

Wpływ allopurinolu na rozwój urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego jelit – nowe spojrzenie

The effect of Allopurinol on intestinal ischemia-reperfusion injury development – the new approach

Tomasz Dawiskiba^{1,2}, Artur Pupka¹, Jan Skóra¹, Dariusz Janczak¹, Stanisław Pawłowski¹, Zbigniew Krawczyk², Przemysław P. Szyber¹, Piotr Szyber¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu (Department of Vascular, General and Transplantation Surgery Medical University Wrocław, Poland)

²Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu (Department of General, Gastroenterology and Endocrinology Medical University Wrocław, Poland)

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena wpływu allopurinolu na rozwój urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego jelita cienkiego w kontekście oddziaływania tego leku na oksydazę ksantynową.

Materiał i metody: Siedemdziesiąt szczurów rasy Buffalo podzielono na 5 grup składających się z 14 osobników. Grupa I stanowiła grupę kontrolną. W grupie II oraz IV wywołano 50-minutowe ostre niedokrwienie jelita cienkiego, w grupie III oraz V — ostre niedokrwienie jelita z następującą 60-minutową reperfuzyją. Badany lek allopurinol podawano zwierzętom z grup IV i V przez 3 dni przed eksperymentem. Doprowadzono do niedokrwienia jelit, zaciskając pień tętnicy kręzkowej górnej. Stopień zmian w śluzówce jelitowej oznaczano 6-stopniową skalą punktową. W supernatancie homogenatu jelitowego oznaczano aktywność oksydazy ksantynowej.

Wyniki: Uraz niedokrwiennie-reperfuzyjny jelita cienkiego nie wpłynął na aktywność oksydazy ksantynowej. Aktywność ta została natomiast silnie zahamowana przez podaż allopurinolu, zarówno w niedokrwionym jelicie poddanym następnej reperfuzyji, jak i w przypadku braku jego rewaskularyzacji. Jednocześnie stwierdzono silny ochronny wpływ wywarły przez allopurinol na rozwój zmian morfologicznych w jelicie poddanym przejściowemu niedokrwieniu i następnej reperfuzyji, przy czym efekt działania leku był zaznaczony już w fazie przed przywróceniem krążenia.

Wnioski: Protekcyjny wpływ allopurinolu na uraz niedokrwiennie-reperfuzyjny jelita cienkiego nie powinien się utożsamiać wyłącznie z oddziaływaniem na zmiany porewaskularyzacyjne. Udział oksydazy ksantynowej w rozwoju tego urazu jest dyskusyjny.

Słowa kluczowe: uraz niedokrwiennie-reperfuzyjny jelita cienkiego, allopurinol, oksydaza ksantynowa

Abstract

Background: The aim of the study was to evaluate the effect of Allopurinol on intestinal ischemia-reperfusion injury and xanthine oxidase system.

Material and methods: 70 Buffalo rats were divided into 5 groups of 14. Group I was the control group. The animals of groups II and IV were subjected to 50 minutes of acute intestinal ischemia. The animals of groups III and V were subjected to 50 minutes of acute intestinal ischemia followed by 60 minutes of reperfusion. The rats of group IV and V were pretreated with Allopurinol for three days before surgery. Total intestinal ischemia was produced by clamping the mesenteric vessels. Mucosal changes underwent histopathological evaluation according to the scoring system (0–5) described by Chiu. Biochemical tests of xanthine oxidase activity were performed in supernatants of small intestine homogenates.

Results: The administration of Allopurinol significantly reduced mesenteric ischemia-reperfusion injury as well as intestinal xanthine oxidase activity. However, there was no significant difference in the xanthine oxidase activity between non-pretreated rats subjected to ischemic processes and the control group. It was also noted that beneficial action of Allopurinol began during the ischemic phase, before reperfusion.

Conclusions: It can be concluded that the protective effect of Allopurinol against intestinal ischemia-reperfusion is not only related to the reperfusion component. The role of xanthine oxidase in the processes of injury resulting from blood flow disturbances remains a matter of controversy.

Key words: intestinal ischemia-reperfusion injury, allopurinol, xanthine oxidase

Wstęp

Zespół niedokrwienia i reperfuzji jelita cienkiego jest częstym zjawiskiem w praktyce klinicznej. Do całkowitego przerwania dopływu krwi dochodzi na skutek zatoru lub zakrzepicy tętnicy krezkowej górnej, zakrzepicy żył krezkowych oraz czynnościowego skurczu tętnic krezki [1]. Najczęstszą przyczyną krytycznego zmniejszenia ukrwienia jelit są wstrząsy: hipowolemiczny, kardiogeny i septyczny [2, 3]. Zaburzenia ukrwienia trzewnego towarzyszą mechanicznej strangulacyjnej niedrożności jelit [4, 5]. Może także do nich dojść w przypadku rozwarstwienia aorty [6] lub w efekcie operacji angiochirurgicznych wymagających zaciśnięcia aorty powyżej odejścia tętnicy krezkowej górnej [7]. Ponadto całkowite niedokrwienie jelita cienkiego jest naturalną konsekwencją zabiegów jego transplantacji [8]. Powrót właściwego napływu krwi do jelit, mimo oczywistych korzyści, może być przyczyną paradoksalnego pogłębienia miejscowych zmian spowodowanych niedokrwieniem [4, 8–10]. Sytuacja taka stwarza jednocześnie wyjątkowo wysokie ryzyko rozwoju niewydolności wielonarządowej [3].

