Učinak pentadekapeptida BPC 157 na ishemijsko/reperfuzijske ozljede u mozgu štakora

Vukojević, Jakša

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:222507

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Jakša Vukojević

Učinak pentadekapeptida BPC 157 na ishemijsko/reperfuzijske ozljede u mozgu štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Jakša Vukojević

Učinak pentadekapeptida BPC 157 na ishemijsko/reperfuzijske ozljede u mozgu štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

Rad je izrađen u laboratorijima Zavoda za farmakologiju i Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: Izv. prof. Alenka Boban Blagaić, dr.vet.

Doc. Danijela Kolenc, dr.med.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Alenki Boban-Blagaić i doc. dr. sc. Danijeli Kolenc, voditeljima rada, i prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, na pomoći, podršci i nesebičnome trudu, bez kojih realizacija ovog znanstvenog rada ne bi bila moguća.

Zahvalnost upućujem i Ivanu Gržibovskom te djelatnicama molekularnog laboratorija Zavoda za patologiju koji su pomogli oko pripreme uzoraka te vodili brigu o eksperimentalnima životinjama i uzorcima.

SADRŽAJ

	Stranica
1. Uvod	1
1.1. BPC i Pentadekapeptid BPC 157	1
1.1.1. Lokalizacija RNA i proteina BPC-a za vrijeme ljudskog razvoja	1
1.1.2. Farmakokinetika BPC-a 157	2
1.1.3. Pentadekapeptid BPC 157	5
1.2. Dosadašnje spoznaje o učinku BPC-a 157 na središnji živčani sustav	6
1.3. Dosadašnja istraživanja o povezanosti BPC-a 157 s NO sustavom	10
1.4. Dosadašnja istraživanja o ishemijsko/reperfuzijskim ozljedama mozga	12
2. Hipoteza	17
3. Ciljevi rada	18
3.1. Opći cilj istraživanja	18
3.2. Specifični ciljevi istraživanja	18
4. Materijali i metode	19

4.1. Eksperimentalne životinje 19

4.2. Eksperimantalne supstance 20

4.3. Eksperimentalni protokol 20

4.4. Skupine i broj životinja 21

4.5. Bihevioralni testovi 24

4.6. Molekularne metode 26

4.7. Patohistološka analiza 27

4.8. Statistička analiza 28

5. Rezultati 29

6. Rasprava 55

7. Zaključak 63

8. Sažetak 65

9. Summary 67

10. Popis literature 69

11. Kratki životopis 86

Popis oznaka i kratica

AKT - protein kinaza B alfa

AUC – doza normalizirana površina ispod krivulje eliminacije lijeka

AUCN - površina ispod krivulje eliminacije lijeka

BCAO – *engl.* billateral carotid artery occlusion

BPC 157 – *engl.* Body Protective Compound 157

BRAF- b-raf proto onkogen

C_{max} - pola maksimalne koncentracije

CRF - kortikotropni faktor otpuštanja

CVI - cerebrovaskularni insult

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EGR1 - rani čimbenik rasta

eNOS - endotelna NO sintetaza

F - indeks bioraspoloživosti

F.O. - fiziološka otopina

GABA - gama aminomaslačna kiselina

GAPDH - Gliceralaldehid-3-fosfat dehidrogenaza

HPLC - visokotlačna tekuća kromatografija

IBW – *engl.* Inclined beam walk tets

i.g. – intragastrički

IL-6 – interleukin 6

iNOS - inducibilna NO sintetaza

i.p. – intraperitonealno

kb - kilobaza, tisuću parova baza

KRAS - V-Ki-Ras2 onkogeni homolog

L-arginin - NO precursor

LD - letalna doza

L-NAME - N^G - nitro-L-arginin metil ester

Log eq/ml – logaritamski ekvivalent po mililitru

LP – *engl.* Lateral push tets

MAPK1 - mitogenom aktivirana protein kinaza

MPTP - metil-fenil-tetrahidro-piridin

MRT – *engl.* Mean residence time

M.W. - molekularna težina

MWM – *engl.* Morris water maze test

µg – mikrogram

ng - nanogram

NO – dušikov (I) oksid

NOS - enzim NO sintetaza

nNOS - neuralna NO sintetaza

NT - neurotenzin

pg – pikogram

PRKCG - protein kinaza C gama

p.o. – peroralno

RNA – ribonukleinska kiselina

SAD – Sjedinjene Američke Države

SRF - factor serumskog odgovora

SRC - tirozin protein kinaza src1

SŽS - središnji živčani sustav

$T_{1/2}$ – poluvrijeme eliminacija

TIA – tranzitorna ishemijska ataka

tj.t. - tjelesna težina

TNF-α – *engl.* tumor necrosis factor alfa

TRH - tirotropin-oslobađajući hormone

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta

1. Uvod

1.1. BPC i pentadekapeptid BPC 157

1.1.1. Lokalizacija RNA i proteina BPC-a za vrijeme ljudskog razvoja

Kako bi se odredila točna lokalizacija, ali i vrijeme ekspresije BPC-a u ljudskom razvoju korištene su metode *in situ* hibridizacije i imunohistokemije. Pomoću navedenih metoda, na uzorcima ljudskih embrija od 6. do 14. tjedna gestacije, učinjena je analiza prostorne i vremenske distribucije proteina BPC-a te je pokazano da je u razdoblju od 6. do 12. tjedna gestacije protein BPC bio eksprimiran u epitelu bronha razvijajućih pluća, dok je u epitelnim stanicama bronhalnih grana bio eksprimiran tek u 12. tjednu (1). Pozitivno bojanje bronhalnog epitela, kroz promatrani period, dobiveno je koristeći se BPC poliklonalnim antitijelima. Protein BPC je isto tako bio eksprimiran u sluznici nekoliko drugih organskih sustava (1). Tako je otkriveno da je protein BPC snažno pobojao i crijevni epitel između 8. i 14. tjedna gestacije. Nadalje je u bubregu, protein BPC bio eksprimiran na razini mRNA u glomerulima u razvoju, dok su visoke razine BPC mRNA nađene i u gastrointestinalnom epitelu odraslih osoba (1). Daljnjom analizom, pomoću Northern blot hibridizacije, otkriveno je postojanje dva odsječka mRNA, različite duljine parova baza, jedan duljine od 3 kb, a drugi od 1.8 kb (1). Ovi podaci impliciraju, da iako je BPC izoliran iz želučanog soka te mu je gastrointestinalni sustav vjerojatno mjesto primarnog djelovanja, BPC bi mogao imati dodatne regulatorne uloge u intrauterinom razvoju, ali i u posljedičnoj funkciji ljudskih pluća, bubrega i kože.

1.1.2. Farmakokinetika BPC-a 157

Farmakokinetska svojstva BPC-a 157 ispitana su pomoću trinaest grupa, od tri štakora i tri štakorice, koji su peroralno primili BPC 157 obilježen radioaktivnim tricijem (^{3}H-BPC157) u dozi od 10 mg/kg (1). Radi analize razine radioaktivnosti u krvi i plazmi, srednje vrijednosti radioaktivnosti u krvi određene su kroz 13 vremenskih intervala nakon administracije radioaktivno označenog BPC-a 157, a dobivene su ubijanjem životinja i skupljanjem krvi u navedenim intervalima. BPC 157 obilježen radioaktivnim tricijem je brzo apsorbiran iz probavnog trakta te je u vremenskom razdoblju između pola sata i 16 sati, nakon administracije, razina radioaktivnosti u plazmi ostala gotovo nepromijenjena (10 µg/ml). Za eliminaciju iz cirkulacije bilo je potrebno između 24 i 168 sati, što je u skladu s već potvrđenim poluvremenom eliminacije ($t_{1/2}$) od oko 68 sati. BPC 157 obilježen radioaktivnim tricijem se ravnomjerno rasporedio između plazme i krvnih stanica. Ekskrecija je većinom išla mokraćom (30 %), a manjim dijelom stolicom (12 %). Razine radioaktivnosti u tkivima nakon 168 sati odgovarale su s 20-25% radioaktivnosti početne doze. Postotak doze (30-35%) koji je preostao izražava eliminarni dio, vjerojatno u obliku $^{3}H_2O$ u izdahnutom zraku nakon prethodne metabolizacije i izmjene izotopa tricijem obilježenog BPC-a 157 s tjelesnom vodom. Povišene razine koncentracije u tkivima nađene su sat vremena nakon administracije; u stijenci želuca i tankog crijeva (dva do tri puta veće u odnosu na koncentracije u plazmi), dok su vrijednosti u plućima i pankreasu bile povišene ali ne u jednakoj mjeri kao i u gastrointestinalnom traktu. U svim ostalim analiziranim tkivima i vremenskim točkama razine

