

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Etiopatogenia aderențelor peritoneale postoperatorii

Doctorand **Ștefan Chiorescu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**



Cuprins

Cuvinte cheie	2
Introducere	3
Stadiul actual al cunoașterii	4
Studiul 1	4
Studiul 2	5
Studiul 3	5
Discuții și concluzii generale	7

Cuvinte cheie: rosuvastatină, aderențe peritoneale, inducere experimentală, profilaxie, inflamație, TNF- α , IL-1 α

Introducere

Dezvoltarea aderențelor peritoneale postoperatorii rămâne o consecință aproape inevitabilă a celor mai multe intervenții chirurgicale abdominale și reprezintă o cauză majoră de mortalitate și morbiditate. Incidența patologiei, raportată în diverse studii, urcă până la 90-95% după laparotomie și chiar 97% consecutiv intervențiilor chirurgicale ginecologice pelvine. Nu sunt întotdeauna simptomatice, dar uneori pot produce ocluzie intestinală, durere cronică abdominală și pelvină, infertilitate, acces dificil în cazul unei reintervenții chirurgicale la nivel abdominal.

Aderențele peritoneale constituie adevărate "legături" patologice care se formează de obicei între epiploon, anse intestinale, viscere și peretele abdominal. Aspectul lor este variabil, de la pelicule fine, avasculare, la adevărate punți de țesut conjunctiv ce pot conține structuri vasculare sau nervi. Uneori se realizează un contact direct între două organe.

Dezvoltarea aderențelor peritoneale a fost și este studiată extensiv, dar, în ciuda datelor obținute, mecanismul exact de formare precum și mijloacele de prevenire sau terapeutice rămân încă incomplet elucidate.

Traumatismul indus de manoperele chirurgicale dar și de alți factori produce leziuni peritoneale. Apare un răspuns inflamator care induce reacții procoagulante și antifibrinolitice, cu o augmentare a formării și depunerii de fibrină. Persistența acestor depozite duce la formarea unor aderențe fibrinoase care, prin depunere de colagen și apariția vaselor de neoformație, devin permanente, fibroase.

Strategiile actuale de prevenire a formării aderențelor postoperatorii pot fi grupate în patru categorii: principii generale, elemente de tehnică chirurgicală, bariere mecanice și agenți farmacologici. Acționând prin scăderea inflamației, manipularea coagulării, creșterea activității fibrinolitice, agenții farmacologici se constituie în terapii potențial eficiente.

În procesul formării aderențelor peritoneale, inflamația reprezintă răspunsul inițial la agresiunea peritoneală. Modularea răspunsului inflamator declanșat de traumatismul chirurgical poate preveni apariția aderențelor.

Statinele constituie o clasă heterogenă de substanțe cu rol de inhibitori de HMG-CoA reductază, enzimă cu rol central în sinteza colesterolului. Sunt folosite în mod curent în tratamentul hiperlipidemiei și în prevenția bolilor cardiovasculare. S-a documentat că exercită și efecte antiinflamatorii, antitrombotice, antioxidante, antifibrotice, de modulare a fibrinolizei. Pentru unii reprezentanți ai clasei s-a demonstrat în studii experimentale efectul de prevenire a formării aderențelor peritoneale, administrate intraperitoneal sau/și pe cale orală. Rosuvastatina este un membru nou din familia statinelor cu un puternic efect hipolipemiant. S-au demonstrat și puternice efecte pleiotropice, dar nu a fost utilizată în studiul aderențelor peritoneale.

Studiul de față s-a realizat la Biobaza Centrului de Aptitudini Practice și Medicină Experimentală al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, în colaborare cu Facultatea de Farmacie și Disciplina de Anatomie Patologică și a dorit să

evalueze efectul administrării intraperitoneale a rosuvastatinei în prevenirea dezvoltării aderențelor peritoneale la șobolan, precum și mecanismele patogenetice implicate, cu accent pe eliberarea citokinelor proinflamatorii.