Uraz niedokrwienno-reperfuzyjny jest efektem poddania tkanek przejściowej hipoksji oraz następującej po niej reoksygenacji. Przyczyną uszkodzenia komórek podczas ich niedotlenienia są zaburzenia bilansu energetycznego spowodowanego ustaniem produkcji energii w mitochondriach [9, 11–13]. Znacznie bardziej jest skomplikowany mechanizm paradoksalnego uszkodzenia reperfuzyjnego. Przyjmuje się, że podstawową wyzwalającą rolę odgrywają tu reaktywne formy tlenu (np. wolne rodniki) [13–17], których jednym z najważniejszych źródeł ma być enzym, tak zwana oksydaza ksantynowa, powstały w warunkach wcześniejszej hipoksji [2, 9, 13, 16–21]. Stres oksydacyjny spowodowany nadmierną generacją wolnych rodników tlenowych inicjuje zmiany odpowiedzialne za uszkodzenie komórek w przebiegu zespołu reperfuzyjnego: aktywację czynników regulujących ekspresję genów (NF- κ B, *nuclear factor- κ B*; AP-1; PPAR- γ , *peroxisome proliferator activated receptor*; HSTF; PARP) [14, 22, 23], pobudzenie elementów komórkowych mechanizmów obronnych (leukocyty, mastocyty, dopełniacz, cytokiny) [9, 15, 24], zaburzenia funkcji czynników endotelialnych (tlenek azotu, endoteliny, pochodne kwasu arachidonowego) [9, 15, 25], a także prostą bezpośrednią destrukcją molekuł białkowych, peroksydację lipidów czy utlenianie kwasów nukleinowych [9, 13, 15]. Konsekwencje reperfuzji jelit dodatkowo potęguje utrata integralności bariery śluzówkowej z translokacją drobnoustrojów i endotoksyn do krążenia ogólnego [3].

Jednym z dostępnych preparatów oddziałujących ochronnie na tkanki poddane czasowemu niedokrwieniu jest allopurinol [4, 13, 17, 24, 26–33]. Lek ten jest kompe-

Introduction

Acute mesenteric ischemia is a frequently occurring event in clinical practice. Total intestinal ischemia may be a consequence of a superior mesenteric artery embolism or thrombosis, mesenteric venous thrombosis or mesenteric arterial spasm [1]. The most frequent reason of intestinal hypoperfusion is prolonged hemorrhagic, cardiac or septic shock [2, 3]. Intestinal blood flow disturbances occur as a result of a strangulated ileus [4, 5], acute aortic dissection [6] or supravisceral aortic cross-clamping (above the superior mesenteric or celiac artery) [7]. Total mesenteric ischemia is also a natural consequence of small bowel transplantation procedures [8]. Reestablishment of circulation, known as reperfusion, may despite its clear benefits, initially results in exacerbation of local intestinal damage [4, 8–10]. Additionally such temporary incidents often trigger multiple organ dysfunction [3].

Ischemia-reperfusion injury is an effect of transient hypoxia followed by reoxygenation. Oxygen deficiency leads to an energy imbalance within the cells as a consequence of impaired mitochondrial function [9, 11–13]. The mechanism underlying the reoxygenation component is generally believed to be increased generation of reactive oxygen species (eg oxygen-derived free radicals) [13–17], the most important biological source of which is generated in hypoxia, the xanthine oxidase enzyme [2, 9, 13, 16–21]. Oxidative stress is caused by overproduction of oxygen-derived free radicals initiates: the activation of gene expression factors (NF- κ B, AP-1, PPAR- γ , HSTF, PARP) [14, 22, 23], the activation of cellular defence mechanisms (leukocytes, mastocytes, complement, cytokines) [9, 15, 24], dysfunction of endothelial factors (nitric oxide, endothelins, arachidonic acid derivatives) [9, 15, 25], or even direct protein destruction, lipid peroxidation and nucleic acid oxidation [9, 13, 15]. The consequences of intestinal reperfusion are additionally amplified by the loss of mucosal barrier integrity with bacterial/endotoxin translocation to the systemic circulation [3].

It has been shown that pretreatment with Allopurinol reduces the severity of tissue damage after ischemic events [4, 13, 17, 24, 26–33]. This protective effect of Allopurinol has been attributed to its xanthine oxidase inhibiting properties and limited directly to the reperfusion phase of injury. However, many discrepancies and even conflicting data have been noted, especially regarding Allopurinol's mechanism of action. At the same time, the role of xanthine oxidase in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury remains

tencyjnym inhibitorem oksydazy ksantynowej i właśnie z blokadą tego enzymu wiąże się mechanizm jego działania, co jest przyczyną identyfikowania efektywności allopurinolu wyłącznie z wpływem na zjawiska zachodzące w reperfundowanych tkankach. To z kolei spowodowało niemal zupełny brak w piśmiennictwie medycznym prac oceniających skuteczność allopurinolu także w kontekście uszkodzeń narządów przed przywróceniem w nich krążenia. Wiąże się z tym ponadto kwestia roli oksydazy ksantynowej w patomechanizmie urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Ponieważ w ocenie tych zagadnień można odnaleźć w literaturze wiele nieodmówień, a nawet sprzeczności, dlatego każda dodatkowa obserwacja, która może pomóc zrozumieć naturę opisywanych zjawisk oraz rolę, jaką może w nich odgrywać allopurinol, ma duże znaczenie praktyczne.

Celem pracy była ocena wpływu allopurinolu na rozwój urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego jelita cienkiego w kontekście oddziaływania tego leku na oksydazę ksantynową.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 70 szczurach rasy Buffalo, pochodzących z wsobnego szczepu, płci męskiej, o średniej wadze około 200 g. Eksperyment wykonywano zgodnie z ustalonymi zasadami wykorzystania zwierząt do badań naukowych. Szczury podzielono losowo na pięć równych grup: I grupa kontrolna — w której materiał do badania pobierano po 110 minutach od momentu wypreparowania pnia tętnicy kręzkowej górnej, na który nie zakładano zacisku naczyniowego; grupa II oraz IV — szczury, u których wywoływano 50-minutowe ostre niedokrwienie jelita; grupa III oraz V — szczury, u których po trwającym 50 minut ostrym niedokrwieniu jelita wywoływano jego 60-minutową reperfuzyję. Badany lek allopurinol podawano zwierzętom z grup IV i V przez 3 dni przed eksperymentem w wodzie do picia w średniej dawce 100 mg/kg wagi ciała na dobę.