vrijednosti radijacije bile su slične plazmatskima. Prosječna razina radioaktivnost u plazmi mužjaka bila je karakterizirana brzom apsorpcijom rezultirajući plazmatskom razinom od oko pola maksimalne koncentracije (C_{max}) u prvoj vremenskoj točki (15 minuta nakon administracije ^{3}H-BPC157). Plazmatske koncentracije narasle su do razine platoa od oko 10.1 log eq/ml, za što je bilo potrebno najmanje osam sati, mjereći od trenutka administracije. U sljedećoj vremenskoj točki (16 sati) bio je opažen pad u plazmatskoj koncentraciji do vrijednosti od 8.58 ± 0.42 log eq/ml, s postupnim daljnjim padom u idućim vremenskim točkama do konačne vrijednosti od 1.74 ± 0.21 log eq/ml u zadnjoj vremenskoj točki (168 sati od administracije). Poluvrijeme eliminacije radioaktivnosti iznosilo je 66 sati. Površina ispod plazmatske koncentracije (AUC), suprotstavljena ekstrapoliranoj krivulji do u beskonačnost, bila je 988 eq/ml. Sličan farmakokinetski profil je dobiven i kod štakorica, premda su u svim vremenskim točkama plazmatske koncentracije bile nešto više nego kod mužjaka iste podskupine. Dosljedno tome, to je dovelo i do većeg AUC-a nego kod mužjaka, u vrijednosti od 1058 eq/ml, dok je poluvrijeme eliminacije iznosilo 69 sati. Ostali važniji farmakokinetski parametri plazmatske koncentracije sažeto su prikazani u Tablici 1. Indeks bioraspoloživosti (F) izračunat je koristeći AUC podatke dobivene u farmakokinetskim studijama kod intravenske primjene. Bioraspoloživost 110-120% je bila izračunata, te pokazuje potpunu apsorpciju BPC-a 157 iz probavnog trakta. Omjer radioaktivnosti krvi i plazme bio je blizu jedan u svim uzorcima, ukazujući na ravnomjernu distribuciju između plazme i krvnih stanica.

PARAMETAR	*JEDINICA*	*MUŽJACI*	*ŽENKE*	*MUŽJACI + ŽENKE*
T_{MAX}	sat	8	3	3
C_{MAX}	µg eq./ml	10.36	10.90	10.53
AUCN	h• µg eq./ml	821	870	845
AUC	h• µg eq./ml	988	1058	1023
$T_{1/2}$	sat	66	69	68
MRT	sat	91	94	93
F	-	1.1	1.2	1.2

Tablica 1. Farmakokinetski parametri u štakorskoj plazmi nakon jednokratne peroralne aplikacije ^{3}H-BPC157

1.1.3. Pentadekapeptid BPC 157

Stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 je protuulkusni peptid, te kao takav predstavlja dio je sekvence ljudskog želučanog proteina BPC-a izoliranog iz želuca. Slobodno je topljiv u vodi pri neutralnom pH, kao i u fiziološkoj otopini (2–4). Administrira se samostalno jer je stabilan u ljudskom želučanom soku te mu pri administraciji nisu potrebni nosači za siguran prolazak kroz želudac. Do sada je dokazane sigurnosti primjene u kliničkim ispitivanjima za upalnu bolest crijeva (PL-10, PLD-116, PL 14736) i cijeljenje rana. U navedenim kliničkim ispitivanjima nije dokazana vlastita toksičnost pentadekapeptida BPC 157 te nije dosegnut LD1 (2–4). Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419), sintetiziran je u kompaniji Diagen iz Ljubljane (Republika Slovenija), te je do sada u istraživanjima najčešće korišten u različitom rasponu doza (10µg/kg, 10 ng/kg, 10 pg/kg) i u različitim načinima primjene (i.p., i.g., p.o., lokalno, kupka, u kapima za oči, kao krema u koncentraciji 1µg/g neutralne kreme). BPC 157 se koristio kao 99%-tni čisti peptid, što je potvrđeno koristeći se visokotlačnom tekućom kromatografijom (HPLC), dok je jedina nečistoća bila peptid 1-des-glipeptideaza (2–4). BPC 157 sa svojim snažnim protuulkusnim potencijalom protiv različitih ulcerogena predstavlja novi medijator Robertovog koncepta citoprotekcije (3).

1.2. Dosadašnje spoznaje o učinku BPC-a 157 na središnji živčani sustav

Učinak BPC-a 157 na središnji živčani sustav (SŽS) je zasnovan na pretpostavci da je BPC 157 bitan dio moždano-probavne osovine te kao takav, osim djelovanja na gastrointestinalni trakt ima i benefitan učinak na mozak (5). Kao što je već prethodno opisano u preglednom radu (5), otkriće mozgovno-probavne osi pripisuje se radu Pavlova i njegovom otkriću uloge vagus živca u kontroli sekrecije želučane kiseline (6). Daljnjim radom i otkrićima Hans Selye je pokazao kako agens uvijek izaziva isti neuroendokrini odgovor. Nadalje on je pokazao kako je gastroduodenalni ulkus posljednji dio trijade: hipofizno-nadbubrežne stimulacije, timo-limfatične involucije i gastroduodenalne ulceracije (7). Sustavni rad Selyeovih studenata je 1980. godine dokazao kako niz peptida, kao što su bombezin, tirotropin-oslobađajući hormon (TRH), kortikotropni faktor otpuštanja (CRF) i neurotenzin (NT) imaju sposobnost modifikacije gastrointestinalnih funkcija. Na ovim istraživanjima je i zasnovano današnje stajalište o osovini mozak-probava te se smatra da os mozak-probavni sustav potvrđuje interakciju između mozga i probavne cijevi, i obratno (8). Ovaj koncept podrazumijeva i neurotransmitore i/ili peptidergičke faktore rasta, porijeklom iz probavnog trakta koji imaju jaki anti ulcerozni potencijal i na taj način iz periferije blagotvorno utječu na poremećaje SŽS-a. Dakle, u terapijske svrhe, to znači dvosmjernu aktivnost dotičnog agensa između mozga i želuca. Pri admimistraciji neuroleptika, točnije antipsihotika kao što su haloperidol i flufenazin ili novije generacije antipsihotika kao što su sulpirid i klozapin, BPC 157 je uspješno abolirao nastanak ulkusa, ali isto tako i poništio ekstrapiramidalne nuspojave navedenih antipsihotika (9, 10). Haloperidol i flufenazin su kod štakora izazvali

katalepsiju, dok su klozapin i sulpirid izazvali senzomotornu dezorijentaciju te su obje nuspojave uspješno spriječene administracijom BPC-a 157 (9, 10). Načelna generalizacija, da BPC 157 može antagonizirati djelovanje različitih grupa antipsihotika, točnije antagonizirati njihove nuspojave, podržana je pretpostavkom da BPC 157 djeluje na dopaminski sustav centralno, ali isto tako i periferno, točnije da ima učinak na pojedine dijelove patofiziologije formacije ulkusa kao i katalepsije. Nadalje BPC 157 je atenuirao i stereotipne kretnje uzrokovane akutnom administracijom amfetamina kao i spriječio razvoj haloperidolom inducirane osjetljivosti na amfetamin (9, 11). Daljnji dokaz BPC 157 interakcije s dopaminskim sustavom je vidljiv u sprječavanju razvitka katalepsije pri administraciji rezerpina, ali i kod mogućnosti atenuacije tremora, akatizije i katalepsije uzrokovane eksperimentalnom supstancom MPTP (12). Na totalnu blokada dopaminskog sustava, istodobnom administracijom haloperidola i rezerpina, BPC 157 je isto tako imao benefitan učinak (12) poništavajući posljedice dopaminom uvjetovane ozljede nigrostrijatalnih neurona, blokade dopaminskih receptora kao i posljedice reducirane dopaminske aktivnosti (11–13). Svi gore navedeni rezultati ukazuju na posebnu interakciju BPC-a 157 i dopaminskog sustava, ali i na moguće interakcije s drugim neurotransmitorskim sustavima. Autoradiografijom je dokazano kako BPC 157 u različitim dijelovima mozga ima različit učinak na otpuštanje i sintezu serotonina (14). Jednokratna primjena BPC-a 157 značajno umanjuje produkciju serotonina u nekim strukturama mozga, kao što su dorzalni talamus, hipotalamus, hipokampus i lateralnim genikulatnim tijelima, dok ista ta jednokratna primjena uzrokuje povećanu produkciju serotonina u supstanciji nigri i medijalnoj prednjoj olfaktornoj jezgri (14).