În partea inițială a tezei, dedicată **stadiului actual al cunoașterii**, am efectuat o recenzie a literaturii de specialitate pe problemele atinse de cercetarea propriu-zisă. Este structurată în opt capitole de sinteză, cu cele mai semnificative și actuale date privind aderențele peritoneale postoperatorii, etiologie, mecanisme fiziopatologice implicate, modalități de profilaxie a formării după intervenții chirurgicale, modelele experimentale utilizate în studiul aderențelor.

Partea de **contribuții personale** cuprinde trei studii precum și alte trei capitole care sunt dedicate discuțiilor generale, concluziilor generale și aspectelor de originalitate a lucrării.

În **primul studiu al tezei** mi-am propus realizarea modelului experimental animal de inducere a aderențelor postoperatorii, o etapă necesară și esențială în studiul mecanismelor formării dar și în cel al profilaxiei dezvoltării aderențelor. Deși sunt descrise și utilizate numeroase modele, nu există o standardizare a metodelor, nici a animalelor de laborator folosite.

Obiectivul principal al studiului a fost inducerea aderențelor peritoneale la șobolan, la un procent semnificativ de subiecți, printr-o tehnică simplă, ușor repetabilă și care să reproducă cât mai fidel traumatismul peritoneal intraoperator. Obiectivele secundare au fost obținerea unui procent mare de acoperire a suprafeței traumatizate cu aderențe și a unor aderențe de grad înalt (la evaluarea macroscopică și microscopică).

Cercetarea s-a efectuat pe un număr de 60 de șobolani albi, de sex masculin, împărțiți aleator în 2 loturi egale – un lot martor și un lot de inducere a aderențelor peritoneale. După laparotomie mediană inducerea aderențelor s-a efectuat prin abraziunea peritoneului parietal și visceral (de la nivel cecal) cu cytobrush – periuța de recoltare cervicală tip rimel, pe o arie de 2.0 x 2.0 cm până la apariția sângerărilor punctiforme, ca martor al traumei peritoneale, în medie fiind necesare 20 ± 3 abraziuni. În lotul martor s-a practicat o laparotomie mediană, cu exteriorizarea cecului în plagă pentru 2-3 minute, urmată de laparorafie.

Evaluarea aderențelor formate s-a realizat la 14 zile din punct de vedere macroscopic (cantitativ – incidența formării la locul traumatismului și procent de acoperire și calitativ – scor de severitate Evans) și microscopic (scor al fibrozei și al inflamației descris de Hooker).

În lotul martor nu s-au constatat aderențe peritoneale. În lotul experimental aderențele au fost induse la 25 de șobolani (83,33%), cu o prevalență mare a aderențelor de grad înalt (doi și trei) (20% respectiv 50%). Procentul de ocupare a suprafeței traumatizate cu aderențe a fost de 51,6%. La evaluarea microscopică se descrie de asemenea fibroză și inflamație medie și severă la majoritatea cazurilor (22 șobolani – 73,33%).

Obiectivul principal al studiului a fost îndeplinit, inducerea aderențelor peritoneale la șobolan prin abraziunea peritoneului parietal și visceral cecal fiind obținută la un procent semnificativ de cazuri, modelul fiind astfel aplicabil în următoarele cercetări. Am obținut, de asemenea, o acoperire de peste 50% a suprafeței supusă abraziunii peritoneale cu aderențe, cu fibroză și inflamație semnificativă la examenul histo-patologic.

Obiectivul **studiului doi al tezei** l-a constituit evaluarea eficienței administrării intraperitoneale a rosuvastatinei în prevenirea formării aderențelor postoperatorii, folosind un model experimental. S-au utilizat un număr de 120 șobolani, împărțiți randomizat în 4 loturi egale ($n=30$) și la care s-a aplicat modelul de inducere a aderențelor peritoneale descris în studiul anterior. Lotul I s-a constituit lot martor, la lotul II s-a administrat intraperitoneal soluție salină (lotul de control), iar la loturile III și IV s-a introdus intraperitoneal soluție de rosuvastatină în două concentrații (10 mg/kg respectiv 5 mg/kg, în doză unică). Soluția a fost preparată la Facultatea de Farmacie a UMF Cluj-Napoca din rosuvastatină în stare pură, sub formă de sare calcică. Dozele utilizate, în condițiile lipsei referințelor anterioare din literatură privind administrarea intraperitoneală în studiul formării aderențelor, s-au calculat echivalând la animalul de experiență dozele administrate în practica umană (doza utilizată în studii clinice și doza maximă aprobată în practică). Conform studiilor anterioare, momentul administrării a fost ales la sfârșitul intervenției chirurgicale, cât mai aproape de momentul traumatismului peritoneal (ce inițiază cascada modificărilor fiziopatologice).