Zabiegi chirurgiczne wykonywano w znieczuleniu ogólnym za pomocą bioketanu (Biowet-Polska), podawanego domięśniowo w dawce 60 mg/kg wagi ciała. Szczurowi ułożonemu na grzbiecie otwierano jamę brzuszną cięciem pośrodkowym, a następnie w krezce jelita cienkiego wypreparowywano pień tętnicy kręzkowej górnej. Na dalszym etapie u wszystkich zwierząt, z wyjątkiem grupy I, na uwidocznioną szypułę naczyniową zakładano jeden delikatny zacisk naczyniowy tuż za odejściem prawej tętnicy okrężniczej oraz kolejny zacisk zamykający kolateralne gałęzie odchodzące proksymalnie od tętnicy kręzkowej górnej. W ten sposób uzyskiwano niezależny od krążenia obocznego, wysoce powtarzalny model całkowitego ostrego niedokrwienia jelita cienkiego, powszechnie przyjęty w tego typu eksperymentach [31]. Niedokrwione jelita wraz z zaciskami naczyniowymi odprowadzono do jamy brzusznej, którą zamykano na okres 50 minut. Po tym czasie podczas kolejnej laparotomii u niektórych zwierząt (grupa III i V) zdejmowano zaciski naczyniowe, przywracając przepływy krwi w jelitach, a u pozostałych (grupa II i IV) wycinano końcowy, około 6-centymetro-

unclear and the significance of the reperfusion component is not well established. This experimental study was designed to clarify such controversy.

The purpose of this investigation was to evaluate the effect of Allopurinol on intestinal ischemia-reperfusion injury progress and on the xanthine oxidase system.

Material and methods

All studies were performed on 70 inbred male Buffalo rats weighing 200 g on average. All trial procedures were performed in accordance with the rules concerning the involvement of animals in scientific investigations. The animals were divided randomly into the following 5 groups of 14: group I (control group) — the superior mesenteric artery was isolated but not occluded and the specimens were harvested after 110 minutes; groups II and IV — the rats were subjected to 50 minutes of acute intestinal ischemia; groups III and V — the rats were subjected to 50 minutes of acute intestinal ischemia followed by 60 minutes of reperfusion. The rats of groups IV and V were pretreated with Allopurinol for three days before surgery — the substance was given orally in drinking water in doses of 100 mg per kilogram of body weight per day.

The surgical procedures were performed under light general anaesthesia achieved by intramuscular injection of Bioketane (Biowet-Poland) in a dose of 60 mg per kilogram of body weight. The abdominal cavity was opened using the midline incision and the superior mesenteric artery was dissected and exposed. Total intestinal ischemia was produced by clamping the mesenteric vessels just distal to the right colic artery using atraumatic vascular clips. Collateral arcades from the right colic artery and the jejunal arteries proximal to the site of occlusion were also clamped. This method allowed the production of the reproducible and independent of collateral circulation model of intestinal ischemia commonly used in such experimental studies [31]. In all groups the bowel was returned to the abdominal cavity for the remainder of the ischemic period. After 50 minutes the abdominal cavity was reopened. In groups III and V an intestinal reperfusion was produced by removing vascular clips while in groups II and IV the distal part of ileum (about 6 cm) was harvested. The intestinal segments were washed out with physiological saline and divided into 2 fragments: proximal for histopathological evaluation, distal for biochemical tests. An ileal resection in groups III and V was performed after 60 minutes of reperfusion.

Intestinal samples obtained for histopathological evaluation were fixed in a 5% buffered formaldehyde solution and used for preparing of hematoxyline and eosine (H-E) stained paraffin preparations. Morphological changes were evaluated according to the scoring system (0–5) described by C.J. Chiu [11], (where 0 means normal mucosal villi, while 5 signifies total disintegration of the mucosal lamina propria). The remaining fragments were temporarily frozen and stored at -80°C . After homogenization and centrifugation these samples were

wy, odcinek niedokrwionego jelita krętego. Po przepłukaniu światło jelita dzielono na fragmenty, z których proksymalny przeznaczono do badania histologicznego, a część dystalną do oznaczeń biochemicznych. Szczurom, u których wywołano reperfuzyję jelit (grupa III i V), powłoki ciała zamykano na dalsze 60 minut, po czym w sposób już opisany pobierano fragmenty jelita cienkiego do analizy.

Fragmenty jelita, pobrane do badań histologicznych, utrwalano w 5-procentowym zbuforowanym roztworze formaldehydu, a następnie przygotowywano z nich preparaty parafinowe barwione hematoksyliną i eozyną. Rozmiar uszkodzenia jelitowej błony śluzowej oznaczano, stosując metodę półilościową z przedstawieniem wyników w formie 6-stopniowej skali punktowej (0–5) według Chiu [11], przy czym stopień 0 oznacza prawidłowy obraz błony śluzowej, a stopień 5 odpowiada całkowitej dezintegracji blaszki właściwej błony śluzowej. Fragmenty ściany jelita pobrane do analizy biochemicznej były doraźnie zamrażane i przechowywane w temperaturze -80°C . Po homogenizacji i odwirowaniu oznaczano w nich aktywność oksydazy ksantynowej (E.C.1.17.3.2; zgodnie z protokołem Boehringer Mannheim, Biochemica Information). Wyniki pomiarów wyrażano w jednostkach aktywności (U) w przeliczeniu na gram tkanki. W analizie statystycznej wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono wyniki dotyczące stopnia uszkodzenia śluzówki jelita cienkiego w badanych grupach szczurów. Na ich podstawie można stwierdzić, że całkowite 50-minutowe ostre niedokrwienie jelita powoduje wystąpienie głębokiego uszkodzenia jego śluzówki, które ulega częściowemu zmniejszeniu już po 60 minutach od momentu przywrócenia w nim krążenia. Obserwuje się jednocześnie silnie protekcyjny wpływ wywierany przez allopurinol na rozwój zmian w jelicie poddanemu przejściowemu niedokrwieniu i następnej reperfuzyji, przy czym efekt jego działania jest widoczny już w fazie przed przywróceniem krążenia. Wszystkie opisane zależności są znamienne statystycznie na poziomie $p < 0,001$.

W tabeli II przedstawiono dane dotyczące aktywności oksydazy ksantynowej w homogenacie ściany jelita cienkiego w poszczególnych grupach szczurów. W przeprowadzo-

used in a biochemical analysis of xanthine oxidase activity (E.C.1.17.3.2; in agreement with the protocol of Boehringer Mannheim, Biochemica Information). Enzymatic activity was expressed in activity units (U) per one gram of tissue. Statistical differences between the groups were assessed using the non-parametric Mann-Whitney test.

Results

The results shown in Table I illustrate the histological sequence of mucosal damage in rats subjected to intestinal ischemia and subsequent reperfusion. The findings revealed that 50 minutes of acute total intestinal ischemia in rats produces profound mucosal lesions, which were reduced after 60 minutes of subsequent reperfusion. The administration of Allopurinol significantly reduced mesenteric ischemia-reperfusion injury. It was also noted that the beneficial action of Allopurinol began during the ischemic phase, before reperfusion. All differences are statistically significant ($p < 0.001$).