Pri dugoročnoj primjeni, točnije nakon sedmodnevne administracije BPC-a 157, došlo je do smanjenja produkcije serotonina u dorzalnim rafe jezgrama, dok je u gornjoj olivarnoj jezgri, supstanciji nigri, lateralnom kaudatusu i jezgri akumbens došlo do značajnog povećanja sinteze serotonina (14). Navedeni utjecaj BPC-a 157 na sintezu serotonina zasigurno je u svezi i s njegovim abolirajućim učinkom kod serotoninskog sindroma, bilo izazvanim administracijom pargilina ili istodobnom administracijom pargilina i L-triptofana (15). Povoljan učinak BPC 157 na serotoninski sustav je hipotetski posredovan antagonističkim djelovanjem na fenomenologiju izazvanu aktivacijom 5-HT2A receptora. Pri istodobnoj administraciji diazepama i BPC-a 157, dolazi do potencijacije učinka diazepama u vidu prolongirane antikonvulzivne aktivnosti, ali isto tako dovodi i do kasnijeg pojavljivanja simptoma iz spektra apstinencijskog sindroma (16). Nadalje je pokazano kako BPC 157 samostalno ima potentan anksiolitički učinak, usporediv s diazepamom, ali i kako postoje jasne razlike u djelovanju navedenih lijekova, pružajući tako dokaze da BPC 157 djeluje na održavanje homeostaze gabergičkog sustava ali i na povećanje same koncentracije GABA-e (16, 17). Iz svega navedenog je vidljivo zašto se BPC 157 smatra dijelom moždano-želučane osovine te kako njegov specifičan međuodnos s nekoliko neurotransmitorskih sustava može biti benefitan u patologiji središnjeg živčanog sustava (5). U modelu multiple skleroze, pri čemu je kurpizonom inducirana demijelinizacija i degeneracija oligodendrocita, BPC 157 uspješno zaustavlja razvitak encefalopatije i nastanak mišićne disfunkcije (18). Patohistološka analiza uzoraka je pokazala manje živčanih ozljeda u nekoliko regija mozga, ali su promjene u laterodorzalnom talamusu i jezgri reuniens bile najizraženije te tako

dodatno potvrdile benefitan učinak BPC-a 157 u modelu multiple skleroze (18). S već dokazanim potentnim učinkom na cijeljenje rana i ozljeda u različitim tkivima (19, 20), BPC 157 je isto pokazao i u modelima traumatske ozljede živca, leđne moždine, ali i mozga (21–23). Ozljeda ishijadičnog živca, te posljedično anastomozirana ili neanastomozirana ozljeda, pokazala je kako BPC 157 uvelike pospješuje cijeljenje živca tako što povećava dijametar i debljinu mijelinskih ploča, ali i broj mijeliniziranih vlakana i pripadajućih krvnih žila (22). Navedene promjene dovode do bihevioralnih razlika u testiranih životinja, ali i uvećanih akcijskih potencijala motornih vlakana pri elektrofiziološkim ispitivanjima (22). Kod traumatske ozljede mozga, BPC 157 je smanjio edem, smanjio veličinu i broj hemoragaijskih traumatskih laceracija, ali je smanjio i intenzitet subarahnoidalnog krvarenja sa značajno umanjenim krvarenjem u intraventrikularne prostore (21). Kod ozljeda leđne moždine, na razini L2- L3, BPC 157 je poboljšao motornu funkciju repa kao i reducirao spastičnost nakon četverotjedne aplikacije (23). Patohistološka analiza je pokazala smanjenje edema u sivoj tvari tretiranih životinja te manje izraženo difuzno aksonalno oštećenje (23), ukazujući na moguće djelovanje BPC 157 na nastanak i prevenciju sekundarne ozljede, a samim time i poboljšanog neurološkog oporavka. Iz svega gore navedenog vidljivo je da BPC 157 ima potentan učinak kod cijeljenja ozljeda SŽS-a, bilo djelujući na primarnu ozljedu, bilo djelujući na nastanak i razvitak sekundarne ozljede (5, 21–23).

1.3. Dosadašnja istraživanja o povezanosti BPC-a 157 s NO sustavom

Učinak BPC-a 157 i njegov međuodnos s NO sustavom nedavno je prikazan u revijalnom radu (24) i referiran u nizu objavljenih radova (1, 25–29). Povezanost BPC 157 i sustava dušičnog oksida osobito je vidljiva u njegovoj participaciji u Moncadinom homeostatskom odgovoru NO-sustava na ozljedu, održavajući vaskularni integritet i kontrolirajući trombocitnu aktivnost (30). BPC 157 svoj učinak cijeljenja sprovodi tako da utječe na sve događaje nakon gubitka vaskularnog integriteta (1, 25). Ovisno o uvjetima, BPC 157 smanjuje duboku vensku trombozu tako što otvara kolateralne krvne žile, te tako premošćuje venski defekt (25). Nadalje BPC 157 smanjuje krvarenje i trombocitopeniju uzrokovanu produljenim krvarenjem uslijed administracije heparina, varfarina ili aspirin (31). BPC 157 konzistentno unaprjeđuje cijeljenje kod serije različitih modela ozljeda, akutnih i kroničnih, čak i kod različitih organskih sustava (1, 4, 18, 26, 32, 33), ali i kod tkiva koja inače spontano ne cijele nakon teških ozljeda, kao što je korneja (34). Radi činjenice da se BPC 157 stvara u želučanoj sluznici te da ima značajan utjecaja na sintezu NO-a, ali i dokaza da postoji bazalno veće stvaranje NO-a u želučanoj sluznici u usporedbi s drugim tkivima, dovela je do hipoteze kako BPC 157 ima specifičnu interakciju s NO sustavom (24, 35). BPC 157 pokazuje generalno kompetitivni učinak prema L-argininu, ali i drugim supstancama koje imaju učinak na NO sustav (npr. L-NAME) te je za pretpostaviti da ima određenu fiziološku funkciju kada govorimo o stvaranju NO-a (24, 36). Navedeno podržava njegove korisne učinke te dalje potkrjepljuje uzajamni odnos BPC 157 i sustava NO-a (s L-NAME/L-argininom, pojedinačno ili zajedno) u zaštiti želučane sluznice i zaštiti sluznice nakon alkoholne lezije

citoprotekcijom, stvaranju NO-a i regulaciji krvnog tlaka (36, 37). Međuodnos BPC-a 157 i NO sustava je dalje vidljiv u akutnoj i kroničnoj alkoholnoj intoksikaciji kao i u sindromu ustezanja (37–39), u kardiovaskularnim poremećajima, kroničnom zatajenju srca, plućnoj hipertenziji i aritmijama (40, 41); u poremećajima nakon hipokalijemije i hiperkalijemije kao i u disfunkciji stanične membrane izazvane kalijem (42, 43). Konačno taj učinak je prisutan i u poremećaju cijeljenja rana (3, 20, 22, 29, 32, 33, 44), ali i kod mnogo kompleksnijih oblika rana kao što je cijeljenje ezofagokutane i kolokutane fistule (44, 45). Iako do sada još nije utvrđen točni mehanizam pomoću kojeg BPC 157 sprovodi svoje učinke te kako se točno odvija interakcija s NO sustavom, pritom uzimajući u obzir specifičan učinak BPC-a 157 na gen za sintezu endotelne sintetaze NO-a (45), ali i na druge gene vezane uz NO sustav (25, 46), izvjesno je da postoji određeni mehanizam interakcije BPC-a 157 i NO sustava te bi daljnja istraživanja na tom području uvelike uznapredovala razumijevanje, a time i poboljšanje kliničkog učinka.

1.4. Dosadašnja istraživanja ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda u mozgu

Moždani udar je drugi vodeći uzrok smrti u globalnim razmjerima, dok je u Sjedinjenim Američkim Državama peti uzrok smrti (47). S prevalencijom od 2.7% on je ujedno i vodeći uzrok ozbiljne dugotrajne invalidnosti u Sjedinjenim Američkim Državama (47). Incidencija se razlikuje ovisno o rasi i spolu te je poznato kako muškarci u mlađim dobnim skupinama imaju veću učestalost moždanog udara, ali i tranzitornih ishemijskih ataka, dok se ta razlika s godinama smanjuje da bi u starijim dobnim skupinama učestalost u ženskoj populaciji bila veća, nego u muškoj (47). Moždani udar je zaslužan za preko 36.7 milijardi dolara troškova liječenja i rehabilitacije uzrokovane posljedicama moždanog udara u SAD-u (47). Uzmemo li u obzir projekcije koje nalažu da će do 2035. godine, direktni medicinski troškovi zbog moždanog udara nadići 94 milijarde dolara, jasno je zašto moždani udar predstavlja takvo socijalno i ekonomsko opterećenje za države diljem svijeta (47). Do danas postoje samo dvije efikasne terapijske mogućnosti, lokalna rekanalizacija i sistemska tromboliza (48). Iako su uvelike poboljšale ishode pacijenata koji dožive moždani udar, obje imaju relativno uski terapijski prozor te su zbog toga primjenjive, a samim time i učinkovite, u manjeg broja pacijenata (48). Imajući navedeno na umu, jasno je zašto je potraga za djelotvornim lijekom za moždani udar od velike važnosti. Do sada je napravljeno na stotine kliničkih studija koje nisu polučile uspjehom tj. nisu našle novi agens za liječenje moždanog udara (48). Ishemijsko-reperfuzijske ozljede nalaze se u podlozi patofizioloških mehanizama cerebrovaskularnih bolesti, koje se najčešće manifestiraju u obliku cerebrovaskularnog inzulta (CVI) kao i tranzitornih ishemijskih ataka (TIA). Kod 87%