Nu s-au înregistrat efecte adverse sau complicații asociate administrării statinei în cursul derulării studiului cu aceste concentrații.

Nu au existat diferențe semnificative ale aderențelor induse între lotul martor și lotul la care s-a administrat soluție salină, atât macroscopic ($p=0,59$), cât și microscopic ($p=0,48$), ceea ce denotă că soluția salină (solvent pentru rosuvastatină), nu intervine și nu influențează formarea aderențelor.

Administrarea rosuvastatinei intraperitoneal s-a corelat cu reducerea formării aderențelor peritoneale. Această observație este valabilă în ambele loturi, în care au scăzut numărul, suprafața ocupată și gradul aderențelor la examinarea macroscopică, dar și gradul de fibroză/inflamație la examinarea microscopică. Diferența este semnificativă statistic între lotul martor și lotul III (10 mg/kg) și între lotul martor și lotul IV (5 mg/kg). Între loturile III și IV nu au existat diferențe semnificative statistic.

Studiul trei al tezei vine în completarea studiului anterior și are ca obiectiv evaluarea efectului antiinflamator al rosuvastatinei administrată intraperitoneal. Acest efect se validează prin scăderea eliberării citokinelor proinflamatorii. Obiectivul secundar l-a reprezentat evaluarea rolului eliberării citokinelor în mecanismul dezvoltării aderențelor. Ca și material biologic am utilizat lotul de 120 șobolani albi, de sex masculin, rasa Wistar-Bratislava, proveniți din Centrul de Aptitudini Practice și Medicină Experimentală al UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, folosit și la studiul doi. La 1 și la 7 zile postoperator s-au recoltat

probe de sânge de la nivelul plexului retroorbital. Concentrațiile serice ale TNF- α , IL-1 α au fost determinate utilizând kituri ELISA (BioVendor – Laboratori medicina a.s., Brno, Czech Republic), respectiv RAF130R (TNF- α) și RAF047R (IL-1 α).

Traumatismul peritoneului consecutiv gesturilor chirurgicale determină un răspuns inflamator. Studiile au demonstrat că în timpul fazei acute a răspunsului inflamator, celulele mezoteliale și macrofagele peritoneale produc o multitudine de citokine proinflamatorii (TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β 1). Acestea, individual sau sinergic reduc sinteza tPA și cresc eliberarea PAI-1.

Cercetările au demonstrat existența unei corelații între creșterea nivelului seric postoperator al citokinelor inflamatorii IL-1 și a TNF- α și formarea aderențelor peritoneale, o creștere mai pronunțată fiind un marker pentru intensitatea sindromului aderențial. Administrarea experimentală de anticorpi anti TNF- α reduce formarea aderențelor peritoneale, existând însă și cercetări care nu susțin aceste rezultate.

Pe modelul experimental studiat de noi traumatismul peritoneului parietal și visceral a fost însoțit de eliberarea în circulație a citokinelor inflamatorii, fiind măsurate valorile serice postoperator ale TNF- α și ale IL-1 α , mai mari în ziua 1 după intervenție. Valorile absolute determinate pentru TNF- α au fost mai mari decât cele ale IL-1 α . Media valorilor serice măsurate ale TNF- α în loturile I (martor) și II (cu administrare intraperitoneală a soluției saline) nu prezintă diferențe semnificative statistic, atât în ziua 1 postoperator ($p=0,914$), cât și în ziua 7 postoperator ($p=0,84$).