Table II presents intestinal xanthine oxidase activity in rats subjected to mesenteric ischemia-reperfusion injury. The presented data show that there was no significant difference in the xanthine oxidase activity between non-pretreated rats subjected to ischemic processes and the control group. The administration of Allopurinol significantly reduced intestinal xanthine oxidase activity in all cases ($p < 0.001$).

Discussion

Until the mid 80s the processes of tissue destruction occurring during ischemia were equated only with the hypoxia while revascularization was treated as an immediate reversion of negative hypoxia effects. A breakthrough occurred due to the research of Granger and Parks. They discovered that morphological changes after the 3 hours of intestinal ischemia resulting from hypotension with the following 1 hour reperfusion are significantly bigger than changes after 4 hours of ischemia [10]. The progression of ischemia injury that occurs after the reestablishment of blood flow is observed in the situation of a "window of reperfusion injury". This means

Tabela I. Stopień uszkodzenia błony śluzowej jelita cienkiego w poszczególnych grupach szczurów w skali punktowej (0–5) według C.J. Chiu

Table I. Mucosal histopathological changes in rats subjected to mesenteric ischemia-reperfusion injury according to the scoring system (0–5) described by C.J. Chiu

	Grupa I — kontrolna <i>Control I</i>	Grupa II — niedokrwienie <i>Group II — ischemia</i>	Grupa III — niedokrwienie/ /reperfuzyja <i>Group III — ischemia/ /reperfusion</i>	Grupa IV — niedokrwienie + allopurinol <i>Group IV — ischemia + allopurinol</i>	Grupa V — niedokrwienie/ /reperfuzyja + allopurinol <i>Group V — ischemia/ /reperfusion + allopurinol</i>
Wartość średnia <i>Mean value</i>	0	4,21	2,25	2,25	1,43
Odchylenie standardowe <i>Standard deviation</i>	0	0,58	0,47	0,61	0,65
Statystyka: I vs. II $p < 0,001$; I vs. III $p < 0,001$; I vs. IV $p < 0,001$; I vs. V $p < 0,001$; II vs. III $p < 0,002$; IV vs. V $p < 0,001$; II vs. IV $p < 0,001$; III vs. V $p < 0,001$ <i>Statistics:</i>					

Tabela II. Aktywność oksydazy ksantynowej w homogenacie ściany jelita cienkiego szczurów poddanych urazowi niedokrwienno-reperfuzyjnemu, wyrażona w mU/g tkanki**Table II. Intestinal xanthine oxidase activity in rats subjected to mesenteric ischemia-reperfusion injury expressed in mU/g tissue**

	Grupa I — kontrolna <i>Control I</i>	Grupa II — niedokrwienie <i>Group II — ischemia</i>	Grupa III — niedokrwienie/ /reperfuzyja <i>Group III — ischemia/ /reperfusion</i>	Grupa IV — niedokrwienie + allopurinol <i>Group IV — ischemia + allopurinol</i>	Grupa V — niedokrwienie/ /reperfuzyja + allopurinol <i>Group V — ischemia/ /reperfusion + allopurinol</i>
Wartość średnia <i>Mean value</i>	82,4	70,8	75,0	7,7	3,1
Odchylenie standardowe <i>Standard deviation</i>	33,4	35,1	41,8	6,6	3,8
Statystyka: I vs. II NS; I vs. III NS; I vs. IV p < 0,001; I vs. V p < 0,001; II vs. III NS; IV vs. V NS; II vs. IV p < 0,001; III vs. V p < 0,001 <i>Statistics:</i>					

nym eksperymencie uraz niedokrwienno-reperfuzyjny jelita cienkiego nie wpłynął na aktywność badanego enzymu. Silnie hamujący wpływ został natomiast wywarty na aktywność oksydazy ksantynowej przez podaż allopurinolu, zarówno w niedokrwionym jelicie poddanym następowej reperfuzyji, jak i w przypadku braku jej rewaskularyzacji (p < 0,001).

Dyskusja

Do połowy lat 80. XX wieku procesy destrukcji tkanek, zachodzące po ustaniu dopływu krwi, utożsamiano wyłącznie z ich niedotlenieniem, a rewaskularyzację traktowano jako natychmiastowe przerwanie niekorzystnych skutków trwającej hipoksji. Przełomowe okazały się badania Grangera i Parks [10], którzy stwierdzili, że zmiany morfologiczne po 3 godzinach wywołanego hipotensją niedokrwienia jelit u szczura z następową godzinową reperfuzyją są wyraźnie większe niż po 4 godzinach ich niedokrwienia. Progresję urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego, występującą po przywróceniu krążenia, można zaobserwować w sytuacji tak zwanego „okna urazu reperfuzyjnego”, czyli nie stwierdza się pogłębienia zmian, jeśli uszkodzenia spowodowane niedokrwieniem są zbyt małe, aby zainicjować kaskadę urazu rewaskularyzacyjnego, lub przeciwnie, są one zbyt duże, aby mogły ulec dalszemu nasileniu [9, 13]. Istotną jest tutaj także dynamika zmian w reperfundowanych tkankach, które ulegając początkowo pogłębieniu, po kilkunastu minutach mogą już tej progresji nie wykazywać [34]. Granger i Parks [17] wykazali, że reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia reperfuzyjne oraz że zmiany te ulegają zahamowaniu pod wpływem stosowania allopurinolu — związku będącego kompetencyjnym inhibitorem oksydazy ksantynowej (XO, *xanthine oxidase*). McCord [35], który jako pierwszy opisał zdolność XO do produkcji RFT, na podstawie wyżej wymienionych eksperymentów wysunął hipotezę, że molekularnym wyzwalaczem rozwoju urazu reperfuzyjnego jest właśnie oksydaza ksantynowa, która powstała w warunkach niedotlenienia na skutek konwersji z pokrewnej jej dehydrogenazy ksantynowej (XDH, *xanthine dehydrogenase*) [16]. Teoria ta powstała już około 20 lat temu i w powszechnej świadomości jest przyjmowana bez zastrzeżeń [9, 13, 17, 18, 20, 36]. W związku z tym