bolesnika u SAD-u, radi se o infarktu uzrokovanom ishemijom, dok je u manjem broju uzrokovan hemoragijom (47). Sam proces počinje prestankom krvnog protoka, što dovodi do deplecije energetskih rezervi stanice i pokretanja serije molekularnih kaskada koje dovode do patoloških promjena i ozljeda mozga (48). Iako je ishemija začetnik ovih promjena, zapravo je reperfuzija, koja nastaje naknadno kao posljedica ponovne uspostave krvotoka, ta koja je važna u krajnjem ishodu. Samo područje ishemije možemo podijeliti na dva dijela, srž samog infarkta gdje dolazi do brze i nepovratne smrti neurona, te područja penumbre, gdje se odvijaju svi procesi i krajnji ishodi vezani uz ishemijsko-reperfuzijske ozljede (48). Područje penumbre je izrazito zanimljivo, jer zavisno od duljine trajanja ishemije, a potom i reperfuzije, to područje može značajno varirati u svojoj površini, a time i posljedičnoj površini infarkta (48). Ishemija može uzrokovati neuronsku nekrozu i apoptozu; dugoročna cerebralna ishemija potiče nekrozu, dok kratkotrajna cerebralna ishemija uzrokuje apoptozu (48, 49). Na ishemiju kod odraslih su najviše osjetljivi piramidalni neuroni regije CA1-4 hipokampusa, piramidalni neuroni trećeg i petog sloja neokorteksa i Purkinjeove stanice malog mozga, točnije kod tih neurona najprije vidimo ishemijske promjene te oni pokazuju najmanju rezistenciju na promjene koncentracije kisika (50). Nakon ishemije, dolazi do postupne deplecije razina energije u stanici, što dovodi do depolarizacije stanice i elektrolitskog disbalansa koji potiče aktivaciju enzima ovisnih o kalciju, među kojima je i dušikov monooksid sintetaza (NOS) (48, 51). Trenutačno najučinkovitija terapija je rekanalizacija krvne žile, koja kao veliki nedostatak ima uski terapijski prozor, ali i sama rekanalizacija, kada opet uspostavi krvotok, ne mijenja bitno ishod ishemijsko-reperfuzijske ozljede (48, 51).

U ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi, produkcija NO-a prolazi kroz više faza i proizvodi se od više vrsta različitih NOS-a, ovisno o kojoj fazi patofiziologije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda je riječ. Prva faza produkcije dušikovog monoksida (NO) nastaje jedan sat nakon ishemije, odnosno jedan sat u periodu reperfuzije, te se NO u početku proizvodi od strane endotelne dušik monoksid sintetaze (eNOS), a nakon poremećaja elektrolita produkciju preuzima neuralna dušikov monoksid sintetaza (nNOS) (51–53). Druga faza produkcije nastaje 24 do 48 sati nakon ishemije, ovisno o težini i trajanju iste, te se NO poglavito producira od strane inducibilne dušikov monoksid sintetaza (iNOS) (51–53). Obje faze su poglavito pod utjecajem nNOS-a i iNOS-a, tj. većina NO-a je produkt navedenih sintetaza, koje za razliku od eNOS-a ne smanjuju opseg ishemije, već dovode do stanične smrti i prekida krvno-moždane barijere (51–53). U samim počecima ishemije kao i na početku prve faze dolazi do produkcije malih količina NO-a, od strane eNOS-a, koji pokazuje neuroprotektivne učinke. U kasnijim fazama ishemije dolazi do aktivacije ostalih sintetaza i proizvodnje velikih količina NO-a, a time i do prekida normalnog funkcioniranja stanica i krvno-moždane barijere (51, 52). Brojna istraživanja imala su za cilj istražiti kako će inhibiranje ili aktivacija pojedinih izoformi NOS-a utjecati na krajnji ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda. Tako su pokusi s "knock-out" miševima, kojima su isključeni geni za nNOS ili eNOS, pokazali da inhibicija nNOS-a dovodi do povoljnog učinka na ishemijske lezije, dok deaktivacija eNOS-a dovodi do pogoršanja lezije (51, 52, 54). Isto tako je inhibitor nNOS-a, eksperimentalna supstanca ARL 17477, poboljšala ishode ozljede kada je aplicirana nakon završetka ishemije (51). Aplikacijom aminogvanidina, također eksperimentalne supstance koja smanjuje

aktivnost samo NOS-a neovisnih o kalciju, kod životinja podvrgnutih ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama, pokazano je značajno smanjenje opsega lezije i sveukupno bolji ishod tretiranih životinja (51, 54). Eksperimentalni podatci pokazuju da se neuroprotektivni eNOS i neurotoksični nNOS i iNOS, aktiviraju u različitim vremenskim intervalima za vrijeme trajanja ishemije i reperfuzije (51, 52, 54) To nam najbolje pokazuje administracija N(G)-nitro-L-argininmetilester (L-NAME), neselektivnog inhibitor NOS, i aplikacija L-arginina, koji je supstrat za NO, u različitim vremenskim intervalima i s različitim ishodima na tijek ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda. Tako je aplikacija L-arginina smanjila veličinu zahvaćenog područja, ali samo ako se administracija dogodila unutar prvih sat vremena od ishemije (51, 54). S druge strane, L-NAME je povećao krajnju površinu ishemijom zahvaćenog područja kada je administriran neposredno nakon ishemije, dok je administracija dva sata nakon ishemije rezultirala smanjenjem ili nepromijenjenim ishodom veličine ishemijski zahvaćenog područja (54). Svi ovi rezultati navode na zaključak da je NO povoljan na samim počecima ishemije, dok je kasnije, nakon aktivacije nNOS-a, a potom i iNOS-a, NO pogoršava stanje i djeluje neurotoksično. Točnije, da veće količine NO imaju neurotoksičan učinak, dok manje imaju neuroprotektivan učinak na ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (51, 52, 54). Jedan od načina aktivacije eNOS-a je kroz signalni put vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) (55). Vezanjem VEGF-a na VEGF receptor 2 dolazi do aktivacije VEGFR2- AKT- eNOS signalnog puta i aktivacije eNOS-a te se tim signalnim putem sprovode neurotropni i proliferacijski učinci VEGF-a (55). Za VEGF je poznato da ima povećanu ekspresiju u centralnom živčanom sustavu nakon

ishemijske ozljede mozga (55, 56) kao i da potiče nastajanje novih krvnih žila odnosno angiogenezu (56, 57). Njegova uloga u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama je još predmet istraživanja, ali dosadašnja istraživanja ukazuju na to da smanjuje mikrovaskularne ozljede, da smanjuje kognitivne deficite u testovima memorije kao i da pospješuje preživljenje neurona u hipokampusu (57, 58). Dosada je pokazano kako najvišu ekspresiju ima nakon 24 sata (57) te da sa svojim angiogenim i neurogenim svojstvima poboljšava ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda u mozgu štakora (55, 57, 58). Inhibicija ekspresije VEGF-a pogoršava neuronske i glijalne ozljede nastale uslijed ishemije (55). VEGF, i gore opisani učinci u ishemiji mozga, ga čine obećavajućim agensom u liječenju ishemijskih ozljeda mozga, a terapije zasnivane na VEGF-u i njegovim signalnim putevima su još u eksperimentalnim fazama (55).

2. Hipoteza

Na štakorskom modelu BCAO-a, primjena pentadekapeptida BPC 157 će smanjiti patohistološke lezije u hipokampusu, popravit će funkcionalne neurološke deficite memorije i motorike, nastale uslijed ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda mozg te će utjecati na ekspresiju ispitanih gena.

3. Ciljevi rada

3.1. Opći ciljevi rada

Sistematično i podrobno istražiti učinke BPC 157 na štakorima podvrgnutim BCAO modelu cerebralne ishemije-reperfuzije.

Verificiranjem učinka BPC 157 na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu mozga i na oporavak moždanih funkcija zahvaćenih istom ozljedom, ustanovit će se terapijski učinak BPC 157 na ovom modelu te omogućiti daljnje planiranje istraživanja.

