

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
Podiplomski študij biomedicine

TINA ROŠKAR

**VPLIV SOČASNE UPORABE MELOKSIKAMA IN
DEKSAMETAZONA Z MIZOPROSTOLOM NA VSEBNOST
PROSTAGLANDINOV, LEVKOTRIENOV IN TROMBOKSANOV V
SERUMU PRI PSIH**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2011

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ljubljana, 1. 9. 2011

Tina Roškar

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Podiplomski študij biomedicine

UDK: 636.7.09:615.212.065:616.3:616.153(043.3)

TINA ROŠKAR, dr.vet.med.

**VPLIV SOČASNE UPORABE MELOKSIKAMA IN
DEKSAMETAZONA Z MIZOPROSTOLOM NA VSEBNOST
PROSTAGLANDINOV, LEVKOTRIENOV IN TROMBOKSANOV V
SERUMU PRI PSIH**

Doktorska disertacija

**THE EFFECT OF CONCOMITANT USE OF MELOXICAM AND
DEXAMETHASON WITH MISOPROSTOL ON PROSTAGLANDIN,
LEUKOTRIEN AND THROMBOXAN SERUM LEVELS IN DOGS**

Ph. D. Thesis

Ljubljana, 2011

Tina Roškar

**VPLIV SOČASNE UPORABE MELOKSIKAMA IN DEKSAMETAZONA Z
MIZOPROSTOLOM NA VSEBNOST PROSTAGLANDINOV, LEVKOTRIENOV
IN TROMBOKSANOV V SERUMU PRI PSIH**

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Predstojnik: prof. dr. Jože Kogovšek, dr. vet. med.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne

Mentorica: izr. prof. dr. Silvestra Kobal, dr. vet. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor

Predsednik: prof. dr. Janoš Butinar, dr. vet. med.

Članica: doc. dr. Alenka Seliškar, dr. vet. med.

Član: izr. prof. dr. Samo Ribarič, dr. med.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	5
KAZALO GRAFOV.....	6
KAZALO RAZPREDELNIC.....	7
KAZALO SLIK.....	7
KRATICE IN OKRAJŠAVE.....	9
IZVLEČEK.....	10
ABSTRACT.....	12
1 UVOD.....	14
1.1NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZE.....	18
2 PREGLED LITERATURE.....	20
2.1NESTEROIDNA PROTIVNETNA ZDRAVILA IN NJIHOVA VLOGA PRI POŠKODBI PREBAVIL.....	20
2.1.1NAČINI NASTANKA POŠKODB NA SLUZNICI PREBAVIL ZARADI DELOVANJA NSPZ.....	22
2.1.1.1Neposredni lokalni vpliv NSPZ na sluznico prebavil.....	22
2.1.1.2 Sistemski vplivi NSPZ – presnova arahidonske kisline.....	24
2.2 PROSTAGLANDINI	27
2.2.1 BIOSINTEZA PROSTAGLANDINOV.....	27
2.2.2VLOGA PROSTAGLANDINOV PRI BOLEČINI IN VNETJU.....	32
2.2.3VPLIV NSPZ IN KORTIKOSTEROIDOV NA SINTEZO PROSTAGLANDINOV.....	32
2.3TROMBOKSAN B2 – nastanek in vloga.....	33
2.3.1 VPLIV NSPZ IN KORTIKOSTEROIDOV NA SINTEZO TROMBOKSANOV	34
2.4LEVKOTRIEN B4 – nastanek in vloga.....	35
2.5PREPUSTNOST ŽELODČNE IN ČREVESNE SLUZNICE.....	37
2.5.1PREHOD SNOVI SKOZI EPITELIJ PREBAVIL IN PREPUSTNOST SLUZNICE PREBAVIL.....	37
2.5.2METODE ZA UGOTAVLJANJE FUNKCIJE BARIERE SLUZNICE PREBAVIL IN NJENIH POŠKODB	39
2.5.2.1Označevalci želodčne in črevesne prepustnosti.....	41
2.6 ZDRAVILA.....	48
2.6.1 MELOKSIKAM.....	48
2.6.2 KORTIKOSTEROIDI	49
2.6.3 MIZOPROSTOL	50
3 MATERIALI IN METODE.....	52
3.1POSKUSNE ŽIVALI.....	52
3.2POSKUSNI PROTOKOL.....	53
3.3 PRIPRAVA, SHRANJEVANJE IN ANALIZA VZORCEV.....	55
3.3.1 Meritve koncentracij PGE ₂ , PGI ₂ , TXB ₂ IN LTB ₄ V SERUMU.....	55
3.3.2TROJNI SLADKORNI TEST.....	56
Metoda za določanje sladkorjev v plazmi in izračun L/M indeksa	56
3.4STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV.....	59
4 REZULTATI.....	61
4.1VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO PROSTAGLANDINA E ₂ (PGE ₂) V SERUMU PSO.....	61

4.2 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO PROSTAGLANDINA I ₂ (PGI ₂) V SERUMU PSOVS	64
4.3 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO TROMBOKSANA B ₂ (TXB ₂) V SERUMU PSOVS	67
4.4 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO LEVKOTRIENA B ₄ (LTB ₄) V SERUMU PSOVS	70
4.5 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA L/M INDEKS PRI PSIH	73
4.6 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO SAHAROZE V PLAZMI PSOVS	76
5 RAZPRAVA	79
6 SKLEPI	94
7 POVZETEK	96
8 ZAHVALA	103
9 LITERATURA	105
10 PRILOGE	125
PRILOGA A Objavljen znanstveni članek	125

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo	61
Graf 2: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo	62
Graf 3: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo	63
Graf 4: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo	63
Graf 5: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo	64
Graf 6: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo	65
Graf 7: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, in pri psih, ki so prejeli placebo	65
Graf 8: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo	66
Graf 9: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo	67
Graf 10: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo	68
Graf 11: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo	68
Graf 12: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB ₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo	69
Graf 13: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB ₄ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo	70

Graf 14: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB4 v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	71
Graf 15: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB4 v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	71
Graf 16: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB4 v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.	72
Graf 17: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M, indeksa izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.....	73
Graf 18: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M, indeksa izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	74
Graf 19: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M indeksa, izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	74
Graf 20: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M indeksa, izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	75
Graf 21: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.....	76
Graf 22: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	77
Graf 23: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.....	78
Graf 24: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.	78

KAZALO RAZPREDELNIC

RAZPREDELNICA 1: Potek poskusa po dnevih.....	54
--	-----------

KAZALO SLIK

SLIKA 1: Vloga COX-1 in COX-2 pri sintezi prostaglandinov in delovanje NSPZ	27
SLIKA 2: Vloga COX-1 in COX-2 pri nastanku prostaglandinov	31

KRATICE IN OKRAJŠAVE

NSPZ	nesteroidno protivnetno zdravilo
NSAID	nesteroidno protivnetno zdravilo (nonsteroidal anti-inflammatory drug)
ATP	adenozin tri fosfat
COX	ciklooksigenaza
PG	prostaglandin
NO	dušikov oksid
TX	tromboksan
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
TNF	faktor tumorske nekroze
LT	levkotrien
LOX	lipooksigenaza
CrEDTA	z izotopom kroma označen etilendiaminatetra acetat
PEG	polietilenglikol

IZVLEČEK

Ključne besede: Psi, boleznj – zdravljenje z zdravili; nesteroidna protivnetna zdravila – farmakologija; mizoprostol – farmakologija; deksametazon – farmakologija; zdravilo, interakcije; želodčna sluznica – učinki zdravil; črevesna sluznica – učinki zdravil; prepustnost – učinki zdravil; prostaglandini – biosinteza; levkotrien B₄ – biosinteza; tromboksan B₂–biosinteza; kri, kemične analize; psi.

Namen raziskave je bil ugotoviti varnost desetdnevne uporabe nesteroidnega protivnetnega zdravila (NSPZ) meloksikama samostojno in v kombinaciji z deksametazonom in mizoprostolom pri psih z določanjem serumske koncentracije prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), tromboksana B₂ (TXB₂) in levkotriena B₄ (LTB₄) ter ugotavljanjem sprememb v prepustnosti želodčne in črevesne sluznice.

Raziskavo, ki je bila razdeljena v pet faz (placebo; meloksikam; meloksikam in mizoprostol; meloksikam in deksametazon; meloksikam, mizoprostol in deksametazon), smo opravili na sedmih odraslih psih pasme beagle. Prvih deset dni vsake faze smo pse tretirali z določeno kombinacijo zdravil, od desetega do dvajsetega dne posamezne faze pa psi niso dobivali ničesar. Vzorce krvi za določanje serumske koncentracije PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄ ter določanje saharoze, manitola in laktuloze v plazmi smo jemali za določitev izhodiščnih vrednosti pred začetkom poskusa, nato pa drugi, šesti, enajsti in dvajseti dan vsake posamezne faze. Med zaporednimi fazami je bilo najmanj 14 dni premora, ko so psi mirovali.

Meloksikam je sam ter v kombinaciji z deksametazonom in mizoprostolom med desetdnevnim tretiranjem povzročil znižanje koncentracije PGE₂ in PGI₂ v serumu psov. Pri sočasni uporabi meloksikama in deksametazona so se pojavili tudi neželeni učinki, kot so bruhanje, driska, napeti abdomni in flatulenca. Tretiranje z meloksikamom in kombinacijo meloksikama, deksametazona in mizoprostola ni značilno znižalo koncentracije TXB₂ v serumu psov. V omenjeni študiji nismo ugotovili statistično značilnega povečanja LTB₄. Meloksikam je samostojno in v kombinaciji z deksametazonom med desetdnevnim tretiranjem povečal prepustnost želodčne in črevesne sluznice, vendar deset dni po tretiranju spremembe s sladkornimi testi niso bile več zaznavne. Pri sočasni uporabi mizoprostola se je koncentracija saharoze v plazmi prej približala vrednostim, ugotovljenim pri psih, ki so prejeli placebo, L/M indeks pa se ni povečal, kar potrjuje pozitiven zaščitni učinek mizoprostola na želodčno in črevesno sluznico pri uporabi NSPZ.

THE EFFECT OF CONCOMITANT USE OF MELOXICAM AND DEXAMETHASON WITH MISOPROSTOL ON PROSTAGLANDIN, LEUKOTRIEN AND THROMBOXAN SERUM LEVELS IN DOGS

ABSTRACT

Key words: Dog, diseases–drug therapy; non-steroidal antiinflammatory agents–pharmacology; misoprostol–pharmacology; dexamethasone–pharmacology; drug interactions; gastric mucosa – drug effects; intestinal mucosa – drug effects; permeability – drug effects; prostaglandins – biosynthesis; leukotrien B₄ – biosynthesis; thromboxane B₂ – biosynthesis; blood, chemical analysis; dogs.

The aim of this doctoral thesis was to investigate the safety of ten-day treatment with meloxicam and the combination of meloxicam with dexamethason and misoprostol in dogs. Adverse effects of the drugs as well as safety of their use were evaluated by measuring the serum concentration of prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin I₂ (PGI₂), thromboxane B₂ (TXB₂) and leukotriene B₄ (LTB₄) and changes of the gastrointestinal permeability.

The study was performed on seven dogs and was divided into five phases (placebo, meloxicam, meloxicam with misoprostol, meloxicam with dexamethason, meloxicam with misoprostol and dexamethason). In the first ten days of each phase dogs were treated with a certain combination of the drugs and between days 10 and 20 of each phase the dogs did not receive any medication. Blood samples for determination of the serum concentrations of PGE₂, PGI₂, TXB₂ and LTB₄ and determination of plasma concentrations of sucrose, mannitol and lactulose were drawn before the beginning of the study and subsequently on days 2, 6, 11 and 20 of each phase. There was a minimum of 14 days resting period between each phase, when the dogs did not receive any medication.

Meloxicam caused a decrease in serum PGE₂ and PGI₂ concentrations when used alone and in combination with misoprostol and dexamethason during the ten days of treatment. Undesirable side effects, such as vomiting, diarrhoea, distended abdomen and flatulence were noticed in phases where meloxicam was used together with dexamethason. There was no significant decrease of TXB₂ serum concentration after treatment with meloxicam and the combination of meloxicam, dexamethason and misoprostol. We did not detect a significant increase in LTB₄ serum concentration in the present study. Meloxicam alone and in combination with dexamethason changed the permeability of gastrointestinal mucosa during the ten days of treatment. However, ten days after treatment these changes were not detectable with sugar permeability tests. In phases where misoprostol was concomitantly used, the plasma sucrose concentration dropped to the placebo level sooner and L/M index did not increase, therefore proving the positive protective effect of misoprostol on gastric and intestinal mucosa after treatment with non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs).

1 UVOD

Nesteroidna protivnetna zdravila (NSPZ) uporabljamo za zdravljenje različnih bolezni in stanj pri malih živalih, kot so osteoartritis, akutne poškodbe mišic in skeleta, akutno vnetje, arterijski tromboembolizem, za blaženje bolečin pri meningitisu, novotvorbah kosti ter pri oteklinah in poškodbah mehkih tkiv. Uporabljamo jih perioperacijsko za lajšanje bolečin pri kirurških posegih in pri ostalih stanjih, ko je treba zagotoviti analgezijo (Bowersox in sod., 1996; Mathews, 1996; Jones in Budsberg, 2000; Lascelles in sod., 2005). Uporabo NSPZ pri psih omejujejo neželeni učinki, kot so razdraženost želodčne sluznice in nastanek želodčnih razjed, ki jih lastniki zlahka spregledajo (Meddings in sod., 1995; Bowersox in sod., 1996; Forsyth in sod., 1998; Buttgereit in sod., 2001). Mehanizem nastanka želodčnih razjed zaradi uporabe NSPZ vključuje več dejavnikov. Poškodbe sluznice nastanejo zaradi neposrednega lokalnega delovanja ter zaradi zaviranja delovanja COX-1, kar ima za posledico zmanjšano sintezo endogenih prostaglandinov (Bowersox in sod., 1996; Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Schneider in sod., 1999; Rich in Scheiman, 2000; Lichtenberger, 2001; Tomlinson in Blikslager, 2003). COX-1, ki je konstitutivna oblika encimov COX (encimov, ki so potrebni za sintezo eikozanoidov, kot so prostaglandini, prostaciklini in tromboksani iz arahidonske kisljine), naj bi sprožila osnovne fiziološke funkcije, ki so odvisne od prostaglandinov (Mathews, 1996; Brideau in sod., 1996; Brooks in sod., 1999; Jones in Budsberg, 2000; Kay-Mugford in sod., 2000; Wallace in Li Ma, 2001; Brideau in sod., 2001; Tomlinson in Blikslager, 2003; Lascelles in sod., 2005). Nasprotno COX-2, ki je inducirana oblika izoencima COX, povzroča vnetno aktivnost prostaglandinov (Steinmeyer, 2000; Jones in Budsberg, 2000; Tomlinson in Blikslager, 2003; Lascelles in sod., 2005; Sessions in sod., 2005). Ekspresija COX-2 ni le inducirana, del aktivnosti COX-2 je stalno potreben za normalno delovanje ledvic, živčevja, rodil in za

celjenje razjed na prebavilih (Poonam in sod., 2005; Laine in sod., 2008). Protivnetni, analgetični in antipiretični učinki so posledica zaviranja COX-2, neželeni učinki na prebavila, ledvice in motnje koagulacije pa so posledica zaviranja predvsem COX-1 (Mitchell in sod., 1994; Vane, 1995; Steinmeyer, 2000; Lichtenberger, 2001; Jones in sod., 2002; Boston in sod., 2003). Prav zaviranje COX-1 s posledičnim zmanjšanjem sinteze endogenih prostaglandinov (PGE₁, PGE₂ in PGI₂), ki so pomembni za zaščito sluznice prebavil, je eden najpomembnejših mehanizmov, ki sprožajo neželene učinke NSPZ (Bowersox in sod., 1996; Rich in Scheiman, 2000; Tomlinson in Blikslager, 2003). Posledica je povečanje prepustnosti sluznice prebavil za toksine in snovi iz lumna črevesja, kot so žolč, izločki trebušne slinavke in bakterije (Bjarnason in Peters, 1996; Reuter in sod., 1997; Thjodleifsson in Bjarnason, 1999).

Endoskopska preiskava prebavil je bila vodilna metoda za ugotavljanje poškodb prebavil zaradi uporabe NSPZ pri ljudeh, vendar je v veterini zaradi omejenih možnosti in pomanjkanja standardizacije, tako postopka kot vrednotenja rezultatov, manj primerna. (Meddings in sod., 1993; Sutherland in sod., 1994; Davies, 1998; Davies in Saleh, 2000; Craven in sod., 2007).

Meloksikam prištevamo k NSPZ z večjo selektivnostjo za COX-2 (Vane, 1995; Noble in Balfour, 1996; Smecuol in sod., 2001; Plumb, 2008a; Jones in sod., 2002; Boston in sod., 2003) in delnim ohranjanjem delovanja COX-1, kot so potrdili z *in-vitro* in *in-vivo* študijami (Engelhardt in sod., 1996a; Engelhardt in sod., 1996b; Kay-Mugford in sod., 2000; Brideau in sod., 2001; Jones in sod., 2002).

Deksametazon je glukokortikoid, ki zmanjšuje nastanek prostaglandinov iz arahidonske kisline ter s tem zmanjša vnetni odziv (Carpani de Kaski 1995; Neiger in sod., 2000). Uporaba deksametazona poveča tveganje za nastanek razjed na prebavilih pri ljudeh in psih (Piper in sod., 1991; Rohrer in sod., 1999).

Mizoprostol je sintetični analog PGE₁ (Bauer, 1985), ki zmanjša nastanek razjed na prebavilih pri ljudeh in psih zaradi uporabe NSPZ. Mizoprostol zmanjša nastajanje želodčne kisline, stimulira ekspresijo COX-2 in s tem nastanek PGE₂, ki pripomorejo k celjenju že nastalih razjed, ter ima citoprotektivno funkcijo (Wilson, 1987; Dejani in sod., 1989; Walt, 1992; Johnston in sod., 1995; Bowersox in sod., 1996; Ward in sod., 2003; Poonam in sod., 2005). Podatki o uspešnosti uporabe mizoprostola kot zaščitnega sredstva za preprečevanje neželenih učinkov zaradi uporabe NSPZ pri živalih so redki (Murtaugh in sod., 1993; Johnston in sod., 1995; Bowersox in sod., 1996; Rohrer in sod., 1998; Ward in sod., 2003).

Raziskavo smo zasnovali na osnovi klinične situacije, v kateri bi bilo indicirano kombiniranje meloksikama in kortikosteroida, vendar se zaradi resnih neželenih učinkov njuna uporaba izključuje. Želeli smo ugotoviti vpliv kratkotrajne uporabe meloksikama samega ali v kombinaciji z deksametazonom na sluznico prebavil ter morebitni zaščitni učinek mizoprostola pri zdravih psih.

Z merjenjem PGE₂ in PGI₂, ki imata v prebavilih citoprotektivno vlogo (zavirata izločanje želodčne kisline, povečata krvotok v sluznici prebavil, stimulirata nastanek sluzi in bikarbonata ter vplivata na proliferacijo celic), smo želeli ugotoviti, koliko uporaba omenjenih zdravil vpliva na njuno serumsko koncentracijo. Rezultate meritev prostaglandinov smo podprli s sladkornimi testi za merjenje prepustnosti želodčne in črevesne sluznice, saj je pričakovati, da se pri sočasni uporabi NSPZ in kortikosteroida

poveča tveganje za nastanek razjed na prebavilih in poveča prepustnost sluznice. Prepustnost sluznice prebavil se poveča pri številnih boleznih, ki so povezane s poškodbo epitelija prebavil (Meddings in sod., 1995), testi za merjenje želodčne in črevesne prepustnosti pa so se izkazali za zanesljive pri ugotavljanju poškodb prebavil zaradi uporabe NSPZ (Davies, 1998; Craven in sod., 2007). Generalizirane poškodbe sluznice prebavil lahko ugotovimo s trojnim sladkornim testom, ki vključuje saharozo, laktulozo in manitol. Dodatno smo želeli ugotoviti, ali bi uporaba trojnega sladkornega testa za ugotavljanje prepustnosti sluznice prebavil pri psih v klinični praksi pomagala pri zgodnjem odkrivanju sprememb na prebavilih, ki nastanejo zaradi zdravljenja z omenjenimi zdravili. Želeli smo ugotoviti tudi, ali mizoprostol zmanjša neželene učinke meloksikama in deksametazona na sluznico prebavil, kar pomeni, da ne pride do zaviranja sinteze prostaglandinov in povečanja prepustnosti sluznice prebavil, ali je ta manj povečana, kadar meloksikam in deksametazon kombiniramo z mizoprostolom.

Z merjenjem TXB_2 smo ugotavljali zaviralni učinek zdravil na trombocitno COX-1, ki privede do motenj primarne hemostaze. Tako meloksikam kot deksametazon naj bi vplivala na zmanjšano sintezo tromboksanov, kar bi nas klinično zanimalo predvsem v primeru, ko bi pacient, ki je zdravila prejel, potreboval kirurški poseg. Z merjenjem LTB_4 , ki je močan kemotaksin za polimorfonuklearne levkocite, smo želeli ovrednotiti lokalni vnetni odziv sluznice prebavil na zdravljenje z meloksikamom, deksametazonom in mizoprostolom.

1.1 NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZE

Namen raziskave je bil ugotoviti:

- ali se serumska koncentracija PGE₂, PGI₂ in TXB₂ zmanjša, serumska koncentracija LTB₄ pa poveča med desetdnevnim dajanjem meloksikama zdravim psom ali po njem;
- ali se prepustnost želodčne in črevesne sluznice poveča med desetdnevnim dajanjem meloksikama zdravim psom ali po njem;
- ali se pri psih, ki jemljejo sočasno meloksikam in deksametazon, koncentracija PGE₂, PGI₂ in TXB₂ zmanjša, koncentracija LTB₄ pa poveča bolj kot pri psih, tretiranih samo z meloksikamom, in ali deksametazon dodatno poveča prepustnost želodčne in črevesne sluznice pri zdravih psih, tretiranih z meloksikamom;
- ali mizoprostol omili zmanjšanje serumske koncentracije PGE₂, PGI₂, TXB₂ in povečanje serumske koncentracije LTB₄ pri zdravih psih, ki jemljejo meloksikam ali kombinacijo meloksikama in deksametazona, ter ali se prepustnost želodčne in črevesne sluznice pri zdravih psih poveča manj, kadar meloksikam in deksametazon kombiniramo z mizoprostolom.

Z raziskavo smo želeli potrditi naslednje hipoteze:

1. Meloksikam sam ali v kombinaciji z deksametazonom pri zdravih psih povzroči zmanjšanje serumske koncentracije PGE₂, PGI₂ in TXB₂ ter povečanje serumske koncentracije LTB₄. Spremembe parametrov so izrazitejše pri kombiniranju meloksikama z deksametazonom.
2. Mizoprostol pri zdravih psih omili zmanjšanje serumske koncentracije PGE₂, PGI₂ in TXB₂ ter povečanje serumske koncentracije LTB₄ zaradi jemanja meloksikama samega ali v kombinaciji z deksametazonom.

3. Meloksikam sam ali v kombinaciji z deksametazonom pri zdravih psih povzroči povečanje L/M indeksa in koncentracije saharoze v plazmi. Spremembe parametrov so izrazitejše pri kombiniranju meloksikama z deksametazonom.

4. Mizoprostol pri zdravih psih prepreči ali vsaj omili povečanje L/M indeksa in koncentracije saharoze v plazmi zaradi jemanja meloksikama samega ali v kombinaciji z deksametazonom.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 NESTEROIDNA PROTIVNETNA ZDRAVILA IN NJIHOVA VLOGA PRI POŠKODBI PREBAVIL

Nesteroidna protivnetna zdravila psom pogosto predpišemo za zdravljenje osteoartritisa, akutne mehanske poškodbe mišično-skeletnega sistema, za lajšanje bolečin pri meningitisu, kostnih novotvorbah, otekanju mehkih tkiv (mastitis), kot podporno terapijo pri zdravljenju dirofilarioze, za preventivo in zdravljenje sistemskega arterijskega tromboembolizma v povezavi s kardiomiopatijo in kot analgetike za preprečevanje perioperacijske in pooperacijske bolečine (Mathews, 1996; Jones in Budsberg, 2000; Mathews, 2001). Uporabljamo jih tudi pri psih z neoperabilnim karcinomom prehodnega epitelija sečnega mehurja (Knapp in sod., 1994). Njihova uporaba je pogosto omejena zaradi neželenih učinkov na prebavila (Buttgereit in sod., 2001; Craven in sod., 2007). Klinični znaki so lahko zelo blagi. Pri ljudeh jih opisujejo kot dispepsijo in pekoč občutek v želodcu. NSPZ lahko povzročijo nastanek peptičnih razjed, katerih posledica je vnetje, izguba krvi, beljakovin in nastanek zožitev na prebavilih. Pojavita se lahko tudi življenje ogrožajoča krvavitve in perforacija želodca (Hudson in sod., 1993; Scarpignato, 1995; Davies, 1998; Tjodleifsson in Blikslager, 1999). Pogostost pojavljanja neželenih učinkov zaradi uporabe NSPZ je pri ljudeh zelo dobro raziskana in dokumentirana, saj ocenjujejo, da od 1 do 2 odstotka svetovne populacije dnevno zaužije vsaj eno tableto aspirina. Najpogostejši zaplet pri dolgotrajni uporabi NSPZ pri ljudeh so razjede in krvavitve na sluznici želodca in dvanajsternika, ki naj bi se pojavile pri od 15 do 30 odstotkov uporabnikov. Krvavitve in perforacije prebavil naj bi samo v Združenih državah Amerike zahtevale več tisoč človeških življenj na leto (Lichtenberger, 2001). Pogostost pojavljanja podobnih neželenih učinkov pri živalih ni znana. Vemo, da so določene živalske vrste bolj občutljive na učinke NSPZ.

Mačke so ene najbolj občutljivih vrst zaradi slabe aktivnosti glukuronil transferaze in posledične nesposobnosti za presnavljanje NSPZ. Psi NSPZ prenašajo veliko bolje kot mačke, vendar so v primerjavi z ljudmi še vedno občutljivejši, kar verjetno lahko pripišemo večjemu obsegu enterohepatičnega kroženja, hitrejši absorpciji v prebavilih in daljši razpolovni dobi NSPZ (Jones in Budsberg, 2000).

Kljub razvoju novih, za prebavila varnejših NSPZ za uporabo v veterinarski medicini je nastanek želodčnih in črevesnih razjed še vedno na prvem mestu med neželenimi učinki teh zdravil. Nadziranje pacientov je oteženo, saj nimamo na razpolago zanesljivih, praktičnih in enostavnih diagnostičnih testov za odkrivanje zgodnjih oblik razjed na prebavilih pri psih. Ugotavljanje okultne krvi v blatu z uporabo guaiac testa in testa o-tolidin je pri psih manj zanesljivo, saj mesna dieta vpliva na izid testov. Zato se nekaj dni pred izvedbo testa priporoča prilagojena vegetarijanska dieta, ki pa žal pri vseh psih ni izvedljiva (Cook in sod., 1992; Rice in Ihle, 1994). Uporaba imunoloških testov za ugotavljanje hemoglobina v blatu se je izkazala za zanesljivo v primerih kolorektalnih novotvorb pri ljudeh (Greenwald, 2005; Parra-Blanco in sod., 2010). Z razvojem podobnih testov za pse bi bilo spremljanje neželenih učinkov NSPZ na prebavila preprostejše.

Klinični znaki razjed na prebavilih vključujejo potrtost, zmanjšano aktivnost, neješčnost ali zmanjšan apetit, napet abdomen, bruhanje, drisko, hematohezijo ali meleno. Bolj ogroženi so psi, ki so že imeli želodčne ali črevesne razjede, starejši psi in tisti, ki jemljejo NSPZ dalj časa (kronična obolenja), oboleli s *Helicobacter pylori*, mastocitomom ter psi z okvarami jeter ali ledvic, hipoproteinemijo ali povečanim številom levkocitov (Lascelles in sod., 2005).

2.1.1 NAČINI NASTANKA POŠKODB NA SLUZNICI PREBAVIL ZARADI DELOVANJA NSPZ

Poleg sluzi, ki prekriva prebavila, in bikarbonata sta pri zaščiti želodčne in črevesne sluznice pred škodljivimi agensi pomembni tudi epitelna in subepitelna zaščita. Epitelno zaščito predstavljajo hidrofobna zaščitna plast in tesne ščitnice. Pomembna je tudi hitra regeneracija celic želodčne sluznice in obnova sluznice z restitucijo, ki jo uravnava epidermalni rastni faktor. Subepitelijsko zaščito predstavlja zadostna oskrba s krvjo in normalno acido-bazno stanje. Kri dovaja kisik in hranljive snovi, odplavlja celične produkte (Hojgaard in sod., 1996) in razredči oz. nevtralizira kislino in toksine ter tako prepreči, da bi se v tkivu sluznice akumulirali v citotoksičnih koncentracijah (Wallace in Ma, 2001).

NSPZ povzročijo poškodbo želodčno-črevesne sluznice na dva načina: z neposredno lokalno poškodbo in sistemsko z zaviranjem sinteze endogenih prostaglandinov (Schneider in sod., 1999; Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Rich in Scheiman, 2000; Lichtenberger, 2001; Tomlinson in Blikslager, 2003). Neposredna lokalna poškodba je prvi korak pri nastajanju razjed zaradi NSPZ. Spremembe v mikrocirkulaciji, skupaj z zaviranjem sinteze prostaglandinov, pripomorejo h klinično zaznavnim razjedam (Hudson in sod., 1993; Rich in Scheiman, 2000).

