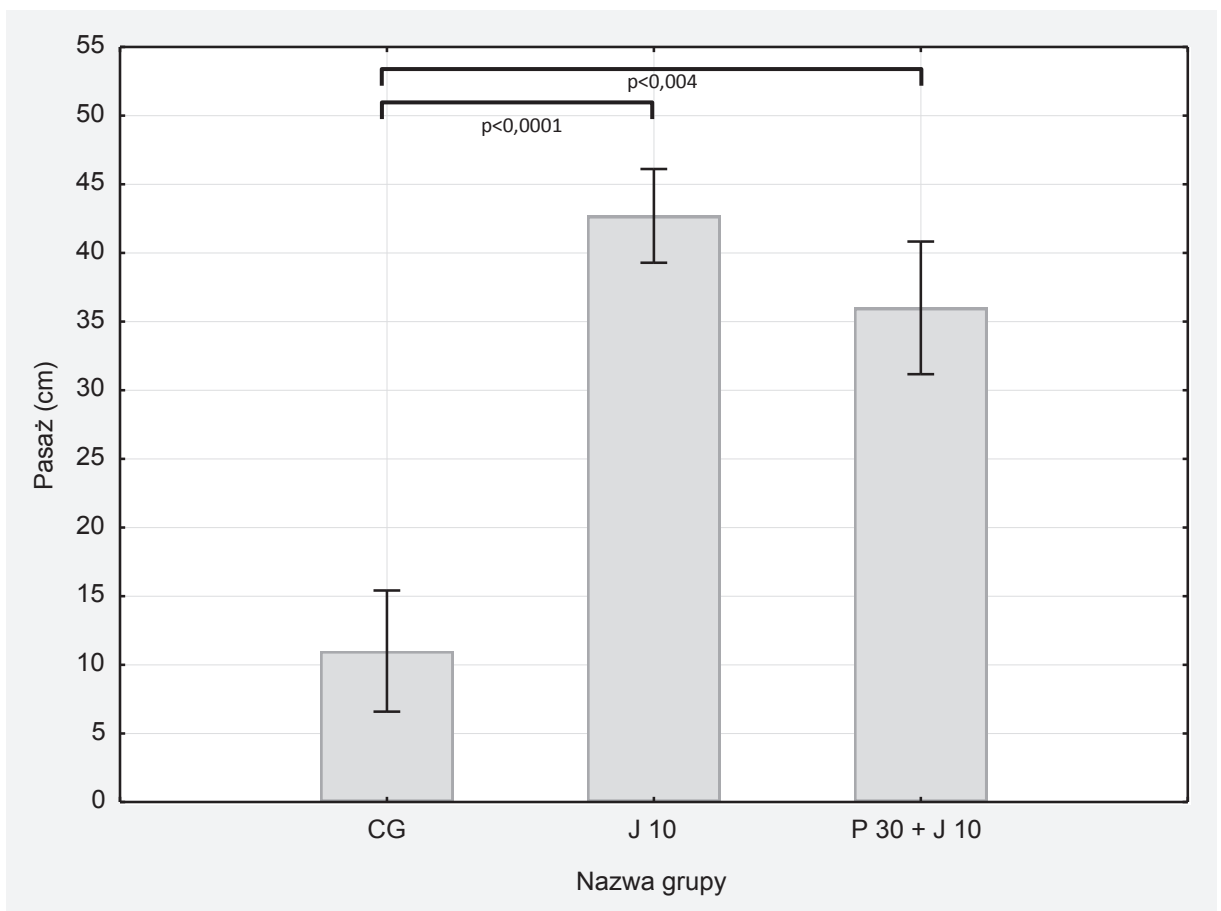
**Wykres 5.** Ocena wpływu antagonistów receptora alfa-adrenergicznego na pasaż jelitowy barwnika po wykonaniu laparotomii i masażu jelita w grupach, w których podano fentolaminę w dawkach 3 – 30 mg/kg m.c. (F 3 – F 30), prazosynę w dawkach 1 – 10 mg/kg m.c. (Pra 1 – Pra 10) i johimbinę w dawkach 3 – 30 mg/kg m.c. (J 3 – J 30) w porównaniu do grupy kontrolnej (CG). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika ± błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 5 - 14$  uzyskano: J 10 vs CG ( $p < 0,0001$ ) i J 30 vs CG ( $p < 0,002$ ).