Similar, valorile serice ale IL-1 α determinate în lotul I sunt asemănătoare cu cele măsurate în lotul II neexistând diferențe semnificativ statistic, atât în ziua 1 postoperator ($p=0,23$), cât și în ziua 7 postoperator ($p=0,52$).

Această observație vine în completarea examenului macroscopic care nu constată diferențe semnificative între loturile I și II ($p=0,59$). Se remarcă încă o dată că administrarea doar a soluției saline nu modifică rezultatele obținute din punctul de vedere al inducerii aderențelor și al răspunsului inflamator.

Terapia cu rosuvastatină este corelată în studiul nostru cu scăderea valorilor serice medii ale TNF- α în loturile III și IV, în ziua 1 și în ziua 7 postoperator, diferență semnificativ statistică ($p<0,01$).

Administrarea intraperitoneală a rosuvastatinei se corelează cu scăderea valorilor medii ale IL-1 α în ziua 1 postoperator în cadrul loturilor III ($p=0,0013$) și IV ($p=0,00011$), dar nu și în ziua 7, unde diferențele nu au mai fost semnificativ statistic ($p=0,8$).

Aceste date au fost interpretate ținând cont și de numărul mare de determinări nemăsurabile. Rezultatele neanalizabile le-am atribuit pe de o parte unui răspuns sistemic mai scăzut (o eliberare mai redusă în circulație) a citokinei ca urmare a unui traumatism mai redus aplicat peritoneului, dar și ca o posibilă limitare tehnică a testelor efectuate.

Valorile serice ale TNF- α determinate în cele 4 loturi și evoluția lor ziua 1 și 7 postoperator s-au corelat cu gradul de severitate macroscopic și suprafața ocupată de aderențe.

Rosuvastatina în administrare intraperitoneală scade astfel în fazele inițiale eliberarea de citokine inflamatorii (în principal a TNF- α , dar și IL-1 α), acest efect putând reprezenta

prima verigă în efectul demonstrat în studiile 2 și 3 – de reducere cantitativă și calitativă a aderențelor induse. Studii viitoare vor trebui să identifice, dacă există, și alte citokine implicate în răspunsul antiinflamator imediat precum și următoarele verigi ale lanțului de evenimente fiziopatologice, o posibilitate fiind reprezentată de participarea tPA și PAI-1 (creșterea nivelului tPA și scăderea celui de PAI-1).

Se remarcă de asemenea rolul inițial și determinant al inflamației în fiziopatologia formării aderențelor. Un răspuns inflamator susținut, sistemic, obiectivat prin creșterea serică a citokinelor inflamatorii, se corelează cu un grad ridicat de dezvoltare a sindromului aderențial.

Ca și în studiul doi trebuie remarcat că rosuvastatina în cele două concentrații utilizate în cercetare produce efecte asemănătoare, ceea ce denotă, din punctul nostru de vedere folosirea unor doze maxime, dar în profilul de siguranță – absența complicațiilor și a reacțiilor adverse.

Prin validarea efectului antiinflamator al rosuvastatinei în mecanismul formării aderențelor postoperatorii se pune încă o dată întrebarea dacă protocolul de administrare a statinei nu poate fi îmbunătățit.

La cazurile care beneficiază de intervenții chirurgicale programate, pe lângă doza de statină administrată intraoperator, asocierea unor cantități preoperator (pe cale orală) ar putea îmbunătăți statusul inflamator local peritoneal și general, pregătind organismul pentru momentul traumatismului chirurgical.

La intervențiile chirurgicale efectuate în urgență și la care este exclusă o astfel de pregătire inițială efectul antiinflamator al dozei intraperitoneale ar putea fi potențat și prelungit de cantități administrate în primele zile postoperator, pe cale orală.

Nu poate fi exclusă în anumite situații o terapie în care să fie asociată administrarea pre, intra și postoperator.

Discuții și concluzii generale

Modelul experimental de inducere a aderențelor postoperatorii prin abraziunea cu cytobrush a peritoneului parietal și visceral cecal la șobolanul de laborator poate fi considerat un model eficient în studierea mecanismelor fiziopatologice implicate dar și a metodelor de profilaxie inițiate, în condițiile simplității tehnice, a execuției rapide, a lipsei complicațiilor și a unei bune reproduceri a traumatismului chirurgical.