2.1.1.1 Neposredni lokalni vpliv NSPZ na sluznico prebavil

Razjede in krvavitve na želodčni in črevesni sluznici, ki so posledica neposredne lokalne poškodbe, nastanejo zaradi peroralnega vnosa NSPZ v lumen prebavil, zaradi izločanja preko žolča ali zaradi kombinacije obeh. Eden prvih prepoznavnih škodljivih učinkov NSPZ je uničenje mukoznega zaščitnega sloja prebavil. Epitelijske celice želodčne sluznice

proizvajajo in izločajo surfaktantu podoben fosfolipid, fosfatidilholin (Lichtenberger, 2001). NSPZ zmanjšajo hidrofobnost sluzi in s tem uničijo zaščitno bariero, ki ščiti prebavila pred želodčno kislino in bakterijami. Škodljive učinke povzročijo z neposrednim delovanjem na celice želodca, ki proizvajajo sluz, ter s prekinitvijo oksidativne fosforilacije v mitohondrijih celic (Schneider in sod., 1999; Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Tomlinson in Blikslager, 2003). Tako prekinajo dihalno verigo, ki vodi do zmanjšane produkcije celičnega adenozin trifosfata (ATP), kar povzroči prehodno povečanje prepustnosti želodčne in črevesne sluznice. Povečana prepustnost izpostavi sluznico škodljivim dejavnikom, ki se nahajajo v lumnu (žolč, bakterije, zaužite snovi ipd.), in povzroči vnetje tkiva (Schneider in sod., 1999; Thjodleifsson in Bjarnason, 1999). Drugi vzrok je v kemični reakciji med fosfatidilholinom ter ostalimi fosfolipidi in NSPZ, kar ima za posledico spremembo fizikalno-kemijskih lastnosti fosfolipidnega hidrofobnega sloja. S tem se tudi zmanjša sposobnost tega sloja, da ubrani sluznico prebavil pred ulcerogenimi snovmi iz lumna prebavil (Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Lichtenberger, 2001). Večina NSPZ so šibke kisline in v kisli želodčni vsebini ostanejo v neionizirani obliki. Neionizirana molekula zlahka preide skozi lipidne membrane epitelnih celic in se v njih kopiči. Ko vstopi v nevtralno okolje epitelnih celic, se ionizira in povzroči sproščanje vodikovih ionov in znotrajcelično acidozo, ki moti normalno delovanje celic (Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Rich in Scheiman, 2000; Tomlinson in Blikslager, 2003).

Nekatera NSPZ vstopijo v enterohepatično kroženje. To potencira njihove škodljive topikalne učinke na sluznico tankega črevesja, saj je ta izpostavljena aktivnim presnovkom, ki se izločajo preko žolča (Schneider in sod., 1999; Rich in Scheiman, 2000; Tomlinson in Blikslager, 2003).

2.1.1.2 Sistemski vplivi NSPZ – presnova arahidonske kisline

Klinično najpomembnejši neželen učinek NSPZ so razjede prebavil, ki so večinoma posledica sistemskega vpliva NSPZ na organizem. NSPZ preko zaviranja aktivnosti fiziološko pomembnega encima ciklooksigenaze-1 (COX-1), ki ima v organizmu konstitutivno vlogo, vplivajo na zmanjšano sintezo endogenih prostaglandinov, predvsem prostaglandina E₁ (PGE₁), prostaglandina E₂ (PGE₂) in prostaglandina I₂ (PGI₂). Ti prostaglandini so pomembni pri obrambi sluznice prebavil, imenujemo jih tudi »citoprotektivni« prostaglandini (Mitchell in sod., 1994; Hawkeye, 1999; Rich in Scheiman, 2000; Brideau in sod., 2001; Lichtenberger, 2001; Wallace in Ma, 2001; Kimberly in sod., 2005; Lascelles in sod., 2005).

V zgodnjih 90. letih so odkrili, da obstajata dve različni obliki encima ciklooksigenaza (COX) (Brideau in sod., 2001; Tomlinson in Blikslager 2003): COX-1, ki je konstitutivna izooblika, in COX-2, ki je inducibilna izooblika. COX-1 naj bi sprožala sintezo prostaglandinov, ki so potrebni za normalno vzdrževanje homeostaze organizma, medtem ko je prvotna funkcija COX-2 povezana s sintezo prostaglandinov pri vnetju (proinflatorna vloga) (Jones in Budsberg, 2000; Kay-Mugford in sod., 2000; Wallace in Ma, 2001; Tomlinson in Blikslager, 2003; Fresno in sod., 2005). Na tem spoznanju temelji tudi dejstvo, da so terapevtski (protivnetni in analgetični) učinki NSPZ povezani z zaviranjem delovanja COX-2, škodljivi učinki NSPZ, kot so razjede na prebavilih in večja nagnjenost h krvavitvam, pa se pripisujejo zaviranju delovanja COX-1. Ta hipoteza se je po nekoliko novejših dognanjih spoznala za preveč preprosto, saj ima COX-2 pomembno biološko vlogo pri razvoju ledvic, procesu celjenja razjed na prebavilih, uravnava homeostazo kardiovaskularnega sistema, ovulacijo in implantacijo (Schmassmann in sod., 1998; Peskar, 2001; Parente in Peretti, 2003). Odkrili so tudi novo obliko encima COX – COX-3

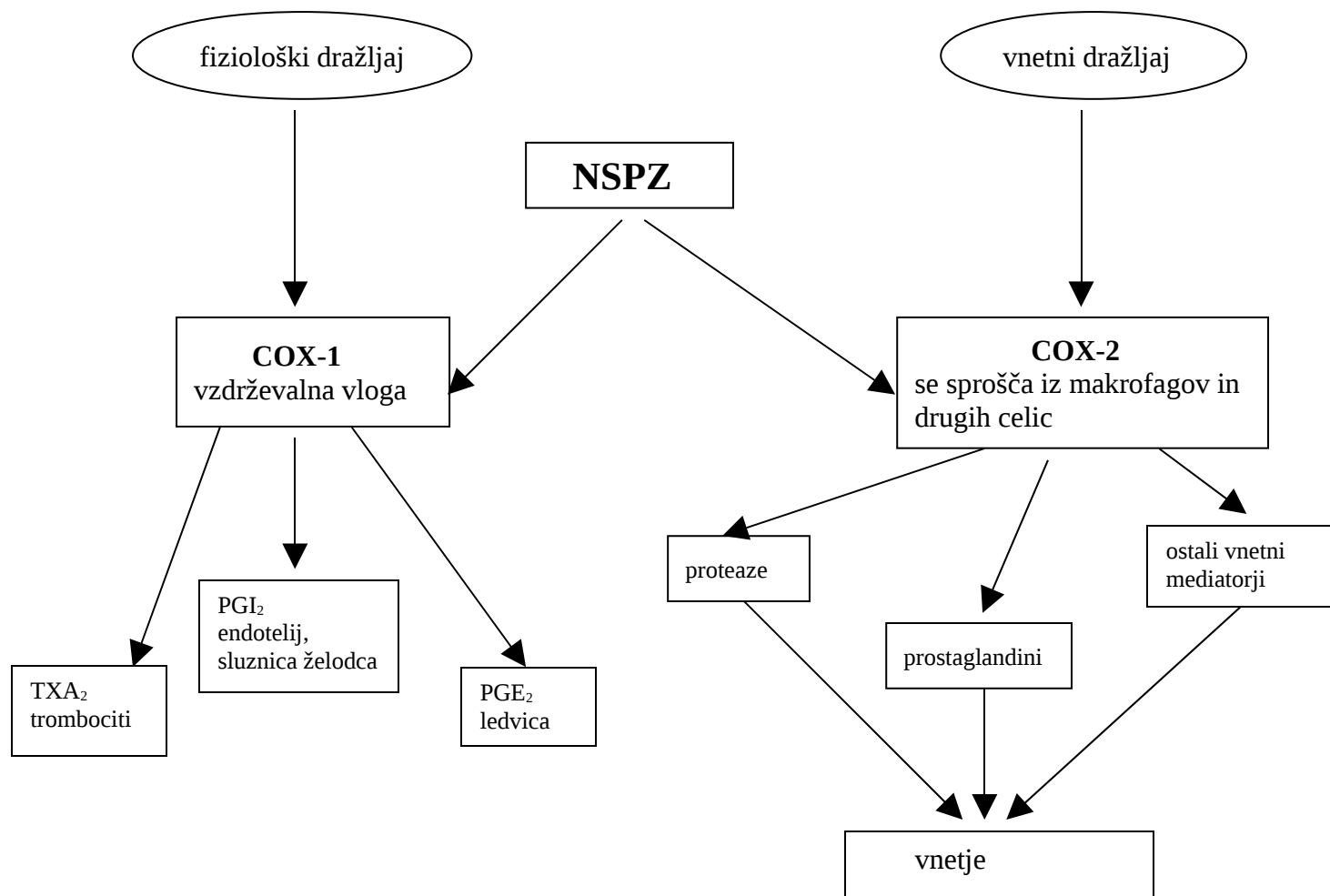
(Chandrasekharan in sod., 2002), ki je različica COX-1 (COX-1b), vendar nima normalne aktivnosti COX, ki privede do sinteze eikozanoidov (Botting in Ayoub, 2005).

COX-1 je v normalnih okoliščinah prisotna v številnih organih, npr. želodcu, ledvicah, reprodukcijskih organih. Nahaja se tudi v trombocitih, v katerih katalizira sintezo prostaglandinov, ki sodelujejo v procesih homeostaze. COX-2 primarno najdemo na mestih vnetja. Vzdrževalno vlogo ima v nekaterih tkivih, kot so možgani in ostalo živčno tkivo, jajčniki ter maternica, in je del normalnega encimskega komplekta v pasjih ledvicah (Jones in Budsberg, 2000; Lascelles in sod., 2005). Njena sinteza se sproži hitro kot odziv na močan vnetni dražljaj in mitogen, predvsem v endotelnih celicah, celicah gladkih mišic, hondrocitih, fibroblastih, monocitih, makrofagih in sinovialnih celicah (Brooks in sod., 1999; Jones in Budsberg, 2000; Steinmeyer, 2000). Hormoni sprožijo njeno sintezo v jajčnikih in fetalnih membranah (Brooks in sod., 1999). Prostaglandini, ki v ledvicah nastanejo zaradi delovanja COX-1 in COX-2, so pomembni za normalno delovanje ledvic, saj uravnavajo tonus krvnih žil, pretok krvi skozi ledvice ter ravnovesje ionov in vode. Ker ima tudi COX-2 v ledvicah vlogo vzdrževanja homeostaze, selektivni zaviralci COX-2 v primeru znižanega sistemskega krvnega pritiska ali zmanjšane volumna krvi lahko povzročijo poškodbe ledvic, ki vodijo v akutno odpoved (Fox, 2010b).

Predvidevajo, da je potrebno vsaj delno zaviranje delovanja obeh izoencimov, da dosežemo zadovoljiv protivnetni odziv (Tanaka in sod., 2002; Tomlinson in Blikslager, 2003). Prav tako je potrebno, da NSPZ zavre delovanje COX-1 in COX-2, da povzroči poškodbo želodčne in črevesne sluznice (Tanaka in sod., 2002). Novejši razvoj NSPZ temelji na iskanju učinkovin, ki so selektivni COX-2 zaviralci ter tako želodčno-črevesno varnejši (Tomlinson in Blikslager, 2003). Treba je ohraniti nekaj aktivnosti COX-1 za vzdrževanje in

zaščito sluznice prebavil, vendar tudi nekaj aktivnosti COX-2, ki je pomembna in potrebna pri obnovi poškodovane želodčne sluznice, ki se lahko upočasnijo z zaviranjem delovanja COX-2 (Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Tomlinson in Blikslager, 2003). NSPZ preko zaviranja COX-1 zmanjšajo mikrovaskularno prekrvavitev želodčne sluznice in povzročijo mikrovaskularno ishemijo, zaradi česar kasneje nastane razjeda. Sledi prilepljanje nevtrofilnih levkocitov na stene majhnih krvnih žil (Rich in Scheiman, 2000; Lichtenberger, 2001). Zmanjšano prekrvavitev sluznice so opazili pri akutnih poškodbah prebavil zaradi jemanja NSPZ, vendar ni povsem znano, ali je to vzrok ali posledica nastalih poškodb, saj se prekrvavitev vrne na normalno po kratkotrajnem jemanju NSPZ. To pripisujejo povečanemu delovanju drugih vazoaktivnih substanc, predvsem dušikovemu oksidu (NO), ki ohranja integriteto epitelija z uravnavanjem prekrvavitve (Tomlinson in Blikslager, 2003). Na živalskih modelih je bilo ugotovljeno, da zaviranje sinteze NO poveča poškodbe sluznice zaradi delovanja NSPZ, medtem ko snovi, ki oddajajo NO, te poškodbe zmanjšajo (Rich in Scheiman, 2000).

Prostaglandini (PG) so skupina oksigeniranih maščobnih kislin iz 20 C-atomov in se nahajajo v večini celic in tkiv sesalcev. V največji koncentraciji se nahajajo v semenski tekočini, vendar tudi sluznica prebavil vsebuje visoke koncentracije PG, predvsem iz razredov E, F in I (Robert, 1979; Miller, 1988; Wallace in Ma, 2001). Dokazali so, da PG povečajo odpornost prebavil na poškodbe. Dokazali so tudi, da je zaviranje sinteze PG eden ključnih vzrokov mehanizma nastanka razjed zaradi delovanja NSPZ (Wallace in Tigley, 1995).



Slika 1: Vloga COX-1 in COX-2 pri sintezi prostaglandinov in delovanje NSPZ (povzeto po Steinmeyer, 2000).

2.2 PROSTAGLANDINI

2.2.1 BIOSINTEZA PROSTAGLANDINOV

Eikozanoidi, med katere sodijo prostaglandini, prostaciklin in tromboksani, nastanejo iz arahidonske kisline po t. i. ciklooksigenazni poti. Druga skupina eikozanoidov, levkotrieni, pa nastane po t. i. lipooksigenazni poti (Higgins, 1985; Argentieri in sod., 1994).

Arahidonska kislina, ki lahko izvira iz hrane ali pa nastane iz linolenske kisline, se nahaja kovalentno vezana v svoji estrificirani obliki v fosfolipidnih delcih celičnih membran večine telesnih celic (Higgins, 1985; Argentieri in sod., 1994). Biosinteza prostanoidov zaradi delovanja encima ciklooksigenaze nastane v treh fazah. Prva faza je mobilizacija arahidonske kisline iz celičnih fosfogliceridov, druga je postopna konverzija sproščenega arahidonata v prostaglandinska endoperoksida prostaglandin G_2 (PGG_2) in prostaglandin H_2 (PGH_2). To reakcijo katalizira encim prostaglandin endoperoksid sintaza (PGH-sintaza) in je po nekaterih navedbah s stališča farmakodinamike NSPZ najpomembnejši encim, saj je tarča delovanja NSPZ. V tretji fazi sledi ali izomerizacija ali redukcija PGH_2 v biološko pomembne prostaglandine D_2 (PGD_2), prostaglandine E_2 (PGE_2), prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), tromboksan A_2 (TxA_2) in prostaciklin oz. prostaglandin I_2 (PGI_2), ki jih katalizirajo PGD-sintaza, PGE-sintaza, PGF-sintaza, TxA -sintaza in PGI-sintaza (Smith in Marnett, 1991; Brooks in sod., 1999). TxA_2 in PGI_2 sta precej nestabilna in hitro preideta v stabilni obliki tromboksan B_2 (TxB_2) in 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ (Hamberg, 1975; Higgins, 1985). Biološko aktivni eikozanoidi sodelujejo pri vseh fazah vnetja, najpomembnejša sta PGE_2 in PGI_2 (Higgins, 1985; Smith in Marnett, 1991).

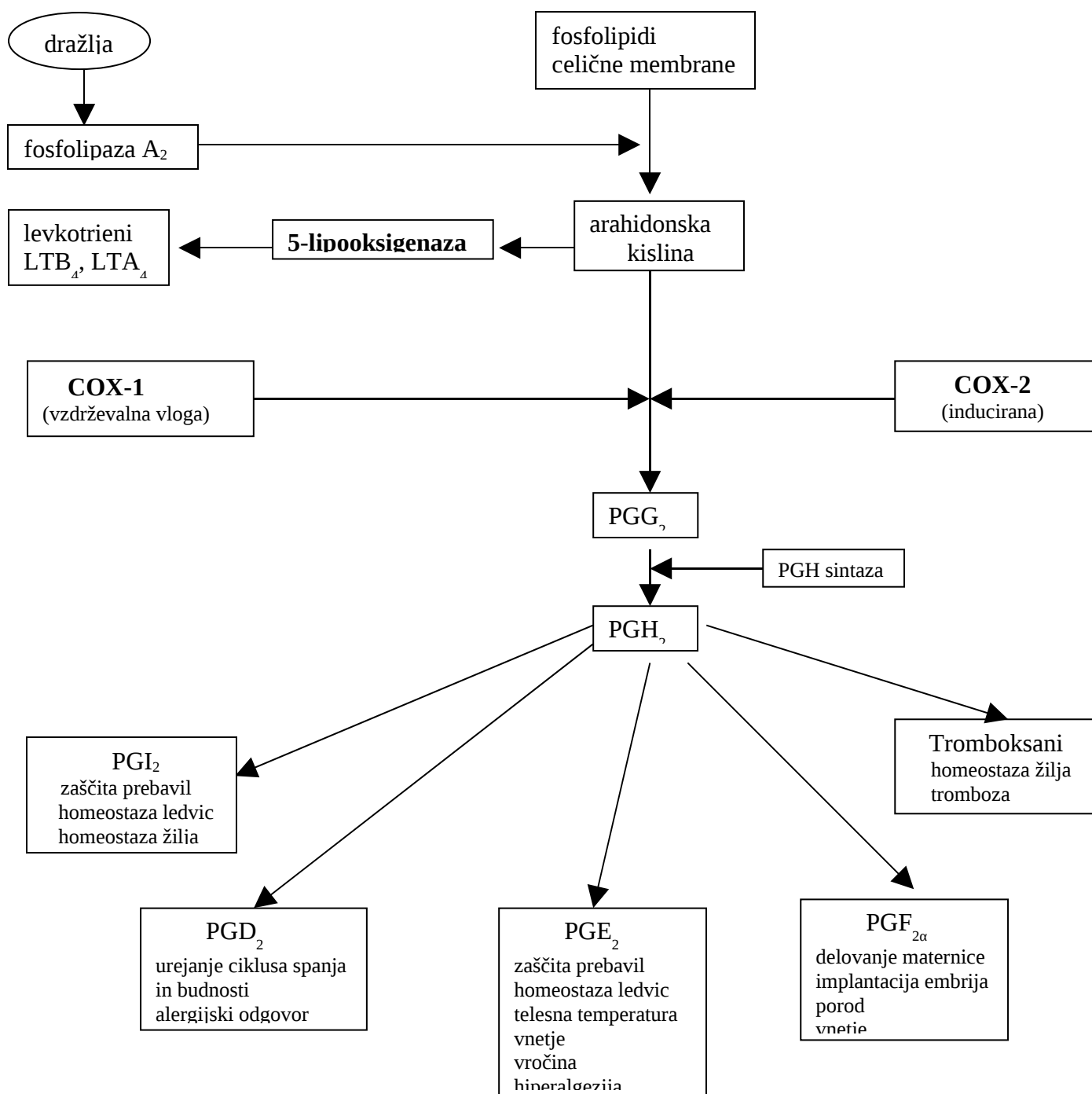
Sintetizirani prostaglandini zapustijo celico s pomočjo transporterja in se vežejo na receptorje celice, v kateri so nastali, ali pa na celice, ki so v bližini. Povečajo aktivnost adenilat ciklaze in nastajanja cikličnega adenozin mono fosfata (cAMP). Prostaglandini učinkujejo na celice, ki jih proizvedejo (avtokrino) in na sosednje celice (parakrino). Lahko jih primerjamo s tkivnimi hormoni, ki nastanejo kot odziv na hormone v cirkulaciji in uravnavajo njihove učinke. Tak primer je sinteza PGE_2 v zbirnih kanalčkih ledvic kot odziv na antidiuretični hormon (Robert, 1979; Smith in Marnett, 1991).

Prostaglandini v organizmu uravnavajo številne fiziološke funkcije. Ena teh je zaščita prebavil, k čemur pripomoreta predvsem PGE₂ in PGI₂, ki uravnavata tudi homeostazo ledvic. Žilno homeostazo pripisujejo PGI₂ in TxA₂, ciklus spanja in budnosti pa naj bi uravnaval PGD₂. Delovanje maternice, implantacija embrija in porod pri ljudeh so povezani s PGF_{2α}, telesno temperaturo uravnava PGE₂ (Brooks in sod., 1999; Steinmeyer, 2000).

Citoprotektivno vlogo PGE₂ in PGI₂ v prebavnem traktu pripisujejo njuni sposobnosti, da stimulirata nastajanje sluzi in bikarbonata, zavirata izločanje želodčne kisline, uravnavata krvni pretok v sluznici prebavil, vplivata na proliferacijo celic in pripomoreta pri obnovi, stimulirata kontrakcije resic v tankem črevesju in na neki način povečata odpornost epitelnih celic na poškodbo zaradi delovanja citotoksinov (Robert, 1979; Miller, 1988; Wallace in Tigley, 1995; Blikslager in sod., 1997; Steinmeyer, 2000; Wallace in Ma, 2001; Tomlinson in Blikslager, 2003). Pod normalnimi pogoji vsebuje sluznica prebavil veliko vnetnih celic (mastociti, makrofagi, nevtrofilni levkociti, eozinofilni levkociti). Njihovo število se spreminja vzdolž prebavil. Prostaglandini uravnavajo vnetni odziv tako, da zmanjšajo sproščanje vnetnih mediatorjev iz vnetnih celic, preprečujejo vdor granulocitnih levkocitov in zmanjšajo prepustnost epitelija in endotelija. PGE₂ je močan zaviralec sproščanja faktorja tumorske nekroze (TNF) iz makrofagov in lahko tudi vpliva na ekspresijo gena za TNF v makrofagih. Prostaglandini zmanjšajo agregacijo trombocitov in sproščanje njihovih mediatorjev, serotonina in tromboksana. Posebno PGI₂ močno zavira aktivacijo in agregacijo trombocitov in s tem zmanjša njihov učinek pri vnetju in poškodbi sluznice (Wallace in Tigley, 1995). PGE₂ in PGI₂ sta zaradi zmožnosti povečanja krvnega pretoka v sluznici prebavil in regulacije izločanja želodčne kisline najpomembnejša eikozanoida pri obrambi sluznice prebavil (Robert, 1979; Tomlinson in Blikslager, 2003). Oba sta tudi pomembna pri obnovi epitelija po poškodbi zaradi ishemije, pri kateri v zgodnji fazi procesa

obnove delujeta sinergistično in sodelujeta pri regeneraciji interepitelialnih tesnih stičnic prek povečanja intracelularnega Ca^{2+} in cAMP. S tem sodelujeta pri ponovni vzpostavitvi črevesne bariere (Tomlinson in Blikslager, 2003). Delovanje tesnih stičnic uravnava njihov citoskelet, ki jih preko aktinskih vlaken s kontrakcijo teh vlaken odpira, z relaksacijo aktinskih vlaken se stičnice pasivno zaprejo. Prostaglandini preko posrednikov Ca^{2+} in cAMP sprožijo zapiranje tesnih stičnic po poškodbi (Blikslager in sod., 1997). Obnova samo z migracijo celic epitelija ne more ponovno vzpostaviti črevesne bariere po akutni ishemični poškodbi prašičjega ileuma. Potrebni so tudi PGE in PGI, ki sodelujejo pri zapiranju medceličnih prostorov (Gooin in sod., 2003).

Po delovanju encima lipooksigenaze na arahidonsko kislino se ta pretvori v hidroperoksi kisline, iz katerih pri sesalcih nastanejo eikozanoidi imenovani levkotrieni (LT). Eden izmed njih je levkotrien B_4 (LTB_4), ki je močan stimulator migracije levkocitov, ostali so mediatorji takojšnje in nekoliko zapoznele preobčutljivostne reakcije. Prisotnost levkocitov poveča vpliv eikozanoidov pri vnetni reakciji. Med fagocitozo se sprostijo produkti arahidonske kisline. Produkti ciklooksigenazne poti neposredno vplivajo na določene vnetne odzive, produkti lipooksigenazne poti so kemotaktični in privabljajo še več levkocitov (Higgins, 1985; Hudson in sod., 1993; Rainsford, 1993; Argentieri in sod., 1994; Kimberly in sod., 2005).



Slika 2: Vloga COX-1 in COX-2 pri nastanku prostaglandinov (povzeto po Brooks in sod., 1999; Agnello in sod., 2005).

2.2.2 VLOGA PROSTAGLANDINOV PRI BOLEČINI IN VNETHJU

Aktivnost vnetnih mediatorjev se odraža z značilnimi znaki vnetja, kot so vazodilatacija, povečana prepustnost žilja, bolečina, izguba funkcije in infiltracija levkocitov (Higgins, 1985). PGE₂ je glavni mediator vnetnega odziva. Z znižanjem praga receptorjev za bolečino potencira učinke nekaterih snovi (npr. bradikina in histamina), ki povzročajo bolečino. Prostaglandini naj bi imeli močan učinek na procesiranje spinalnih dražljajev, omogočili naj bi sprožanje dražljaja po centralnih nevronih in omogočili sproščanje nevrottransmitterjev iz primarnih spinalnih senzoričnih aferentnih poti (Malmberg in Yaksh, 1992). PGE₂ ima tudi piretične učinke in sodeluje pri povišanju telesne temperature, ki je posledica infekcijskih agensov. Sintezo PGE₂ na mestu vnetja uravnava COX-2 (Jones in Budsberg, 2000). COX-2 naj bi povzročala hiperalgezijo in bolečino po poškodbi, njena sinteza se sproži pod vplivom citokinov v poškodovanem ali vnetem tkivu, kar privede do nastanka prostaglandinov, predvsem PGE₂ (Mathews, 1996).

2.2.3 VPLIV NSPZ IN KORTIKOSTEROIDOV NA SINTEZO PROSTAGLANDINOV

Prisotnost prostaglandinov v celicah epitelijskega prebavila je potrebna, da celice ohranijo svojo celovitost. Če se vsebnost prostaglandinov zmanjša zaradi delovanja NSPZ ali kortikosteroidov, te celice postanejo ranljive in se ne morejo več upirati škodljivim dejavnikom okolja. V primeru želodčnih celic so ti škodljivi dejavniki želodčna kislina, pepsin ter zaužite snovi, pri črevesnih celicah pa žolčne kisline, razgradni produkti hrane in bakterijski toksini (Robert, 1979).

Glavni mehanizem poškodbe, ki nastane zaradi delovanja NSPZ, je zaviranje sinteze prostaglandinov. Tisti PG, ki v prebavilih nastanejo zaradi delovanja COX-1, naj bi imeli ključno vlogo pri vzdrževanju integritete sluznice prebavil (Smith in Marnett, 1991; Wallace in Tigley, 1995; Pasloske in sod., 1998). NSPZ, ki zavrejo delovanje COX-1 ali obeh izoencimov COX-1 in COX-2, zavrejo nastanek PG, ki so pomembni za vzdrževanje homeostaze in naredijo prebavila bolj dovzetna za poškodbe (Hudson in sod., 1993; Wallace in Tigley, 1995; Tomlinson in Blikslager, 2003). Z razvojem novih zdravil, ki selektivno zavrejo delovanje COX-2, naj bi zmanjšali neželene učinke NSPZ na prebavila.

Kortikosteroidi zavirajo sintezo eikozanoidov tako, da preprečijo sproščanje arahidonske kisline iz fosfolipidov z inhibicijo encima fosfolipaze A, ki je potrebna za to reakcijo (Robert, 1979; Higgins, 1985; Neiger in sod., 2000). Inaktivacija fosfolipaze A prepreči sintezo arahidonske kisline in s tem produkcijo eikozanoidov, ki nastanejo po poti ciklooksigenaze in po poti lipooksigenaze. Ta t. i. dvojna blokada omogoča kortikosteroidom močno protivnetno aktivnost, vendar je tudi vzrok za resne neželene učinke, ki so povezani z dolgotrajnejšo uporabo (Higgins, 1985; Mathews, 1996).

2.3 TROMBOKSAN B₂ – nastanek in vloga

Tromboksan A₂ (TxA₂) je produkt, ki nastane v glavnem v trombocitih iz arahidonske kisline. TxA₂ ima zelo kratko razpolovno dobo ($t_{1/2}$ pri 37°C je 32 ± 2 sekundi) in se pretvori v stabilno hidrolizirano obliko tromboksan B₂ (TxB₂) (Hamberg in sod., 1975; Gilmer in sod., 2003; Bohm in sod., 2004). Ker trombociti nimajo jedra, pri sintezi tromboksanov ne sodeluje COX-2. Zato je TxB₂, ki ga izmerimo v serumu po nastanku krvnega strdka,

izključno odraz delovanja COX-1 v trombocitih, pogosto z njim ugotavljamo tudi zaviralni učinek NSPZ na trombocitno ciklooksigenazo pri ljudeh in živalih (McKellar in sod., 1990; Brideau in sod., 1996; Brooks in sod., 1999; Streppa in sod., 2002; Gilmer in sod., 2003; Sessions in sod., 2004; Lascelles in sod., 2005; Morchon in sod., 2006). TxA₂ je ključen pri agregaciji trombocitov ter povzroča konstrikcijo gladkih mišic v arterijah in bronhih (Yamanaka in sod., 1993; Kamath in sod., 2001; Wallace in Ma, 2001; Gilmer in sod., 2003; Bohm in sod., 2004; Lascelles in sod., 2005; Brainard in sod., 2007). Ker tromboksan spodbuja sproščanje levkotriena B₄ in prilepljanje levkocitov na žilni endotelij, naj bi tudi preko uravnavanja vnetnega odziva vplival na poškodbo sluznice prebavil (Goldman in sod., 1991; Wallace in Ma, 2001).

Občutljivost trombocitov na TxA₂ je različna med posameznimi živalskimi vrstami in znotraj njih. Pasji trombociti se različno odzovejo na presnovo arahidonske kisline in njene produkte. Bazalne vrednosti tromboksana se precej razlikujejo glede na dražljaj, ki je povzročil agregacijo (McKellar in sod., 1990; Yamanaka in sod., 1993; Pallapies in sod., 1994; Gilmer in sod., 2003; Brainard in sod., 2007). Psi imajo po ugotovitvah McKellarja in sodelavcev (1990) najvišjo serumsko koncentracijo TxB₂ med domačimi živalmi.