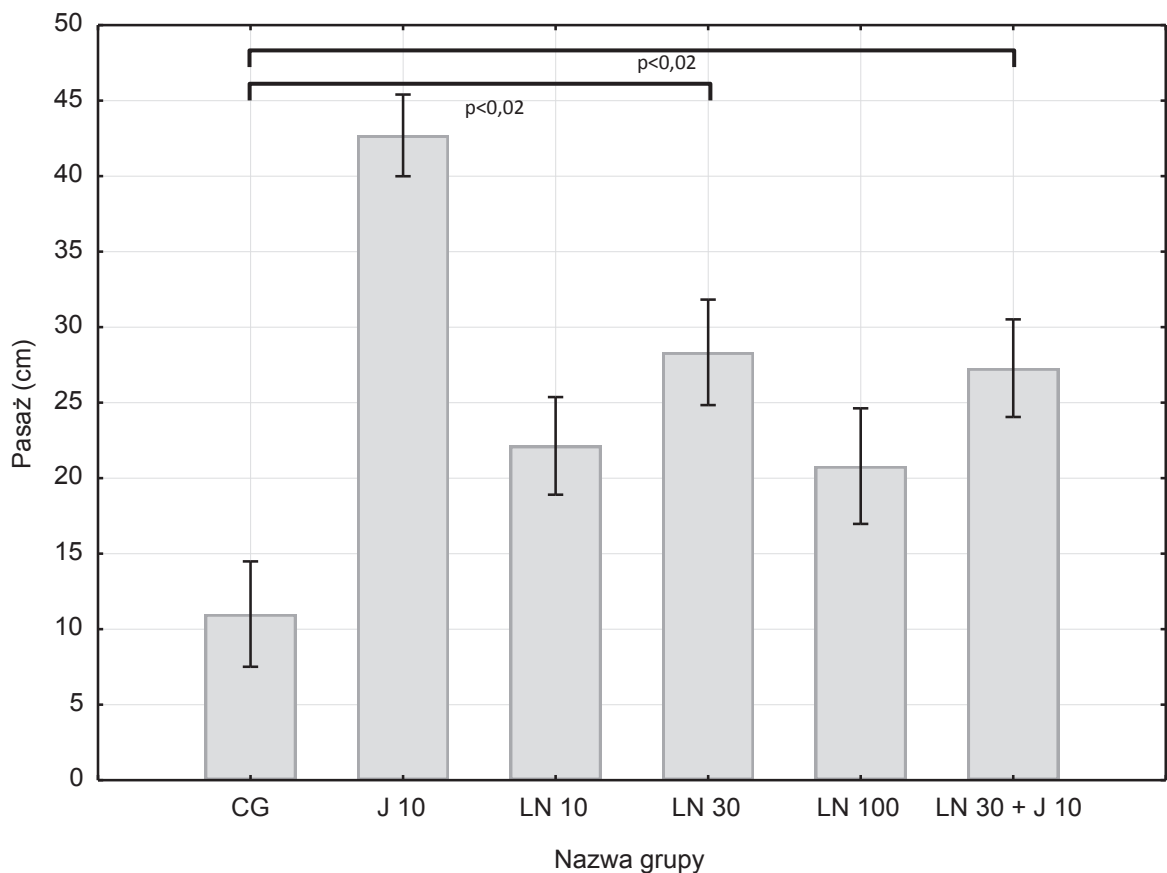
**Wykres 6.** Wpływ podania johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c. i propranololu w dawce 30 mg/kg m.c. u szczurów poddanych znieczuleniu eterem (E + J 10 oraz E + P 30) lub laparotomii (L + J 10 oraz L + P 30) w porównaniu do grup, w których wykonano odpowiednio jedynie znieczulenie eterem (E) lub laparotomię (L). Wyniki przedstawiono w cm pasaży barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Podanie leków nie spowodowało istotnego statystycznie zwiększenia pasaży barwnika po znieczuleniu eterem ani laparotomii na założonym poziomie wartości prawdopodobieństwa testowego  $p < 0,05$ . Grupy miały liczebność  $n = 5 - 11$ .



**Wykres 7.** Porównanie skuteczności łącznego podania johimbiny w dawce 10 mg/kg m.c. i propranololu w dawce 30 mg/kg m.c. (J 10 + P 30) na przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika po wykonaniu laparotomii i masażu jelit w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) i grupy, w której podano wyłącznie johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c. (J 10). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa w jelicie od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami o liczebności  $n = 5 - 10$  uzyskano w przypadku J 10 + P 30 vs CG ( $p < 0,004$ ) i J 10 vs CG ( $p < 0,0001$ ). Brak synergistycznego działania obu leków w porównaniu do grupy J 10 ( $p > 0,05$ ).