that the damage progression is not observed when the damage is too small to cause cascade of revascularization injury or just the opposite — the damage is so large that it cannot increase [9, 13]. Obviously, the dynamics of changes in the tissue being reperfused is also important. The changes that initially increase after several minutes may not reveal progression [34]. Granger and Parks pointed out that the reactive oxygen species (ROS) are jointly responsible for the reperfusion injury. Meanwhile the injuries were reduced by the influence of Allopurinol which is a competitive inhibitor of xanthine oxidase (XO) [17]. McCord was the first to describe the ability of XO to produce ROS [35]. On the basis of the aforementioned experiments, he stated a hypothesis that the molecular trigger of a reperfusion injury is XO which is derived from related xanthine dehydrogenase (XDH) in oxygen deficiency conditions [16]. This theory is 20 years old and in the common view is approved with no objections [9, 13, 17, 18, 20, 36]. It is then surprising to find many works in the literature whose results seem to question the major role of the XO in the described processes. It also occurs that there has been no research done to definitively confirm this role. Definite proof may be obtained by restraining in specific way, with the use of genetic engineering, the conversion of XDH to XO [20]. Hitherto, attempts to restrain conversion, such as the use of non-specific serine proteases inhibitors, has simultaneously influenced the other factors responsible for the revascularization injury (e.g. leukocyte enzymes). The role of XO in an ischemia-reperfusion injury is then confirmed only with indirect premises. Some of these premises result from the observation of ROS which are the important factors responsible for injury development. When the blood flow was reestablished the increase in the ROS level was observed [14, 37]. Then the negative effects of reperfusion were reduced with the administration of antioxidative enzymes [17, 29]. Since XO shows the ability to produce ROS, the destructive influence of ROS to the tissues is the first indirect premise [35]. Another premise is the occurrence of the rise in activity of XO within the ischemic tissues, as the result of XDH conversion. The first to examine this phenomenon were Roy and McCord [38]. They found that in the intestinal mucosa of a rat, the full conversion of XDH to XO occurs

zaskakujący jest fakt, jak wiele można odnaleźć w literaturze prac, których wyniki wydają się kwestionować główną rolę XO w omawianych procesach. Jednocześnie okazuje się, że dotychczas nie przeprowadzono badań, które w sposób jednoznaczny potwierdzałyby tę rolę. Ostateczny dowód można uzyskać, hamując, z wykorzystaniem inżynierii genetycznej, w sposób specyficzny konwersję XDH do XO [20]. Dotychczasowe próby takiej blokady, za pomocą chociażby niespecyficznych inhibitorów proteaz serynowych, wpływały jednocześnie na inne czynniki odpowiedzialne za uszkodzenie rewaskularyzacyjne (np. enzymy leukocytarne). W tej sytuacji rolę XO w urazie niedokrwiennie-reperfuzyjnym potwierdzają wyłącznie świadectwa pośrednie. Część z nich wynika z obserwacji, że w rozwoju tego uszkodzenia niezwykle ważną funkcję pełnią wolne rodniki tlenowe. Potwierdzono to, wykazując wzrost stężenia RFT [14, 37], następujący po przywróceniu krążenia, oraz uzyskując złagodzenie następstw reperfuzji w efekcie zastosowania enzymów antyoksydacyjnych [17, 29]. Wykazywana przez XO zdolność do produkcji RFT, wpływających destrukcyjnie na tkanki, w tym momencie stanowi pierwszy ze wspomnianych dowodów pośrednich [35]. Kolejnym jest stwierdzane w niedokrwiennych tkankach zjawisko wzrostu aktywności XO na skutek konwersji z XDH. Pierwszymi, którzy badali ten fenomen, byli Roy oraz McCord [38]. Stwierdzili oni, że w błonie śluzowej jelita cienkiego szczeniaka pełna konwersja XDH do XO następuje już w ciągu pierwszej minuty niedokrwienia. Nieco odmienne wyniki uzyskał Parks [36], który zaobserwował, że w 1., 2. i 3. godzinie niedokrwienia jelit, odpowiednio tylko 34%, 46% i 61% z łącznej aktywności obydwu oksydoreduktaz ksantynowych stanowiła oksydaza. Jednocześnie fizjologicznie, w grupie kontrolnej proporcja ta wynosiła 19%. Zjawisko nasilenia aktywności XO w efekcie ostrego niedokrwienia jelit potwierdzili także inni badacze [12, 37, 39]. Trzeci, najważniejszy dowód, opiera się na fakcie, iż środki hamujące aktywność XO: aldehyd pterynowy [18], dieta pozbawiona molibdenu i jednocześnie wzbogacona w wolfram [13], a przede wszystkim stosowanie allopurinolu są bardzo skuteczne w łagodzeniu następstw urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego zarówno jelit [4, 13, 24, 26, 29, 31], jak i innych narządów [27, 28, 30, 32, 33]. Wysoką efektywność ochronną allopurinolu potwierdzono w zrealizowanym przez autorów artykułu eksperymencie. Jednocześnie pod jego wpływem zdecydowanie zmniejszyła się aktywność jelitowa XO i potwierdzałyby to rolę tego enzymu w rozwoju urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego jelit. Z drugiej jednak strony, niedokrwienie jelita cienkiego nie spowodowało wzrostu aktywności zawartej w nim XO, co nie musi podważać roli XO w indukcji uszkodzenia reperfuzyjnego. Na ten temat pisze Hammerman [19], który mimo że w efekcie długotrwałej okluzji tętnicy krezkowej górnej nie obserwował również zmian stężenia XO, to jednocześnie wykazał zdecydowane obniżenie stężenia XDH. Tym samym procentowy udział oksydazy w łącznej aktywności XO + XDH zmienił się z 28% do 41%, świadcząc o zaistniałej konwersji XDH do XO. Frederiks [40], który nie stwierdzał także nasile-