2.3.1 VPLIV NSPZ IN KORTIKOSTEROIDOV NA SINTEZO TROMBOKSANOV

Neselektivna NSPZ zavirajo aktivnost COX-1 in tako zmanjšajo nastanek TxA₂. Ta zdravila posledično zmanjšajo agregacijo trombocitov, kar privede do motenj ali celo do zaviranja primarne hemostaze. Vsako zmanjšanje prekrvavitve sluznice prebavil naj bi povečalo njeno dovzetnost za nastanek razjed in tako naj bi bil tromboksan pomemben dejavnik pri nastanku razjed na prebavilih (Patrono in sod., 1980; Tomlinson in Bliklager, 2003; Cox in

sod., 2006). Teoretično lahko sklepamo, da je prednost zdravil, ki selektivno zavirajo COX-2, ohranitev osnovnega homeostatskega delovanja COX-1 kljub protivnetnemu učinku zaradi zaviranja aktivnosti COX-2 (Galbraith in McKellar, 1996; Jones in Budsberg, 2000; Fresno in sod., 2005). NSPZ z večjo afiniteto do COX-2 naj bi ohranila osnovno funkcijo pasjih trombocitov in naj ne bi imela posebnega vpliva na produkcijo tromboksana in agregacijo trombocitov. Meloksikam je selektivni zaviralec COX-2, zato naj bi bili njegovi neželeni učinki (tudi vpliv na tromboksane) minimalni (Jones in Budsberg 2000; Jones in sod., 2002). Fresno in sodelavci (2005) so dokazali, da predoperacijska aplikacija meloksikama v terapevtskem odmerku 0,2 mg/kg telesne mase intravensko ni poslabšala hemostaze (vrednotene na podlagi določanja agregacije trombocitov, časa krvavenja bukalne sluznice in števila trombocitov v periferni krvi) pri zdravih psih, pri katerih so opravili elektivno ovariohistirektomijo.

Kortikosteroidi preprečijo sproščanje arahidonske kisline iz fosfolipidov z inhibicijo encima fosfolipaze A in tako vplivajo na zmanjšano sintezo tromboksanov, kar so dokazali z *in-vivo* ter *in-vitro* študijami (Robert, 1979; Higgins, 1985; Kirk in sod., 1994; Siler-Khodr in sod., 1997; Neiger in sod., 2000; Wang in sod., 2003).

2.4 LEVKOTRIEN B₄ – nastanek in vloga

Levkotrieni nastanejo iz arahidonske kisline po t. i. 5-lipooksigenazni poti (5-LOX). Delimo jih na dve podvrsti, in sicer levkotrien B₄ in peptido-levkotriene (levkotrien C₄ (LTC₄), levkotrien D₄ (LTD₄) in levkotrien E₄ (LTE₄)). Njihova sinteza se v glavnem odvija v vnetnih celicah, epitelnih in endotelih celicah. Levkotrieni so znani mediatorji vnetja

(Wallace in Ma, 2001; Hua in sod., 2006). LTB_4 je zelo močan kemotaksin za polimorfonuklearne levkocite in povzroči njihovo degranulacijo ter sproščanje lizosomalnih encimov, kar potencira vnetni odziv pri uporabi NSPZ (Ford-Hutchinson in sod., 1980; Strom in sod., 1990; Thomsen in sod., 1990; Asako in sod., 1992; Hudson in sod., 1993; Rainsford, 1993; Argentieri in sod., 1994; Wallace in Ma, 2001; Tomlinson in Blikslager, 2003; Kimberly in sod., 2005). Povzroča izstopanje levkocitov iz žil, spodbuja tudi sproščanje reaktivnih kisikovih presnovkov iz nevtrofilnih levkocitov, kar veliko pripomore k poškodbi tkiva, povezanega z vnetjem sluznice. LTB_4 naj bi s svojo sposobnostjo pospeševanja prilepljanja levkocitov na žilni endotelij pripomogel k patogenezi poškodbe želodčne sluznice zaradi delovanja NSPZ (Thomsen in sod., 1990; Asako in sod., 1992; Hudson in sod., 1993; Rainsford 1993; Yamagiwa, 2001; Wallace in Ma, 2001). Eden izmed verjetnih vzrokov povečane sinteze LTB_4 v želodcu pri uporabi NSPZ naj bi bil ta, da zaviranje enega ali obeh encimov COX povzroči presežek substrata. Ta substrat naj bi se nato uporabil v ostalih presnovnih poteh arahidonske kisline, kot je npr. 5-lipooksigenazna pot, ki privede do povečane sinteze LTB_4 (**slika 2**) (Hudson in sod., 1993; Kimberly in sod., 2005). Drugi razlog naj bi bila sekundarno povečana sinteza levkotrienov zaradi gastritisa in ostalih poškodb želodčne sluznice, ki so povezane z uživanjem NSPZ. Epitelne celice želodčne sluznice so glavni vir LTB_4 , zato bi bila lahko povečana sinteza s strani teh celic posledica hiperplastičnega epitelija, ki spremlja gastritis, povzročen s kemičnimi snovmi (Hudson in sod., 1993). *In-vivo* meritve koncentracije LTB_4 se uporabljajo tudi kot pokazatelj aktivnosti lipooksigenazne poti (Kimberly in sod., 2005). Kortikosteroidi zavirajo nastanek arahidonske kisline z indirektno inhibicijo fosfolipaze A_2 (**slika 2**), zato lahko del močnega protivnetnega učinka kortikosteroidov pripišemo njihovi sposobnosti, da zavrejo nastanek prostaglandinov in levkotrienov hkrati (Argentieri in sod., 1994).

2.5 PREPUSTNOST ŽELODČNE IN ČREVESNE SLUZNICE

2.5.1 PREHOD SNOVI SKOZI EPITELIJ PREBAVIL IN PREPUSTNOST SLUZNICE PREBAVIL

Epitelij prebavil pokriva celotno površino prebavil. Celice epitelija imajo dve pomembni funkciji: zaščitno in transportno. Predstavljajo bariero med lumnom in spodaj ležečimi plastmi sluznice ter mesto, kjer poteka absorpcija hranljivih snovi iz črevesnega lumna. Črevesni epitelij se obnavlja zelo hitro, saj je življenjska doba diferenciranih epitelnih celic črevesja 4–7 dni (Sinclair in Evans, 1995; Sun in sod., 1998). Transport molekul skozi nepoškodovan črevesni epitelij poteka skozi celice (transcelularno) ali med celicami (paracelularno). Transcelularni transport je po svoji naravi aktivni transport in vključuje gibanje snovi ali elektrolitov čez celično membrano, skozi citosol celice in nato čez bazalno membrano (Warnock in sod., 1984). Proces absorpcije hranljivih snovi se začne z vstopom skozi mikrovile apikalne membrane in izločanjem na bazolateralni strani, kjer so krvne žile. Zaradi transporta nabitih ionov transcelularno je treba vzdrževati električno nevtralnost s paracelularnim transportom nasprotno nabitih ionov po intercelularni poti skozi tesne stičnice (Evloff in Warnock, 1987; Sun in sod., 1998). Paracelularno pot sestavljajo tesne stičnice in spodaj ležeči intercelularni prostor. Medcelični stiki predstavljajo naravno prekinitev v kontinuiteti membrane, tam najdemo malo številčne velike pore (premera 6,5 nm), skozi katere predvidoma poteka prehod velikih molekul. Tesne stičnice, ki predstavljajo manj kot 5 % skupne površine črevesnega epitelija, imajo osrednjo vlogo v uravnavanju paracelularne prepustnosti. Transcelularno pot sestavlja veliko majhnih por v celični membrani (premera 0,4–0,7 nm), skozi katere prehajajo majhne molekule. Prehod velikih molekul, s premerom večjim od 0,8 nm, je omejen na paracelularno pot skozi velike pore, medtem ko majhne molekule lahko prehajajo po obeh poteh, transcelularno in

paracelularno (Madara, 1989; Sinclair in Evans, 1995; Unno in Fink, 1998). Prepustnost tesnih stičnic se zmanjšuje vzdolž črevesja, tako da je začetni del črevesja precej bolj prepusten kot kolon za pasivno gibanje tekočin in elektrolitov (McRoberts in sod., 1985). Več faktorjev vpliva na prepustnost snovi po trans- in paracelularni poti. Difuzija snovi v vodni raztopini je odvisna od molekulske mase preiskovane tekočine ter razmerja polmera molekule proti polmeru pore. Druga hipoteza navaja, da izhaja različna prepustnost za majhne in velike molekule po paracelularni poti zaradi razlik v prepustnosti tesnih stičnic med epitelnimi celicami v črevesnih resicah in med epitelnimi celicami v črevesnih kriptah. Tesne stičnice v črevesnih resicah so tesnejše kot tiste v kriptah, kar omejuje prehod velikih molekul skozi tesne stičnice v kriptah, medtem ko manjše molekule lahko prehajajo skozi oboje. Ker je površina črevesnih resic večja in ker so črevesne kripte relativno težko dostopne, je prepustnost manjših molekul določena z morfologijo črevesnih resic, prepustnost za velike molekule pa z morfologijo črevesnih kript (Hollander, 1992; Meddings in Gibbons, 1998).

Prepustnost sluznice prebavil za makromolekule lahko definiramo s hitrostjo prehoda določenih snovi, uporabljenih kot označevalci, skozi površino črevesne sluznice z neposredovano difuzijo iz lumna črevesja v krvni obtok. Prehod molekul je odvisen od razlike koncentracij in/ali gradienta pritiska brez posredovanja pasivnega ali aktivnega biokemijskega transportnega sistema (Menzies, 1984; Sun in sod., 1998; Tibble in Bjarnason, 2001). Označevalci prehajajo hitreje skozi poškodovano kot skozi intaktno sluznico (Meddings in sod., 1993; Sun in sod., 1998).

2.5.2 METODE ZA UGOTAVLJANJE FUNKCIJE BARIERE SLUZNICE PREBAVIL IN NJENIH POŠKODB

Bariera črevesne sluznice je udeležena pri etiologiji in patogenezi številnih črevesnih in sistemskih boleznih, zato obstaja več načinov proučevanja njene funkcije, odziva na določeno zdravljenje in napovedovanje izida zdravljenja (Bjarnason, 1994; Uil in sod., 1997). Seznam stanj, povezanih s povečano črevesno prepustnostjo pri ljudeh, je obsežen, med najpomembnejšimi pa so:

- prisotnost snovi, ki povečajo črevesno prepustnost: citotoksična zdravila, nekateri neabsorbirani antibiotiki (npr. neomicin), prekomerno uživanje alkohola;
- ionizacijska sevanja (npr. radiacijsko obsevanje abdomna);
- črevesna obolenja: celiakija, Kronova bolezen, infekcijske bolezni črevesja, cistična fibroza, nekatere bolezni imunske pomanjkljivosti, ishemija črevesja;
- ostala stanja: dolgotrajno stradanje, aktivna pulmonarna sarkoidoza, pomanjkanje železa, atopični dermatitis pri otrocih (Brooks in sod., 1999).

Gastroduodenalna endoskopija je standardna metoda za ugotavljanje poškodb želodčno-črevesnega trakta, ki so nastale zaradi jemanja NSPZ pri ljudeh (Davies in Saleh, 2000, Craven in sod., 2007). Te poškodbe so opisane kot edem, eritem, mukozne krvavitve, erozije ali razjede. Razločevanje med posameznimi poškodbami ni jasno in se lahko pomembno razlikuje med posameznimi preiskovalci. Tipi poškodb so po navadi številčno ovrednoteni in nato sešteti kot točke. Tako se pri ljudeh uporablja lestvica Lanza, ki je relativno zanesljiva, vendar še vedno subjektivna, z manjšimi odstopanji v interpretaciji (Davies,

1998). Ugotavljanje razjed z endoskopijo pri ljudeh je sicer enostavno, vendar omejeno na želodec z dvanajstnikom, je drago, zamudno, subjektivno, ni dostopno v vseh centrih in je neprimerno za rutinske preglede večjih skupin (Meddings in sod., 1993; Sutherland in sod., 1994; Davies, 1998; Davies in Saleh, 2000; Bjarnason in Takeuchi, 2009).

Pomanjkljivost endoskopske metode v veterinarski medicini je v tem, da potrebujemo drago opremo in da postopek opravljamo v splošni anesteziji. Metoda za ocenjevanje in točkovanje poškodb ni standardizirana, zato je endoskopija v veterinarski medicini izredno subjektivna metoda (Davis in sod., 2006; Craven in sod., 2007). Z endoskopijo ne moremo ugotavljati funkcionalnih posebnosti, ki se pojavijo na sluznici prebavil še pred pojavom vidnih erozij in razjed ter funkcijo oz. delovanje bariere sluznice (Davis in sod., 2006).

Neinvazivna metoda ugotavljanja želodčne in črevesne prepustnosti se izvaja z uporabo testov za prepustnost. Cave in sodelavci (2003) so ugotovili povečano prepustnost črevesne sluznice pri številnih črevesnih obolenjih psov in mačk, kot so občutljivost na gluten, prekomerno razraščanje bakterij v tankem črevesju, poškodbe črevesne sluznice zaradi ishemije in reperfuzije ter zaradi jemanja NSPZ. Princip testiranja želodčno-črevesne prepustnosti in funkcije sluznice prebavil je preprost. Oralno apliciramo molekulo ali več molekul označevalca in opazujemo njihovo pojavljanje v urinu ali v periferni krvi (Steiner in sod., 2002). Z ugotavljanjem različne absorpcije sladkorjev v različnih delih prebavil lahko ugotovimo specifične lokacije poškodbe sluznice (Craven in sod., 2007). Poleg njihove neinvazivnosti je prednost teh testov tudi v tem, da odražajo funkcionalno stanje večjega območja želodčno-črevesne sluznice, saj so morfološke analize lahko napačne zaradi nepravilnega odvzema vzorcev, predvsem če so lezije naključno razporejene po prebavilih (Meddings in sod., 1993; Davies, 1998). Klinična uporabnost testov za ugotavljanje

želodčno-črevesne prepustnosti pri bolnikih, ki uživajo NSPZ, temelji na možnosti odkrivanja poškodb, še preden te postanejo klinično zaznavne in zahtevajo hospitalizacijo. Omogočajo tudi daljše spremljanje bolnikov z večjim tveganjem za nastanek razjed in pravočasno terapevtsko posredovanje (Davies, 1998).

2.5.2.1 Označevalci želodčne in črevesne prepustnosti

Idealni označevalci pasivne prepustnosti naj bi bili nestrupeni, hidrofilni, lipofobni, popolnoma absorbirani s pasivno difuzijo, nespremenjeni oz. neprebavljeni z encimi, omejeni na zunajcelični prostor, naj ne bi bili sestavina prehrane, naj ne bi nastajali endogeno, iz telesa naj bi se izločili hitro in popolnoma. Bili naj bi neimunogeni ter hitro in enostavno merljivi v bioloških tekočinah z veliko natančnostjo in točnostjo (Cooper, 1984; Sinclair in Evans, 1995; Uil in sod., 1997; Davies, 1998). Vsi označevalci, ki se trenutno uporabljajo, imajo svoje prednosti in slabosti, vendar nobeden ne zadostuje vsem kriterijem idealnega označevalca.

Principi merjenja prepustnosti sluznice prebavil so podobni. Določen odmerek označevalca se da peroralno, določena količina bo prešla skozi črevesno bariero v krvni obtok in se nato izločila z urinom. Odstotek zaužitega označevalca, ki se izloči, ni odvisen le od črevesne prepustnosti, temveč tudi od številnih drugih parametrov, kot so praznjenje želodca, razredčenje v lumnu, čas prehoda skozi črevesje, sistemska distribucija, presnova in ledvični očistek (Cooper 1984; Menzies, 1984; Uil in sod., 1997; Steiner in sod., 2000; Steiner in sod., 2002).

Označevalce za ugotavljanje prepustnosti v klinični praksi lahko razdelimo v tri skupine: polietilenglikol, radioaktivni izotopi in sladkorji.

Polietilenglikol (PEG)

Polietilenglikol (PEG) je viskozna zmes polimerov etilen glikola. Uporabljajo se molekulske mase 400–4000 Da in z masami jih tudi označimo (Uil in sod., 1997; Davies, 1998). PEG 400 se je veliko uporabljal kot označevalec črevesne prepustnosti (Davies, 1998), najpogosteje so uporabljeni PEG 600 in 1000 ali njihove kombinacije. PEG je odporen proti bakterijskim toksinom in biokemijsko inerten. Test se izvaja z zaužitjem 1–5 g PEG različnih molekulskih mas v 50–100 ml vode po nočnem postu. Urin se zbira do 6 ur, meritve v urinu pa se izvajajo s plinsko-tekočinsko ali visoko tlačno tekočinsko kromatografijo (Uil in sod., 1997). Izkazalo se je, da je PEG zaradi nizke in različne navzočnosti PEG polimerov v urinu po intravenskem dajanju pri ljudeh nezadovoljiv označevalec tudi za črevesno prepustnost. Zaradi svoje relativne lipofilnosti intenzivno prehaja skozi membrane črevesnih celic, zato je nezanesljiv za ugotavljanje manjših sprememb v črevesni prepustnosti, ki nastanejo zaradi prehoda molekul po intercelularni poti (Cooper, 1984; Uil in sod., 1997; Davies, 1998).

Radioaktivni izotopi

Cr-EDTA (z izotopom kroma označen etilendiaminotetra acetat) je fiziološko in biokemično inertna substanca, je stabilen, vodotopen in se omejuje na zunajcelični prostor (Lokken in Soggen, 1967; Uil in sod., 1997). Zadovoljuje kar nekaj prej naštetih kriterijev idealnega označevalca in je že bil uporabljen tudi pri psih (Hall in Batt, 1990; Sorensen, 1997). Test se izvaja po nočnem postu z zaužitjem raztopine, ki vsebuje ⁵¹Cr-EDTA. Urin se zbira 24 ur, v

njem s števcem gama merimo koncentracijo izločenega EDTA (Uil in sod., 1997). Prehajanje Cr-EDTA naj bi bilo specifično za tanko črevo, vendar so študije dokazale, da deloma prehaja tudi skozi sluznico debelega črevesja. Če obstaja poškodba sluznice debelega črevesja (kolitis), se prepustnost za Cr-EDTA poveča (Bjarnason in sod., 1983; Davies, 1998). Cr-EDTA se uporablja tudi v kombinaciji z laktulozo, kar poveča specifičnost za prepustnost tankega črevesja (Jenkins in sod., 1991). Test Cr-EDTA je požel kritike zaradi velikih razlik med posameznimi osebki in nizke občutljivosti, prav tako je neprimeren za večkratno uporabo, posebno pri otrocih, zaradi radioaktivnosti (Uil in sod., 1997; Davies, 1998). Razpolovna doba izotopa ^{51}Cr je en mesec, kar omejuje shranjevanje izotopa in vzorcev pred analizo (Davies, 1998).

Sladkorji

Različni sladkorji se uporabljajo kot označevalci za ugotavljanje želodčne in črevesne prepustnosti. V klinični praksi s testi, ki temeljijo na absorpciji sladkorjev, ugotavljamo prisotnost ali odsotnost enteropatij (Travis in Menzies, 1992; Van Elburg in sod., 1995). Navadno so sladkorji razdeljeni glede na njihovo kemijsko strukturo in molekulsko maso.

Ločimo:

- monosaharide, med katere spadajo D-manitol, L-ramnoza in D-ksiloza. Premer molekul je manjši od 0,4 nm in molekulska masa je manjša od 200 Da;
- disaharide, kamor štejemo laktulozo, celobiozo, saharozo in laktozo. Premer molekul je večji od 0,5–0,6 nm in molekulska masa večja od 300 Da (Meddings in sod., 1993; Uil in sod., 1997).

Monosaharidi so majhne molekule in prehajajo bariero črevesne sluznice po obeh poteh z neposredovano difuzijo. Disaharidi prehajajo bariero intercelularno ter večinoma na mestih

poškodb. Na splošno ugotavljamo razliko v prepustnosti za dva različna sladkorja, disaharid in monosaharid, rezultat pa izrazimo kot razmerje med disaharidom in monosaharidom, določenem v urinu ali v krvi. Z ugotavljanjem razmerja med disaharidom in monosaharidom je mogoče boljše razlikovanje med bolniki z boleznimi prebavil in kontrolnimi osebki, kot če ugotavljamo individualno prisotnost posameznih sladkorjev v urinu ali v krvi (Sorensen in sod., 1997). Najpogosteje uporabljene kombinacije so laktuloza/manitol, laktuloza/ramnoza, in celobioza/manitol (Menzies, 1984; Travis in Menzies, 1992; Meddings in sod., 1993; Uil in sod., 1997; Davies, 1998). Sorensen in sodelavci (1997) ter Cox in sodelavci (1997) so ugotovili, da lahko ugotavljamo prisotnost sladkorjev v plazmi oz. v serumu z enako zanesljivostjo kot v urinu. Prednost metod, ki so jih razvili, je v tem, da se izognemo od 5 do 6 ur trajajočemu zbiranju urina ter z enkratnim odvzemom krvi zagotovimo zelene rezultate. Takšni testi imajo prednost predvsem v pediatriji in veterinarski medicini (Cox in sod., 1997; Sorensen in sod., 1997). Najprimernejši čas za odvzem je 120 minut po aplikaciji testnih raztopin, vendar so v času med 90 in 180 minutami po navedbah Sorensena in sodelavcev (1997) razmerja laktuloze/ramnoze in ksiloze/3-O-metilglukoze ostala relativno konstantna, tako da manjša odstopanja med odvzemi ne bi smela bistveno vplivati na rezultate (Sorensen in sod., 1997).

Uporaba sladkorjev kot označevalcev v klinični praksi ima določene omejitve. Raztopine, ki vsebujejo laktulozo in njihova osmolarnost presega 1500 mOsm/L, lahko prehodno zmanjšajo prepustnost sluznice prebavil (Davies, 1998). Raztopine sladkorjev pri bolnikih lahko povzročijo napet trebuh, drisko in napenjanje (Hamilton in sod., 1982; Uil in sod., 1997; Uil in sod., 2000; Steiner in sod., 2002). Analize vzorcev so zamudne, zahtevajo dolgotrajno ekstrakcijo in kromatografske procese, ki niso povsod mogoči, kar onemogoča uporabo sladkornih raztopin za rutinske preglede (Davies, 1998).

Sladkorji, ki jih uporabljamo kot označevalce prepustnosti želodčne sluznice

Saharoza in laktuloza sta si po sestavi zelo podobni, obe sta disaharida podobnih molekulskih mas, torej pričakujemo, da bosta prehajali po podobnih poteh. Glavna razlika med njima je, da se saharoza v tankem črevesju hitro razgradi pod vplivom encima saharaza-izomaltaza na monosaharidne komponente, glukozo in fruktozo. Tudi v primeru obsežnih poškodb tankega črevesja se aktivnost saharaze ohrani, kar pomeni, da je saharoza neprimeren označevalec prepustnosti tankega črevesja. Njena absorpcija je omejena na začetni del prebavil, predvsem želodec (Meddings in sod., 1993). Meddings in sodelavci (1993) so s poskusom na kuncih dokazali, da saharoza prehaja skozi poškodovano sluznico želodca in dvanajstnika hitreje kot skozi nepoškodovan epitelij. Te ugotovitve so kasneje potrdili s preučevanjem vpliva NSPZ na želodčno sluznico pri psih (Meddings in sod., 1995). Specifične in hude poškodbe tankega črevesja njene prepustnosti ne povečajo. To dokazuje, da saharoza v dvanajstniku hidrolizira na monosaharidne komponente in je zato zelo občutljiv in specifičen označevalec poškodb želodčne in duodenalne sluznice (Meddings in sod., 1993; Sutherland in sod., 1994; Meddings in sod., 1995; Vogelsang in sod., 1996). Količine nespremenjene saharoze, ki se pojavijo v periferni cirkulaciji in končno v urinu, odražajo stopnjo poškodb sluznice želodca in dvanajstnika (Meddings in sod., 1993; Vinet in sod., 1998; Hewetson in sod., 2006). Povečana prepustnost za saharozo uspešno odkrije razjede in hude gastritise kar v 84 %, ni pa tako zanesljiva za ugotavljanje blagih gastritisov, ezofagitisov ali bolezni dvanajstnika (Sutherland in sod., 1994). Vogelsank in sodelavci (1996) predvidevajo, da povečana prepustnost za saharozo pomeni generalizirane mikroskopske poškodbe celotne želodčne sluznice. Odkrili so jih pri 60 % bolnikov s celiakijo. Zaradi enostavnosti metode je primerna za nadzor ljudi in živali, ki dobivajo NSPZ in so izpostavljeni večjim tveganjem za nastanek bolezni začetnega dela

prebavil. Spremembe tako ugotovimo, še preden postanejo klinično zaznavne (Sutherland in sod., 1994, Meddings in sod., 1995).

Sladkorji, ki jih uporabljamo kot označevalce prepustnosti sluznice tankega črevesja

Za označevalca prepustnosti sluznice tankega črevesja se po literaturnih navedbah najpogosteje uporablja kombinacija disaharida laktuloze in monosaharida manitola. Laktuloza izpolnjuje veliko kriterijev idealnega označevalca: je nestrupena, se ne presnavlja in se po intravenski aplikaciji hitro izloči z urinom. Ker se v tankem črevesju ne presnovi, razmerje izločene količine laktuloze sovpada s poškodbami tankega črevesja pri boleznih, kot sta celiakija ali Kronova bolezen (Meddings in sod., 1993; Dastyh in sod., 2008). Manjše količine manitola so fiziološko prisotne v urinu nekaterih ljudi. Te količine naj bi bile zanemarljive in naj ne bi vplivale na končno koncentracijo izločenega manitola (Hamilton in sod., 1982; Uil in sod., 1997; Davies, 1998).

Trojni sladkorni test

Uporaba označevalcev, ki so specifični za določanje spremenjene prepustnosti posameznih območij prebavil, omogoča, da z enim testom ugotovimo funkcionalno integriteto želodčne in črevesne sluznice. Hkratna uporaba saharoze, manitola in laktuloze omogoča neinvazivno odkrivanje poškodb želodčne sluznice in sluznice tankega črevesja (Van Elburg in sod., 1995; Uil in sod., 1997; Uil in sod., 2000; Smecuol, 2001). Za pripravo testne raztopine trojnega sladkornega testa večina avtorjev navaja kombinacijo 2 g manitola, 10 g laktuloze in 40 g saharoze z dodatkom vode do 100 ml. Osmolarnost takšne raztopine je 1560 mmol/L (Van Elburg in sod., 1995; Uil in sod., 1997; Uil in sod., 2000). Uporablja se tudi raztopina s 5 g manitola, 10 g laktuloze in 20 g saharoze z dodatkom vode do 100 ml (Vogelsang in

sod., 1996) ali 100 g saharoze, 5 g laktuloze in 2 g manitola v 450 ml vode (Smecuol in sod., 2001). Sladkorje nato lahko merimo v serumu, plazmi ali v izločenem urinu. Rezultate vrednotimo z računanjem indeksa prepustnosti (laktuloza/manitol indeks) ali razmerja relativne izločene laktuloze proti relativnemu izločenemu manitolu (Meddings in sod., 1993; Vogelsang in sod., 1996; Uil in sod., 1997; Uil in sod., 2000). Prednost ugotavljanja razmerja je v povečani občutljivosti testa, s katerim ne ugotavljamo samo povečane prepustnosti zaradi večjega prehajanja disaharida zaradi odprtja intercelularne poti, temveč tudi zmanjšano absorpcijo monosaharida zaradi zmanjšane absorpcijske površine. Poleg tega nam ugotavljanje razmerja pomaga zmanjšati napake, ki nastanejo zaradi različne hitrosti praznjenja želodca in prehoda hrane skozi črevesje, ki s samo sluznico nimata dosti opraviti, prizadeneta pa enakovredno oba sladkorja (Sorensen in sod., 1997, Bruet in sod., 2008).

Rezultati sladkornih testov se pomembno razlikujejo glede na osmolarnost uporabljenih sladkornih raztopin. Hiperosmolarne raztopine naj bi bile boljše pri razlikovanju med normalnimi in patološkimi stanji sluznice tankega črevesja, kot je npr. atrofija resic zaradi t. i. osmotskega stresa. Pri poškodovani sluznici povzročijo relativno povečanje prepustnosti za laktulozo, pri normalni pa le mejno povečanje (Bjarnason, 1994; Sigthorsson in sod., 1998). Drugi predlagajo uporabo raztopin nizke osmolarnosti, posebno pri otrocih, zaradi možnosti pojava osmotske driske pri bolnikih z atrofijo črevesnih resic (Bjarnason, 1994; Van Elburg in sod., 1995; Uil in sod., 2000; Lascelles in sod., 2005).

2.6 ZDRAVILA

2.6.1 MELOKSIKAM

Meloksikam je NSPZ, ki se pri psih uporablja za zagotavljanje analgezije pri kirurških posegih in pri kronični bolečini, za zdravljenje osteoartritisa ter pri vročinskih in vnetnih stanjih (Plumb, 2002). Meloksikam bolj zavira aktivnost COX-2 v primerjavi s COX-1 in ga zato uvrščamo med pretežne zaviralce COX-2 (Vane, 1995; Poulsen, 1999; Plumb, 2002; Kimberly in sod., 2005), kot je bilo dokazano v *in-vitro* in *in-vivo* študijah (Engelhardt in sod., 1996a; Engelhardt in sod., 1996b; Kay-Mugford in sod., 2000; Brideau in sod., 2001; Jones in sod., 2002). Njegovi protivnetni, analgetični in antipiretični učinki so primerljivi z ostalimi NSPZ, ki so registrirani za uporabo pri psih (Plumb, 2008a). Po zaužitju se meloksikam v celoti resorbira iz prebavil v 5–6 urah. Razpolovni čas eliminacije je vrstno specifičen, pri psih je v povprečju 24 ur (12–36 ur), kar omogoča dajanje enkrat na dan (Hawkey, 1999; Poulsen, 1999; Plumb, 2008a). Najvišjo vrednost v plazmi doseže v 7–8 urah po zaužitju (Plumb, 2008a). Zaužitje hrane ne vpliva na resorbcijo. Biotransformira se v jetrih, izloča se z urinom in blatom. Precejšnja količina meloksikama vstopi v enterohepatično kroženje. Njegovi presnovki, ki jih najdemo v urinu, so biološko neaktivni in ne vplivajo na sintezo prostaglandinov v ledvicah (Poulsen, 1999; Plumb, 2008a). Meloksikam odsvetujejo pri živalih, mlajših od 6 tednov, ter pri živalih z razjedami na prebavilih. Previdno ga uporabljamo pri bolnikih z jetrnimi, ledvičnimi in kardiološkimi boleznimi ter motnjami v strjevanju krvi (Plumb, 2008a).