**Wykres 8.** Przyspieszenie pasażu jelitowego barwnika Evansa po wykonaniu laparotomii i masażu jelit w grupach, w których podano L-NAME w dawkach 10 -100 mg/kg m.c. (LN 10 – 100) oraz L-NAME w dawce 30 mg/kg m.c. łącznie z johimbiną w dawce 10 mg/kg m.c. (LN 30 + J 10) w porównaniu do grupy kontrolnej (CG) i grupy, w której podano wyłącznie johimbinę w dawce 10 mg/kg m.c. (J 10). Wyniki przedstawiono w cm pasażu barwnika Evansa od odźwiernika  $\pm$  błąd standardowy (SEM). Istotnie statystycznie zwiększenie pasażu uzyskano w grupach LN 30 vs CG ( $p < 0,02$ ) i LN 30 + J 10 vs CG ( $p < 0,02$ ). Zwiększenie pasażu barwnika było istotnie statystycznie mniejsze w grupach LN 30 vs J 10 ( $p < 0,04$ ) oraz LN 30 + J 10 vs J 10 ( $p < 0,03$ ). Liczebność grup wynosiła  $n = 5 - 10$ .



## 9. Streszczenia

### 9.1. Streszczenie

**Wstęp:** Pooperacyjna niedrożność jelit to czynnościowe zmniejszenie perystaltyki jelit i pasażu jelitowego występujące głównie po operacjach na jamie brzusznej i obejmujących manipulację jelit. Jest to proces odwracalny, ale jego wystąpienie powoduje zwiększenie dyskomfortu pacjenta, wydłużenie hospitalizacji oraz znaczne zwiększenie kosztów leczenia. Leczenie pooperacyjnej niedrożności jelit opiera się obecnie w głównej mierze na leczeniu objawowym.

Patogeneza pooperacyjnej niedrożności jelit nie została w pełni wyjaśniona. Na rozwój tego powikłania ma wpływ wiele czynników, zarówno mechanicznych jak i humoralnych. Wśród czynników wywołujących pooperacyjną niedrożność jelit opisuje się wpływ mediatorów układu współczulnego wydzielanych w trakcie inwazyjnego zabiegu na jamie brzusznej.

**Cel pracy:** Określenie wpływu antagonistów poszczególnych podtypów receptorów adrenergicznych na motorykę jelit w modelu pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów poprzez pomiar pasażu barwnika Evansa w jelicie cienkim.

**Materiały i metody:** Zastosowany model badawczy pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów obejmuje fazę wczesną tego powikłania. Opiera on się na obserwacji, iż zahamowanie perystaltyki jest proporcjonalne do zastosowanego podczas zabiegu bodźca bólowego. W modelu tym perystaltykę określano na podstawie odległości, na jaką dochodziło do pasażu w jelicie cienkim błękitu Evansa podanego przez sondę do

żołądka szczura. Badania przeprowadzono w znieczuleniu eterem dietylowym. W pilotażowej serii doświadczeń poddawano szczury operacji polegającej na nacięciu skóry (SI), laparotomii (L) i laparotomii z masażem jelit (L+M). Oceniano również wpływ zastosowania wyłącznie znieczulenia eterowego (E) a także pasaż barwnika u szczurów niepoddanych żadnym procedurom (UT). W części badawczej podawano dootrzewnowo poszczególnych antagonistów receptorów adrenergicznych oraz L-NAME i badano ich wpływ na pasaż jelitowy barwnika Evansa po wykonaniu laparotomii i manipulacji jelit (L+M). Ponadto oceniono wpływ wybranych antagonistów receptorów adrenergicznych na pasaż barwnika po wykonaniu jedynie znieczulenia eterem (E) oraz jedynie laparotomii (L).