3.2. Specifični ciljevi rada

1. Određivanje neurološkog statusa i deficita memorije kod ispitanih životinja.
2. Istražiti učinke antagonista i agonista NO sustava i njihovog međuodnosa s BPC-om 157.
3. Patohistološkom analizom odrediti težinu ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda kod kontrolnih i testiranih životinja.
4. Otkrivanje molekularnih mehanizama kojima BPC 157 sprovodi svoje učinke.

4. Materijali i metode

4.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje se provelo u sklopu sveučilišnog projekta BM099, na muškim štakorima soja Wistar. Korišteni štakori su bili starosti između 10 i 12 tjedana, prosječne tjelesne mase oko 250 grama. Bili su smješteni u u nastambi za životinje Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja HR-POK-007), gdje su držani u standardnim kavezima (po dvije životinje u jednom kavezu), hranili se peletama ad libitum, a voda im je također bila na raspolaganju ad libitum. Prostorija u kojoj su držani je klimatizirana (24°C) i ventilirana, s reguliranim ciklusom svjetlosti i tame koji se izmijenjujivao svakih 12h (dnevni ciklus od 8 do 20 sati). Istraživanje se provelo u skladu s Zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/99), a osiguranje etičkih načela u ispitivanju osigurano je pridržavanjem europske direktive 2010/63/EU, Zakona o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13), Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06), Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13), FELASA preporuka i preporuka Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokus se po težini smatra umjerenim. Netom prije žrtvovanja životinje se uveslo u duboku anesteziju (diazepam, 5 mg/kg i.p. i natrijev tiopental 50 mg/kg i.p.) i žrtvovalo dekapitacijom uz pomoć giljotine.

4.2. Eksperimantalne supstance

Pentadekapeptid BPC 157 (aminokiselinski slijed: Gly-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val, Mr 1419) je sekvenca peptida BPC. Sintetizira se prema patentu (EPO 57268), a za i.p. primjenu priprema se otapanjem u vodi i u fiziološkoj otopini. Pentadekapeptid BPC 157 je 99%-tne čistoće, dobiven visokotlačnom likvidnom kromatografijom s 1-des-Gly peptidom kao nečistoćom. Supstance koje su korištene u ovom istraživanju su pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 μg/kg, fiziološka otopina (0,9% NaCl), N(G)-nitro-L-argininmetilester (L-NAME) u dozi od 5mg/kg te prekursor NO-sustava L-arginin u dozi od 100 mg/kg. Supstance korištene u ovom istraživanju bile su administrirane lokalno na mjestu operacije u volumenu od 1 ml.

4.3. Eksperimentalni protokol

Za izazivanje ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda koristio se model BCAO (49, 51, 53, 59). Nakon primjene anestezije (diazepam (5 mg/kg i.p.) i natrijev tiopental (50 mg/kg i.p.)) i perioda da anestezija postigne željeni učinak slijedila je sama operacija. Prvo se vršila incizija na vratu, u medijanoj ravnini, te se nakon otklanjanja fascija i mišića pažljivo pristupalo samim karotidnim arterija. Potom se postupno karotidna arterija izolirala od svih prileżećih struktura, pa tako i vagalnog živca. Izolirana zajednička karotidna arterija je potom bila ligirana 20 minuta („clammping“ metoda uz pomoć gumom obloženih peana) te je po završetku ligacije životinja bila zašivena po slojevima, rana dezinficirana te je slučajnim odabirom bila raspoređena

u jednu od terapijskih skupina. Nakon što su raspoređene u skupine, istim je životinjama aplicirana terapija ovisno u kojoj su skupini te je bilo dozvoljeno razdoblje reperfuzije od 24 ili 72 sata, ovisno o inicijalnim postavkama pokusa s obzirom na metodologiju. Po završenom razdoblju reperfuzije životinje su se uvele u duboku anesteziju te su potom biti žrtvovane dekapitacijom, uz pomoć giljotine. Uzorci pojedinih dijelova mozga bili su sačuvani za daljnju analizu u puferiranoj otopini formalina (10%) ili u tekućem dušiku, zavisno od daljnje metodologije.

4.4. Skupine i broj životinja

Istraživanje se provodilo u dva vremenska intervala. Prvi interval od 24 sata, gdje je bilo ukupno šest skupina (n=8), a supstance su bile administrirane odmah po učinjenoj operaciji. Drugi interval od 72 sata, gdje je bilo ukupno šest skupina (n=8), supstance su se također administrirale odmah po učinjenoj operaciji. Točan protokol pokusa po ispitivanim grupama je naveden u tablici 2.

TERAPIJSKA SKUPINA	*TRETMAN (JEDNOKRATNI)*	*VRIJEME ŽRTVOVANJA*	*BROJ ŽIVOTINJA*
KONTROLA 24H	1 ml 0.9% NaCl	24 sata	8
KONTROLA 72H	1 ml 0.9% NaCl	72 sata	8
BPC 157 MG 24H	BPC 157 10 µg/kg tj.t.	24 sata	8
BPC 157 MG 72H	BPC 157 10 µg/kg tj.t.	72 sata	8
L-NAME 24H	L-NAME 5 mg/kg tj.t.	24 sata	8
L-NAME 72H	L-NAME 5 mg/kg tj.t.	72 sata	8
L-NAME + BPC 157 24H	L-NAME 5 mg/kg tj.t. + BPC 157 10 µg/kg tj.t.	24 sata	8
L-NAME + BPC 157 72H	L-NAME 5 mg/kg tj.t. + BPC 157 10 µg/kg tj.t.	72 sata	8
L-ARGININ 24H	L-arginin 100 mg/kg tj.t.	24 sata	8

L-ARGININ 72H	L-arginin 100 mg/kg tj.t.	72 sata	8
L-ARGININ + BPC 157 24H	L-arginin 100 mg/kg tj.t. + BPC 157 10 µg/kg tj.t.	24 sata	8
L-ARGININ + BPC 157 72H	L-arginin 100 mg/kg tj.t. + BPC 157 10 µg/kg tj.t.	72 sata	8
UKUPNO ŽIVOTINJA			96

Tablica 2. Protokol pokusa po ispitivanim skupinama

4.5. Bihevioralni testovi

Ispitivanje neurološkog statusa životinje vršilo se koristeći se s tri bihevioralna testa. Sva testiranja su učinjena 24 sata nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda. Za ispitivanje memorije i prostorne orijentacije koristio se Morris water maze test (MWM) (60–62), dok se ispitivanje motoričkih sposobnosti, koordinacije i ravnoteže ispitivalo pomoću Inclined beam walk testa (IBW) (60, 62, 63) i Lateral push testa (LP) (60, 62, 64).

MWM test je korišten kako bi se ispitala memorija i prostorna orijentacija životinja nakon induciranja ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (61). U MWM testu je korišten sivi bazen, promjera 150cm i dubine 30cm, u koji je bila potopljena platforma promjera devet cm. Vizualne oznake su bile postavljene na sva četiri zida prostorije, te se cijeli postav nije mijenjao tijekom cijelog ispitivanja. Pronalazak platforme se smatrao kada bi životinja stavila obje prednje šape na platformu. Svaka testirana životinja je prošla kroz četiri trening ispitivanja dnevno, s pauzom od deset minuta između pojedinog testiranja, i tako pet dana u nizu. Trening ispitivanje se sastojalo od plivanja u bazenu te potragom za skrivenom platformom koja se nalazila u jednom od kvadranata bazena. Petog dana testiranja, vrijeme latencije za pronalaskom skrivene platforme je uzeto kao indeks akvizicije odnosno učenja i kao takvo je korišteno kao osnovno vrijeme potrebno za naći platformu. Nakon pet dana testiranja, životinje su operirane te su inducirane ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Nakon 24 sata odmora tj. reperfuzije, životinje su ponovno testirane kroz četiri različita ispitivanja te je zabilježeno vrijeme srednje latencije tj. vrijeme potrebno za pronalazak platforme.

IBW test je korišten kako bi se ispitale lokomotorne sposobnosti testiranih životinja nakon ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (63, 65). Svaka od životinja je individualno postavljena na drvenu šipku, duljine 110 cm i širine 1.5 cm, postavljenu pod kutem od 60 stupnjeva te je imala 60 sekundi kako bi istu prehodala. Njihove motoričke sposobnosti su skorirane na skali od nula do četiri (63, 65). Ocjena četiri je dodijeljena životinji koja je u 60 sekundi prohodala više od ¾ hodne pruge; ocijena tri je dodijeljena životinji koja je uspjela prohodati više od pola ali manje od ¾ hodne pruge; ocjena dva je dodijeljena životinjama koje su bile u stanju prohodati više od ¼ duljine hodne pruge; ocjena jedan je dodijeljena životinjama s izrazito teškim neurološkim ispadima koje nisu bile u stanju prohodati niti ¼ tražene duljine dok je ocjenu nula dobila životinja koja nije bila u stanju hodati. IBW je sproveden dan prije same operacije te 24 sata poslije indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (63, 65). Sve životinje nakon nasumičnog odabira i podjele u terapijske grupe, a prije same operacije i administracije supstanci, su imale trening period koji se sastojao od četiri hodanja. U samom periodu treninga nije nađeno nikakve statistički značajne razlike između pojedinih grupa.