during the first minute of ischemia. Slightly different results were found by Parks [36]. He observed that in the 1st, 2nd, and the 3rd hour of intestine ischemia only 34%, 46% and 61%, respectively, of the xanthine oxidoreductases was XO. Simultaneously in the comparison group, physiologically the proportion was 19%. The occurrence of the strengthening XO activity as a result of acute intestine ischemia has been confirmed by other researchers [12, 37, 39]. The third, most important proof is based on the fact, that the factors hindering XO activity: pterine aldehyde [18], tungsten-supplemented molybdenum-free diet [13], and most of all — Allopurinol — are effective in diminishing the results of ischemia-reperfusion injury. This concerns the intestine [4, 13, 24, 26, 29, 31] as well as to other organs [27, 28, 30, 32, 33]. In the experiment executed by us, the high protective effectiveness of Allopurinol was confirmed. At the same time under the influence of Allopurinol, XO activity in intestines was reduced. This may confirm the role of the XO enzyme in the development of ischemia-reperfusion injury. On the other hand an intestinal ischemia itself does not cause the increase in the activity of mucosal XO. A latter occurrence, however, does not necessarily challenge the role of XO in the induction of reperfusion damage. Hammerman has described the effects of long term superior mesenteric artery occlusion which did not lead to the increase of XO level. At the same time he observed a distinct decrease of XDH content. Hence the percentage of oxidase in total XDH + XO activity altered from 28% to 41%, revealing the occurred conversion XDH to XO [19]. Frederiks, who also has not observed an increase of XO activity in intestinal mucosa, pointed out the significant changes of the enzyme distribution in particular cells. As a result, there was a substantial increase of XO activity in the basal regions of the epithelium while in the summit regions this activity decreased [40]. Different assumptions that confirmed the role of XO in reperfusion injury due to the observed lack of conversion have been made by Nishino. According to his theory the accumulation of nicotinamide adenine nucleotides occurring in ischemia conditions competitively inhibits XDH. This results in the intensified oxidation of purine nucleotide degradation products by XO which is left with no "competition". Hence, XO may become the cause of the excessive synthesis of ROS which are responsible for reperfusion injury induction [21]. However, there are also other theories. One of them states that the cause of the XDH conversion to XO is not tissue ischemia but its homogenization during biochemical processing [40]. Another one states that in some conditions it is possible that the XDH becomes the direct source of ROS [20]. The role of XO as the molecular trigger of intestine reperfusion injury may be also questioned by the high spread of the mucosal xanthine oxidoreductases activities of different species [39]. The total XO+XDH activity in the intestine of the rat is estimated at a level of 150 mU/g while in the human intestine it is 30 mU/g and only 1.5 mU/g in the intestine of the pig [5].

nia aktywności XO w błonie śluzowej jelita szczurów, zwrócił uwagę na istotne zmiany rozmieszczenia badanego enzymu w poszczególnych komórkach. W efekcie doszło do istotnego wzrostu aktywności XO w regionach podstawnych kosztem regionów szczytowych epitelium [40]. Inne założenia potwierdzające rolę XO wobec wykazywanego braku konwersji XDH przyjął Nishino [21]. Według niego akumulacja nukleotydów nikotynoamido-adeninowych, zachodząca podczas niedokrwienia, blokuje kompetencyjnie XDH, w związku z czym pozbawiona „konkurencji” XO utlenia produkty degradacji zasad purynowych w znacznie większych niż dotąd ilościach. Tym samym XO mogłaby się stać przyczyną nadmiernej syntezy RFT odpowiedzialnych za indukcję urazu reperfuzyjnego [21]. Jednocześnie jednak w literaturze można odnaleźć teorię, że przyczyną konwersji XDH do XO nie może być niedotlenienie tkanek, ale ich homogenizacja podczas obróbki biochemicznej [40]. Ponadto możliwe jest wystąpienie sytuacji, w której źródłem wolnych rodników staje się bezpośrednio XDH [20]. Rolę XO jako wyzwalacza urazu reperfuzyjnego jelit wydaje się również kwestionować wybitna rozpiętość poziomów oksydoreduktaz ksantynowych w błonie śluzowej poszczególnych gatunków zwierząt [39]. Ocenia się łączną aktywność XO + XDH w ścianie jelita krętego szczura na 150 mU/g, przy 30 mU/g u człowieka i zaledwie 1,5 mU/g u świni [5].

Jak już wspomniano, najważniejszym pośrednim dowodem roli XO w rozwoju urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego jest efekt ochronny wywierany na tkanki poddane takiemu urazowi przez środki hamujące aktywność XO. Okazuje się jednak, że nie jest to regułą. Wykazał to Nalini, który za pomocą diety bezmolibdenowej, bogatej w wolfram, u szczurów uzyskał 80-procentowy spadek aktywności XO, a mimo to uraz niedokrwienno-reperfuzyjny jelit nie uległ osłabieniu [37]. Innym badaczem, który stwierdził, że blokada XO może nie mieć związku przyczynowo-skutkowego z efektywnością ochrony tkanek przed następstwami ich przejściowego niedokrwienia był Garcia. Porównując działanie allopurinolu w dwóch grupach szczurów, z których jedna otrzymywała go 2 godziny przed czasowym zamknięciem tętnicy kręzkowej górnej, podczas gdy w drugiej rozpoczęto jego podaż dobowo wcześniej, ochronny wpływ leku stwierdzono tylko u zwierząt dłużej go przyjmujących. Okazało się to ściśle związane ze zdecydowanie wyższym stężeniem leku w ścianie jelita drugiej grupy szczurów, natomiast nie wiązało się z aktywnością XO, która wykazywała identyczny stopień zahamowania u wszystkich zwierząt [26].

Zakładając, że mechanizmem działania allopurinolu jest hamowanie porewaskularyzacyjnego stresu oksydacyjnego, za naturalne można uznać wyniki badań, w których lek ten zadziałał ochronnie, mimo że był podany dożylnie tuż przed rewaskularyzacją niedokrwionych tkanek [2, 4, 24]. Z drugiej jednak strony, można znaleźć również takie prace, w których podaż allopurinolu tuż przed zwolnieniem zacisków naczyniowych z naczyń kręgowych nie wpływała w istotny sposób na stopień uszkodzenia jelitowej błony śluzowej [41]. Obserwacje te są szczególnie interesujące w kontekście wykazanego

As mentioned above, the protective effect of the factors that inhibits XO activity is the main proof for the role of XO in ischemia-reperfusion injury development. It turns out however, that such an effect is not a general rule. Nalini, who obtained in rats an 80% decrease in XO activity by means of a tungsten-supplemented molybdenum-free diet, observed that ischemia-reperfusion injury was not reduced [37]. Garcia was another researcher who stated that the inhibition of XO may not be directly related with the effectiveness of tissue protection against consequences of transient ischemia. He compared the effect of Allopurinol administration to 2 groups of rats from which one group had been provided with Allopurinol 2 hours before temporary occlusion of the superior mesenteric artery, while the rats of the other group had started to receive the medication the previous day. The protective effect was observed only in the rats from the group being under the longer influence of Allopurinol. The effects were strictly connected with the higher content of the medication in the intestinal mucosa but they were not related to XO activity which was inhibited to the same extent in both groups of animals [26].