2.6.2 KORTIKOSTEROIDI

Protivnetni učinek glukokortikoidov je posledica zmanjšane sinteze prostaglandinov, levkotrienov in drugih eikozanoidov, kar privede do zmanjšanega vnetnega odziva (Higgins, 1985; Hullin in sod., 1989; Neiger in sod., 2000). Zdravljenje z glukokortikoidi poveča tveganje za nastanek krvavitev in razjed na prebavilih pri ljudeh in pri psih (Piper in sod., 1991; Rohrer in sod., 1999). Kortikosteroidi spodbujajo sintezo beljakovin, kot sta lipomodulin in makrokortin, ki zavirata fosfolipazo A₂ in s tem zmanjšata presnovo arahidonske kisline, kar privede do zmanjšanega nastanka prostaglandinov. Spodbujajo tudi nastanek številnih beljakovin, ki zavirajo delovanje prostanoidov, ena takih je lipokortin (Hullin in sod., 1989; Izhar in sod., 1992; Carpani de Kaski, 1995; Neiger in sod., 2000.). Poleg vpliva kortikosteroidov na zmanjšano regeneracijo celic so zaradi njihovega vpliva na zmanjšan nastanek prostaglandinov prizadeti še številni drugi obrambni mehanizmi, ki jih uravnavajo prostaglandini. Ti pa so: zgoščevanje želodčne sluzi, spodbujanje aktivnega izločanja bikarbonatov, spremembe v prekrvavitvi sluznice želodca, zaviranje izločanja želodčne kisline, povečan prehod vode iz serozne v mukozno plast sluznice, vpliv na hiperplazijo gastrinskih in parietalnih celic in zaviranje prilepljanja nevtrofilnih levkocitov na stene krvnih žil (Piper in sod., 1991; Hudson in sod., 1992; Rohrer in sod., 1999; Neiger in sod., 2000). Raziskave na podganah so pokazale, da kortikosteroidi poslabšajo eksperimentalno povzročene razjede in podaljšajo čas njihovega zdravljenja. Povzročijo tudi ponovno ulceracijo že zaceljenih razjed ter pospešijo bakterijsko kolonizacijo že nastalih razjed (Piper in sod., 1991; Carpani de Kaski, 1995; Neiger in sod., 2000).

Kortikosteroidi spremenijo želodčno-črevesno prepustnost pri ljudeh in vplivajo na intracelularne *sekundarne prenosnike* in vnetne mediatorje, ki uravnavajo prepustnost tesnih stičnic ter tako spremenijo prepustnost epitelnih tesnih stičnic v želodcu in dvanajstniku

(Anderson in Van Itallie, 1995; Kiziltas in sod., 1998). Visoki odmerki steroidov povzročijo makroskopske spremembe na sluznici želodca in z njimi povezane klinične znake (Kiziltas, 1998). Nekatera nevrološka stanja, kot je npr. akutna poškodba hrbtenjače zaradi travme ali ekstruzije medvretenčne ploščice, predstavljajo povečano tveganje za nastanek krvavitev in razjed na prebavilih pri ljudeh. Kortikosteroidi, ki so nujni del zdravljenja, nastanek razjed na prebavilih pri teh bolnikih še pospešijo (Moore in Withrow, 1982; Toombs in sod., 1986; Rohrer in sod., 1999; Neiger in sod., 2000). Potencirajo tudi nastanek želodčnih razjed zaradi drugih dejavnikov, kot sta npr. hipotenzija in stres (Neiger in sod., 2000).

2.6.3 MIZOPROSTOL

Mizoprostol je sintetični nadomestek prostaglandina E₁ (PGE₁), ki je po zgradbi podoben naravnemu PGE₁. Mizoprostol zavira nastajanje želodčne kisline in ima t. i. »citoprotektivni učinek«. Preprečuje nastanek poškodb želodčne sluznice zaradi uporabe NSPZ pri ljudeh in pri psih (Miller, 1988; Johnston in sod., 1995; Bowersox in sod., 1996; Neiger in sod., 2000; Ward in sod., 2003; Plumb, 2008c). Pri psih zmanjša izločanje histamina, pentagastрина in želodčne kisline, ki jo spodbuja zaužitje hrane. Mehanizem zaščite želodčne sluznice zaradi uporabe mizoprostola vključuje ohranjanje bariere želodčne sluznice, spodbujanje izločanja sluzi in bikarbonatov in spodbujanje prekrvavitve želodčne sluznice (Bauer, 1985; Ward in sod., 2003; Plumb, 2008c). Bruhanje se kot neželeni učinek mizoprostola pri psih redko pojavlja. Pogosta je driska, predvsem pri večjih odmerkih (Graham in sod., 1988; Walt in sod., 1992; Murtaugh in sod., 1993; Buttgerit in sod., 2001; Neiger, 2003; Ward in sod., 2003). Povzroča lahko tudi neprijeten občutek v želodcu in flatulenco (Plumb, 2008c). Neželeni učinki so prehodni, izzvenijo v nekaj dneh, omilimo jih lahko s prilagajanjem odmerka ali z dajanjem zdravila s hrano (Plumb, 2008c). Mizoprostol vpliva na mehčanje

materničnega vratu in krčenje maternice ter tako izzove abortuse predvsem v zgodnji fazi gestacije. Uporabo mizoprostola odsvetujejo pri brejih živalih in živalih v laktaciji (Buttgereit in sod., 2001; Neiger, 2003; Ward in sod., 2003, Plumb, 2008c). Mizoprostol uspešno zmanjša ali odpravi škodljive učinke ciklosporina na ledvice, ublaži tudi klinične znake, povezane z atopičnim dermatitisom pri psih (Plumb, 2008c).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Raziskava je bila opravljena na sedmih odraslih psih pasme beagle (šest samcev in ena samica). Povprečna telesna masa psov je bila 19,3 kg (od 14,7 kg do 22,6 kg). Teden dni pred raziskavo so bili psi razgliteni s prazikvantelom in febendazolom (Zantel®, CPML, Galway, Irska) v odmerku ena tableta na 10 kg telesne mase in klinično pregledani. Pri kliničnih pregledih psov nismo odkrili nobenih posebnosti.

Tri dni pred začetkom raziskave smo pri vseh psih odvzeli krvne vzorce za preiskavo osnovne in diferencialne bele krvne slike. Obe preiskavi sta bili opravljene v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za kirurgijo in male živali z avtomatskim hematološkim analizatorjem Bayer-Technicon H*1 (Bayer-Technicon, Nemčija), ki je prilagojen za uporabo v veterinarski medicini. Preiskovane vrednosti so bile pri vseh psih v mejah referenčnih vrednosti za pse.

Istočasno smo vsem psom odvzeli tudi krvne vzorce za biokemijske preiskave krvi (sečnine, kreatinina, celokupnih beljakovin in albuminov) ter v vzorcih določili koncentracijo natrija, kalija in klora. Preiskave so bile opravljene v istem laboratoriju z analizatorjem Technicon RA-TX (Bayer-Technicon, Nemčija) za biokemijske preiskave in z analizatorjem Ilyte (IL – Instrumentation Laboratory, ZDA) za določanje mineralov v krvi. Psi so imeli vse parametre v mejah referenčnih vrednosti za pse.

3.2 POSKUSNI PROTOKOL

Dovoljenje za izvajanje raziskave je izdalo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS 31. 5. 2004. Številka dovoljenja za izvajanje poskusa na živalih je 323-02-221/2004/3.

Raziskava je bila razdeljena na pet faz, ki so trajale dvajset dni. Prvih deset dni vsake faze so psi dobivali zdravila, od enajstega do dvajsetega dne vsake faze pa niso dobivali ničesar. Med posameznimi fazami je bilo najmanj štirinajst dni presledka, ko so psi mirovali (razpredelnica 1).

Dan pred začetkom prve faze smo psom odvzeli kri za določitev izhodiščnih vrednosti PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄ v serumu. Za določitev izhodiščnih vrednosti laktuloze, manitola in saharoze v plazmi smo psom dali popiti 100 ml pripravljene sladkorne raztopine in čez 120 minut odvzeli vzorce krvi. Psi so bili tešči 8 ur pred aplikacijo sladkornih raztopin.

V **prvi fazi** so psi deset dni dobivali placebo, vodo za injekcije (Voda za injekcije Braun[®], B Braun, Nemčija) ob 7 h zjutraj peroralno. Odmerek je bil volumsko enak odmerku meloksikama, ki so ga psi dobivali v naslednjih fazah.

V **drugi fazi** so psi deset dni dobivali peroralno suspenzijo nesteroidnega analgetika meloksikama (Metacam[®], Vetmedica, Boehringer Ingelheim, Nemčija) v odmerku 0,2 mg na kilogram telesne mase ob 7 h zjutraj peroralno.

V **tretji fazi** so psi deset dni dobivali meloksikam na enak način in v enakih odmerkih kot v drugi fazi, vseh deset dni tretiranja smo dodajali še sintetični analog prostaglandina E₁

mizoprostol (Cytotec[®], Searle, Pfizer, NY, ZDA) v odmerku 0,5 µg na kilogram telesne mase ob 7 h, 15 h in 22 h peroralno.

V **četrti fazi** so psi deset dni dobivali meloksikam na enak način in v enakih odmerkih kot v drugi fazi, prve tri dni tretiranja smo dodali še glukokortikoid deksametazon (Deksametazon[®], Krka, Slovenija) v odmerku 1 mg na kilogram telesne mase ob 7 h zjutraj v stegensko muskulaturo.

V **peti fazi** so psi deset dni dobivali meloksikam in mizoprostol na enak način in v enakih odmerkih kot v tretji fazi ter prve tri dni tretiranja še deksametazon na enak način in v enakih odmerkih kot v četrti fazi.

V vsaki fazi smo psom jemali kri iz jugularne vene za določitev vrednosti PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄ v serumu ter določitev laktuloze, manitola in saharoze v plazmi drugi in šesti dan tretiranja, ter enajsti dan (1 dan po končanem tretiranju) in dvajseti dan (10 dni po končanem tretiranju).

Za ugotavljanje vrednosti PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄ v serumu smo kri odvzeli iz jugularne vene dve uri po zaužitju zdravil oz. kombinacije zdravil, tik pred aplikacijo pripravljene sladkorne raztopine.

Za določitev laktuloze, manitola in saharoze v plazmi smo psom po 12-urnem postu dve uri po zaužitju zdravil oz. kombinacije zdravil dali popiti 100 ml pripravljene sladkorne raztopine, ogrete na sobno temperaturo. Vzorce krvi smo odvzeli iz jugularne vene 120 minut po zaužitju sladkorne raztopine.¹

Dnevi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Faza raziskave																					
1 placebo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 meloksikam	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 meloksikam + mizoprostol	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 meloksikam + deksametazon	X X	X X	X X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 meloksikam + mizoprostol + deksametazon	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Razpredelnica 1: Potek raziskave po fazah in po dnevih. Senčena polja predstavljajo dneve odvzemov vzorcev krvi.

3.3 PRIPRAVA, SHRANJEVANJE IN ANALIZA VZORCEV

3.3.1 MERITVE KONCENTRACIJ PGE₂, PGI₂, TXB₂ IN LTB₄ V SERUMU

Za ugotavljanje PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄ v serumu smo kri odvzeli v 4 ml serumske epruvete (Vacuette, Greiner bio-one, Kremsmuenster, Avstria). Epruvete smo pustili na sobni temperaturi 10 minut, da je kri koagulirala, in jih nato centrifugirali pri 1300 g 10 minut pri sobni temperaturi, odpipetirali serum in ga zamrznili na -20°C do meritev.

¹ Potek raziskave je podrobno predstavljen v Razpredelnici 1.

Za določanje PGE₂ smo uporabili komercialni monoklonalni EIA Kit, za določanje prostaciklina pa 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA Kit (R&D Systems Inc., ZDA). Za določanje TXB₂ smo uporabili komercialni Thromboxane B₂ Elisa Kit, za določanje LTB₄ pa Leukotriene B₄ Elisa Kit (Cayman Chemical, ZDA). Vse meritve smo opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra v Ljubljani v skladu z navodili proizvajalcev.

3.3.2 TROJNI SLADKORNI TEST

Za ugotavljanje prepustnosti želodčne in črevesne sluznice smo uporabili trojni sladkorni test z disaharidom saharozo, laktulozo in monosaharidom manitolom. Sladkorna raztopina je v 100 ml vode vsebovala 2 g manitola, 40 g saharoze in 10 g laktuloze. Osmolarnost raztopine je bila 1560 mmol/L. Pripravljeno raztopino smo pred uporabo hranili v hladilniku pri 4°C do največ 14 dni.

Vzorci krvi (2 ml) za določanje koncentracije laktuloze, manitola in saharoze smo odvzeli v 2-mililitrske epruvete z natrijevim fluoridom in EDTA K₃ (Vacuette, Greiner bio-one, Kremsmuenster, Avstria) in jih takoj po odvzemu centrifugirali 15 minut na 1500 g pri 4°C. Takoj nato smo ločili plazmo in jo zamrznili na -80°C. Zmrznjeno plazmo so nato na Kemijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani hranili na -70°C do meritev koncentracije sladkorjev s tenkoplastno kromatografijo (TLC).

Metoda za določanje sladkorjev v plazmi in izračun L/M indeksa

Za določanje koncentracije laktuloze, manitola in saharoze v plazmi smo uporabili tenkoplastno kromatografijo (TLC) po metodi, ki je opisana v Pukl in Prošek, 1990, ter

Vovk in sod., 2003. Po tej metodi se na kromatografski plošči, ki je razvita z izbranim sistemom topil, posamezni monosaharidi in disaharidi ločijo med seboj. Po derivatizaciji se pojavijo kot obarvane lise na svetli podlagi kromatografske plošče.

Uporabljene aparature:

- analitska tehtnica (Sartorius A 2005, Nemčija),
- linomat IV applicator (Camag, Švica),
- denzitometer (Camag TLC scanner 3, Švica),
- aparat za potapljanje plošč (Camag chromatogram Immersion Device II, Švica),
- grelna plošča (Camag TLC plate heater II, Švica).

Reagenti in standardi:

- difenilamin (Sigma, Nemčija),
- anilin (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija),
- fosforna (V) kislina (Merck, Nemčija),
- acetonitril (Merck, Nemčija),
- 2-aminoetil-difenilborinat (Fluka, Švica),
- aceton (Merck, Nemčija),
- standardi: - 0,15 % fruktoze v 80-odstotnem metanolu (v/v) (Sigma, Nemčija),
- 0,15 % saharoze v 80-odstotnem metanolu (v/v) (Sigma, Nemčija),
- 0,15% glukoze v 80-odstotnem metanolu (v/v) (Sigma, Nemčija),
- plošča: HPTLC, 20 x 10cm, Silikagel, 0,5 mikrometrov (Merck, Nemčija).

Raztopine

Derivatizacijski reagent DAP: v erlenmajerico z obrusom damo 4 g difenilamina in 4 g anilina, 160 ml metanola in 40 ml fosforne(V) kisline in dobro premešamo.

Raztopina 2-aminoetil-difenilborinata: v 200 ml merilno bučko odtehtamo 135 mg 2-aminoetil-difenilborinata in dopolnimo do oznake z acetonitrilom.

Postopek

Pred analizo se vzorce centrifugira 20 minut pri hitrosti 10000 obr/min, nato se jih nanese na točke na ploščo, ki se jo razvije v mobilni fazi: raztopina 2-aminoetil-difenilborinata/voda/metanol = 17/3/0,25 (v/v/v). Ploščo se v mobilni fazi razvija trikrat. Med vsakim razvijanjem se ploščo posuši na zraku. Po končanem zadnjem razvijanju se ploščo posuši in za devet sekund potopi v sveže pripravljen derivatizacijski reagent. Ploščo se osuši in segreva 10–15min pri 105–110°C.

Vrednotenje

Intenziteto posameznih komponent izmerimo z denzitometrom. Meri se intenziteto difuzno odbite svetlobe (refleksijo) sivozelenih oz. rdečerjavih madežev na beli podlagi pri valovni dolžini 520 nm.

Koncentracijo posameznih sladkorjev smo izrazili v µg/ml, indeks L/M smo izračunali po naslednji formuli: $L(\text{izločena})/M(\text{izločeni}) : L(\text{zaužita})/M(\text{zaužit})$.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Analiza je bila narejena za dva pogoja hkrati, pri čemer je eden od pogojev vedno placebo (prva faza poskusa), drugi pa eden izmed preostalih štirih faz raziskave. V obeh pogojih nas je zanimalo, pri katerem odvzemu se bodo pojavile statistično značilne razlike v primerjavi s prvim odvzemom. Zanimalo nas je tudi, ali je prišlo do statistično značilnih razlik v posameznih spremenljivkah med eksperimentalnima pogojema.

Spremenljivke so bile: PGE₂, PGI₂, TXB₂, LTB₄, L/M indeks in koncentracija saharoze.

Za statistično preizkušanje domnev smo uporabili dvosmerno analizo variance za ponovljene meritve (two-way repeated measures ANOVA), pri kateri sta bila glavna učinka eksperimentalni pogoj (faza poskusa) in število odvzemov (4 odvzemi). Statistične analize smo izvedli s programom SPSS® for Windows 14.0.1.

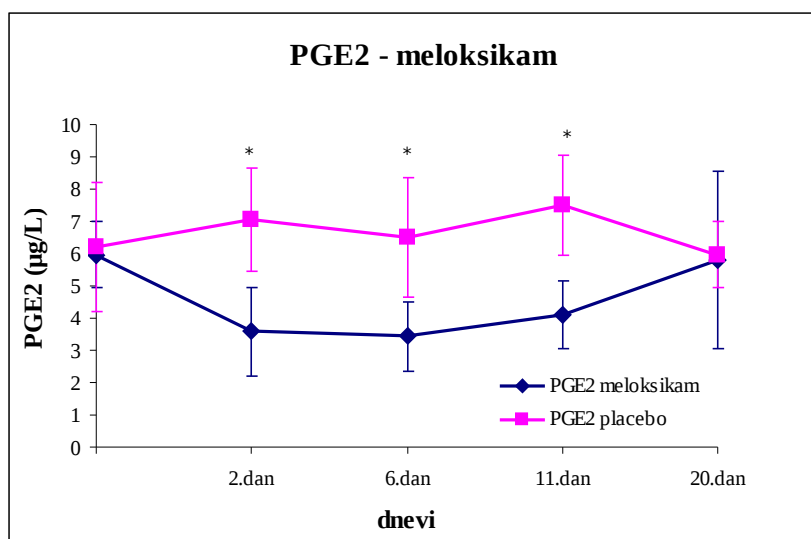
V primerih, v katerih učinek interakcije ni bil statistično značilen – torej je upravičeno predpostaviti, da je časovni potek enak v obeh eksperimentalnih pogojih –, smo za primerjavo povprečja meritev ob vsakem od kasnejših odvzemov s prvim odvzemom uporabili načrtovane primerjave v okviru analize variance (simple within-subject contrasts). V primerih, v katerih je bil učinek interakcije statistično značilen – torej se časovni potek med eksperimentalnima pogojema razlikuje –, smo znotraj vsakega eksperimentalnega pogoja uporabili teste *t* za odvisna vzorca (paired-samples *t*-test). Dodatno smo povprečje meritev za vsak odvzem primerjali med eksperimentalnima pogojema s testom *t* za odvisna vzorca. Pri tem smo zaradi večkratnih testiranj upoštevali Bonferronijev popravek (Bonferroni correction for multiple tests), kar pomeni, da kot kritično vrednost za statistično značilnost upoštevamo 0,05 deljeno s številom primerjav, kar za štiri odvzeme znaša 0,013.

Grafične prikaze rezultatov smo izdelali s preglednico Microsoft® Excel 2003. V grafičnih prikazih rezultatov smo ponazorili bazalne vrednosti in potek povprečja meritev po odvzemih v posameznih fazah raziskave za oba eksperimentalna pogoja (prva faza oz. placebo in ena od ostalih štirih faz raziskave). Navpične črte v grafih označujejo standardne odklone.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂) V SERUMU PSOV

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, smo najnižjo srednjo vrednost koncentracije PGE₂ v serumu, ki je bila $3,43 \pm 1,08 \mu\text{g/L}$, ugotovili šesti dan. Srednja vrednost koncentracije PGE₂ je bila dvajseti dan pri psih, ki so prejeli meloksikam, $5,81 \pm 2,75 \mu\text{g/L}$ in je bila podobna srednji vrednosti pri psih, ki so prejeli placebo ($5,97 \pm 1,0 \mu\text{g/L}$). Statistično značilno znižanje koncentracije PGE₂ smo v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, ugotovili drugi, šesti in enajsti dan druge faze raziskave.

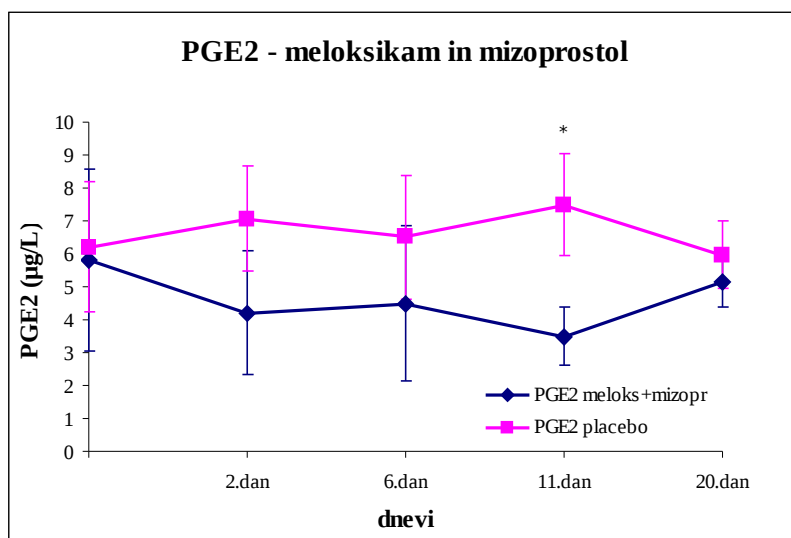


Graf 25: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, smo ugotovili znižanje srednje vrednosti koncentracije PGE₂ v serumu drugi, šesti in enajsti dan v primerjavi s psi, ki so

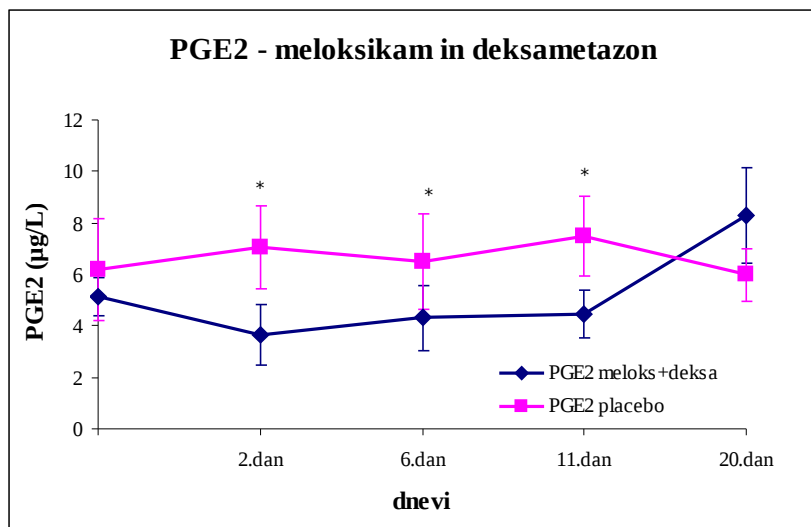
prejemali placebo. Statistično značilno znižanje smo ugotovili 11.enajsti dan, ko je bila ugotovljena tudi najnižja srednja vrednost koncentracije PGE₂ ($3,5 \pm 0,86 \mu\text{g/L}$) v primerjavi s srednjo vrednostjo $7,48 \pm 1,54 \mu\text{g/L}$ pri živalih, ki so dobivale placebo. Dvajseti dan, 10 dni po zadnjem odmerku zdravil, se je srednja vrednost koncentracije PGE₂ ($5,16 \pm 0,75 \mu\text{g/L}$) približala srednji vrednosti psov, ki so prejemali placebo ($5,97 \pm 1,01 \mu\text{g/L}$).



Graf 26: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE₂ v serumu pri psih, ki so prejemali meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejemali placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

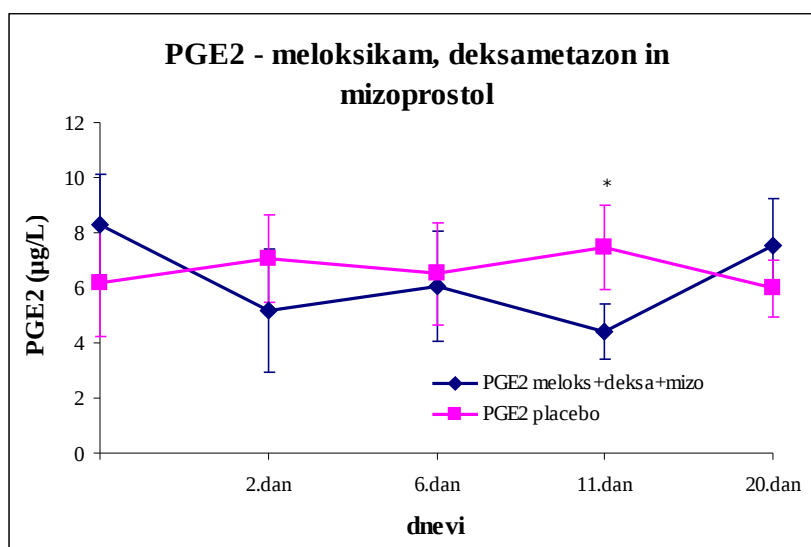
Pri psih, ki so prejemali meloksikam in deksametazon, smo pri vseh treh odvzemih ugotovili nižje srednje vrednosti koncentracije PGE₂ v serumu v primerjavi s koncentracijami PGE₂ pri psih, ki so prejemali placebo, z najnižjo srednjo vrednostjo drugi dan ($3,66 \pm 1,15 \mu\text{g/L}$). Statistično značilno znižanje koncentracije PGE₂ smo pri psih, ki so dobivali meloksikam in deksametazon, v primerjavi s psi, ki so dobivali placebo, ugotovili drugi, šesti in enajsti dan.



Graf 27: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, so bile srednje vrednosti koncentracije PGE₂ v serumu nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi pri psih, ki so prejeli placebo, pri vseh treh odvzemih v času dajanja zdravil. Statistično značilno znižanje koncentracije PGE₂ pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, smo ugotovili enajsti dan, ko je bila ugotovljena tudi najnižja srednja vrednost ($4,41 \pm 1,0 \mu\text{g/L}$).

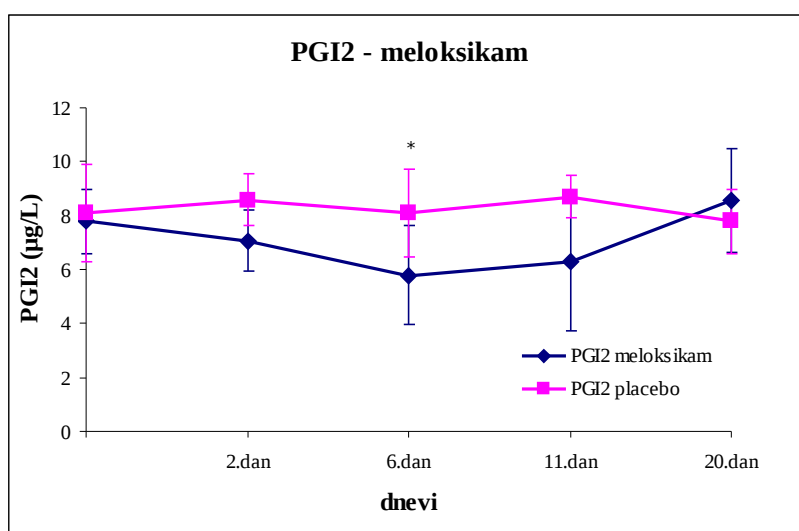


Graf 28: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGE₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

4.2 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO PROSTAGLANDINA I₂ (PGI₂) V SERUMU PSOV

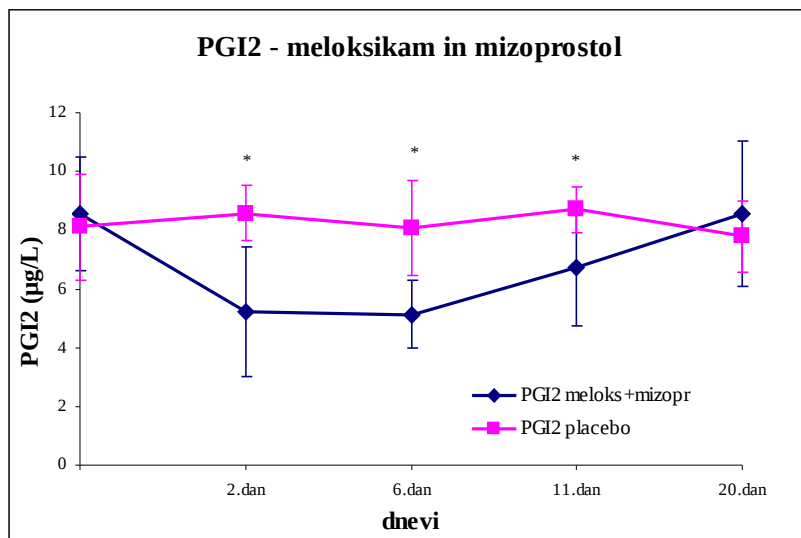
Pri psih, ki so prejeli meloksikam, smo drugi, šesti in enajsti dan ugotovili nižje srednje vrednosti koncentracije PGI₂ v serumu v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo. Statistično značilno znižanje koncentracije PGI₂ pri psih, ki so prejeli meloksikam, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, smo ugotovili šesti dan, ko je bila koncentracija PGI₂ v serumu tudi najnižja ($5,76 \pm 1,84 \mu\text{g/L}$).