LP test je napravljen kako bi se procijenila motorika i snaga ispitanih životinja (64, 65). Test je proveden prije i 24 sata nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda. Životinje su bodovane na temelju mogućnosti odupiranja lateralnom guranju te se njihov učinak nakon operacije ocijenio kao + (životinja se i dalje aktivno opire lateralnom guranju) ili – (životinja se ne opire lateralnom guranju) u odnosu na inicijalno testiranje. Krajnji rezultat LP testa je izražen kao postotak životinja koje su se odupirale ili se nisu odupirale u odnosu na inicijalno testiranje (64, 65).

4.6. Molekularne metode

Nakon aplikacije odgovarajućih supstanci te žrtvovanja životinja, uzorci hipokampusa su se brzo prikupili te stavili u tekući dušik. Uzeti uzorci hipokampusa su se homogenizirali uz pomoć homogenizatora T10 Ultra-turrax homogenizator (IKA Werke GmbH, Njemačka) te se sveukupna RNA izolirala iz tkiva hipokampusa, nakon 24 sata, uz pomoć TRIzol reagensa (Invitrogen, Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. Potom se RNA kvantificirala koristeći NanoDrop ND-1000 spektrofotometar (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, SAD) kako bi se osigurala dovoljna količina mRNA i time krenulo u postupak reverzne transkripcije s približno jednakom količinom mRNA u svakom uzorku. Za reverznu transkripciju koristio se High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača u aparatu ProFlex 3x32-well PCR System (Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Za analizu razine ekspresije željenih gena, koristio se 10 TaqMan gene expression assays (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) sa strojem Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema protokolu proizvođača (66). Relativna kvantifikacija ekspresije traženih gena; *Prkcg* (protein kinaza C gama), *eNos*, *nNos*, *iNos*, *Mapk1* (mitogenom aktivirana protein kinaza), *Kras* (V-Ki-Ras2 onkogeni homolog), *Egr1* (rani čimbenik rasta), *Srf* (faktor serumskog odgovora), *Braf* (b-raf protoonkogen), *Src* (tirozin protein kinaza src1), *Vegfr-2*, *Akt* (protein kinaza B alfa) Nfκb (nuklearni faktor kappa B), vršila se nakon

24 sata, u odnosu na ekspresiju kontrolnih gena (*Gapdh* (gliceralaldehid-3-fosfat dehidrogenaza) i *Beta-actin*), to jest vršila se normalizacija ekspresije u odnosu na navedene *housekeeping* gene (67). Većina odabranih gena (*Prkcg, Mapk1, eNos, Kras, Egr1, Srf, Braf, Src, Vegfr-2, Akt*) su dijelovi signalnih puteva VEGF-a, točnije za svaki dio pojedinog signalnog puta je uzeto najmanje jedno mjesto na kojima će se vršiti analiza ekspresije RNA. Ostali geni, koji nisu dio signalnog puta VEGF-a, su tri izoforme NO sintetaze (*eNos, nNos, iNos*) pomoću kojih će se procijeniti sudjelovanje NO sustava u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama.

4.7. Patohistološka analiza

Po žrtvovanju životinja, mozgovi su bili fiksirani 48 sati u 10%-tnom puferiranom formalinu te su preuzeti koronarni rezovi kroz srednji dio hipokampusa. Tkivo se zatim dehidriralo u etanolu postepeno rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%), potom provodilo kroz ksilol i prožimalo u tekućem parafinu na temperaturi od +60℃ te uklopljeno u parafinske blokove. Tako uklopljeno tkivo je ohlađeno na +4℃ i rezano na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4-5 μm. Rezovi su nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije, u opadajućem nizu koncentracija etanola (100%, 96%, 80% i 70%), bojani hemalaun eozinom. Na takvim preparatima je slikana regija CA4 hipokampusa na pet velikih vidnih povećanja (povećanje x200). Brojani su zdravi neuroni i hipoksično promijenjeni neuroni. Hipoksično promijenjen neuron ima “ušiljen” (eng. shrinkage) oblik, hipereozinofilnu plazmu te piknotično promijenjenu jezgru koja nastaje kao posljedica kondenzacije kromatina, dok

histološki normalan neuron ima srednje veliku ili veliku citoplazmu (ovisno o lokalizaciji) te okruglu jezgru s izraženim nukleolom (68). Kvantitativno se odredio broj hipoksično promijenjenih neurona u hipokampusu, u regiji CA4, nakon 24 sata kao i nakon 72 sata kako bi se vidjela progresija ishemije neurona (60, 62, 69).

4.8. Statistička analiza

Power test analizom, tablično (uz očekivanu razliku od 20% i koeficijent varijance od 10-15%) i učinjenom u programu R (α=0.05, π= 0.90, d=1.2) (70), potvrdilo se da je osam životinja po grupi dostatno za otkrivanje statistički značajne razlike. Za statističku obradu podataka će se koristiti program R i Rstudio (70). Distribucija uzorka je testirana Shapiro/ Wilksovim testom. U slučaju normalne distribucije, koristio se Student T-test ili ANOVA, ovisno o metodi koja je bila testirana. Kao post hoc test koristio se Dunnettov test (usporedba s kontrolnom skupinom) i Bonferroni test (usporedba ostalih skupina međusobno). U slučaju distribucije koja ne slijedi normalnu raspodjelu koristila se neparametrijska statistika i Kruskal-Wallis test. Podaci su prezentirani tablično i grafički kao srednja vrijednost +/- standardna devijacija (SD) ili minimum, median, maksimum (min/med/max). Vrijednost $p < 0.05$ smatrala se statistički signifikantnom.