The results of studies which demonstrate the protective effect of Allopurinol, even if it is administered intravenously just before revascularization of ischemic tissues, are regarded as natural and obvious because the protective effect of this substance has been identified with inhibition of postrevascularizational oxidative stress [2, 4, 24]. On the other hand, articles may be found in the medical literature proving that administration of Allopurinol followed by immediate revascularization did not significantly influence intestinal ischemia-reperfusion injury [41]. These observations are especially interesting in the context of Allopurinol's protective effect already at the phase before the reestablishment of the blood flow, that means directly in the ischemic injury which has been shown in our experiment. It is particularly worth noticing as there is very little information on this subject in the literature [27, 30, 31]. Due to the fact that the oxidative stress induced by XO does not appear in the case of ischemia, the outcome of the experiment can be considered amazing. To explain this phenomenon it is important to notice the features of Allopurinol, which are rarely mentioned in the literature. The most important of its properties is the ability to protect cellular energy sources. On one hand, the cause of it is the inhibition of xanthine oxidoreductases, as a result of which the final metabolism stage of high-energy adenine nucleotides becomes disturbed. This prevents the irreversible loss of the nucleotides [13, 27, 30]. On the other hand, the phenomenon is caused by an increased production of high-energy compounds accomplished by mitochondrial membrane stabilization [27] as well as facilitated transport of electrons in the mitochondrial electron transport chain [42]. What is more, Allopurinol in a high concentration, has the ability of direct ROS scavenging [13, 43], which plays an important role in the case of both the reperfused and ischemic tissues. The first situation does not require any comment. The cause of the second is the fact of ROS forming even

w eksperymencie autorów artykułu protekcyjnego działania allopurinolu w urazie stricte niedokrwinnym, czyli w fazie przed przywróceniem krążenia. Wymaga to szczególnego podkreślenia, ponieważ w literaturze światowej istnieje niewiele doniesień na ten temat [27, 30, 31]. Z uwagi na fakt, iż w niedokrwieniu nie dochodzi do indukowanego przez XO stresu oksydacyjnego, wynik ten można uznać za zaskakujący. Jego wytłumaczeniem są bardzo rzadko podkreślane w piśmiennictwie właściwości allopurinolu. Najważniejszą z nich jest zdolność do ochrony komórkowych zasobów energetycznych. Przyczyną tego zjawiska z jednej strony jest blokada oksydoreduktaz ksantynowych, w efekcie czego zostaje zakłócony końcowy etap metabolizmu wysokoenergetycznych nukleotydów adeninowych, zapobiegając ich nieodwracalnej utracie [13, 27, 30], a z drugiej strony nasilenie produkcji związków wysokoenergetycznych, osiągnięte przez stabilizację błon mitochondrialnych [27], oraz ułatwienie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów [42]. Ponadto lek ten w wysokich stężeniach posiada zdolność do bezpośredniego zmiatania RFT [13, 43], co mogło mieć znaczenie zarówno w tkankach reperfundowanych, jak i niedokrwionych. Pierwsza sytuacja nie wymaga komentarza, natomiast przyczyną drugiej jest fakt tworzenia się RFT w mitochondriach, nawet w warunkach hipoksji, przy współdziałaniu resztkowego tlenu [44].

Mimo dyskusyjnego mechanizmu działania, nie można kwestionować efektywności działania allopurinolu na modelu zwierzęcym. W związku z tym zaskakuje fakt, że dotychczas nie przeprowadzono oceny jego wpływu na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne jelit u człowieka. Realizacja takich badań jest wysoce celowa, a przemawia za tym dodatkowo fakt, iż lek ten jest mało toksyczny, ogólnie dostępny i często stosowany u ludzi.

Wnioski

1. Allopurinol obniża aktywność jelitową oksydazy ksantynowej i jednocześnie łagodzi stopień zaawansowania zmian histologicznych śluzówki jelita cienkiego poddanego przejściowemu niedokrwieniu i następowej reperfuzji, przy czym efekt jego działania jest już zaznaczony w fazie przed przywróceniem krążenia.

2. Pogląd, że protekcyjne działanie allopurinolu, będącego inhibitorem oksydazy ksantynowej, potwierdza rolę oksydazy ksantynowej w rozwoju urazu reperfuzyjnego, jest kontrowersyjny, podobnie jak sam udział oksydazy w rozwoju tego urazu.

Piśmiennictwo (References)

1. Park WM, Głowiczki P, Cherry KJ Jr *et al.* Contemporary management of acute mesenteric ischemia. *J Vasc Surg.* 2002; 35: 445–452.
2. Flynn WJ Jr, Pilati D, Hoover EL. Xanthine oxidase inhibition prevents mesenteric blood flow deficits after resuscitated hemorrhagic shock by preserving endothelial function. *J Surg Res.* 1997; 68: 175–180.

in hypoxia conditions with the participation of mitochondrial residual oxygen [44].

Despite its simplicity, this experimental model allows practical conclusions to be drawn regarding the effects of Allopurinol on small intestinal injury caused by temporal ischemia. Although its action mechanism remains to a certain extent unclear, the significant protective role of Allopurinol in animal models was proved. The feasibility of using Allopurinol to counter situations of intestinal ischemia and reperfusion in humans should be evaluated, especially when such situations are predictable.

Conclusions

1. The administration of Allopurinol significantly reduces mesenteric ischemia-reperfusion injury as well as intestinal xanthine oxidase activity. The beneficial action of Allopurinol begins during the ischemic phase, before reperfusion.

2. The protective effect of Allopurinol against intestinal ischemia-reperfusion in rats cannot be related only to the blocking of the xanthine oxidase system. The role of xanthine oxidase in the processes of injury resulting from blood flow disturbances remains a matter of controversy.