În modelul experimental studiat, abraziunea peritoneală a determinat în fazele inițiale eliberarea serică a citokinelor inflamatorii TNF- α și IL-1 α .

Administrarea soluției de rosuvastatină intraperitoneal, în doză unică, la sfârșitul intervenției chirurgicale s-a constituit într-o metodă eficientă de reducere a formării aderențelor peritoneale postoperatorii la șobolan.

Evaluarea macroscopică la 14 zile de la inducere a aderențelor a demonstrat o reducere semnificativă a gradului de severitate macroscopic și a procentului de acoperire a suprafeței traumatizate consecutiv administrării intraperitoneale a rosuvastatinei.

La examinarea microscopică s-a constatat reducerea gradului de fibroză și inflamație în aderențele induse după administrarea rosuvastatinei.

Administrarea intraperitoneală a rosuvastatinei se asociază cu inhibarea reacțiilor inflamatorii în etapele inițiale ale formării aderențelor, prin scăderea eliberării citokinelor TNF- α și IL-1 α .

La concentrațiile studiate nu s-au înregistrat efecte secundare sau complicații asociate administrării intraperitoneale a rosuvastatinei la șobolan.

Rosuvastatina, în administrare intraperitoneală, poate reprezenta o metodă de viitor în profilaxia formării aderențelor postoperatorii.

Pentru a se înțelege toate mecanismele fiziopatologice implicate și pentru a se elabora un protocol terapeutic adecvat se impun studii clinice aprofundate.

PhD thesis

Etiopathogenesis of Postoperative Peritoneal Adhesions

PhD student **Ștefan Chiorescu**

PhD advisor **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**



Contents

Key words	2
Introduction	3
Current stage of knowledge	4
Study 1	4
Study 2	5
Study 3	6
Discussion and general conclusions	8

Key words: rosuvastatin, peritoneal adhesions, experimental induction, prevention, inflammation, TNF- α , IL-1 α

Introduction

The development of postoperative peritoneal adhesions remains an almost unavoidable consequence of most abdominal surgical interventions and represents a major cause for mortality and morbidity. The incidence rate of the pathology, reported in various studies, reaches up to 90-95% after laparotomy and even 97% after pelvic gynecological surgery. They are not always symptomatic, but they can sometimes cause bowel obstruction, chronic abdominal and pelvic pain, infertility, and difficult access in the case of a surgical reintervention in the abdominal area.

Peritoneal adhesions are actual pathological “links” that are usually formed between the epiploon, the intestinal loops, the viscera, and the abdominal wall. Their appearance varies from fine, avascular films to actual connective tissue bridges that may contain vascular structures or nerves. Sometimes a direct contact between two organs is realized.

The development of peritoneal adhesions has been and is being studied extensively, but, in spite of the data obtained, their exact formation mechanism as well as the means of prevention or the therapeutic means continue to remain incompletely elucidated.

The trauma induced by surgery but also by other factors causes peritoneal lesions. An inflammatory response occurs, which induces pro-coagulant and antifibrinolytic reactions, with an augmentation of fibrin formation and deposition. The persistence of these deposits leads to the formation of certain fibrinous adhesions which, by deposition of collagen and the occurrence of newly formed vessels, become permanent, fibrous.

The current strategies in the prevention of the formation of postoperative adhesions can be grouped into four categories: general principles, surgical technique elements, mechanical barriers, and pharmacological agents. Acting by decreasing inflammation, manipulating coagulation, and by increasing the fibrinolytic activity, the pharmacological agents establish themselves as potentially effective therapies.

In the peritoneal adhesion formation process, inflammation is the initial response to peritoneal aggression. The modulation of the inflammatory response triggered by the surgical trauma can prevent the occurrence of adhesions.