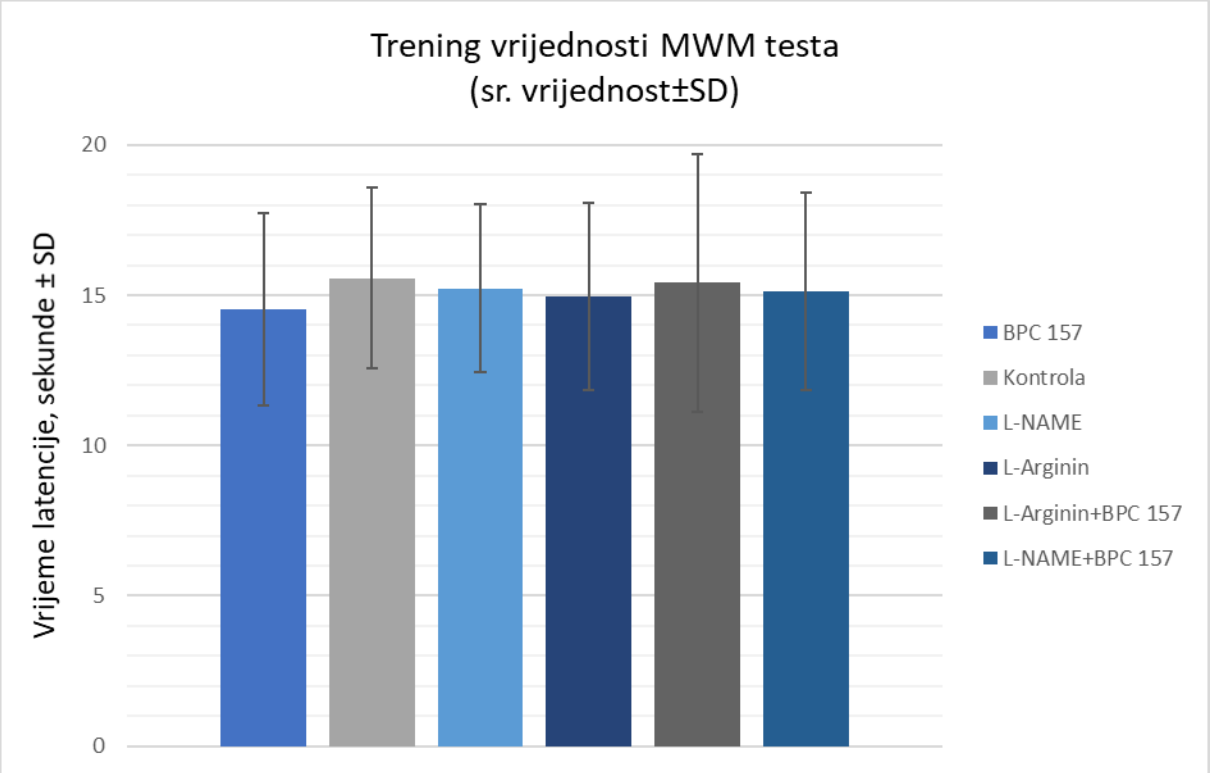
5. Rezultati

Izazvane ishemijsko-reperfuzijske ozljede su kod svih testiranih životinja dovele do nastanka deficita u bihevioralnim testovima. MWM test, koji služi za ispitivanje memorije i prostorne orijentacije te kao takav ima dokazanu povezanost između učinka na testu i aktivnosti neurotransmitora ali i ispitivanih supstanci (61). Poznato je da su neuroni hipokampusa, najosjetljiviji na promjene uzrokovane hipoksijom to jest na ishemijske ozljede, te je ispitivanje memorije kroz MWM test dokazano validan parametar za procjenu funkcionalnosti hipokampusa, ali i drugih regija u nešto manjoj mjeri (61). U slučaju MWM testa, u razdoblju treninga, sve su ispitivane životinje svladale navedeni test te između njihovih završnih vremena latencije nije nađena nikakva statistički značajna razlika (Slika 1.). Nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda najveće pogoršanje u vremenu potrebnom za naći platformu, imale su životinje tretirane L-NAME-om i kontrolne životinje (Slika 2., Slika 3.). Tako su životinje tretirane L-NAME-om u trening periodu imale srednje vrijeme od 15.2 ± 2.8 sekunde, dok su u postoperativnom testiranju imale srednje vrijeme od 31.1 ± 4.7 sekunde. Kontrolna skupina je u periodu treninga imala srednje vrijeme od 15.5 ± 3.0 sekunde, a nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda su imale srednje vrijeme od 23.2 ± 3.8. Iz navedenog se vidi kako je aplikacija L-NAME-a nakon izazivanja ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda uzrokovala pogoršanje vremena pronalaska platforme za 15.8 ± 3.2 sekundi u prosjeku, dok je samo izazivanje ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda, bez aplikacije aktivne supstance, već aplikacije samo fiziološke otopine, dovela do pogoršanja vremena pronalaska platforme za 7.6 ± 1.8. Životinje, kod kojih je neposredno nakon operacije apliciran pentadekapeptid

BPC 157 (Slika 2., Slika 3.), u preoperativnoj trening fazi imale su srednje vrijeme pronalaska platforme od 14.5 ± 3.2 sekundi, dok su nakon operacije imale srednje vrijeme od 15.3 ± 2.9 sekundi. To je pogoršanje vremena pronalaska platforme manje od sekunde, točnije 0.8 ± 1.7 sekundi. Životinje, koje su bile u skupini koja je kao terapijsku supstancu dobila L-arginin (Slika 2., Slika 3), u trening periodu imale su srednje vrijeme pronalaska platforme od 14.9 ± 3.1 sekundi, dok su u postoperativnim pokušajima imale srednje vrijeme od 20.4 ± 2.9, dakle pogoršanje od 5.5 ± 2.3 sekunde u odnosu na vrijeme treninga. Pri istodobnoj aplikaciji L-NAME-a i BPC-a 157, došlo je do atenuacije lošeg učinka L-NAME-a na ishod MWM testa, te su životinje u postoperativnom testiranju imale srednje vrijeme od 19.8 ± 2.8 sekundi, dakle pogoršanje od 4.7 ± 2.2 sekunde u odnosu na preoperativno testiranje koje je iznosilo 15.1 ± 3.3 sekundi. Pri istodobnoj aplikaciji L-arginina i pentadekapeptida BPC 157 (Slika 2., Slika 3.) došlo je do uzajamno benefitnog međudjelovanja dvaju supstanci te je tretiranim životinjama bilo potrebno 18.4 ± 3.3 sekundi za pronalazak platforme, dakle pogoršanje od samo 3 ± 2.8 sekunde u odnosu na vrijeme treninga kad je iznosilo 15.4 ± 4.1 sekunde.

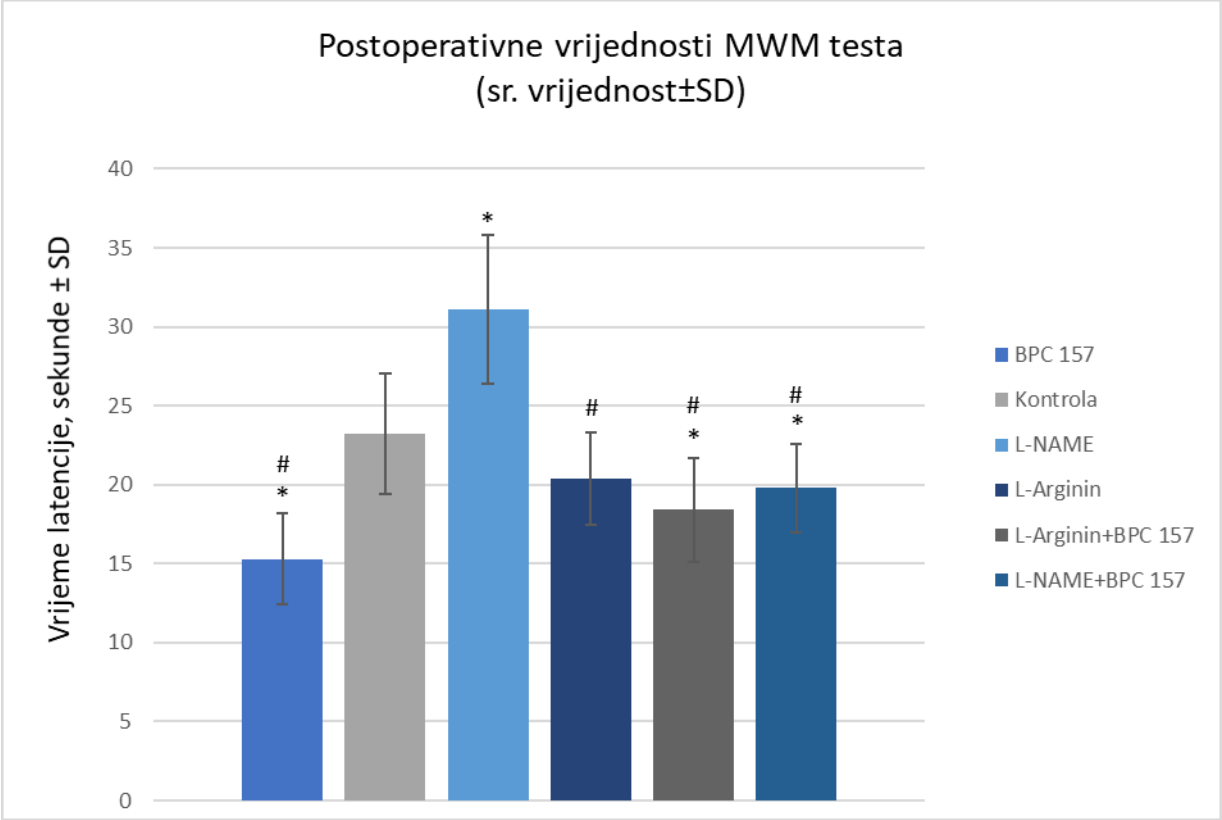
U MWM testu, životinje koje su tretirane s pentadekapeptidom BPC 157, imale su statistički značajno kraće vrijeme latencije u odnosu na kontrolne životinje. Statistički značajno bolje vrijeme latencije, u odnosu na kontrolne životinje, imale su i životinje tretirane s kombinacijom BPC-a 157 i L- Arginina, kao i s kombinacijom L-NAME-a i BPC-a 157, dok je statistički značajno pogoršanje zabilježeno kod L-NAME grupe (Slika 2., Slika 3.). Razlika između postoperativnih vremena latencije, nije bila

statistički značajna između BPC 157 grupe i grupe tretirane kombinacijom BPC-a 157 i L-arginina.