**Wyniki:** Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w długości jelit u badanych szczurów, dlatego wyniki przedstawiono w postaci odległości w cm od odźwiernika do najdalszego miejsca migracji barwnika Evansa w jelicie. Pasaż jelitowy barwnika po zastosowaniu znieczulenia eterem dietylowym bez zabiegu (E) wynosił  $55,37 \pm 4,10$  cm i nie wykazywał statystycznej różnicy z pasażem barwnika obserwowanym u szczurów z grupy kontrolnej (UT) niepoddanych żadnym zabiegom, u których wynosił on  $59,37 \pm 4,10$  cm. W grupie SI pasaż jelitowy wynosił  $53,87 \pm 4,10$  cm i nie wykazywał istotnej statystycznie różnicy z grupą UT. Po zastosowaniu L pasaż jelitowy ulegał zmniejszeniu do  $32,0 \pm 3,5$  cm, natomiast po zastosowaniu L+M do  $12,28 \pm 4,38$  cm.

Zastosowanie przed zabiegiem operacyjnym propranololu powodowało częściowe odwrócenie hamującego wpływu masażu jelit na pasaż jelitowy barwnika Evansa. Wynosił on odpowiednio dla dawek 10, 30 i 45 mg/kg m.c.:  $18,00 \pm 1,88$  cm,  $23,75 \pm 1,71$  cm i  $22,5 \pm 2,43$  cm i dla dwóch ostatnich dawek wykazywał istotne statystycznie



przyspieszenie pasaży barwnika w porównaniu do grupy kontrolnej (CG), w której pasaż wynosił  $11,00 \pm 2,43$  cm.

Nie obserwowano przyspieszenia pasaży jelitowego barwnika Evansa po zastosowaniu selektywnych antagonistów receptorów beta<sub>1</sub>, 2 i 3-adrenergicznego metoprololu, ICI 118,551 i SR58894A.

Zastosowanie johimbiny w dawkach 3, 10 i 30 mg/kg m.c. powodowało zależne od dawki przyspieszenie pasaży jelitowego barwnika Evansa do  $21,35 \pm 2,11$  cm,  $42,70 \pm 2,50$  cm i  $32,6 \pm 3,54$  cm. Dla 2 ostatnich grup odnotowano istotność statystyczną.

Zastosowanie nieselektywnego antagonisty receptorów alfa-adrenergicznych fentolaminy oraz selektywnego antagonisty receptora alfa<sub>1</sub>-adrenergicznego prazosyny nie wykazało ochronnego działania tych leków na pasaż jelitowy barwnika Evansa w zastosowanym w tej pracy modelu pooperacyjnej niedrożności jelit.

Nie wykazano synergistycznego efektu jednoczesnego zastosowania optymalnych dawek 30 mg/kg mc. propranololu i 10 mg/kg mc. johimbiny na pasaż jelitowy barwnika Evansa. W grupie tej był on nieznacznie mniejszy od obserwowanego po podaniu optymalnej dawki johimbiny i wynosił  $36,48 \pm 4,83$  cm, jednakże dla różnicy tej nie stwierdzono istotności statystycznej.

Ponadto zastosowanie zarówno propranololu, jak i johimbiny u szczurów poddanych znieczuleniu eterowemu bez wykonywania procedur chirurgicznych nie powodowało istotnego statystycznie przyspieszenia pasaży barwnika w porównaniu do grupy, w której zastosowano jedynie znieczulenie eterowe. W grupie, w której wykonano laparotomię bez masażu jelit podanie johimbiny powodowało przyspieszenie pasaży

barwnika do  $36,25 \pm 3,26$  cm, a podanie propranololu w dawce 30 mg/kg. m.c. spowolnienie pasażu barwnika do  $29,6 \pm 4,12$  cm, jednakże nie obserwowano istotnej statystycznie różnicy w porównaniu do grupy L, w której pasaż wynosił  $32,00 \pm 2,78$  cm.

Po podaniu L-NAME w dawkach 10, 30 i 100 mg/kg m.c. pasaż jelitowy barwnika Evansa wynosił odpowiednio  $22,14 \pm 3,23$  cm,  $28,33 \pm 3,49$  cm i  $20,8 \pm 3,82$  cm, przy czym istotne statystycznie przyspieszenie pasażu barwnika w porównaniu do CG obserwowano jedynie w grupie N30. Łącznie podanie L-NAME i johimbiny w optymalnych dawkach odpowiednio 30 i 10 mg/kg m.c. nie wykazywało działania synergistycznego, a pasaż barwnika w tej grupie wynosił  $27,28 \pm 3,23$  cm. Przyspieszenie pasażu barwnika było istotnie statystycznie mniejsze niż w grupie J10, w której pasaż wynosił  $42,7 \pm 2,70$  cm.