3. Pastores SM, Katz DP, Kveran V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Gastroenterol.* 1996; 91: 1697–1710.
4. Akgur FM, Olguner M, Yenici O, Gokden M, Aktung T, Yilmaz M, Atac G. The effect of allopurinol pretreatment on intestinal hypoperfusion encountered after correlation of intestinal volvulus. *J Pediatr Surg.* 1996; 31: 1205–1207.
5. Blikslager A, Roberts MC, Rhoads JM, Argenzio RA. Is reperfusion injury an important cause of mucosal damage after porcine intestinal ischemia. *Surgery* 1997; 121: 526–534.
6. Neri E, Sassi C, Massetti M *et al.* Nonocclusive intestinal ischemia in patients with acute aortic dissection. *J Vasc Surg.* 2002; 36: 738–745.
7. Juel IS, Solligard E, Lyng O *et al.* Intestinal injury after thoracic aortic cross-clamping in the pig. *J Surg Res.* 2004; 117: 283–295.
8. Filez L, Penninckx F, Stalmans W, Kerremans R, Geboes K. Prevention of mucosal reperfusion damage after orthotopic small bowel autotransplantation in cats. *Transplant Proc.* 1994; 26: 1485–1488.
9. Byrka-Owczarek K. Ocena ochronnego działania wybranych leków antyoksydacyjnych na jelito cienkie królika doświadczalnie uszkodzone niedokrwieniem i reperfuzją. Rozprawa doktorska. Śląska Akademia Medyczna, Zabrze 1999.
10. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion. *Am J Physiol.* 1986; 250: G749–753.
11. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesions in low-flow states. A morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970; 101: 478–483.
12. Nakao M, Hirata Y, Taguchi T, Yamada T, Rahman MS, Suita S. Energy metabolism and xanthine oxidase enzyme system during ischemia reperfusion in rat small intestine. *Transplant Proc.* 1996; 28: 2614.

13. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993; 21 (9): 1376–1386.
14. Fan H, Sun B, Gu Q, Lafond-Walker A, Cao S, Becker LC. Oxygen radicals trigger activation of NF-kappaB and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. *Am J Physiol.* 2002; 282: H1778–1786.
15. Kamiński KA, Bonda TA, Korecki J, Musiał W. Oxidative stress and neutrophil activation — the two keystones of ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2002; 86: 41–59.
16. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982; 60: 1346–1352.
17. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82: 9–15.
18. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80–84.
19. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS *et al.* Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999; 29: 69–74.
20. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002; 9: 161–175.
21. Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K *et al.* Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem Soc Trans.* 1997; 25: 783–786.
22. Di Paola R, Genovese T, Caputi AP, Threadgill M, Thiemermann C, Cuzzocrea S. Beneficial effects of 5-aminoisoquinolinone, a novel, potent, water-soluble, inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2004; 492: 203–210.
23. Stojadinovic A, Kiang J, Smallridge R, Galloway R, Shea-Donohue T. Induction of heat-shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine. *Gastroenterology* 1995; 109: 505–515.
24. İlhan H, Alatas O, Tokar B, cOlak O, Pasaoglu O, Koku N. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody, allopurinol, and methylene blue on intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2003; 38: 1591–1595.
25. Ozturk H, Aldemir M, Dokucu AI, Yagmur Y, Kilinc N, Sahin AH. The nitric oxide donor molsidomine prevents ischemia/reperfusion injury of the adult rat small intestine. *Pediatr Surg Int.* 2003; 19: 305–308.
26. Garcia JG, Rollan CM, Enrriquez R, Madruga MH *et al.* Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine-oxidase inhibition. *J Surg Res.* 1990; 48 (2): 144–146.
27. Godin DV, Bhimji S. Effects of allopurinol on myocardial ischemic injury induced by coronary artery ligation and reperfusion. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36: 2101–2107.
28. Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB, Saedi SF. A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *Am Heart J.* 1991; 121 (1 Pt 1): 20–24.
29. Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg.* 1999; 42: 427–431.
30. Khatib SY, Farah H, El-Migdadi F. Allopurinol enhances adenosine nucleotide levels and improves myocardial function in isolated hypoxic rat heart. *Biochemistry* 2001; 66: 328–333.
31. Megison SM, Horton JW, Chao H, Walker PB. Prolonged survival and decreased mucosal injury after low-dose enteral allopurinol prophylaxis in mesenteric ischemia. *J Pediatr Surg.* 1990; 25: 917–921.
32. Mikrut K, Krauss H, Koźlik J. *et al.* Effect of antioxidants and of the xanthine oxidase inhibitor on the level of free radicals as well as the antioxidative activity of enzymes in rat skeletal muscles during acute ischemia and reperfusion. *Med Sci Mon.* 1998; 4: 222–227.
33. Rhoden E, Teloken C, Lucas M *et al.* Protective effect of allopurinol in the renal ischemia-reperfusion in uninephrectomized rats. *Gen Pharmacol.* 2002; 35: 189–193.
34. Ikeda H, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998; 42: 530–537.
35. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 1968; 243: 5753–5760.
36. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988; 254: 768–774.
37. Nalini S, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemia/reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. *Mol Cell Biochem.* 1993; 124: 59–66.
38. Roy RS, McCord JM. Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. W: Oxy radicals and their scavenger systems. Greenwald RA, Cohen G. (ed). Elsevier Science Publishing, New York 1983; 145–153.
39. Bianciardi P, Scorza R, Ghilardi G, Samaja M. Xanthine oxidoreductase activity in ischemic human and rat intestine. *Free Radic Res.* 2004; 38: 919–925.
40. Frederiks WM, Marx F, Kooij A. The effect of ischaemia on xanthine oxidase activity in rat intestine and liver. *Int J Exp Path.* 1993; 74: 21–26.
41. Horne MM, Pascoe PJ, Ducharme NG, Barker IK, Grovum WL. Attempts to modify reperfusion injury of equine jejunal mucosa using dimethylsulfoxide, allopurinol and intraluminal oxygen. *Vet Surg.* 1994; 23: 241–249.
42. Peterson DA, Kelly B, Gerrard JM. Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury? *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 137: 76–79.
43. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JMC. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 1987; 213: 23–28.
44. Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29: 2571–2583.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr hab. med. Artur Pupka
 ul. Poniatowskiego 2, 50–326 Wrocław
 tel./faks: (071) 733–22–99
 e-mail: apupka@chirn.am.wroc.pl