Graf 29: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

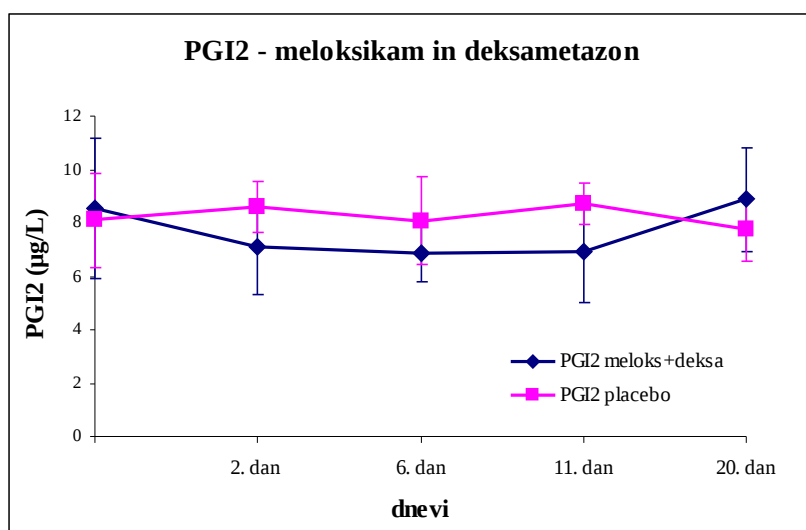
Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, so bile srednje vrednosti koncentracije PGI₂ v serumu statistično značilno nižje v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo od drugega do enajstega dne. Srednja vrednost koncentracije PGI₂ je nato naraščala in dvajseti dan dosegla srednjo vrednost $8,54 \pm 2,65 \mu\text{g/L}$, ki je bila višja od srednje vrednosti pri psih, ki so prejeli placebo ($7,79 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$).



Graf 30: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

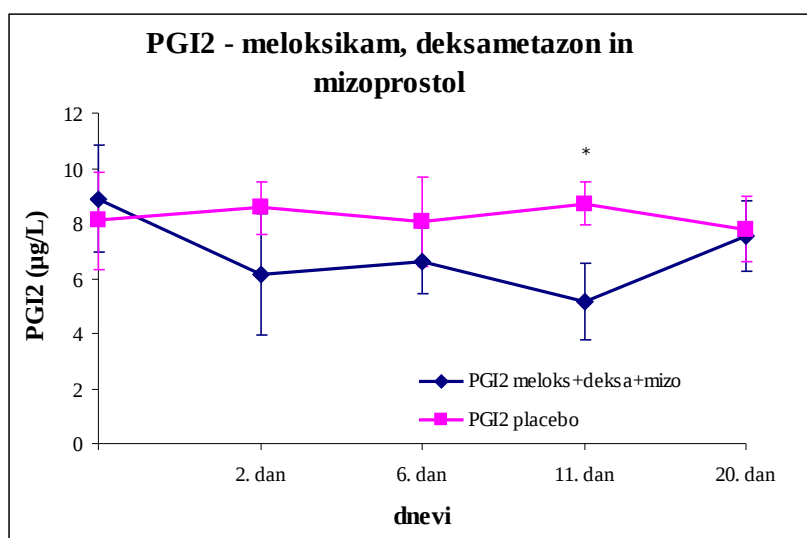
* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, so bile srednje vrednosti koncentracije PGI₂ v serumu drugi ($7,09 \pm 1,75 \mu\text{g/L}$), šesti ($6,9 \pm 1,05 \mu\text{g/L}$) in enajsti dan ($6,9 \pm 1,89 \mu\text{g/L}$) nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi pri psih, ki so prejeli placebo, vendar brez statistične značilnosti. Serumska koncentracija PGI₂ je dvajseti dan dosegla najvišjo srednjo vrednost ($8,89 \pm 1,94 \mu\text{g/L}$), ki je bila višja v primerjavi s srednjo vrednostjo pri psih, ki so prejeli placebo ($7,79 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$).



Graf 31: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, in pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, so bile srednje vrednosti koncentracije PGI₂ v serumu nižje v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo od drugega do enajstega dne. Enajsti dan smo ugotovili statistično značilno znižanje koncentracije PGI₂ v serumu v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, ter najnižjo srednjo vrednost, ki je bila $5,16 \pm 1,38 \mu\text{g/L}$.

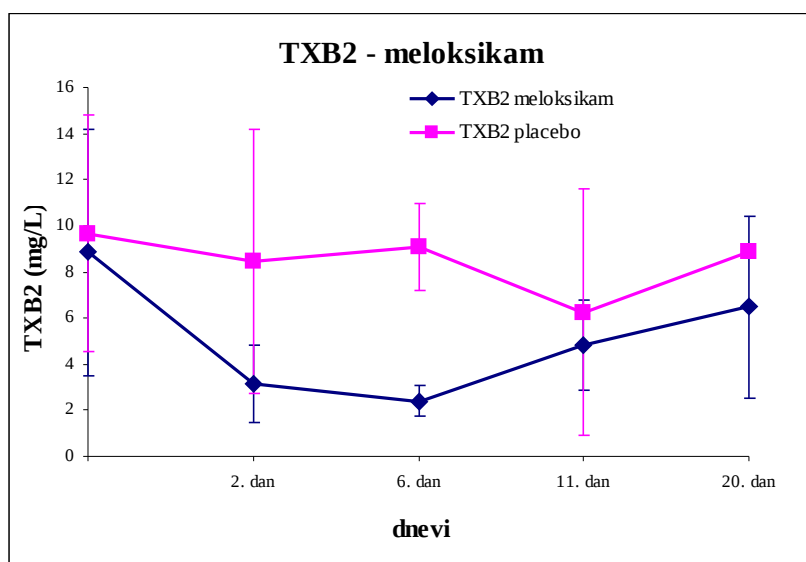


Graf 32: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije PGI₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

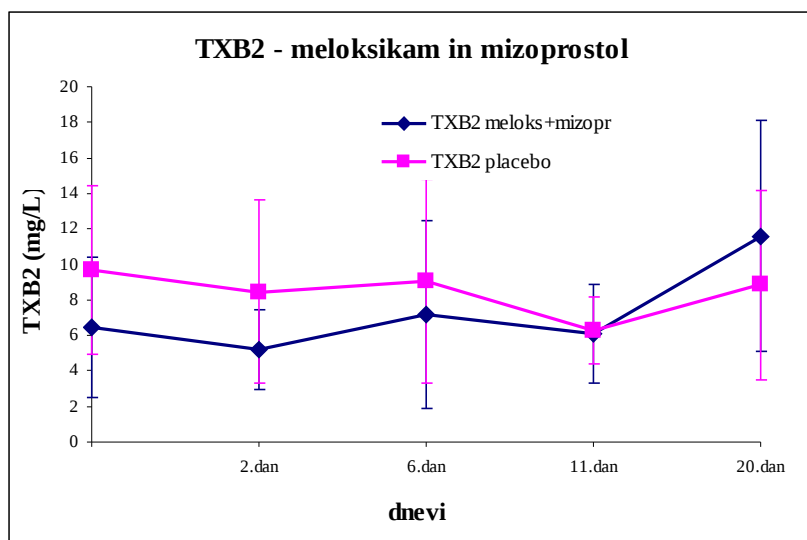
4.3 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO TROMBOKSANA B₂ (TXB₂) V SERUMU PSOV

Srednje vrednosti koncentracije TXB₂ v serumu psov, ki so prejeli meloksikam, so ves čas ostale nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi pri psih, ki so prejeli placebo, z najnižjo srednjo vrednostjo šesti dan. Statistično značilnih razlik v koncentraciji TXB₂ med psi, ki so prejeli meloksikam, in psi, ki so prejeli placebo, nismo ugotovili.



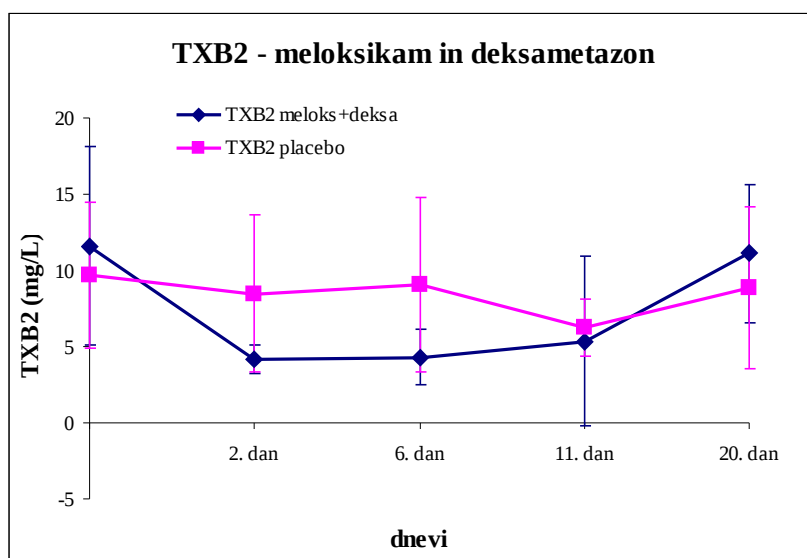
Graf 33: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, so bile srednje vrednosti koncentracije TXB₂ v serumu nižje v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo do enajstega dne. Koncentracija TXB₂ v serumu psov, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, je dvajseti dan poskusa dosegla najvišjo srednjo vrednost ($11,58 \pm 6,50$ mg/L) in presegla srednjo vrednost, ugotovljeno pri psih, ki so prejeli placebo ($8,84 \pm 5,33$ mg/L). Statistično značilnih razlik v koncentraciji TXB₂ med psi, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, in psi, ki so prejeli placebo, nismo ugotovili.



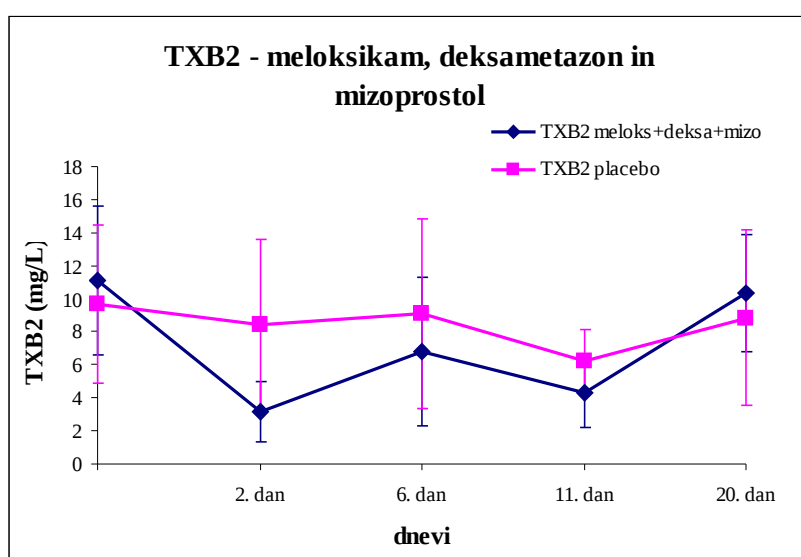
Graf 34: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, smo v času dajanja zdravil ugotovili nižje srednje vrednosti koncentracije TXB₂ v serumu v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, z najnižjo srednjo vrednostjo drugi dan ($4,17 \pm 0,89$ mg/L). Serumska koncentracija TXB₂ pri psih, ki so dobivali meloksikam in deksametazon, je dvajseti dan dosegla najvišjo srednjo vrednost ($11,1 \pm 4,51$ mg/L), ki je bila višja od srednje vrednosti koncentracije TXB₂, ugotovljene pri psih, ki so dobivali placebo ($8,84 \pm 5,33$ mg/L). Statistično značilnih razlik v koncentraciji TXB₂ v serumu med psi, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter psi, ki so prejeli placebo, nismo ugotovili.



Graf 35: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

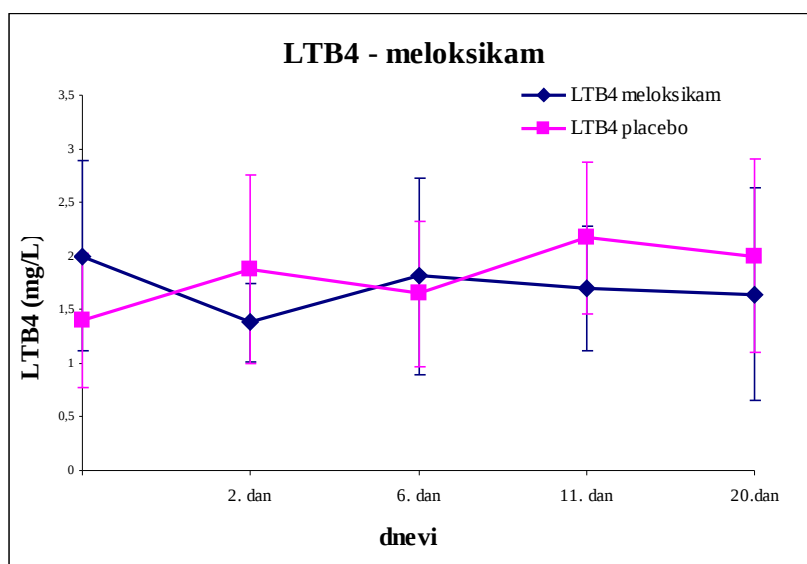
Pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, so srednje vrednosti koncentracije TXB₂ v serumu ostale nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi koncentracije TXB₂ v serumu psov, ki so prejeli placebo od prvega do enajstega dne z najnižjo srednjo vrednostjo drugi (3,17 ± 1,84 mg/L) in najvišjo šesti dan (6,8 ± 4,48 mg/L). Statistično značilnih razlik v koncentraciji TXB₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, nismo ugotovili.



Graf 36: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije TXB₂ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

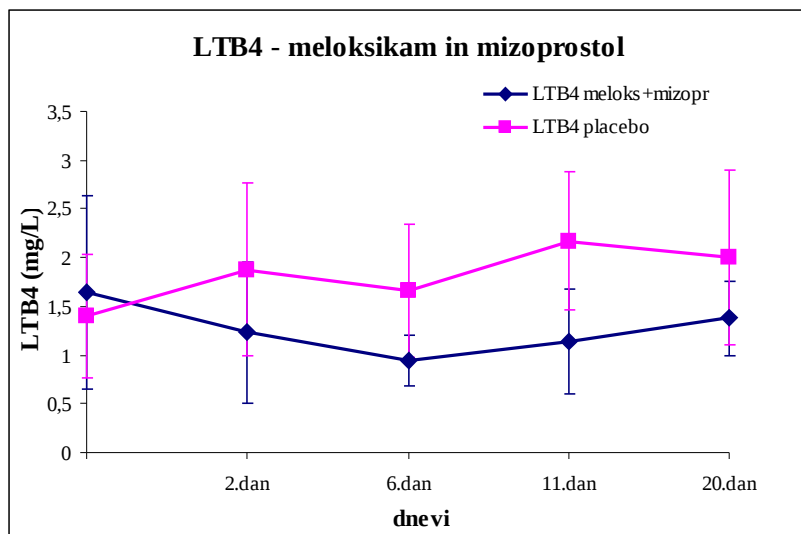
4.4 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO LEVKOTRIENA B₄ (LTB₄) V SERUMU PSOV

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, je bila koncentracija LTB₄ v serumu najvišja šesti dan ($1,81 \pm 0,92$ mg/L) in je presegla srednjo vrednost koncentracije LTB₄ šestega dne pri psih, ki so prejeli placebo ($1,66 \pm 0,68$ mg/L). V tej fazi raziskave nismo ugotovili statistično značilnih razlik med srednjimi vrednostmi koncentracije LTB₄ v serumu psov, ki so prejeli meloksikam, ter psov, ki so prejeli placebo.



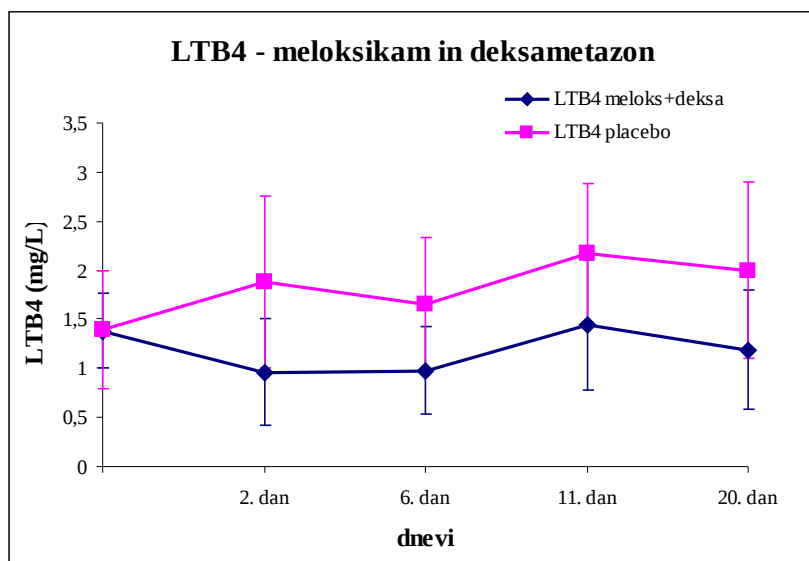
Graf 37: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB₄ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, so srednje vrednosti serumske koncentracije LTB₄ ostale nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi, ugotovljenimi pri psih, ki so prejeli placebo vseh 20 dni tretje faze raziskave. Statistično značilnih razlik v koncentraciji LTB₄ v serumu med skupinama v tej fazi nismo ugotovili.



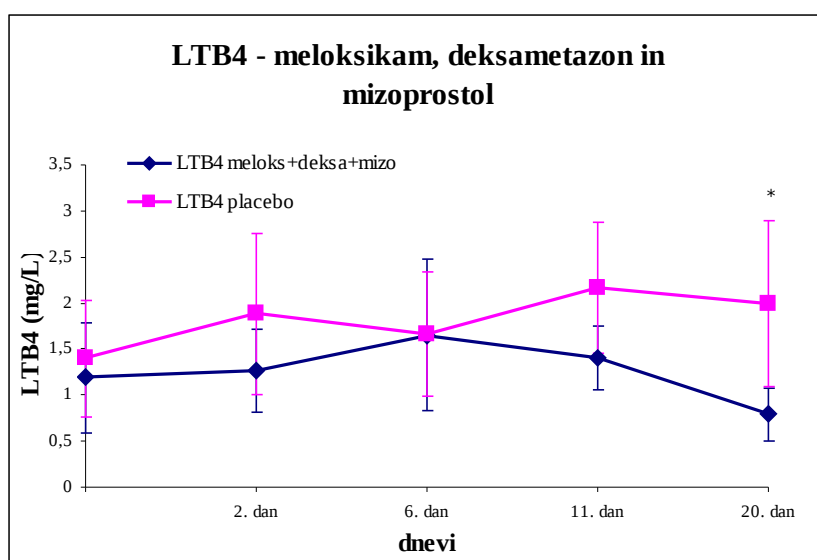
Graf 38: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB₄ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, so srednje vrednosti koncentracije LTB₄ v serumu ostale nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi pri psih, ki so prejeli placebo vseh 20 dni. V tej fazi raziskave nismo ugotovili statistično značilnih razlik v serumski koncentraciji LTB₄ med psi, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter psi, ki so prejeli placebo.



Graf 39: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB₄ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, so med poskusom srednje vrednosti koncentracije LTB₄ v serumu ostale nižje v primerjavi s srednjimi vrednostmi koncentracije LTB₄ pri psih, ki so prejeli placebo, z najvišjo srednjo vrednostjo šesti dan ($1,65 \pm 0,82$ mg/L). Nato je koncentracija LTB₄ v plazmi začela padati in je dvajseti dan poskusa dosegla najnižjo srednjo vrednost, ki je bila $0,79 \pm 0,28$ mg/L in je bila statistično značilno nižja od srednje vrednosti pri psih, ki so prejeli placebo ($2,0 \pm 0,9$ mg/L).

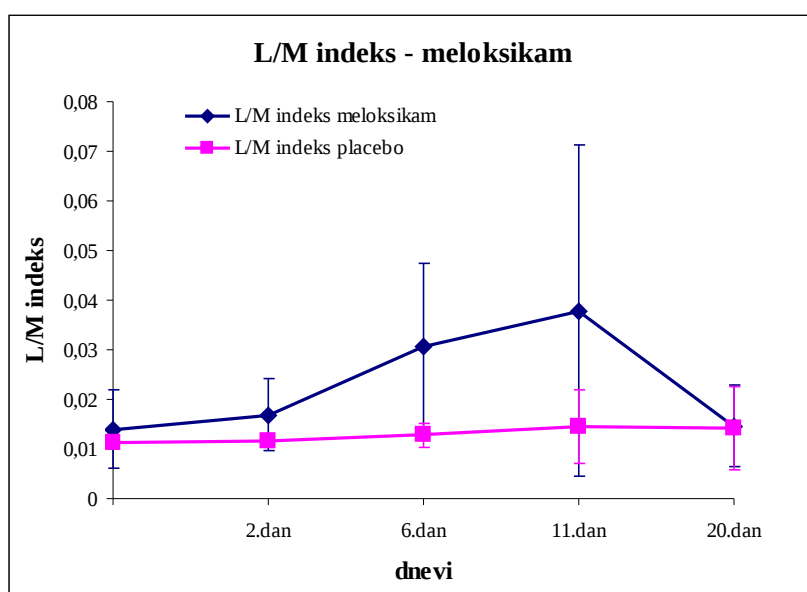


Graf 40: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije LTB₄ v serumu pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

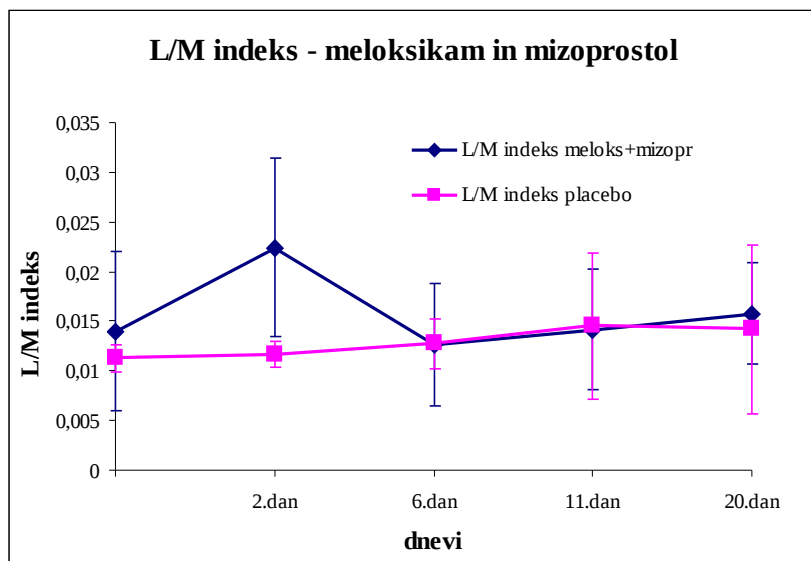
4.5 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA L/M INDEKS PRI PSIH

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, smo ugotovili povečanje L/M indeksa v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo. Najvišja srednja vrednost L/M indeksa je bila enajsti dan ($0,037 \pm 0,033$) v primerjavi z najnižjo srednjo vrednostjo, ki smo jo ugotovili drugi dan in je bila $0,016 \pm 0,007$. Kljub očitnemu povečanju L/M indeksa pri psih, ki so prejeli meloksikam, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, zaradi velikega standardnega odklona nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinama.



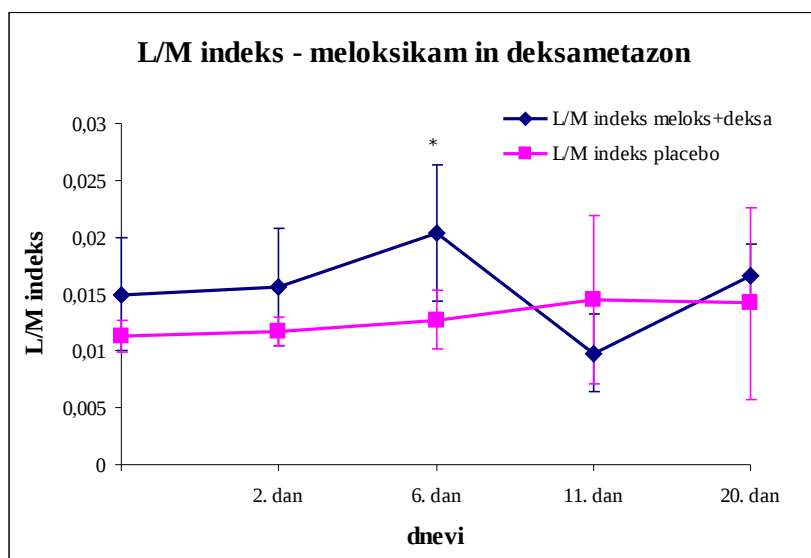
Graf 41: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M, indeksa izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, se je L/M indeks povečal drugi dan. L/M indeks je že šesti dan dosegel enake srednje vrednosti pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, kot in pri psih, ki so prejeli placebo. L/M indeks se ni značilno razlikoval med psi, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, in psi, ki so prejeli placebo.



Graf 42: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M, indeksa izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

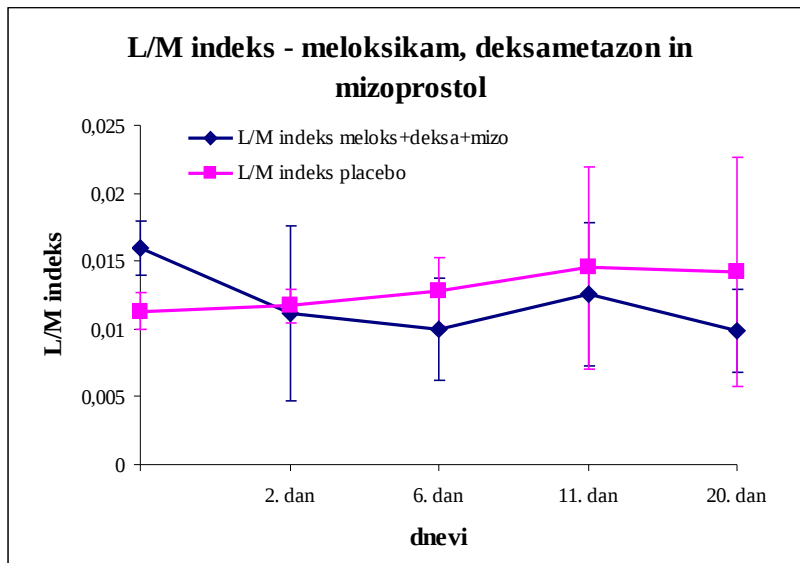
Pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, je bil L/M indeks večji drugi in šesti dan v primerjavi z L/M indeksom pri psih, ki so prejeli placebo, z največjo srednjo vrednostjo $0,020 \pm 0,006$ šesti dan, ko je bilo to povečanje tudi statistično značilno.



Graf 43: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M indeksa, izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

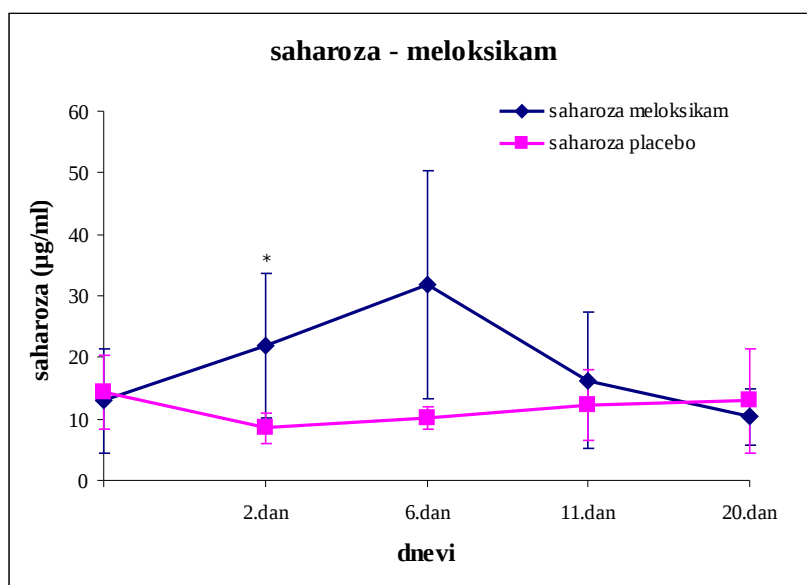
Pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, je bil L/M indeks nižji od L/M indeksa pri psih, ki so prejeli placebo vseh dni raziskave. L/M indeks se v tej fazi raziskave ni značilno razlikoval med skupinama.



Graf 44: Srednje vrednosti in standardni odkloni L/M indeksa, izračunanega iz koncentracije laktuloze in manitola v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

4.6 VPLIV MELOKSIKAMA, DEKSAMETAZONA IN MIZOPROSTOLA NA KONCENTRACIJO SAHAROZE V PLAZMI PSOV

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, smo ugotovili povišano koncentracijo saharoze v plazmi ves čas desetdnevnega dajanja zdravila v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo. Najvišjo srednjo vrednost ($31,9 \pm 18,57 \mu\text{g/L}$) smo pri psih, ki so prejeli meloksikam, ugotovili šesti dan. Dvajseti dan je bila koncentracija saharoze v plazmi pri psih, ki so dobivali meloksikam, nižja od koncentracije pri psih, ki so dobivali placebo. Statistično značilno povišanje koncentracije saharoze v plazmi smo pri psih, ki so prejeli meloksikam, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, ugotovili drugi dan.