Statins are a heterogeneous class of substances with an HMG-CoA reductase inhibitor role, an enzyme that plays a central role in cholesterol synthesis. They are commonly used in the treatment of hyperlipidemia and in the prevention of cardiovascular diseases. It has been documented that they also exercise anti-inflammatory, antithrombotic, antioxidant, antifibrotic, and fibrinolysis modulation effects. For some of the class representatives, experimental studies have demonstrated their preventive effect in peritoneal adhesion formation, when administered intraperitoneally or/and orally. Rosuvastatin is a new member of the statin family, with a strong hypolipidemic effect. Strong pleiotropic effects have also been demonstrated, but rosuvastatin was not used in the study of peritoneal adhesions.

The present study was conducted at the Biobase of the Center for Practical Skills and Experimental Medicine of the Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-

Napoca, in cooperation with the Pharmacy Faculty and the Pathological Anatomy Department, and its aim was to assess the effect of the intraperitoneal administration of rosuvastatin in the prevention of the development of peritoneal adhesions in rats, as well as the pathogenetic mechanisms involved, with an emphasis on the release of proinflammatory cytokines.

In the initial part of the thesis, dedicated to the **current stage of knowledge**, I conducted a review of the literature on issues touched upon by research proper. It is structured in eight synthesis chapters, containing the most significant and most current data regarding postoperative peritoneal adhesions, etiology, the physio-pathological mechanisms involved, prophylactic methods for their formation after surgical interventions, and the experimental models used in the study of adhesions.

The **personal contributions** part comprises three studies as well as three other chapters dedicated to general discussions, general conclusions, and the original aspects of the paper.

In the **first study of the thesis**, I undertook to accomplish the animal experimental model for the induction of postoperative adhesions, a necessary stage in the study of the formation mechanisms but also in the study of the prophylaxis of adhesion development. Although numerous models have been described and used, there is no standardization of methods or of the laboratory animals used.

The main aim of the study was the induction of peritoneal adhesions in rats, in a significant percentage of subjects, via a simple, easily repeatable technique that reproduces the intraoperative peritoneal trauma as accurately as possible. The secondary aims were to obtain a large percentage of coverage of the traumatized area with adhesions and to obtain some high degree adhesions (upon the macroscopic and microscopic assessment).

The research was carried out on 60 white male rats, randomly divided into two equal groups – a control group and a group in which peritoneal adhesions were induced. After median laparotomy, the adhesions were induced via abrasion of the parietal and visceral peritoneum (in the cecum area) with a Cytobrush – a brush for collecting endocervical samples – over an area of 2.0 x 2.0 cm, until the occurrence of punctiform bleeding, as proof of the peritoneal trauma; on average, 20 ± 3 abrasions were necessary. In the control group, median laparotomy was performed, with the exteriorization of the cecum in the wound for 2-3 minutes, followed by laparorrhaphy.

The assessment of the adhesions formed was conducted 14 days later, from a macroscopic point of view (quantitatively – the incidence rate of their formation at the spot of the trauma and coverage percentage, and qualitatively – adhesion severity score according the Evans model), and from a microscopic point of view (fibrosis and inflammation score described by Hooker).

In the control group, no peritoneal adhesions were found. In the experimental group, the adhesions were induced in 25 rats (83.33%), with a large prevalence of high (second and

third) degree adhesions (20% and 50%, respectively). The percentage of coverage of the traumatized area with adhesions was 51.6%. Upon microscopic assessment, moderate and severe fibrosis and inflammation are also described in the majority of cases (22 rats – 73.33%).

The main objective of the study has been achieved, in that the induction of peritoneal adhesions in rats via abrasion of the parietal and cecal visceral peritoneum was achieved in a significant percentage of cases, the model being thus applicable in later research. We also obtained a coverage with adhesions of over 50% of the area subjected to peritoneal abrasion, with significant fibrosis and inflammation upon histopathological examination.