**Wnioski:** Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, iż mediatory układu adrenergicznego mają wpływ na spowolnienie pasażu jelitowego w pooperacyjnej niedrożności jelit u szczurów. Efektywnie przeciwdziała temu zastosowanie przed operacją johimbiny, powodując przywrócenie pasażu jelitowego do poziomu zbliżonego do obserwowanego po wykonaniu jedynie laparotomii. Nie wykazano synergistycznego działania L-NAME i johimbiny na pasaż jelitowy, który po łącznym zastosowaniu tych środków był mniejszy, niż po zastosowaniu jedynie johimbiny. Ponadto johimbina nie powodowała przyspieszenia pasażu barwnika u szczurów, u których wykonano jedynie laparotomię, co w oparciu o cytowane publikacje wskazuje raczej na komórkowe, a nie odruchowe działanie tej substancji.

Co więcej z przeprowadzonych badań wynika, iż obserwowane po zastosowaniu dużych dawek propranololu, niewielkie przyspieszenie pasażu jelitowego po masażu jelit, wynikało raczej z jego działania stabilizującego błony, niż działania receptorowego, jako, że po zastosowaniu selektywnych antagonistów poszczególnych podtypów receptora beta-adrenergicznego nie obserwowano tego efektu. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, iż podobnych badań dotyczących działania selektywnych antagonistów receptora beta-adrenergicznego w modelu *in vivo* dotąd nie publikowano.

Co więcej w wykonanych badaniach nie obserwowano synergistycznego wpływu optymalnych dawek johimbiny 10 mg/kg m.c. i propranololu 30 mg/kg m.c. Pasaż jelitowy w tej grupie wynosił  $36,0 \pm 4,83$  cm i był mniejszy od obserwowanego w grupie, w której zastosowano optymalną dawkę johimbiny, gdzie wynosił on  $42,7 \pm 3,41$  cm, przy czym nie wykazano tu istotnej statystycznie różnicy. Trend wskazuje jednak, iż podobnie jak w cytowanych wcześniej badaniach *in vitro*, również *in vivo* łączne zastosowanie propranololu i antagonisty receptora alfa-2 wykazuje niewielkie działanie antagonistyczne.

## 9.2. Abstract

**Background:** Postoperative ileus (PI) is defined as transient bowel dysmotility following abdominal surgery with gut manipulation. The process is reversible, but leads to increased patient suffering, prolonged hospitalization and increased hospitalization costs. Current treatment techniques of PI mainly involve supportive measures.

Mechanisms underlying development of PI have not been fully explained. Both mechanical and humoral factors are related to PI pathogenesis. The release of sympathetic mediators occurring during invasive abdominal surgery has been described as one of mechanisms involved in PI induction.

**Aim:** To evaluate the influence of antagonists of individual adrenergic receptor subtypes on bowel motility following abdominal surgery in rat model of PI.

**Materials and methods:** The experimental design of PI employed in this study involves the early phase of this complication. It is based on the observation that inhibition of peristalsis is proportional to the applied pain stimulus during the procedure. Bowel motility in this model is determined by the distance over which the passage of Evans blue introduced via orogastric tube occurred in the small intestine. All procedures were performed under diethyl ether anaesthesia. In pilot series of experiments rats underwent surgical procedures of skin incision (SI), laparotomy (L) and laparotomy with gut manipulation (L+M). The intestinal transit of dye in rats undergoing exclusive diethyl ether anaesthesia without surgical procedures (E) and untreated rats (UT) was also evaluated. In following series of experiments rats were given intraperitoneally

individual adrenergic receptor subtypes antagonists and L-NAME respectively, and the influence of administered agents on intestinal transit of Evans blue was evaluated following laparotomy and gut manipulation (L+M). Additionally intestinal transit of dye in rats given selected adrenergic antagonists undergoing diethyl ether anaesthesia (E) or laparotomy (L) was evaluated.

**Results:** No statistically significant differences in the length of intestine in tested rats were observed, so the results were presented as the distance in cm from the pylorus to the farthest points of Evans blue migration in the intestine. Evans blue migrated over the distance of  $55,37 \pm 4,10$  cm in rats undergoing exclusive diethyl ether anaesthesia without surgical procedures (E) and no statistically significant difference with untreated rat group (UT) was observed, in which dye transit was  $59,37 \pm 4,10$  cm. Dye migration in SI group was  $53,87 \pm 4,10$  cm and also shown no statistical difference with UT group. In rats undergoing laparotomy (L) and laparotomy with gut manipulation (L+M) dye passage was reduced to  $32,0 \pm 3,5$  cm and  $12,28 \pm 4,38$  cm respectively.