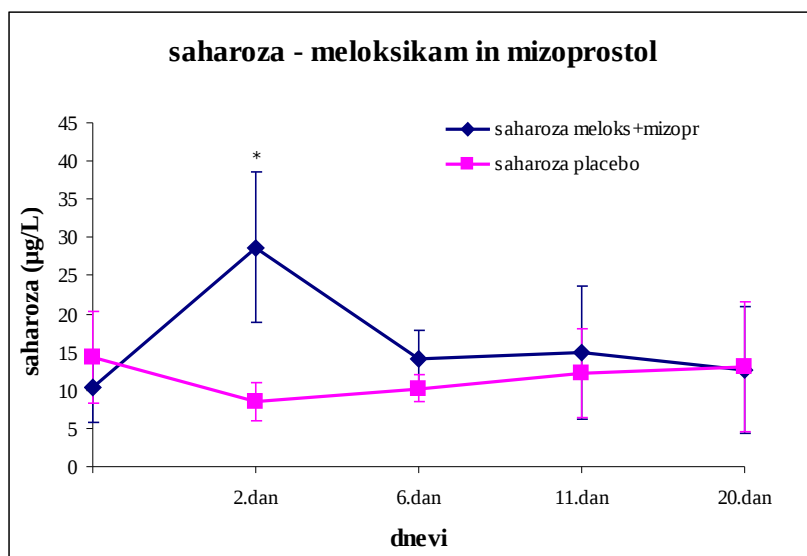


Graf 45: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, in pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, je bila od drugega do enajstega dne koncentracija saharoze v plazmi višja v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, z najvišjo srednjo vrednostjo $28,7 \pm 9,92 \mu\text{g/L}$ drugi dan poskusa. Že šesti dan se je koncentracija

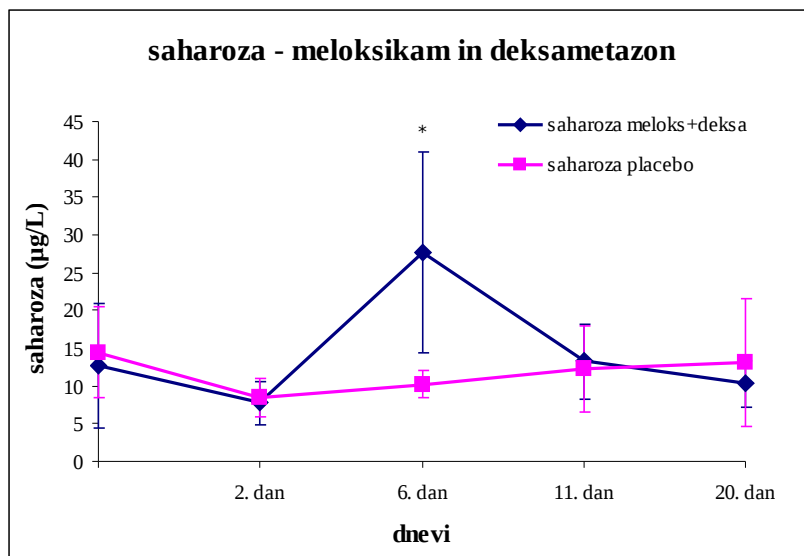
saharaze v plazmi močno znižala ($14 \pm 3,79 \mu\text{g/L}$) in se približala vrednostim, ki smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo, ($10,21 \pm 1,79 \mu\text{g/L}$) ter ostala blizu teh vrednosti do dvajsetega dne te faze. Statistično značilno povečanje koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, smo ugotovili drugi dan.



Graf 46: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

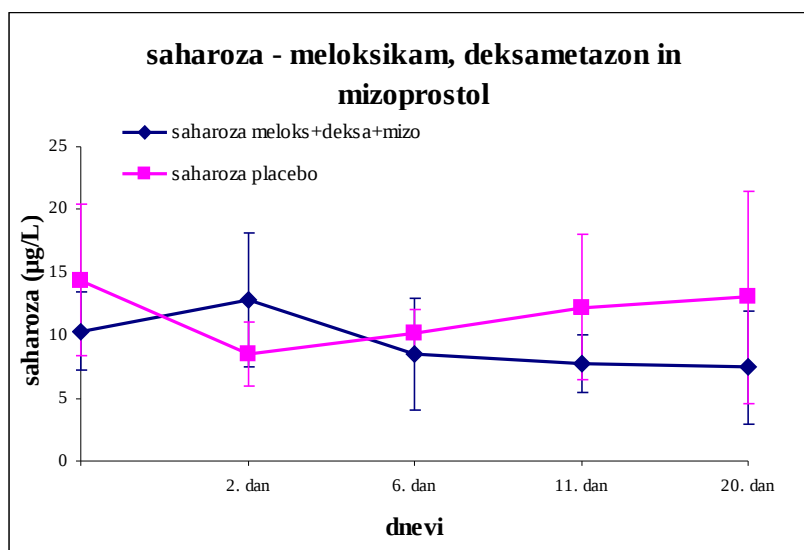
Pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, smo statistično značilno povečanje koncentracije saharoze v plazmi ugotovili šesti dan, s srednjo vrednostjo $27,66 \pm 13,36 \mu\text{g/L}$, v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, pri katerih je bila srednja vrednost $10,21 \pm 1,79 \mu\text{g/L}$. Koncentracija saharoze v plazmi se je nato znižala in se je enajsti dan te faze približala srednjim vrednostim, ki smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo.



Graf 47: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

* statistično značilna razlika med skupinama ($p < 0,05$)

Pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, je bila koncentracija saharoze v plazmi povišana drugi dan, s srednjo vrednostjo $12,81 \pm 5,33 \mu\text{g/L}$, v primerjavi s srednjo vrednostjo pri psih, ki so prejeli placebo, pri katerih je bila $8,5 \pm 2,56 \mu\text{g/L}$. V tej fazi raziskave nismo ugotovili statistično značilnih razlik v koncentraciji saharoze v plazmi med psi, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter psi, ki so prejeli placebo.



Graf 48: Srednje vrednosti in standardni odkloni koncentracije saharoze v plazmi pri psih, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, ter pri psih, ki so prejeli placebo.

5 RAZPRAVA

NSPZ poškodujejo želodčno in črevesno sluznico z neposrednim lokalnim delovanjem ter preko sistemskega zaviranja encimov ciklooksigenaz, s katerim preprečijo nastanek t. i. citoprotektivnih prostaglandinov iz arahidonske kisline (Bowersox in sod., 1996; Thjodleifsson in Bjarnason, 1999; Rich in Scheiman, 2000; Lichtenberger, 2001; Wallace in Ma, 2001; Tomlinson in Blikslager in sod., 2003; Lascelles in sod., 2005). V sluznici želodca in dvanajstnika najdemo velike koncentracije prostaglandinov iz skupin E, F in I. Ti prostanoidi imajo zelo pomembno funkcijo, saj uravnavajo prekrvavitev želodca, zavirajo izločanje želodčne kisline, spodbujajo obnovo epitelnih celic, spodbujajo izločanje želodčne sluzi z visoko vsebnostjo beljakovin, kar je vse pomembno pri vzdrževanju zdrave želodčne in črevesne sluznice (Miller, 1988; Vane, 1995; Neiger in sod., 2000). V naši raziskavi smo na osnovi prostaglandinov v serumu ugotavljali morebitne neželene učinke meloksikama in deksametazona ter njune kombinacije na želodčno sluznico ter citoprotektivno vlogo mizoprostola. Meloksikam je značilno znižal koncentracijo PGE₂ v serumu že drugi dan dajanja zdravila. Najnižjo vrednost smo izmerili šesti dan, ko je bila značilno nižja tudi koncentracija PGI₂. Po navedbah Buscha in sodelavcev (1998) naj bi po 3–5 odmerkih v 24-urnem intervalu dajanja meloksikam dosegel stabilno ravnovesje koncentracije v plazmi. Predvidevamo, da so se koncentracije PGE₂ in PGI₂ v serumu znižale zaradi sistemskega učinka meloksikama na sintezo prostaglandinov. V *in-vivo* raziskavah o sintezi prostanoidov pri psih so dokazali, da so bile koncentracije PGE₂ v bioptih želodčne sluznice nižje po zdravljenju z meloksikamom (Neiger, 2003). Prav tako so Jones in sodelavci (2002) dokazali, da je bila koncentracija PGE₂ v plazmi psov značilno nižja po sedmih in tudi po 21 dneh dajanja meloksikama. Deset dni po zadnjem odmerku meloksikama, dvajseti dan poskusa, so se koncentracije PGE₂ in PGI₂ v serumu v naši raziskavi približale vrednostim, ki smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo. Po tem lahko sklepamo, da so

sistemski učinki meloksikama na sintezo prostaglandinov kratkotrajni in s prenehanjem njegove uporabe v roku desetih dni izzvenijo. Naši rezultati se ujemajo z dognanji iz podobnih raziskav, v katerih so ugotavljali koncentracijo prostaglandinov po zdravljenju s selektivnimi zaviralci COX-2 (Knapp in sod., 1994; Brideau in sod., 1996; Tanaka in sod., 2002; Sessions in sod., 2005; Brainard in sod., 2007), in potrjujejo domnevo, da NSPZ zavirajo sintezo t. i. »citoprotektivnih« prostaglandinov.

Neželeni učinki zdravljenja z meloksikamom pri psih se lahko kažejo z minimalnimi prodromalnimi znaki, ki jih lastniki zlahka spregledajo (Meddings in sod., 1995; Forsyth in sod., 1998). Najpogostejši neželeni učinki pri zdravljenju z meloksikamom, ki včasih omejujejo njegovo uporabo pri psih, so nelagoden občutek v trebuhu, driska in bruhanje. Pojavljali naj bi se le občasno, bili prehodnega značaja in naj bi minili brez zdravljenja v nekaj dneh (Vane, 1971; Noble in Balfour, 1996; Poulsen in Horstermann, 1999; Buttgerit in sod., 2001; Neiger, 2003). Po navedbah kliničnih študij meloksikam v primerjavi z drugimi NSPZ, uporabljenimi pri psih (karprofen, etodolak, derakoksib, tepoksalin in firokoksib), najpogosteje povzroča bruhanje in drisko. Razjede na želodcu, ki nastanejo predvsem v območju antruma pilorusa, imajo v primeru prepoznega zdravljenja slabo prognozo (Fox, 2010c). Tudi uporaba mizoprostola pri psih lahko povzroči bruhanje in prehodno drisko, ki izzveni brez zdravljenja v nekaj dneh (Bauer, 1985; Graham in sod., 1988; Walt in sod., 1992; Murtaugh in sod., 1993; Ward in sod., 2003). Blago drisko smo pri nekaterih psih opazili v drugi fazi raziskave, ko so psi prejeli meloksikam – največ šesti dan, ko je meloksikam tudi dosegel dinamično ravnovesje v plazmi (Busch, 1998). Nekateri psi, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, so imeli občasno blago drisko od drugega in šestega dne. Driska in bruhanje sta bila prehodne narave pri vseh psih, apetit je ostal nespremenjen in zdravljenje ni bilo potrebno. Hipertonična sladkorna raztopina, ki smo jo uporabili za trojni sladkorni test za ugotavljanje prepustnosti želodčne in črevesne bariere,

po nekaterih navedbah tudi lahko povzroči osmotsko drisko, napet abdomen in flatulenco (Hamilton in sod., 1982; Uil in sod., 1997; Uil in sod., 2000; Steiner in sod., 2002), kar smo opazili v vseh petih fazah raziskave pri nekaterih psih kmalu po zaužitju sladkorne raztopine. Ne moremo z gotovostjo trditi, da so opažene prebavne motnje v naši raziskavi posledica preiskovanih zdravil. Deloma lahko driske na dan jemanja vzorcev pripišemo zaužitju hipertonične raztopine sladkorjev, saj smo mehkejše blato opazili tudi pri kontrolni skupini po zaužitju sladkornih raztopin.

V študiji Bostona in sodelavcev (2003) so z endoskopijo potrdili, da sočasna uporaba meloksikama in deksametazona veliko pogosteje povzroča razjede na prebavilih pri zdravih psih kot vsako zdravilo posebej, zato odsvetujejo uporabo te kombinacije zdravil pri živalih z obolenji prebavil. Podobnih študij pri psih, v katerih bi merili tudi prostaglandine v serumu, nismo zasledili. Mehanizem delovanja kortikosteroidov, s katerim prizadenejo proliferacijo želodčnih celic, še ni popolnoma znan, vendar lahko tudi pri samostojni uporabi povzročijo razjede in perforacije želodčne sluznice. Vnetje želodčne sluznice naj bi nastalo zaradi zmanjšane nastajanja želodčne sluzi ter spremembe v njeni sestavi, povečanega nastajanja želodčne kisline in zaradi počasnejše regeneracije celic sluznice (Menguy in Masters, 1963; Neiger in sod., 2000; Boston in sod., 2003). Kortikosteroidi preko lipokortina-1 (neksina-1) zavirajo delovanja fosfolipaze A, ki sprošča arahidonsko kislino, ki je substrat za sintezo prostaglandinov. Dodatno zmanjšajo tudi ekspresijo gena za COX-2. Posledica obeh učinkov je zmanjšano nastajanje prostaglandinov (Carpani de Kaski, 1995; Neiger in sod., 2000; Boston in sod., 2003). V naši raziskavi razlike so se vrednosti PGE₂ in PGI₂ v četrti fazi (meloksikam in deksametazon) znižale v primerjavi s prvo fazo (placebo). Meloksikam v kombinaciji z deksametazonom je značilno zmanjšal koncentracijo PGE₂ v serumu drugi, šesti in enajsti dan, enako kot sam meloksikam. Potenciranje neželenih učinkov tako nismo dokazali z določanjem koncentracije PGE₂ in PGI₂ v serumu.

Nastanek in delovanje prostaglandinov sta tkivno specifična, zato merjenje prostaglandinov v serumu morda ne odraža nastanka prostaglandinov v želodčni sluznici, temveč odraža le vpliv zdravil na skupni nastanek prostanoidov v telesu (Fox, 2010a). Z merjenjem PGE₂ in PGI₂ v biopsih sluznice prebavil (Takeuchi in sod., 2001; Tanaka in sod., 2001; Neiger, 2003; Sessions in sod., 2005) bi rezultate lahko dopolnili, saj je sluznica prebavil mesto, kjer so ti prostaglandini prisotni. Kortikosteroidi zavirajo arahidonsko kislino v višjem nivoju kaskadne reakcije kot NSPZ ter potencirajo neželene učinke na prebavila, zato se njihova sočasna uporaba odsvetuje (Lascelles in sod., 2005; Boston in sod., 2003). V naši raziskavi se je to klinično pokazalo pri sočasni uporabi meloksikama in deksametazona. Prve tri dni, ko so psi poleg meloksikama prejeli tudi deksametazon, so bili potrjeni. Nekateri so imeli občutljiv in napet trebuh, apetit pa je ostal nespremenjen. Več psov je imelo drisko, ki se je tretji dan poskusa poslabšala, in na blatu smo opazili sledove sveže krvi. Do sedmega dne so imeli vsi psi normalno blato in zdravljenje ni bilo potrebno. Po navedbah Lascellesa in sodelavcev (2005) naj bi se razjede in perforacije na prebavilih pri uporabi selektivnega zaviralca COX-2 pojavile predvsem zaradi drugih dejavnikov, npr. predoziranje, sočasna uporaba kortikosteroidov ali prehitra menjava različnih NSPZ.

Dodatek mizoprostola meloksikamu ali meloksikamu in deksametazonu naj bi omilil neželene učinke NSPZ samega in v kombinaciji s kortikosteroidom na sluznico prebavil, saj mizoprostol ohranja bariero želodčne sluznice, spodbuja izločanje sluzi in bikarbonatov ter spodbuja prekrvavitev želodčne sluznice in mehanizme njene obrambe (Bauer, 1985; Ward in sod., 2003; Plumb, 2008b; Plumb, 2008c). Dokazano zmanjšuje nastanek razjed na sluznici prebavil pri ljudeh, ki uživajo NSPZ (Wilson in sod., 1987; Bjarnason in sod., 1989; Dejani in sod., 1989; Walt, 1992; Johnston in sod., 1995; Steinmeyer, 2000; Buttgerit in sod., 2001). Priporočajo ga za zaščito želodčne sluznice pri psih, ki prejemajo NSPZ (Murtaugh in sod., 1993; Johnston in sod., 1995; Rohrer in sod., 1999; Ward in sod., 2003).

Carpani de Kaski in sodelavci (1995) so potrdili pozitivni učinek eksogenega PGE₁ na celjenje eksperimentalno povzročenih razjed. Mizoprostol zmanjša izločanje želodčne kisline in izniči antiprostaglandinski vpliv, ki ga imajo druga zdravila na sluznico prebavil ter tako deluje citoprotektivno (Miller, 1988; Johnston in sod., 1995; Bowersox in sod., 1996; Neiger in sod., 2000; Ward in sod., 2003). V celicah želodčne sluznice podgan, predvsem na robovih eksperimentalno povzročenih razjed, mizoprostol spodbuja ekspresijo COX-2 in s tem nastanek PGE₂, ki pripomore k celjenju že nastalih razjed (Poonam in sod., 2005). Prav tako je mizoprostol povečal vsebnost proteina COX-2 in posledično povečal sintezo endogenih PGE₂ v levkocitih v vnetnem eksudatu pri podganah (Buluc in sod., 2002). Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, so srednje vrednosti PGE₂ ostale nižje v primerjavi s placebo (značilno nižje enajsti dan). Domnevamo, da je to povzročila uporaba mizoprostola. Srednja vrednost koncentracije PGI₂ se je znižala značilno drugi, šesti in enajsti dan. Razlage v literaturi nismo našli, saj viri ne navajajo specifičnega vpliva mizoprostola na PGI₂. Pričakovali smo, da bodo tudi srednje vrednosti koncentracije PGI₂ ostale višje pri sočasni uporabi meloksikama in mizoprostola, saj PGI₂ in PGE₂ nastaneta iz istega substrata, PGH₂ (slika 2). Podobnih študij, v katerih bi z merjenjem prostaglandinov v krvi testirali učinek mizoprostola pri uporabi meloksikama pri psih, v literaturi nismo našli.

Po navedbah Rohrerja in sodelavcev (1999) mizoprostol ni preprečil želodčnih razjed in krvavitev, povzročenih z visokimi odmerki metilprednizolona. V našem primeru se je koncentracije PGE₂ in PGI₂ v serumu značilno znižala enajsti dan pri psih, ki so dobivali meloksikam, deksametazon in mizoprostol. Blage driske in slabše počutje smo opazili do sedmega dne. Glede na rezultate in klinično sliko lahko ugotovimo, da sta se PGE₂ in PGI₂ kljub uporabi mizoprostola značilno znižala in mizoprostol neželenih stranskih učinkov kombinacije meloksikama in deksametazona ni povsem preprečil.

Z merjenjem TXB₂ po nastanku krvnega strdka ugotavljamo aktivnost trombocitne COX-1, saj le-ta encim povzroči nastanek TXA₂ v trombocitih, ki se hitro pretvori v stabilno obliko TXB₂ (De Meijer in sod., 1999). Pogosto z njim ugotavljamo tudi zaviralni učinek NSPZ na trombocitno ciklooksigenazo pri ljudeh in živalih (McKellar in sod., 1990; Brideau in sod., 1996; Streppa in sod., 2002; Gilmer in sod., 2003; Sessions in sod., 2004). V naši raziskavi smo merili serumski TXB₂, da bi ugotovili zaviralni učinek meloksikama, deksametazona in mizoprostola na trombocitno COX-1. Po navedbah Jonesa in sodelavcev (2002) meloksikam ne vpliva pomembno na koncentracijo TXB₂ pri sedem- in enaindvajsetdnevem dajanju, zato naj bi ohranil aktivnost COX-1. V naši raziskavi so bile srednje vrednosti koncentracije TXB₂ v serumu psov, ki so prejeli meloksikam, ves čas nižje v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, vendar značilnih razlik nismo ugotovili. Več avtorjev navaja, da prihaja do velikih razlik v presnovi arahidonske kisline v trombocitih med posameznimi živalskimi vrstami ter do intra-individualnih razlik, saj je količina nastalega TXA₂ odvisna od dražljaja, ki je povzročil agregacijo trombocitov (McKellar in sod., 1990; Yamanaka in sod., 1993; Gilmer in sod., 2003). V naši raziskavi smo ugotovili velike standardne odklone pri vseh skupinah, s čimer si lahko razlagamo dejstvo, da nismo ugotovili značilnih razlik med skupinami. Pričakovali smo, da bo meloksikam znižal koncentracijo TXB₂, vendar ne bistveno v primerjavi s skupino, ki je dobivala placebo, zaradi visoke selektivnosti za COX-2 (Mathews in sod., 2001; Van Kraaij in sod., 2002; Fresno in sod., 2005). Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, je bila koncentracija TXB₂ nižja v primerjavi s placebom. V *in-vitro* ter *in-vivo* študijah je mizoprostol znižal koncentracijo TXB₂ (Widomski in sod., 1991; Mertz-Nielsen in sod., 1995), zato predvidevamo, da so naši rezultati v skladu z omenjenimi študijami ter ponovno brez statistične značilnosti zaradi majhnega števila vzorcev in velikih individualnih razlik (Gilmer in sod., 2003).

Literatura navaja, da pri Kronovi bolezni in kolitisu prekomerno nastajajo tromboksani, ki so vazokonstriktorji, kar poslabša perfuzijo sluznice in privede do bolezni (Vilaseca in sod., 1990; Garrelds in sod., 1999; Wang in sod., 2003). Zdravljenje s prednizolonom zmanjša poškodbe sluznice in sintezo tromboksana (Vilaseca in sod., 1990). Takahashi in sodelavci (1999) so ugotovili, da se sinteza TXA₂ izrazito poveča v ulceriranem tkivu želodca ter da zaviralci tromboksan sintaze zelo pospešijo celjenje želodčne razjede s spodbujanjem regeneracije sluznice. Z *in-vitro* ter *in-vivo* študijami so dokazali, da kortikosteroidi zmanjšajo nastanek TXB₂ v številnih tkivih in celicah. Povečajo število cirkulirajočih trombocitov, vendar zmanjšajo njihovo agregacijo (Kirk in sod., 1994; Siler-Khodr in sod., 1997; Garrelds in sod., 1999; Wang in sod., 2003; Plumb, 2008b). Nasprotno pa v naši raziskavi nismo v primerjavi s skupino, ki je dobivala placebo, ugotovili značilnega znižanja koncentracije TXB₂ pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon. Prav tako ni bilo nobene razlike med placebo in drugimi fazami raziskave. Naši rezultati niso v skladu s podatki iz literature. Razloge za to lahko iščemo v različnih metodah in pripravi vzorcev (Jerin in sod., 2008).

Zaviranje aktivnosti COX-1 zaradi delovanja NSPZ ni edini razlog za nastanek poškodb na prebavilih. Zmanjšana aktivnost ciklooksigenaze lahko privede do povečane sinteze levkotrienov po poti 5-LOX. Med zdravljenjem z NSPZ se nevtrofilni levkociti aktivirajo in migrirajo v prebavila. Ugotovili so, da pride do povečane sinteze LTB₄ v želodčni sluznici (Ford-Hutchinson, 1980; Asako in sod., 1992; Hudson in sod., 1993; Yamagiwa 2001; Wallace in Ma, 2001). Povišane koncentracije levkotrienov, tudi LTB₄, zaradi močnega kemotaktičnega vpliva na levkocite in vazokonstrikcije prizadenejo mikrocirkulacijo želodčne sluznice. Ohromljena mikrocirkulacija privede do nastanka poškodb na sluznici po uporabi NSPZ (Ford-Hutchinson in sod., 1980; Hudson in sod., 1993; Rainsford, 1993).

Agnello in sodelavci (2005) pri uporabi meloksikama niso ugotovili povišanih vrednosti LTB₄ v želodčni sluznici in ne v levkocitih, stimuliranih s kalcijevim ionoforom. Enako so Punke in sodelavci (2008) ugotovili, da nobeden od treh preiskovanih NSPZ (firokoksib, meloksikam in tepoksalin) ni vplival na sintezo LTB₄ v želodčni in duodenalni sluznici. Prav tako meloksikam ni povišal koncentracije LTB₄ pri poskusih na miših (Engelhardt in sod., 1996b). Povečano sintezo LTB₄ v želodčni sluznici so dokumentirali pri ljudeh, ki so dolgotrajno jemali NSPZ (Hudson in sod., 1993). Natančni mehanizmi teh ugotovitev niso znani, hipotetično naj bi meloksikam ohranil aktivnost COX-1 in tako naj bi bila presnova arahidonske kisline po poti COX-1 še vedno prisotna. Zato se manj arahidonske kisline prenese v cikel presnovne poti lipooksigenaze ter tako ni presežka produktov, ki nastanejo po poti 5-LOX, torej levkotrienov (Hudson in sod., 1993; Agnello in sod., 2005). V naši raziskavi smo v primerjavi z drugimi merili LTB₄ v serumu. Pričakovali smo, da bo v drugi (meloksikam), četrti (meloksikam in deksametazon) ter peti fazi raziskave (meloksikam, mizoprostol in deksametazon) prišlo do povečanja koncentracije LTB₄ v serumu zaradi močnega zaviranja COX-1 (predvsem v fazah, ko smo dodali deksametazon) in posledično do povečane sinteze levkotrienov po ciklooksigenazni poti. Šesti dan druge faze smo pri psih, ki so prejeli meloksikam, ugotovili rahlo povišane koncentracije LTB₄ v serumu v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, vendar to povišanje ni bilo značilno. V vseh ostalih fazah naše raziskave se LTB₄ ni povišal. Povečanja koncentracije LTB₄ v serumu zaradi zdravljenja z meloksikamom, deksametazonom in mizoprostolom s to raziskavo nismo dokazali. Glede na navedbe iz literature (Asako in sod., 1992; Hudson in sod., 1993; Yamagiwa, 2001; Wallace in Ma, 2001), v kateri so v raziskavah LTB₄ merili v sluznici želodca in duodenuma in ne v serumu kot v naši raziskavi, lahko predvidevamo, da bi z opisanimi meritvami povečano sintezo LTB₄ v prebavilih kot posledico uporabe omenjenih zdravil v morebitnih nadaljnjih študijah lahko dokazali.

Povečana prepustnost sluznice prebavil je eden od prvih znakov poškodbe sluznice, tudi ob odsotnosti makroskopskih poškodb sluznice prebavil. NSPZ poškodujejo sluznico prebavil in povečajo prepustnost sluznice želodca in dvanajstnika ter sluznice črevesja (Bjarnason in sod., 1986; Jacobson, 1992; Meddings in sod., 1993; Craven in sod., 2007; Bjarnason in Takeuchi, 2009). Fokalne prekinitve sluznične bariere lahko privedejo do vdiranja potencialno škodljivih spojin, kot so antigeni, proteaze, vodikovi ioni, bakterije in drugi dejavniki, ki na principu pozitivne kemotakse spodbujajo zbiranje vnetnih celic (Craven in sod., 2007). Trojni sladkorni test, ki ga sestavljajo saharoza, laktuloza in manitol in se uporablja za ugotavljanje želodčne in črevesne prepustnosti, za uporabo v veterini ni standardiziran in o njem tudi ni podatkov v literaturi. Test omogoča, da na neinvaziven način ugotovimo spremembe na sluznici želodca, dvanajstnika in tankega črevesja, ki nastanejo zaradi uporabe NSPZ (Meddings in sod., 1993; Vogelsang in sod., 1996; Uil in sod., 1997; Uil in sod., 2000; Smecuol in sod., 2001; Craven in sod., 2007). V naši raziskavi smo uporabili trojni sladkorni test, da bi z enim testom na neinvaziven način ugotovili spremembe v želodčni in črevesni prepustnosti zaradi uporabe meloksikama, deksametazona in mizoprostola pri psih.

Merjenje želodčne prepustnosti je preprosto zaradi dejstva, da je saharoza edinstveni označevalec za določanje prepustnosti želodca in dvanajstnika, saj jo prebavni procesi razgradijo, ko prispe v tanko črevo. Test s saharozo ne zazna obsežnih sprememb na sluznici tankega črevesja, če so le-te za dvanajstnikom (Meddings in sod., 1993; Meddings, 1995; Smecuol, 2001; Davies, 2006). Meddings in sodelavci (1993) so ugotovili, da povečana prepustnost za saharozo pomeni generalizirano poškodbo sluznice in ne le endoskopsko zaznavne ulceracije, saj so poškodbe epitelija, gledane s strani molekule, velike kot disaharid, v primerjavi s tistimi, ki jih lahko zaznamo z endoskopom, precej različne. Endoskopsko zaznavne razjede so pogosto povezane z obsežnimi spremembami v

želodčnem epiteliju. Pri psih, ki so prejeli meloksikam, smo ugotovili značilno povečanje koncentracije saharoze v plazmi že drugi dan desetdnevnega dajanja zdravila. Najvišjo srednjo vrednost je koncentracija saharoze dosegla šesti dan, vendar povečanje ni bilo značilno (velik standardni odklon). Pri ljudeh je meloksikam pomembno povečal prepustnost želodčne in duodenalne sluznice že po dveh dneh dajanja (Smecuol in sod., 2001). Med drugim in šestim dnem meritev nismo izvajali, zato podatkov za to obdobje nimamo in ne moremo ugotoviti, kdaj točno je v našem poskusu meloksikam najbolj vplival na povečano prehajanje saharoze. Šesti dan smo pri psih, ki so dobivali meloksikam, ugotovili tudi značilne razlike v koncentraciji PGE₂ in PGI₂ v primerjavi s kontrolno skupino, tako da sklepamo, da bi bil lahko pri tem odvzemu učinek meloksikama kar največji, kot navajajo tudi Busch in sodelavci (1998). Koncentracija saharoze v plazmi pri psih v naši raziskavi se je po prenehanju dajanja meloksikama znižala do podobnih koncentracij, kot smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo. Glede na rezultate teh meritev bi lahko ugotovili, da meloksikam prehodno poveča prepustnost želodčne sluznice in da po prekinitvi dajanja njegov učinek izzveni ter deset dni pozneje ne pusti takšnih sprememb na želodčni sluznici, ki bi jih test s saharozo zaznal. Meddings in sodelavci (1995) so ugotovili, da se je prepustnost za saharozo zmanjšala hitreje, kot so izginile vidne razjede na želodčni sluznici pri psih, zaradi česar sklepajo, da ima takšen test večjo občutljivost pri generalizirani poškodbi sluznice kot pri posameznih endoskopsko zaznavnih razjedah. V naši raziskavi endoskopije nismo opravili. Ti podatki bi pripomogli k celostni podobi obsega in stopnje poškodb na želodčni sluznici po uporabi meloksikama, deksametazona in mizoprostola ter omogočili primerljivost s podobnimi študijami (Meddings, 1993; Meddings 1995; Davis, 2000; Smecuol, 2001).