The aim of the **second study of the thesis** was to assess the efficiency of intraperitoneal administration of rosuvastatin in the prevention of the formation of postoperative adhesions, using an experimental model. 120 rats were used, randomly divided into 4 equal groups (n=30) and in whose case the peritoneal adhesion induction model described in the previous study was applied. Group I was the control group; in the case of group II, a saline solution was administered intraperitoneally; and in the case of groups III and IV, rosuvastatin solution with two concentrations (10 mg/kg and 5 mg/kg, respectively, in single dose) was introduced intraperitoneally. The solution was prepared by the Faculty of Pharmacy of the University of Medicine and Pharmacy of Cluj-Napoca, from pure rosuvastatin, in the shape of calcium salt. The doses used, in a situation where there weren't any previous references in the literature regarding intraperitoneal administration in the study of the formation of adhesions, were calculated by adapting to the experimental animal the doses administered in human practice (the dose used in clinical studies and the maximum dose approved in practice). According to previous studies, the moment of administration was chosen to be at the close of the surgical intervention, as close as possible to the moment of peritoneal trauma (which initiates the cascade of physio-pathological changes).

No adverse effects or complications were recorded related to the administration of statin in the course of the progress of the study with these concentrations.

There were no significant differences of the adhesions induced, between the control group and the group in whose case a saline solution was administered, either from a macroscopic point of view ($p=0.59$) or from a microscopic point of view ($p=0.48$), which indicates the fact that the saline solution (solvent for rosuvastatin) does not intervene and does not influence the formation of adhesions.

The intraperitoneal administration of rosuvastatin was correlated with a reduction in the formation of peritoneal adhesions. This observation is valid in the case of both groups, in which the number of adhesions, the area covered by them, and their degree all decreased upon macroscopic examination, as did the fibrosis/inflammation degree upon microscopic examination. The difference is statistically significant between the control group and group III (10 mg/kg) and between the control group and group IV (5 mg/kg). Between groups III and IV, there were no statistically significant differences.

The **third study of the thesis** complements the previous study and its aim is to assess the anti-inflammatory effect of intraperitoneally administered rosuvastatin. This effect is validated by a decrease in the release of proinflammatory cytokines. The secondary objective was the assessment of the role played by the release of cytokines in the adhesion development mechanism. For biological material, we used a group of 120 white male rats of the Wistar-Bratislava breed, provided by the Center for Practical Skills and Experimental Medicine of the Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, which was used in the case of study two, as well. 1 day and 7 days postoperatively, blood samples were taken from the retro-orbital plexus. The serum concentrations of TNF- α , IL-1 α were determined using ELISA kits (BioVendor - Laboratorni medicina a.s., Brno, Czech Republic), namely RAF130R (TNF- α) and RAF047R (IL-1 α), respectively.

Peritoneal trauma following surgical operations triggers an inflammatory response. Studies have demonstrated that during the acute stage of the inflammatory response, the mesothelial cells and the peritoneal macrophages produce a multitude of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β 1). These, either individually or synergistically, reduce tPA synthesis and increase the release of PAI-1.

Research has demonstrated the existence of a correlation between the postoperative rise in the serum level of inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α , and the formation of peritoneal adhesions, a more pronounced increase being a marker for the intensity of the adhesion syndrome. The experimental administration of anti TNF- α antibodies reduces the formation of peritoneal adhesions; however, there are studies that do not support these results.

In the case of the experimental model we studied, the parietal and visceral peritoneum trauma was accompanied by the release of inflammatory cytokines into the bloodstream; the TNF- α and IL-1 α serum values were measured postoperatively, and they were higher on day one following surgery. The absolute values determined for TNF- α were higher than those of IL-1 α . The mean serum values measured for TNF- α in groups I (control group) and II (with intraperitoneal administration of a saline solution) do not show any statistically significant differences, either on day 1 postoperatively ($p=0.914$) or on day 7 postoperatively ($p=0.84$).

Similarly, the IL-1 α serum values established in the case of group I are similar to the ones measured in group II, and there were no statistically significant differences, either on day 1 postoperatively ($p=0.23$) or on day 7 postoperatively ($p=0.52$).

This observation complements the macroscopic examination, which does not find any significant differences between groups I and II ($p=0.59$). One notices once again that the administration of just the saline solution does not alter the results obtained from the point of view of the induction of adhesions and of the inflammatory response.

Rosuvastatin therapy is correlated in our study with a decrease in the mean serum values of TNF- α in groups III and IV, on days 1 and 7 postoperatively, the difference being statistically significant ($p<0,01$).