Propranolol administered prior to surgical procedure has shown protective effect on Evans blue migration in rats undergoing L+M. Intestinal dye transit for propranolol doses of 10, 30 and 45 mg/kg was  $18,00 \pm 1,88$  cm,  $23,75 \pm 1,71$  cm and  $22,5 \pm 2,43$  cm respectively, and for last two doses statistically significant increase of dye passage was noted compared to Evans blue transit of  $11,00 \pm 2,43$  cm in the control group (CG). No acceleration of dye migration was seen following administration of selective beta<sub>1</sub>, 2 and 3 adrenergic receptor antagonists metoprolol, ICI 118,551 and SR58894A respectively.

Evans blue migration after administration of 3, 10 and 30 mg/kg of yohimbine increased dye migration in dose dependent manner, to  $21,35 \pm 2,11$  cm,  $42,70 \pm 2,50$  cm and  $32,6 \pm 3,54$  cm respectively. For two later doses statistically significant increase in dye passage was achieved compared to UT.

Administration of the nonselective alpha - adrenoreceptor antagonist phentolamine and the selective alpha<sub>1</sub> - adrenergic receptor antagonist prazosine showed no protective effects of these drugs on intestinal Evans blue transit in the employed experimental model of PI.

There was no evidence of the synergistic effect of the concurrent application of optimal doses of 30 mg/kg propranolol and 10 mg/kg yohimbine on intestinal Evans blue transit. Dye migration of  $36.48 \pm 4.83$  cm seen in this group was slightly lower (with no statistical significance) than that observed after administration of optimal dose of yohimbine.

Furthermore, the administration of either propranolol or yohimbine in ether anesthetized rats has not resulted in statistically significant acceleration of dye migration compared to untreated, ether anesthetized rats (E). In rats undergoing laparotomy the administration of 10 mg/kg yohimbine resulted in statistically non-significant increase in Evans blue migration to  $36.25 \pm 3.26$  cm, and the administration of 30 mg/kg propranolol nonsignificantly reduced dye migration to  $29.6 \pm 4.12$  cm, compared to the L group, in which dye passage achieved  $32.00 \pm 2.78$  cm.

Administration of L -NAME in the dose of 10, 30 and 100 mg/kg increased Evans blue migration to  $22.14 \pm 3.23$  cm,  $28.33 \pm 3.49$  and  $20.8 \text{ cm} \pm 3.82$  cm , wherein a statistically significant acceleration of dye passage compared to the CG was observed

only in the N30 group. Concurrent administration of L- NAME and yohimbine at optimal doses of 30 and 10 mg/kg showed no synergistic effect. Evans blue migration in this group was  $27.28 \pm 3.23$  cm, and was significantly lower than seen in J10 group, where it achieved  $42.7 \pm 2.70$  cm .

**Conclusions:** Results allow us to conclude that adrenergic mediators have an impact on intestinal transit delay in the postoperative ileus in rats. Administration of yohimbine before surgery that involved gut manipulation effectively counteracts PI development, resulting in the restoration of intestinal dye transit to a level similar to that observed after laparotomy. There was no evidence of the synergistic effect of L- NAME and yohimbine on intestinal dye transit, and the effect of concurrent use of these agents on the intestinal dye transit acceleration was inferior to sole yohimbine administration. Furthermore, in rats undergoing laparotomy yohimbine has not increased Evans blue migration, which based on the cited publications suggest rather cellular, not a reflex mechanism of action of this agent in PI.

Moreover, the study shows that slight acceleration of intestinal dye transit after surgery with gut manipulation observed at high doses of propranolol is rather connected with membrane-stabilizing action, than the receptor blocking effect, as this effect was not observed upon the application of selective antagonists of various subtypes of beta-adrenergic receptor. The available literature indicates that similar trials with selective beta adrenergic receptor subtype antagonists in an *in vivo* model have not yet been published.

What is more, performed experiments showed no synergistic effect of optimal doses of yohimbine (10 mg/kg) and propranolol (30 mg/kg). Intestinal dye migration of  $36.0 \pm$

4.83 cm seen in this group was slightly lower than that of  $42.7 \pm 3.41$  cm observed after administration optimal dose of yohimbine. No statistically significant difference was seen between those groups, however the trend shows that, as in the case of *in vitro* studies cited earlier, concurrent *in vivo* application of propranolol and an alpha -2 antagonist exhibits slight antagonistic effect.