NSPZ zavirajo proces proliferacije epitelnih celic, ki vodi k ozdravitvi želodčnih razjed. Pri eksperimentalnih živalih je sočasna uporaba analoga PGI₁ povzročila, da so se

eksperimentalno povzročene razjede hitro celile in da je bila proliferacija celic v želodčnih kriptah ob robovih razjed spet normalna (Levi in sod., 1990; Carpani de Kaski in sod., 1995). Pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, smo značilno povečanje koncentracije saharoze v plazmi ugotovili drugi dan v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo; enako kot pri psih, ki so prejeli le meloksikam. Vendar se je pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, srednja vrednost koncentracije saharoze v plazmi znižala na podobne vrednosti, kot smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo, že šesti dan in je v teh mejah tudi ostala do konca tretje faze. Po tem sklepamo, da je bila v našem primeru souporaba mizoprostola pri zdravljenju z meloksikamom uspešna, saj se je vpliv meloksikama na povečanje prepustnosti želodčne sluznice zmanjšal. V podobnih študijah so dokazali, da je bil mizoprostol uspešen pri zdravljenju želodčnih razjed pri ljudeh, ki so jemali NSPZ (Wilson in sod., 1987; Bjarnason in sod., 1989; Dejani in sod., 1989; Levi in sod., 1990; Walt, 1992; Carpani de Kaski in sod., 1995; Johnson in sod., 1995; Buttgerit in sod., 2001; Park in sod., 2007). Prav tako naj bi bil mizoprostol učinkovit pri preprečevanju nastanka krvavitev in razjed želodčne sluznice pri psih, zdravljenih z NSPZ (Murtraugh, 1993; Bowersox in sod., 1996; Neiger, 2003; Ward in sod., 2003), vendar v teh študijah ugotovitev niso podprli z uporabo testa s saharozo, zato primerljivost ni mogoča. Craven in sodelavci (2007) so ugotovili, da standardni odmerki meloksikama in karprofena niso značilno vplivali na spremembe v želodčni in črevesni prepustnosti in niso spremenili absorptivne kapacitete pri psih. Pri psih, ki so prejeli karprofen, so med prvim in tretjim dnevom ugotovili celo zmanjšano želodčno prepustnost, kar so pripisali povečani debelini in viskoznosti površinskega mukoznega sloja, spremenjeni prekrvavitvi sluznice, zatekanju celic in s tem manjšanju odprt in redukciji že obstoječih lezij zaradi protivnetnega vpliva zdravila na subklinični gastritis.

Pri psih v naši raziskavi, ki so prejeli meloksikam, deksametazon in mizoprostol, je koncentracija saharoze dosegla podobne srednje vrednosti, kot smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo že šesti dan poskusa, in je v istih mejah ostala do konca poskusa. Tudi v tem primeru bi si to lahko pojasnili z močnim protivnetnim učinkom kombinacije omenjenih zdravil na sluznico. Primerljivih študij na psih nismo našli.

Povečana prepustnost sluznice prebavil je prvi pokazatelj poškodbe sluznice, tudi zaradi delovanja NSPZ (Craven in sod., 2007). V primeru normalnega oz. nepatološkega stanja tankega črevesja je prepustnost za večje molekule sladkorjev (disaharide, kot je laktuloza) veliko manjša v primerjavi s prepustnostjo za majhne molekule sladkorjev (monosaharide, kot je manitol), kar pomeni, da je razmerje disaharidov proti monosaharidom majhno. V patoloških pogojih se prepustnost za velike molekule sladkorjev poveča, medtem ko prepustnost za majhne molekule sladkorjev ostane enaka in se ne zmanjša. To pomeni, da se poveča razmerje disaharidov proti monosaharidom. Ta fenomen lahko uporabimo za razločevanje nepatoloških in patoloških pogojev, posebno pri številnih obolenjih prebavil, pri katerih je motena funkcionalna integriteta črevesja (Van Elburg in sod., 1995; Travis in Menzies, 1992). Z računanjem razmerja laktuloza/manitol ali indeksa L/M lahko bolje ločimo med kontrolami in pacienti s črevesnim obolenjem v primerjavi z individualnim merjenjem teh sladkorjev po zaužitju. Občutljivost testa je večja, saj ne ugotavlja sprememb v prepustnosti črevesja le zaradi večjega prehajanja laktuloze in odprtja intercelularnih poti, temveč tudi zaradi zmanjšane absorpcije monosaharida manitola in zmanjšane absorpcijske površine (Sorensen in sod., 1997). L/M indeks se poveča pri ljudeh s poškodbami črevesne sluznice (Menzies, 1984; Sorensen in sod., 1997; Van der Hulst in sod., 1998; Johnston in sod., 2000; Dastyh in sod., 2008; Kerckhoffs in sod., 2009). V naši raziskavi je bil L/M indeks neznačilno povečan ves čas desetdnevnega dajanja meloksikama. Prepustnost črevesne sluznice se je šesti dan povečala zaradi povečanega prehajanja disaharida

laktuloze, kar je privedlo do povečanega razmerja med laktulozo in manitolom. Enajsti dan se je L/M indeks povečal zaradi zmanjšane absorpcije manitola. Po zadnjem odmerku zdravila se je indeks L/M začel nižati in je dvajseti dan dosegel enake vrednosti, kot smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo. Uporaba meloksikama naj torej ne bi pustila poškodb na sluznici črevesja deset dni po koncu zdravljenja. Pozitiven učinek sočasne uporabe meloksikama in mizoprostola na črevesno sluznico lahko potrdimo z rezultati, ki smo jih dobili pri psih, ki so prejeli meloksikam in mizoprostol, saj je L/M indeks dosegel enake vrednosti kot skupina, ki je dobivala placebo, že šesti dan jemanja zdravil.

Piper in sodelavci (1991) so s študijo pri ljudeh ugotovili, da sočasna uporaba NSPZ in kortikosteroidov poveča tveganje za nastanek želodčnih razjed za petnajstkrat v primerjavi z rezultati pri tistih bolnikih, ki niso prejeli nobenih zdravil. Sočasna uporaba NSPZ in velikih odmerkov kortikosteroidov pri zdravljenju poškodb hrbtnjače povzroči nastanek želodčnih razjed in v skrajnem primeru perforacije želodčne stene (Toombs in sod., 1986; Piper in sod., 1991; Neiger in sod., 2000; Boston in sod., 2003). Boston in sodelavci (2003) so z endoskopijo ugotovili, da so poškodbe, ki so nastale zaradi kratkotrajne sočasne uporabe majhnih odmerkov deksametazona in meloksikama, na želodčni sluznici blage. Samostojna uporaba deksametazona je na želodčni sluznici povzročila značilno večje spremembe, ugotovljene z endoskopom, kot samostojna uporaba meloksikama, ki je povzročil spremembe, podobne tistim, ugotovljenim pri skupini psov, ki je prejela le 0,9-odstotno raztopino natrijevega klorida. Kiziltas in sodelavci (1998) so ugotovili, da kortikosteroidi spremenijo prepustnost sluznice želodca in dvanajstnika pri bolnikih z boleznimi, ki naj po znanih podatkih na prepustnost sluznice ne bi vplivale. Ugotovitve so podobne tistim iz starejših raziskav (Toombs in sod., 1986; Dow in sod., 1990; Piper in sod., 1991). Pri psih v naši raziskavi, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, smo pomembno povečanje saharoze v plazmi ugotovili šele šesti dan dajanja zdravil, vendar brez

statistične značilnosti. V primerjavi s psi, ki so dobivali le meloksikam, je bila srednja vrednost koncentracije saharoze v plazmi psov, ki so dobivali meloksikam in deksametazon, šesti dan dajanja zdravil celo nižja. Prav tako se je enajsti dan koncentracija saharoze pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, približala vrednostim, ki smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo, in ostala v teh mejah do konca faze. Ti rezultati niso v skladu z našimi pričakovanji, saj smo pričakovali, da bo kombinacija meloksikama in deksametazona povzročila hujše poškodbe sluznice kot samostojna uporaba meloksikama. Do povečanega prehajanja saharoze naj bi prišlo že drugi dan dajanja zdravil. Razlog, da ni bilo tako, bi lahko iskali v prehodnih prebavnih težavah – torej v pospešeni peristaltiki po dajanju te kombinacije zdravil –, ki so se pojavile ta dan (Graham in Leib, 2009), zaradi česar bi se v časovni enoti resorbiralo manj saharoze. Tudi hipertonična raztopina sladkorjev lahko prehodno zmanjša prepustnost sluznice (Davies, 1998). Deksametazon povzroči proliferacijo parietalnih celic želodca, kar bi lahko vplivalo na zmanjšano resorbcijo saharoze (Reid in sod., 1961; Goksen in Hardy, 1967; Hanson in sod., 1997). Sodeč po naših rezultatih, sočasna uporaba meloksikama in deksametazona ni bistveno bolj vplivala na prepustnost želodčne sluznice kot uporaba samega meloksikama. Tudi te ugotovitve bi lahko podprli in primerjali s podobnimi študijami, če bi psom sočasno s testi prepustnosti naredili tudi endoskopsko in histopatološko preiskavo prebavil. Tako bi ugotovili, ali je kombinacija zdravil povzročila le posamezne manjše razjede ali so poškodbe generalizirane in obsegajo večje predele sluznice. V primeru generaliziranih poškodb bi po ugotovitvah Meddingsa in sodelavcev (1993) morali dognati povečano prepustnost sluznice prebavil. Glede na rezultate, ki smo jih za L/M indeks dobili pri psih, ki so prejeli meloksikam in deksametazon, lahko predvidevamo, da ta kombinacija zdravil prehodno poveča prepustnost črevesne sluznice (značilno šesti dan dajanja zdravil), saj se je L/M indeks še pred koncem zdravljenja zmanjšal in dan po zadnjem odmerku zdravil dosegel nižje vrednosti kot pri skupini, ki je dobivala placebo (razlika ni bila značilna). Predvidevamo, da večjih poškodb

sluznice po prenehanju zdravljenja ni bilo, kar bi dodatno lahko podprli z endoskopsko preiskavo prebavil.

Trojni sladkorni test se v naši raziskavi ni najbolje obnesel, saj na osnovi dobljenih rezultatov težko ugotovimo, koliko so prebavne motnje na dan aplikacije testne raztopine spremenile prepustnost in koliko so jo spremenila preiskovana zdravila. Potrebne bi bile študije z različnimi količinami testne raztopine in standardizacijo metode, da bi bil trojni sladkorni test s saharozo, laktulozo in manitolom uporaben za zgodnje odkrivanje poškodb želodčne in črevesne sluznice zaradi uporabe NSPZ in kortikosteroidov pri psih v klinični praksi.

6 SKLEPI

1. Desetdnevno dajanje meloksikama samega ali v kombinaciji z deksametazonom prehodno zniža koncentracijo PGE₂ v serumu psov.
2. Desetdnevno dajanje meloksikama prehodno zniža (značilno le šesti dan dajanja) koncentracijo PGI₂ v serumu psov.
3. Desetdnevno dajanje meloksikama, kombinacije meloksikama in deksametazona ter kombinacije meloksikama, deksametazona in mizoprostola ne povzroči značilnega povišanja LTB₄ v serumu psov.
4. Desetdnevno dajanje meloksikama, kombinacije meloksikama in deksametazona ter kombinacije meloksikama, deksametazona in mizoprostola ne povzroči značilnega znižanja serumske koncentracije TXB₂ pri psih.
5. Desetdnevno dajanje meloksikama psom poveča prepustnost želodčne sluznice, saj se značilno poveča koncentracija saharoze v plazmi.
6. Kljub sočasni uporabi mizoprostola in meloksikama se na začetku zdravljenja (drugi dan) prepustnost želodčne sluznice značilno poveča, nato pa se pokaže zaščitni učinek mizoprostola in koncentracija saharoze kot indikatorja prepustnosti želodčne sluznice se že šesti dan dajanja vrne na začetno raven.

7. Desetdnevno dajanje meloksikama psom poškoduje črevesno sluznico, kar dokazuje povečanje indeksa L/M.

8. Mizoprostol omeji ali celo prepreči poškodbo črevesne sluznice pri psih, zdravljenih z meloksikamom, saj se pri sočasni uporabi obeh zdravil L/M indeks ne poveča.

7 POVZETEK

Veterinarji se pri kliničnem delu včasih znajdemo pred dilemo, ali je psom varno aplicirati NSPZ in kortikosteroid istočasno, saj literatura in navodila proizvajalcev to odsvetujejo zaradi potenciranja neželenih učinkov na prebavila. Kljub temu bi pri določenih stanjih potrebovali terapevtske učinke obeh zdravil. V raziskavi smo poskusili raziskati sistemske in lokalne neželene učinke meloksikama; sistemske preko vpliva na presnovo arahidonske kisline in posledično sprememb v tvorbi PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄, lokalne pa predvsem z ugotavljanjem sprememb v prepustnosti sluznice prebavil. Istočasno nas je zanimalo, ali bi neželene učinke zdravil lahko preprečili oz. omilili s sočasno uporabo mizoprostola. Zanimala nas je tudi uporabnost trojnega sladkornega testa za zgodnje odkrivanje sprememb, ki nastanejo na sluznici prebavil zaradi uporabe NSPZ in kortikosteroidov.

Raziskavo smo opravili na sedmih odraslih psih pasme beagle in jo razdelili v pet faz, ki so trajale dvajset dni. Prvih deset dni smo psom dajali določeno kombinacijo zdravil (placebo; meloksikam; meloksikam in mizoprostol; meloksikam in deksametazon (prve tri dni); meloksikam in mizoprostol; meloksikam, deksametazon (prve tri dni) in mizoprostol), nato deset dni psi niso dobivali ničesar. Vzorce krvi za določanje serumske koncentracije PGE₂, PGI₂, TXB₂ in LTB₄ ter določanje saharoze, manitola in laktuloze v plazmi smo jemali drugi, šesti, enajsti in dvajseti dan posamezne faze. Med fazami je bilo najmanj 14 dni premora.

Koncentracijo PGE₂ in PGI₂ v serumu smo določali z monoklonalnimi EIA Kiti, koncentracijo TXB₂ in LTB₄ v serumu pa z ELISA Kiti. Koncentracijo saharoze, laktuloze

in manitola v plazmi za ugotavljanje prepustnosti sluznice prebavil smo določili s tenkoplastno kromatografijo (TLC).

Ugotovili smo, da desetdnevno dajanje NSPZ meloksikama ter desetdnevno dajanje meloksikama in analoga PGE₁ mizoprostola zniža koncentracije PGE₂ in PGI₂ v serumu psov v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo. V podobnem obsegu se koncentraciji PGE₂ in PGI₂ znižata pri dajanju meloksikama in deksametazona, pri psih pa se pojavijo neželeni klinični znaki, kot so bruhanje, driska, napet trebuh in sveža kri v blatu. S tem smo potrdili, da se pri uporabi meloksikama in deksametazona njuni neželeni učinki potencirajo, čeprav meritve PGE₂ in PGI₂ tega niso potrdile. Deset dni po zadnjem odmerku meloksikama ali meloksikama in mizoprostola so se koncentracije PGE₂ in PGI₂ približale vrednostim, ki smo jih ugotovili pri psih, ki so prejeli placebo. Prav tako dajanje meloksikama, mizoprostola in deksametazona prehodno zniža koncentraciji PGE₂ in PGI₂ v serumu psov. Mizoprostol je omilil klinično sliko le delno, saj smo pri psih, ki so dobivali mizoprostol, prav tako ugotovili bruhanje in drisko, vendar brez napetega trebuha in primesi sveže krvi v blatu.

Vse štiri kombinacije zdravil, ki smo jih uporabili, neznačilno znižajo koncentracijo TXB₂ v serumu psov v primerjavi s psi, ki prejemo placebo. S to raziskavo nismo potrdili vpliva meloksikama, mizoprostola in deksametazona na koncentracijo TXB₂ v serumu psov ter njihovega zaviralnega učinka na trombocitno COX-1.

Meloksikam je povečal koncentracijo LTB₄ v serumu psov v primerjavi s psi, ki so prejeli placebo, vendar neznačilno in le šesti dan desetdnevnega dajanja. Pri ostalih kombinacijah zdravil povišanih koncentracij LTB₄ nismo ugotovili. Do lokalnega vnetnega odziva naj torej ne bi prišlo, vendar LTB₄ v tem primeru morda ni dovolj zanesljiv pokazatelj.

Raziskava je pokazala, da kratkotrajno dajanje meloksikama ter kombinacije meloksikama in deksametazona spremeni prepustnost želodčne sluznice v podobnem obsegu. Deset dni po prenehanju dajanja zdravil spremembe prepustnosti sluznice s trojnim sladkornim testom niso bile zaznavne. Pri sočasni uporabi mizoprostola se je koncentracija saharoze v plazmi prej približala vrednostim skupine, ki je dobivala placebo, kar potrjuje pozitivni zaščitni učinek mizoprostola na želodčno sluznico pri uporabi meloksikama. Sočasno dajanje meloksikama, mizoprostola in deksametazona je povzročilo neznačilno povečanje prepustnosti želodčne sluznice le drugi dan.

Desetdnevno dajanje meloksikama spremeni prepustnost črevesne sluznice in neznačilno poveča L/M indeks, vendar deset dni kasneje L/M indeks doseže vrednosti, ki so primerljive s skupino, ki je dobivala placebo. Desetdnevno dajanje meloksikama in mizoprostola prav tako prehodno neznačilno poveča prepustnost črevesne sluznice.

Meloksikam in deksametazon povečata prepustnost črevesne sluznice (značilno le šesti dan dajanja), vendar se po končanem tretiranju L/M indeks vrne na vrednosti, ugotovljene pri skupini, ki je dobivala placebo, ter celo nižje od teh. Pri dajanju meloksikama, mizoprostola in deksametazona je bil L/M indeks podoben kot pri skupini, ki je dobivala placebo, vseh dvajset dni poskusa.

Nadaljnje študije, ki bi vključevale standardizacijo trojnega sladkornega testa pri psih, endoskopijo in histopatološke preiskave sluznice prebavil ter ugotavljanje okultne krvi v blatu z imunokemično metodo sočasno z meritvami prostaglandinov, bi bile potrebne, da bi ugotovili, kdaj in kje se dejansko pojavijo spremembe sluznice, kakšno tveganje za nastanek razjed predstavljajo ter kako hitro si sluznica opomore po prekinitvi zdravljenja z zgoraj omenjenimi zdravili.

7 SUMMARY

In clinical work of veterinary medicine, practitioners sometimes ask themselves how safe it is to treat a dog with an NSAID and a corticosteroid at the same time. The literature on this subject, as well as product information does not recommend it due to the fact that side effects on the gastro intestinal tract are potentiated, even though the therapeutic effects of both drugs are sometimes needed. In the present study we examined systemic and local side effects of meloxicam: i.e. systemic through its effect on arachidonic acid metabolism and the consequences on PGE₂, PGI₂, TXB₂ and LTB₄ synthesis, and locally by means of gastro intestinal permeability changes. We tried to discover at the same time whether the side effects of the drugs could be diminished by concomitant administration of misoprostol. We also tested the usefulness of the triple sugar test for early diagnosis of lesions that develop on gastro intestinal mucosa after the use of NSAID and corticosteroids.

The study was performed on seven adult beagle dogs and was divided into five phases, each lasting for 20 days. In the first ten days of each phase the dogs were treated with a certain drug combination (placebo, meloxicam, meloxicam with misoprostol, meloxicam with dexamethason – added in the first three days, meloxicam with misoprostol and dexamethason – added in the first three days) and then left for ten days without any treatment. Blood samples were drawn for determination of serum PGE₂, PGI₂, TXB₂ and LTB₄ concentrations and plasma sucrose, lactulose and mannitol concentrations on day 2,6,11 and 20 of each phase. There was a minimum of 14 days resting period between each phase.

The serum concentrations of PGE₂ and PGI₂ were determined by a monoclonal EIA kit. The serum concentrations of TXB₂ and LTB₄ were determined using the ELISA kit. The plasma concentrations of sucrose, lactulose and mannitol for gastro intestinal permeability determination were determined by thin layer chromatography (TLC).

We found that the ten day treatment of dogs with meloxicam and the PGE₁ analog misoprostol decreases PGE₂ and PGI₂ serum concentrations in comparison with the placebo treated dogs. Similar results were obtained in the meloxicam and dexamethason phase, although undesirable side effects such as vomiting, diarrhoea, distended abdomen and fresh blood in the stool appeared. According to these results we proved that undesirable side effects are summed when NSAID and corticosteroids are used, although this cannot be concluded only from PGE₂ and PGI₂ concentration determinations. Ten days after the treatment with meloxicam or meloxicam with misoprostol was ended, the PGE₂ and PGI₂ concentrations came close to the placebo level. The ten day treatment with meloxicam, misoprostol and dexamethason (added in the first three days of the treatment) also decreased the PGE₂ and PGI₂ serum concentration in dogs. According to the clinical picture the gastrointestinal tract was only partially protected by misoprostol, since a few dogs also had diarrhoea and vomited, but none had distended abdomen or bloody stool.

All four drug combinations used in phases 2 through 5 insignificantly decreased the TXB₂ serum concentration in dogs in comparison to the placebo group, therefore we were unable to prove the inhibitory effect of meloxicam, misoprostol and dexamethason on thrombocyte COX-1 and their effect on TXB₂ serum concentration in dogs.

Meloxicam treatment increased serum LTB₄ concentration in dogs in comparison to the placebo group, but in this study the differences were not statistically significant and it only

became apparent on day 6 of the ten day treatment. No elevation in LTB₄ serum concentration was found in phases 3 to 5. According to these results there was no local inflammatory response but in this case LTB₄ might not be specific enough.

According to the results of the present study ten day treatment with meloxicam and meloxicam with dexamethason changed the permeability of the gastric mucosa in a similar manner. Permeability changes were no longer detectable by the triple sugar test ten days after treatment ceased. The plasma sucrose concentration reached the placebo level sooner when misoprostol was used concomitantly, which proves the positive protective effect of misoprostol on gastric mucosa after the use of NSAID. The ten day treatment with meloxicam, misoprostol and dexamethason resulted in a (statistically non-significant) change of gastric permeability on day two of the treatment.

The ten day treatment with meloxicam changed the permeability of intestinal mucosa and therefore increased the L/M index. Ten days after the end of treatment the L/M index reached the placebo level. The ten day treatment with meloxicam and misoprostol also insignificantly changed the permeability of intestinal mucosa. The ten day treatment with meloxicam and dexamethason changed the intestinal permeability (significant only on day 6) and increased the L/M index, but the L/M index reached levels even lower than placebo when the treatment was discontinued. There were no significant changes in intestinal permeability when the dogs were treated with meloxicam, misoprostol and dexamethason (added in the first three days). The L/M index stayed lower than the placebo level for the whole 20 days.

Further studies, which should include standardization of the triple sugar test for dogs, endoscopy with histopathology of the mucosa and evaluation of the occult blood in faeces

by immunochemical test together with prostaglandin measurement would give a better insight on when lesions actually appear, what risk for further ulcer development they represent, and how fast regeneration of the mucosa proceeds after therapy with the above mentioned drugs ended.

8 ZAHVALA

Mentorici, izr. prof. dr. *Silvestri Kobal* – hvala, da ste sprejeli to poslanstvo in me podpirali do konca. Hvala za vašo vzpodbudo in uporabne napotke pri nastajanju naloge in za to, da kljub dolgemu procesu niste izgubili volje, potrpljenja in zaupanja.

Prof. dr. Janoš Butinar – hvala za vse znanje in napotke, ki ste mi jih posredovali v času skupnega dela na fakulteti. Hvala tudi za pomoč pri začetku in koncu nastajanja naloge.

Doc. dr. Alenka Seliškar – iskrena hvala za tvoje mentorstvo, napotke, nesebično razdajanje znanja in informacij pri mojem vstopu v svet anestezije in kliničnega dela. Od tebe sem se največ naučila in dala si mi dobro popotnico za moje nadaljno delo. Velika hvala tudi za popravke, zelo koristne nasvete in ogromno potrpljenja pri nastajanju te naloge.

Izr. prof. dr. Samo Ribarič – hvala za hitre odgovore, konstruktivne pripombe in popravke.

Doc. dr. Alenka Nemeč – verjamem, da brez tebe marsikateri članek in doktorat ne bi nastal, prav tako je z mojimi. Tvoja pomoč je neprecenljiva, napotki zlata vredni, predvsem pa si ena redkih, ki nikoli ne pozabiš na vzpodbudo in pozitivne misli. Pa na to, da obstaja še življenje onkraj znanosti. Velika, velika hvala.

Prof. dr. Robert Frangež – hvala ti za vsa konstruktivna mnenja, napotke, vzpodbudo in dobro voljo, ter da si vedno pripravljen pomagati.

Ga. Tatjana Penšek Slivar – vaša skrb in vzpodbuda sta krivi, da sem na prelomni točki s to nalogo nadaljevala in jo zaključila. Hvala za vse nasvete in informacije, ter skrb za vaše podiplomce.

Hvala *prof.dr. Miranu Prošku* in *Mateji Puklavc* ter ostalim s kemijskega inštituta za pripravljane tetsnih raztopin in analizo podatkov, ter vso prijaznost.

Hvala tudi *prof.dr. Alešu Jerinu* ter vsem z inštituta za Biokemijo za analizo vzorcev.

Velika hvala *Mateji Nagode* za statistično obdelavo podatkov in zelo veliko mero potrpežljivosti z mojimi vprašanji.

Miha Melinc in Dipros d.o.o. – brez prijateljev in uslug bi bilo vse tole težje izvedljivo, hvala za pomoč.

Mag. Gita Greccs-Smole – hvala za hiter in temeljit pregled literature in napotke, hvala tudi za neizmerno pomoč pri zbiranju člankov. Zahvaljujem se tudi osebju knjižnice.

Dr. Barbara Lukanc - hvala za pomoč in nasvete pri zbiranju člankov.

Ana Rejec – hvala za pomoč pri izvedbi poskusa.

Hvala tudi *Aleksandru Jenku* za pomoč v laboratoriju.

Hvala asist. *Sari Suhadolc Scholten* in vsem *tehnikom KKMŽ* za skrb za bigle.

Barbari Freljih hvala za temeljito in hitro lektoriranje naloge.

Tati – velika hvala, da pomagaš tistemu delu družine, ki ni tako računalniško nadarjen, da si poskrbel, da je vse tole dobilo neko obliko. Predvsem hvala za potrpežljivost in za zavest, da se nate res vedno lahko zanesem.

Mami – hvala za tvoje lektoriranje, vse spodbude, vsa kosila in varstva otrok, brez katerih pa res ne bi imela časa še pisat! Hvala tudi *babi!*

Rok – hvala za lektoriranje angleškega besedila ter članka in vse kritične pripombe.

Saša – hvala za tvojo veliko pomoč pri oblikovanju naloge.

Dr. Tony Byrne – hvala za hitro lektoriranje angleškega besedila.

Prijatelji in vsi tisti, ki ste kdaj rekli: »Pa ja no, sej boš že nardila...«, hvala - je pomagalo.

Miha – tebi hvala za veliko mero potrpljenja pri prenašanju moje nervoze, slabe volje, teženja in vsega kar je vključeval ta projekt. Za vse vzpodbude in za to, da si me vedno podprl in verjel vame.

Živa in Lina – z vajinimi rojstvi so nazivi dobili drug pomen in najpomembnejši in najljubši je postal naziv MAMI. Življenje pa se od takrat vrti z neko drugo hitrostjo, predstavljeno v drugo dimenzijo.

9 LITERATURA

1. Agnello KA, Reynolds LR, Budberg SC (2005). In vivo effects of tepoxalin, an inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase, on prostanoid and leukotriene production in dogs with chronic osteoarthritis. *Am J Vet Res* 66(6): 966-72.
2. Allenspach K, Steiner JM, Bhavin N et al. (2006). Evaluation of gastrointestinal permeability and mucosal absorptive capacity in dogs with chronic enteropathy. *Am J Vet Res* 67(3): 479-83.
3. Anderson JM, van Itallie CM (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 269(4 Pt 1): G467-75.
4. Argentieri D, Ritchie D, Ferro M et al. (1994). Tepoxalin: a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor of arachidonic acid metabolism with potent anti-inflammatory activity and a favorable gastrointestinal profile. *J Pharmacol Exp Ther* 271(3): 1399-408.
5. Asako H, Kubes P, Wallace JL, Gaginella T, Wolf RE, Granger DN (1992). Indomethacin induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am J Physiol* 262(5 Pt 1): G903-8.
6. Bauer RF (1985). Misoprostol preclinical pharmacology. *Dig Dis Sci* 30(11 Suppl): 118S-25S.
7. Berger K, Sander M, Spies CD et al. (2009). Profound haemodilution during normothermic cardiopulmonary bypass influences neither gastrointestinal permeability nor cytokine release in coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth* 103(4): 511-7.
8. Bjarnason I, O'Morain C, Levi AJ, Peters TJ (1983). Absorption of ⁵¹Cr-EDTA in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 85: 318-22.