The intraperitoneal administration of rosuvastatin is correlated with a decrease in the mean values of IL-1 α on day 1 postoperatively in the case of groups III ($p=0.0013$) and IV ($p=0.00011$), but not on day 7, where the differences were no longer statistically significant ($p=0.8$).

The data was interpreted also taking into account the large number of unmeasurable determinations. The unanalyzable results were attributed to a lower systemic response (a more reduced release into the bloodstream) of cytokine as a result of a more reduced trauma applied to the peritoneum, on the one hand, but also to a possible technical limitation of the tests performed, on the other hand.

The serum values of TNF- α determined in the four groups and their evolution on days 1 and 7 postoperatively were correlated with the macroscopic degree of severity and the area covered by the adhesions.

Thus rosuvastatin, when administered intraperitoneally, in the initial stages, lowers the release of inflammatory cytokines (of TNF- α mainly, but also of IL-1 α), and this effect may represent the first link in the effect demonstrated in studies 2 and 3, namely the quantitative and qualitative reduction of the adhesions induced. Future studies will have to also identify other cytokines, if there be any, involved in the immediate anti-inflammatory response, as well as the next links in the physio-pathological chain of events, a possibility being represented by the participation of tPA and PAI-1 (an increase in the tPA level and a decrease in the PAI-1 level).

One also notices the initial and decisive role of the inflammation in the physiopathology of the formation of adhesions. A sustained, systemic inflammatory response, objectified through a serum increase of inflammatory cytokines is correlated with a high degree of adhesion syndrome development.

As in study two, one needs to observe that rosuvastatin in the two concentrations used in research produces similar effects, which indicates, from our point of view, the use of maximum doses, but within the limits of the safety profile – the absence of complications and adverse reactions.

The validation of the anti-inflammatory effect of rosuvastatin in the mechanism of the formation of postoperative adhesions raises once more the question whether the statin administration protocol might not be improved.

In the cases that benefit from scheduled surgical interventions, besides the dose of statin administered intraoperatively, the association of certain orally-administered quantities preoperatively could improve the peritoneal local and general inflammatory status, preparing the body for the moment of surgical trauma.

In the case of emergency surgical interventions, in which case such initial preparation is out of the question, the inflammatory effect of the intraperitoneal dose could be boosted and extended by quantities administered orally, in the first days postoperatively.

In certain situations, one cannot exclude an associated therapy with pre-, intra-, and postoperative administration.

Discussion and general conclusions

The experimental model for the induction of postoperative adhesions via abrasion with a Cytobrush of the parietal and cecal visceral peritoneum in laboratory rats can be considered to be an efficient model in the study of the physio-pathological mechanisms involved but also of the initiated prophylaxis methods, under conditions of technical simplicity, quick execution, lack of complications, and a good reproduction of the surgical trauma.

In the studied experimental model, peritoneal abrasion caused in the initial stages the serum release of inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 α .

The intraperitoneal administration of rosuvastatin solution in a single dose, at the end of the surgical intervention, was established as an efficient method in reducing the formation of postoperative peritoneal adhesions in rats.

The macroscopic assessment 14 days after the adhesions were induced has shown a significant reduction in the macroscopic degree of severity and in the percentage of the coverage of the traumatized area following the intraperitoneal administration of rosuvastatin.

Upon microscopic examination it was found that the degree of fibrosis and inflammation dropped in the adhesions induced after the administration of rosuvastatin.

The intraperitoneal administration of rosuvastatin is associated with the inhibition of the inflammatory reactions in the initial stages of the formation of adhesion, via a decrease in the release of cytokines TNF- α and IL-1 α .

In the case of the studied concentrations, no side effects or complications associated with the intraperitoneal administration of rosuvastatin in rats were recorded.

Rosuvastatin, when administered intraperitoneally, may represent a future method in the prophylaxis of the formation of postoperative adhesions.

Thorough clinical studies are required in order to understand all the physio-pathological mechanisms involved and in order for an appropriate therapeutic protocol to be developed.