9. Bjarnason I, Williams P, Smethurst P, Peters TJ, Levi J (1986). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut* 27: 1292-7.
10. Bjarnason I, Smethurst P, Fenn CG, Lee CE, Menzies IS, Levi J (1989). Misoprostol reduces indomethacin-induced changes in human small intestinal permeability. *Dig Dis Sci* 34(3): 407-11.
11. Bjarnason I (1994). Intestinal permeability. *Gut* 35(1 Suppl): S18-22.
12. Bjarnason I, Peters TJ (1996). Influence of anti-rheumatic drugs on gut permeability and on the gut associated lymphoid tissue. *Baillieres Clin Rheumatol* 10(1): 165-76.
13. Bjarnason I, Takeuchi K (2009). Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy. *J Gastroenterol* 44(19 Suppl): 23-9.
14. Blikslager AT, Roberts MC, Rhoads JM, Argenzio RA (1997). Prostaglandins I₂ and E₂ have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum. *J Clin Invest* 100(8): 1928-33.
15. Bohm E, Sturm GJ, Weiglhofer I et al. (2004). 11-Dehydro-thromboxane B₂, a stable thromboxane metabolite is a full agonist of chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells (CRTH2) in human eosinophils and basophils. *J Biol Chem* 279(9): 7663-70.
16. Boston S, Moens N, Kruth S, Southorn E (2003). Endoscopic evaluation of the gastroduodenal mucosa to determine the safety of short-term concurrent administration of meloxicam and dexamethasone in healthy dogs. *Am J Vet Res* 64(11): 1369-75.
17. Botting R, Ayoub SS (2005). COX-3 and mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72(2): 85-7.

18. Bowersox TS, Lipowitz AJ, Hardy RM et al. (1996). The use of a synthetic prostaglandin E₁ analog as a gastric protectant against aspirin-induced hemorrhage in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 32(5): 401-7.
19. Brainard BM, Meredith CP, Callan MB et al. (2007). Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dog. *Am J Vet Res* 68(3): 251-7.
20. Brideau C, Kargman S, Liu S et al. (1996). A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* 45(2): 68-74.
21. Brideau C, van Staden C, Chan C (2001). In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs and cats. *Am J Vet Res* 62(11): 1755-60.
22. Brooks P, Emery P, Evans JF et al. (1999). Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology* 38(8): 779-88.
23. Bruet V, Bourdeau P, Bizzarri M, Martin L, Dumon H (2008). Rapid blood sampling method for measuring intestinal permeability by gas chromatography in dogs. *Rev Med Vet* 159: 276-81.
24. Buhner S, Reese I, Kuehl F, Lochs H, Zuberbier T (2004). Pseudoallergic reactions in chronic urticaria are associated with altered gastroduodenal permeability. *Allergy* 59(10): 1118-23.
25. Buluc M, Gurdal H, Melli M (2002). Effect of misoprostol and indomethacin on cyclooxygenase induction and eicosanoid production in carrageenan-induced air pouch inflammation in rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 70(1/2): 227-39.
26. Busch U, Schmidt J, Heinzl G et al. (1998). Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. *Drug Metab Dispos* 26: 576-84.

27. Buttgereit F, Burmester GR, Simon LS (2001). Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med* 110(3A): 13S-9S.
28. Carpani de Kaski M, Rentsch R, Levi S, Hodgson HJ (1995). Corticosteroids reduce regenerative repair of epithelium in experimental gastric ulcers. *Gut* 37(5): 613-6.
29. Cave NJ (2003). Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of companion animals. *NZ Vet J* 51: 262-74.
30. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL et al. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21): 13926-31.
31. Cook AK, Gilson SD, Fischer WD, Kass PH (1992). Effect of diet on results obtained by use of two commercial test kits for detection of occult blood in feces of dogs. *Am J Vet Res* 53(10):1749-51.
32. Cooper BT (1984). Small intestinal permeability in clinical practice. *J Clin Gastroenterol* 6: 499-501.
33. Cox MA, Iqbal TH, Cooper BT, Lewis KO (1997). An analytical method for the quantitation of mannitol and disaccharides in serum: a potentially useful technique in measuring small intestinal permeability in vivo. *Clin Chim Acta* 263: 197-205.
34. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ (2006). Effects of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke* 37(8): 2153-8.
35. Craven M, Chandler ML, Steiner JM et al. (2007). Acute effects of carprofen and meloxicam on canine gastrointestinal permeability and mucosal absorptive capacity. *J Vet Intern Med* 21(5): 917-23.

36. Dastyh M, Dastyh M Jr, Novotna H, Cihalova J (2008). Lactulose/mannitol test and specificity, sensitivity, and area under the curve of intestinal permeability parameters in patients with liver cirrhosis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 53(10): 2789-92.
37. Davies NM (1998). Review article: non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal permeability. *Aliment Pharmacol Ther* 12: 303-20.
38. Davies NM, Saleh JY (2000). Detection and prevention of NSAID-induced enteropathy. *J Pharm Pharmaceut Sci* 3(1): 137-55.
39. Davis MS, Willard MD, Williamson K, Steiner JA, Williams DA (2005). Sustained strenuous exercise increases intestinal permeability in racing Alaskan Sled dogs. *J Vet Intern Med* 19:34-9.
40. Dejana EZ, Agrawal NM (1989). Protective effects of prostaglandins against nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. *Int J Clin Pharmacol Res* 9: 359-69.
41. De Meijer A, Vollaard H, de Metz M, Verbruggen B, Thomas C, Novakova I (1999). meloxicam, 15 mg/day, spares platelet function in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 66(4): 425-30.
42. Dow SW, Rosychuk RA, McChesney AE, Curtis CR (1990). Effects of flunixin and flunixin plus prednisone on the gastrointestinal tract of dogs. *Am J Vet Res* 51(7): 1131-7.
43. Engelhardt G, Bogel R, Schnitzler ChR, Utzman R (1996a). Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part I. In vitro findings. *Biochem Pharmacol* 51(1): 21-8.
44. Engelhardt G, Bogel R, Schnitzler ChR, Utzman R (1996b). Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part II. In vivo findings. *Biochem Pharmacol* 51(1): 29-38.

45. Eveloff JL, Warnock DG (1987). Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am J Physiol* 252(1 Pt 2): F1-10.
46. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ (1980). Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286(5770): 264-5.
47. Forsyth SF, Guilford WG, Haslett SJ, Godfrey J (1998). Endoscopy of gastroduodenal mucosa after carprofen, meloxicam and ketoprofen administration in dogs. *J Small Anim Pract* 39: 421-4.
48. Fresno L, Moll J, Penalba B et al. (2005). Effects of postoperative administration of meloxicam on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *Vet J* 170(1): 138-40.
49. Fox SM (2010a). *Chronic pain in small animal medicine*. London: Manson Publishing, 139.
50. Fox SM (2010b). *Chronic pain in small animal medicine*. London: Manson Publishing, 147.
51. Fox SM (2010c). *Chronic pain in small animal medicine*. London: Manson Publishing, 145.
52. Galbraith EA, McKellar QA (1996). Protein binding and in vitro serum thromboxane B₂ inhibition by flunixin meglumine and meclufenamic acid in dog, goat and horse blood. *Res Vet Sci* 61(1): 78-81.
53. Garrelds IM, van Hal PT, Haakmat RC, Hoogsteden HC, Saxena PR, Zijlstra FJ (1999). Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm* 8(4/5): 229-35.

54. Gilmer JF, Murphy MA, Shanon JA, Breen CG, Ryder SA, Clancy JM (2003). Single oral dose study of two isosorbide-based aspirin products in the dog. *J Pharm Pharmacol* 55(10): 1351-7.
55. Giofre MR, Meduri G, Pallio S et al. (2000). Gastric permeability to sucrose is increased in portal hypertensive gastropathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12(5): 529-33.
56. Goksen Y, Hardy J (1967). Effects of cortisone on parietal cells and acid secretion in dogs. *J Surg Res* 7(9): 406-12.
57. Goldman G, Welbourn R, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB (1991). Thromboxane A₂ induces leukotriene B₄ synthesis that in turn mediates neutrophil diapedesis via CD 18 activation. *Microvas Res* 41(3): 367-75.
58. Gooin JL, Galanko JA, Blikslager AT, Argenzio RA (2003). PG-mediated closure of paracellular pathway and not restitution is the primary determinant of barrier recovery in acutely injured porcine ileum. *Am J Physiol Gastro Intest Liver Physiol* 285(5): G967-79.
59. Graham DY, Agrawal NM, Roth SH (1988). Prevention of NSAID-induced gastric ulcer with misoprostol: multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2(8623): 1277-80.
60. Graham H, Leib MS (2009). Effects of prednisolone alone or prednisolone with ultralow-dose aspirin on the gastroduodenal mucosa of healthy dogs. *J Vet Intern Med* 23(3): 482-7.
61. Greenwald B (2005). From guaiac to immune fecal occult blood tests: the emergence of technology in colorectal cancer screening. *Gastroenterol Nurs* 28(2): 90-6.
62. Hall EJ, Batt RM (1990). Enhanced intestinal permeability to ⁵¹Cr-labelled EDTA in dogs with small intestinal disease. *J Am Vet Med Assoc* 196: 91-5.

63. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(8): 2994-8.
64. Hamilton I, Cobden I, Rothwell J, Axon AT (1982). Intestinal permeability in coeliac disease: the response to gluten withdrawal and single dose gluten challenge. *Gut* 23(3): 202-10.
65. Hanazaki K, Kuroda T, Kajikawa S, Amano J (2000). Prostaglandin E₁ reduces thromboxane A₂ in hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatogastroenterology* 47(33): 807-11.
66. Hanson SM, Bostwick DR, Twedt DC, Smith MO (1997). Clinical evaluation of cimetidine, sucralfate, and misoprostol for prevention of gastrointestinal tract bleeding in dogs undergoing spinal surgery. *Am J Vet Res* 58(11): 1320-3.
67. Hawkey CJ (1999). COX-2 inhibitors. *Lancet* 353(9149): 307-14.
68. Hewetson M, Cohen ND, Love S et al. (2006). Sucrose concentration in blood: a new method for assessment of gastric permeability in horses with gastric ulceration. *J Vet Intern Med* 20: 388-94.
69. Higgins AJ (1985). The biology, pathophysiology and control of eicosanoids in inflammation. *J Vet Pharmacol Therap* 8: 1-18.
70. Hojgaard L, Mertz Nielsen A, Rune SJ (1996). Peptic ulcer pathophysiology: acid, bicarbonate and mucosal function. *Scand J Gastroenterol* 31(Suppl 216): 10-15.
71. Hollander D (1992). The intestinal permeability barrier: a hypothesis as to its regulation and involvement in chron's disease. *Scand J Gastroenterol* 27: 721-6.
72. Hua Z, Fei H, Mingming X (2006). Evaluation and interference of serum and skin lesion levels of leukotrienes in patients with eczema. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(1): 51-5.

73. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PDE, Hawkey CJ (1992). Mechanisms of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterology* 39(1): 31-6.
74. Hudson N, Balsitis M, Everitt S, Hawkey SJ (1993). Enhanced gastric mucosal leukotriene B4 synthesis in patients taking non-steroidal antiinflammatory drugs. *Gut* 34(6): 742-7.
75. Hullin F, Raynal P, Ragab-Thomas JM, Fauvel J, Chap H (1989). Effects of dexamethasone on prostaglandin synthesis and on lipocortin status in human endothelial cells. *J Biol Chem* 264(6): 3506-13.
76. Izhar M, Pasmanik M, Marcus S (1992). Dexamethasone inhibition of cyclooxygenase expression in bovine term placenta. *Prostaglandins* 43(3): 239-54.
77. Jacobson ED (1992). Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterology* 102:1788-800.
78. Jenkins AP, Trew DR, Crump BJ et al. (1991). Do non-steroidal anti-inflammatory drugs increase colonic permeability? *Gut* 32(1): 66-9.
79. Jerin A, Seliškar A, Lukanc B, Butinar J, Nemeč Svete A (2008). Serum thromboxane B2 (THB2) determination is influenced by sample incubation temperature in healthy beagle dogs. *Acta Vet Brno* 78: 223-8.
80. Johnston SA, Leib MS, Forrester SD, Marini M (1995). The effect of misoprostol on aspirin-induced gastroduodenal lesions in dogs. *J Vet Intern Med* 9(1): 32-8.
81. Johnston SD, Smye M, Watson RG, McMillan SA, Trimble ER, Love AH (2000). Lactulose-mannitol intestinal permeability test: a useful screening test for adult celiac disease. *Ann Clin Biochem* 37: 512-9.
82. Jones C, Budberg S (2000). Physiologic characteristics and clinical importance of the cyclooxygenase isoforms in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 217(5): 721-9.

83. Jones C, Streppa H, Harmon B, Budsberg S (2002). In vivo effects of meloxicam and aspirin on blood, gastric mucosal and synovial fluid prostanoid synthesis in dogs. *Am J Vet Res* 63(11): 1527-31.
84. Kamath S, Blann AD, Lip GYH (2001). Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* 22(17): 1561-71.
85. Kay-Mugford P, Benn SJ, La Marre J, Conlon P (2000). In vitro effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in cyclooxygenase activity in dogs. *Am J Vet Res* 61(7): 802-10.
86. Kerckhoffs AP, Akkermans LM, de Smet MB et al. (2009). Intestinal permeability in irritable bowel syndrome patients: effects of NSAIDs. *Dig Dis Sci* 55(3): 716-23.
87. Kirk PF, Williams JD, Petersen MM, Compston DA (1994). The effect of methylprednisolone on monocyte eicosanoid production in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 241(7): 427-31.
88. Kiziltas S, Imeryuz N, Gurcan T et al. (1998). Corticosteroid therapy augments gastroduodenal permeability to sucrose. *Am J Gastroenterol* 93(12): 2420-5.
89. Knapp DW, Richardson RC, Chan TCK et al. (1994). Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 8(4): 273-8.
90. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A (2008). Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 135(1): 41-60.
91. Lascelles BD, Blikslager AT, Fox SM, Reece D (2005). Gastrointestinal tract perforations in dogs treated with a selective cyclooxygenase-2 inhibitor: 29 cases (2002-2003). *J Am Vet Med Assoc* 227(7): 1112-7.
92. Lascelles BD, McFarland JM, Swann H (2005). Guidelines for safe and effective use of NSAIDs in dogs. *Vet Ther* 6(3): 237-51.

93. Levi S, Goodlad R, Lee CY et al. (1990). Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mucosal cell proliferation associated with gastric ulcer healing. *Lancet* 336(8719): 840-3.
94. Lichtenberger LM (2001). Where is the evidence that cyclooxygenase inhibition is the primary cause of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastrointestinal injury? Topical injury revisited. *Biochem Pharmacol* 61(6): 631-7.
95. Lokken P, Sognen E (1967). ⁵¹Cr EDTA as a reference substance in research on gastrointestinal functions. *Acta Pharmacol Toxicol* 25(4): 39.
96. Madara JL (1989). Loosening tight junctions. *J Clin Invest* 83: 1089-94.
97. Malmberg NB, Yaksh L (1992). Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 136-46.
98. Mathews KA (1996). Nonsteroidal anti-inflammatory analgesics in pain management in dogs and cats. *Can Vet J* 37(9): 539-45.
99. Mathews KA, Petiffer G, Foster R, McDonnell W (2001). Safety and efficacy of peroperative administration of meloxicam, compared with that of ketoprofen and butorphanol in dogs undergoing abdominal surgery. *Am J Vet Res* 62(6): 882-8.
100. McKellar QA, Nolan AM, Galbraith EA (1990). Serum thromboxane generation by platelets in several domestic animal species. *Br Vet J* 146(5): 398-404.
101. McRoberts JA, Beuerlein G, Dharmasathaphorn K (1985). Cyclic AMP and Ca²⁺ activated K⁺ transport in a human colonic epithelial cell line. *J Biol Chem* 260(26): 14163-72.
102. Meddings JB, Sutherland LR, Byles NI, Wallace JL (1993). Sucrose: a novel permeability marker for gastroduodenal disease. *Gastroenterology* 104(6): 1619-26.

103. Meddings JB, Kirk D, Olson ME (1995). Noninvasive detection of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in dogs. *Am J Vet Res* 56(8): 977-81.
104. Meddings JB, Gibbons I (1998). Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology* 114(1): 83-92.
105. Menguy R, Masters YF (1963). Effect of cortisone on mucoprotein secretion by gastric antrum of dogs: pathogenesis of steroid ulcer. *Surgery* 54:19-28.
106. Menzies IS (1984). Transmucosal passage of inert molecules in health and disease. In: Skadhauge E, Heintze K, eds. *Intestinal absorption and secretion*. 8th ed. Falk symposium 36. Lancaster: MTP Press, 527-43.
107. Mertz-Nielsen A, Eskerod O, Bukhave K, Rask-Madsen J (1995). Misoprostol inhibits gastric mucosal release of endogenous prostaglandin E₂ and thromboxane B₂ in healthy volunteers. *Gut* 36(4): 511-5.
108. Metz LM, Sabuda D, Hilsden RJ, Enns R, Meddings JB (1999). Gastric tolerance of high-dose pulse oral prednisolone in multiple sclerosis. *Neurology* 53(9): 2093-6.
109. Miller TA (1988). Gastroduodenal mucosal defense: factors responsible for the ability of the stomach and duodenum to resist injury. *Surgery* 103(4): 389-97.
110. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemerman Chr, Flower R, Vane JR (1994). Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(24): 11693-7.
111. Moore RW, Withrow SJ (1982). Gastrointestinal hemorrhage and pancreatitis associated with intervertebral disc disease in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 180(12): 1443-7.
112. Morchon R, Lopez-Belmonte J, Rodriguez-Barbero A, Simon F (2006). High levels of serum thromboxane B₂ are generated during human pulmonary dirofilariosis. *Clin Vaccine Immunol* 13(10): 1175-6.

113. Murtaugh RJ, Matz ME, Labato MA, Boudrieau RJ (1993). Use of synthetic prostaglandin E₁ (misoprostol) for prevention of aspirin-induced gastroduodenal ulceration in arthritic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 202(2): 251-6.
114. Neiger R, Gaschen F, Jaggy A (2000). Gastric mucosal lesions in dogs with acute intervertebral disc disease: characterization and effects of omeprazole or misoprostol. *J Vet Intern Med* 14(1): 33-6.
115. Neiger R (2003). NSAID-induced gastrointestinal adverse effects in dogs – can we avoid them? *J Am Intern Med* 17(3): 259-61.
116. Noble S, Balfour JA (1996). Meloxicam. *Drugs* 51(3): 424-30.
117. Pallapies D, Peskar BA, Brune K, Geisslinger G (1994). Effects on platelet functions and pharmacokinetics of azapropazone and ketorolac tromethamine given as single parenteral dose. *Br J Clin Pharmacol* 37(4): 335-9.
118. Park SH, Cho CS, Lee OY et al. (2007). Comparison of prevention of NSAID-induced gastrointestinal complications by rebamipide and misoprostol: a randomized, multicenter, controlled trial-storm study. *J Clin Biochem Nutr* 40(2): 148-55.
119. Parente L, Perretti M (2003). Advances in pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol* 65: 153-159.
120. Parra-Blanco A, Gimeno-Garcia AZ, Quintero E et al. (2010). Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *J Gastroenterol* 45(7): 703-12.
121. Pasloske K, Burger J, Conlon P (1998). Plasma prostaglandin E₂ concentrations after single dose administration of ketorolac tromethamine (Toradol) in dogs. *Can J Vet Res* 62(3): 237-40.

122. Patrono C, Ciabattoni G, Pinca E et al. (1980). Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B₂ production in healthy subjects. *Thromb Res* 17(3/4): 317-27.
123. Peskar BM (2001). Role of COX-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci* 95: 3-9.
124. Piper JM, Ray WA, Daugherty JR, Griffin MR (1991). Corticosteroid use in peptic ulcer disease: role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Intern Med* 114(9): 735-40.
125. Plumb DC (2008a). *Plumb's veterinary drug handbook*. 6th ed. Ames: Blackwell, 574-5.
126. Plumb DC (2008b). *Plumb's veterinary drug handbook*. 6th ed. Ames: Blackwell, 265-9.
127. Plumb DC (2008c). *Plumb's veterinary drug handbook*. 6th ed. Ames: Blackwell, 625-7.
128. Poonam D, Vinay CS, Gautam P (2005). Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in experimental chronic gastric ulcer healing. *Eur J Pharmacol* 519(3): 277-84.
129. Poulsen Nautrup B, Horstermann D (1999). Pharmacodynamic and pharmacokinetic aspects of the non-inflammatory non-steroidal agent meloxicam in dogs. *Dtsch Tieraztl Wochenschr* 106(3): 94-100.
130. Punke JP, Speas AL, Reynolds LR, Budsberg SC (2008). Effects of firocoxib, meloxicam, and tepoxalin on prostanoid and leukotriene production by duodenal mucosa and other tissues of osteoarthritic dogs. *Am J Vet Res* 69(9): 1203-9.
131. Rainsford KD (1993). Leukotriens in the pathogenesis of NSAID-induced gastric and intestinal mucosal damage. *Agents Actions Suppl* 39 (spec. iss.): C24-6.
132. Reid NC, Hackett RM, Welbourn RB (1961). The influence of cortisone on the parietal cell population of the stomach in the dog. *Gut* 2: 119-22.

133. Reuter BK, Davies NM, Wallace JL (1997). Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria and enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 112(1): 109-17.
134. Rice JE, Ihle SL (1994). Effects of diet on fecal occult blood testing in healthy dogs. *Can J Vet Res* 58(2): 134-7.
135. Rich M, Scheiman JM (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy at the new millenium: mechanisms and prevention. *Semin Arthritis Rheum* 30(3): 167-79.
136. Robert A (1979). Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77(4 Pt 1): 761-7.
137. Rohrer CR, Hill RC, Fischer A et al. (1999). Gastric hemorrhage in dogs given high doses of methylprednisolone sodium succinate. *Am J Vet Res* 60(8): 977-81.
138. Rohrer CR, Hill RC, Fischer A et al. (1999). Efficacy of misoprostol in prevention of gastric hemorrhage in dogs treated with high doses of methylprednisolone sodium succinate. *Am J Vet Res* 60(8): 982-5.
139. Scarpignato C (1995). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: how do they damage gastroduodenal mucosa? *Dig Dis* 13(suppl 1): 9-39.
140. Schmassmann A, Peskar BM, Stettler CH et al. (1998). Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 123: 795-804.
141. Schneider AR, Benz C, Riemann JF (1999). Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large bowel. *Endoscopy* 31(9): 761-7.

142. Sessions JK, Reynolds LR, Budsberg SC (2005). In vivo effects of carprofen, deracoxib, and etodolac on prostanoid production in blood, gastric mucosa, and synovial fluid in dogs with chronic osteoarthritis. *Am J Vet Res* 66: 812-7.
143. Siler-Khodr TM, Kang IS, Koong MK, Grayson M (1997). The effect of dexamethasone on CRH and prostanoid production from human term placenta. *Prostaglandins* 54(3): 639-53.
144. Sigthorsson G, Tibble J, Hayllar J et al. (1998). Intestinal permeability and inflammation in patients on NSAIDs. *Gut* 43(4): 506-11.
145. Sinclair DG, Evans TW (1995). Gut permeability: mechanisms, measurement and clinical applications. In: Vincent JL, ed. *Yearbook of intensive care and emergency medicine*. Berlin, New York: Springer, 1995: 684-91.
146. Smecuol E, Bai JC, Sugai E et al. (2001). Acute gastrointestinal permeability responses to different non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 49(5): 650-5.
147. Smith WL, Marnett LJ (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1083(1): 1-17.
148. Sorensen SH, Proud FJ, Rutgers C, Markwell P, Adam A, Batt RM (1997). A blood test for intestinal permeability and function: A new tool for the diagnosis of chronic intestinal disease in dogs. *Clin Chim Acta* 264(1): 103-15.
149. Steinmeyer J (2000). Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* 2(5): 379-85.
150. Steiner JM, Williams DA, Moeller EM (2002). Kinetics of urinary recovery of five sugars after orogastric administration in healthy dogs. *Am J Vet Res* 63(6): 845-8.
151. Steiner JM, Williams DA, Moeller EM (2000). Development and validation of a method for simultaneous separation and quantification of 5 different sugars in canine urine. *Can J Vet Res* 64(3): 164-70.

152. Streppa HK, Jones CJ, Budsberg SC (2002). Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood. *Am J Vet Res* 63(1): 91-4.
153. Strom H, Krogsgaard Thomsen M (1990). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on canine neutrophil chemotaxis. *J Vet Pharmacol Therap* 13(2): 186-91.
154. Sun Z, Wang X, Andesson R (1998). Role of intestinal permeability in monitoring mucosal barrier function. *Dig Surg* 15(5): 386-97.
155. Sutherland LR, Verhoef M, Wallace JL, Van Rosendaal G, Crutcher R, Meddings JB (1994). A simple, non-invasive marker of gastric damage: sucrose permeability. *Lancet* 343(8904): 998-1000.
156. Takahashi S, Shigeta J, Ishikawa M, Kobayashi N, Okabe S (1999). Role of thromboxane A2 in healing of gastric ulcers in rats. *Jpn J Pharmacol* 79(1): 101-7.
157. Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Takeuchi K (2002). Up-regulation of cyclooxygenase-2 by inhibition of cyclooxygenase-1: a key to non-steroidal anti-inflammatory drug – induced intestinal damage. *J Pharmacol Exp* 300(3): 754-61.
158. Thjodleifsson B, Bjarnason I (1999). Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: the effects of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. *Rheumatology* 38(suppl.1): 24-32.
159. Thomsen MK, Skak-Nielsen T, Ahnfelt-Ronne I (1990). Effects of etodolac, indomethacin and sodium salicylate on canine neutrophil function. *Agents Actions* 29(1/2): 54-5.
160. Tibble JA, Bjarnason I (2001). Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 7(4): 460-5.
161. Tomlinson J, Blikslager A (2003). Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in gastrointestinal tract injury and repair. *J Am Vet Med Assoc* 222(7): 946-51.

162. Toombs JP, Collins LG, Graves GM, Crowe DT, Caywood DD (1986). Colonic perforation in corticosteroid-treated dogs. *J Am Vet Med Assoc* 188(2): 145-50.
163. Travis S, Menzies IS (1992). Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci* 82(5): 471-88.
164. Uil JJ, van Elburg RM, van Overbeek FM, Mulder CJ, van Berge-Henegouwen GP, Heymans HS (1997). Clinical implications of the sugar absorption test: intestinal permeability test to assess mucosal barrier function. *Scand J Gastroenterol* 32(Suppl 223): 70-8.
165. Uil JJ, van Elburg RM, Janssens PMW, Mulder CJJ, Heymans HS (2000). Sensitivity of hyperosmolar or "low"-osmolar test solution for sugar absorption in recognizing small intestinal mucosal damage in coeliac disease. *Dig Liver Dis* 32(3): 195-200.
166. Unno N, Fink MN (1998). Intestinal epithelial hyperpermeability: mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterol Clin North Am* 27(2): 289-307.
167. van der Hulst RR, von Meyenfeld MF, van Kreel BK et al. (1998). Gut permeability, intestinal morphology, and nutritional depletion. *Nutrition* 14: 1-6.
168. van Elburg RM, Uil JJ, Kokke FTM et al. (1995). Repetability of the sugar-absorption test, using lactulose and mannitol, for measuring intestinal permeability for sugars. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 20(2): 184-8.
169. van Kraaij DJ, Hovestad AH, de Metz M, Vollaard EJ (2002). A comparison of the effects of nabumetone vs. meloxicam on serum thromboxanes B2 and platelet function in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 53(6): 644-7.
170. Vane JR (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature* 231: 232-5.
171. Vane JR (1995). NSAIDS, COX-2 inhibitors, and the gut. *Lancet* 346: 1105-6.

172. Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Malagelada JR (1990). Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology* 98(2): 269-77.
173. Vinet B, Panzini B, Boucher M, Massicotte J (1998). Automated enzymatic assay for the determination of sucrose in serum and urine and its use as a marker of gastric damage. *Clin Chem* 44(11): 2369-71.
174. Vogelsang H, Oberhuber G, Wyatt J (1996). Lymphocytic gastritis and gastric permeability in patients with coeliac disease. *Gastroenterology* 111(1): 73-7.
175. Wallace JL, Tigley AW (1995). Review article: new insights into prostaglandins and mucosal defence. *Aliment Pharmacol Ther* 9(3): 227-35.
176. Wallace JL, Li Ma (2001). Minireview: inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med* 226(11): 1003-15.
177. Wang ZF, Pan CE, Lu Y, Lui SG, Zhang GJ, Zhang XB (2003). The role of inflammatory mediators in severe acute pancreatitis and regulation of glucocorticoids. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2(3): 458-62.
178. Walt RP (1992). Misoprostol for the treatment of peptic ulcer and antiinflammatory-drug-induced gastroduodenal ulceration. *N Engl J Med* 327(22): 1575-80.
179. Ward D, Leib MS, Johnson SA, Marini M (2003). The effect of dosing interval on the efficacy of misoprostol in the prevention of aspirin-induced gastric injury. *J Vet Intern Med* 17(3): 282-90.
180. Warnock DG, Greger R, Dunham PB et al. (1984). Ion transport processes in apical membranes of epithelia. *Fed Proc* 43(10): 2473-87.
181. Widomski DL, Walsh RE, Baron DA et al. (1991). Effects of the prostaglandin analogue misoprostol on inflammatory mediator release by human monocytes. *Agents Actions* 34(1/2): 30-1.

182. Wilson DE (1987). Antisecretory and mucosal protective actions of misoprostol. Potential role in the treatment of peptic ulcer disease. *Am J Med* 83(1A): 2-8.
183. Yamagiwa S, Yoshida Y, Halder RC et al. (2001). Mechanisms involved in enteropathy induced by administration of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS). *Dig Dis Sci* 46(1): 192-9.
184. Yamanaka S, Miura K, Yukimura T, Yamamoto K (1993). 11-Dehydro thromboxane B₂: a reliable parameter of thromboxane A₂ production in dogs. *Prostaglandins* 45(3): 221-8.
185. Zeng J, Li YQ, Zou XL, Zhen YB, Yang J, Liu CH (2008). Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 28(8): 994-1002.

10 PRILOGE

PRILOGA A

Objavljen znanstveni članek