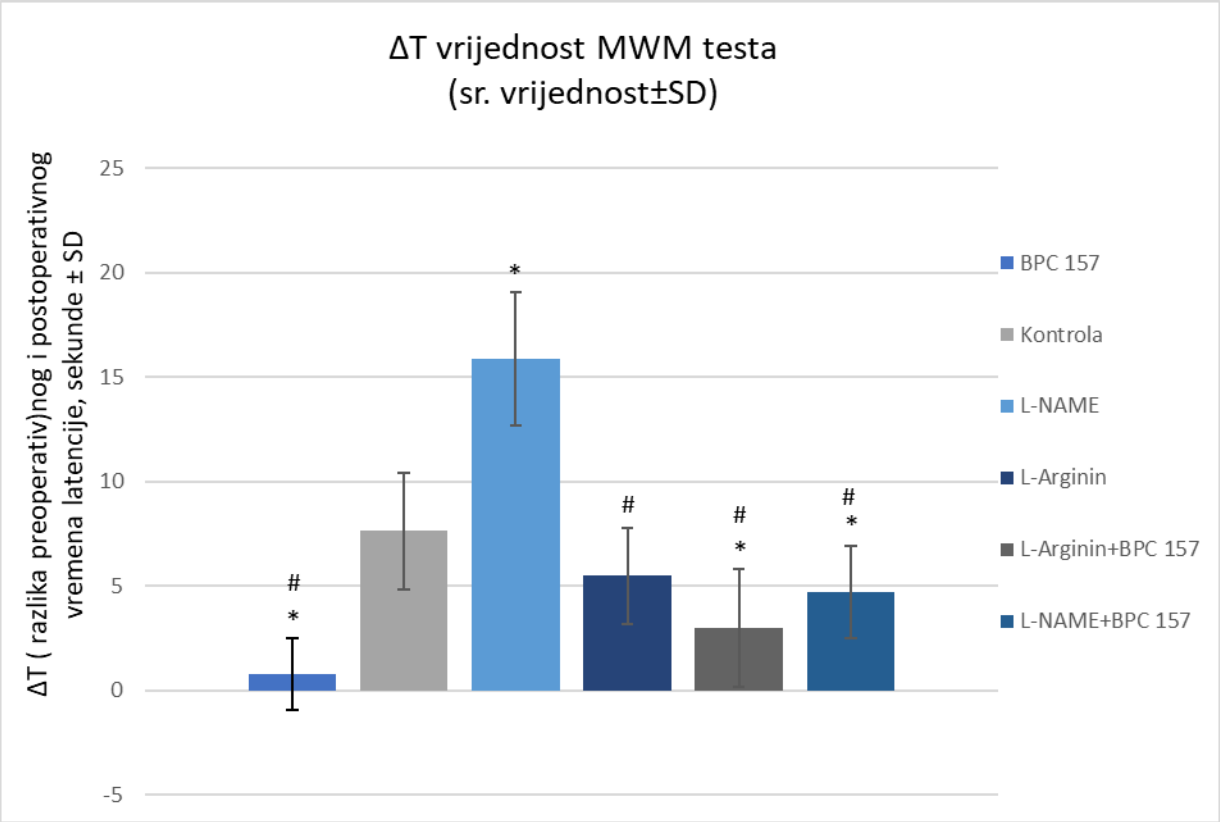
Slika 1. Trening vrijednosti MWM testa, srednja vrijednost ± SD

Na slici su prikazani rezultati testiranja u MWM testu (MWM) u periodu treninga. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost vremena latencije ± standardna devijacija, dok su * označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0.05$).



Slika 2. Postoperativna vremena latencije MWM testa, srednja vrijednost ± SD

Na slici su prikazani rezultati MWM testiranja 24 sata nakon operacije. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost vremena latencije ± standardna devijacija, dok su * označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0.05$), dok su s # označene vrijednosti koje su statistički značajne u odnosu na grupu tretiranu s L-NAME ($p<0.05$).

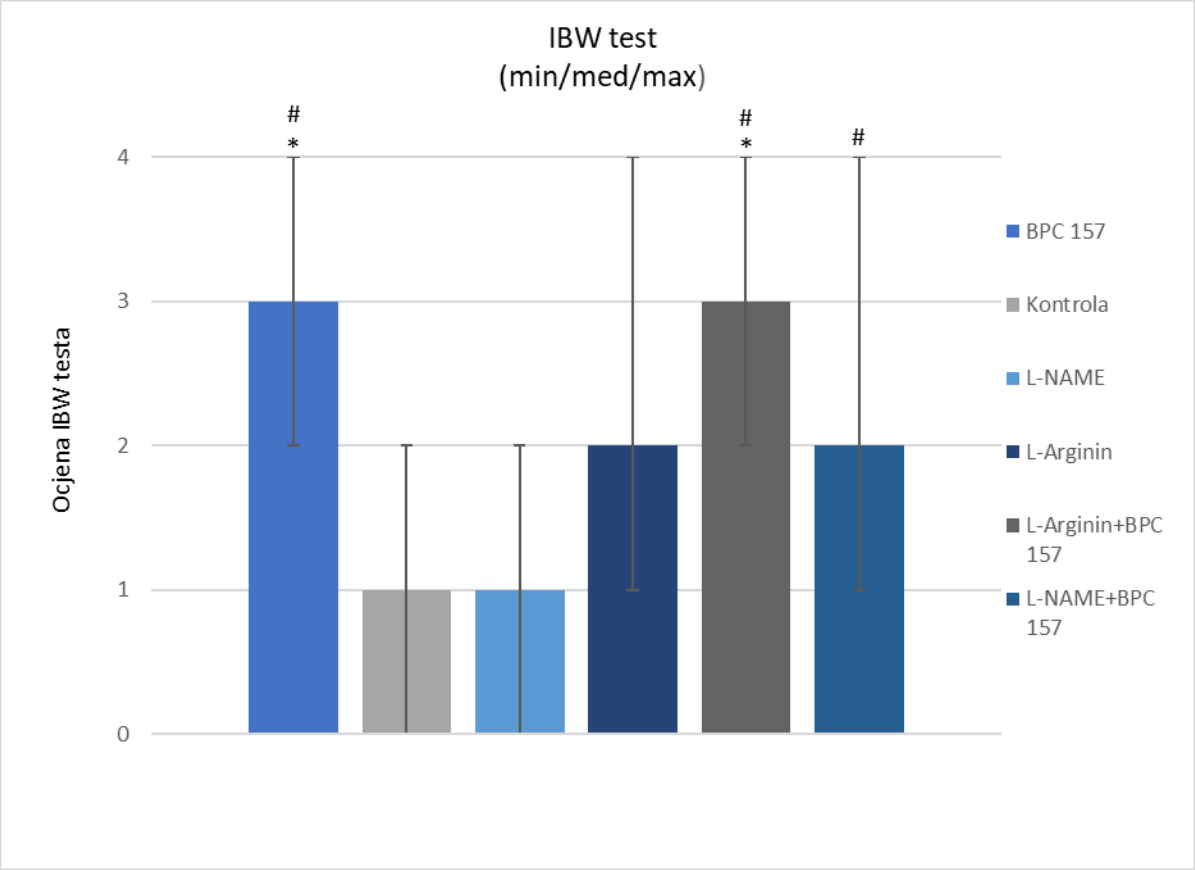


Slika 3. Razlika vremena latencije u MWM testovima, srednja vrijednost ± SD

Na slici su prikazani rezultati testiranja u MWM testu, razlika preoperativnog vremena latencije i postoperativnog vremena latencije (ΔT). Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost vremena latencije ± standardna devijacija, dok su * označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0.05$), dok su s # označene vrijednosti koje su statistički značajne u odnosu na grupu tretiranu s L-NAME ($p<0.05$).

IBW test služi za ispitivanje koordinacije prednjih i stražnjih udova ispitivanih životinja, ali isto tako služi za sveukupnu procjenu lokomotorne aktivnosti (65). U trening periodu, koji je bio dan prije operacije te se sastojao od četiri pokušaja hodanja, nije nađena nikakva statistički značajna razlika među pojedinim grupama. Sve testirane životinje su pokazale, barem djelomično, pogoršanje rezultata srednje vrijednosti u IBW testu u odnosu na preoperativno testiranje (Slika 4.), kada su sve tretirane životinje othodale cijelu hodnu prugu. U navedenom testu su najbolje prošle životinje tretirane ili samo pentadekapeptidom BPC 157 ili kombinacijom BPC-a 157 i L-arginina (Slika 4.) te su na testu imale median rezultata od tri, s minimalnom ocjenom od tri i maksimalnom od četiri, u slučaju BPC-a 157 te median rezultata od tri, s minimalnom ocjenom od tri i maksimalnom od četiri, bez statistički značajne razlike među njima, ali sa statistički značajnom razlikom u odnosu na druge testirane grupe. To znači da su životinje tretirane samo BPC-om 157, ili kombinacijom BPC-a 157 i L-arginina, u prosjeku othodale ¾ tražene hodne pruge i samim time nisu pokazivale značajne neurološke deficite u postoperativnom razdoblju. Životinje koje su tretirane s L-NAME-om su imale najgoru medijan vrijednost bodovanja od jedan, s minimalnom ocjenom od nula i maksimalnom od jedan, što znači da su u prosijeku bile u stanju othodati manje od ¼ hodne pruge (Slika 4.). Kontrolne životinje su imale median vrijednost rezultata od jedan, s minimalnom ocjenom nula i maksimalnom ocjenom dva, statistički značajno manji srednji rezultata u odnosu na životinje tretirane s BPC-om 157 (Slika 4.). Kombinacija L-NAME-a i pentadekapeptida BPC 157 je abolirala negativni učinak koji je L-NAME imao na skor IBW testa (Slika 4.) te su te životinje imale medijan vrijednost rezultata od dva,

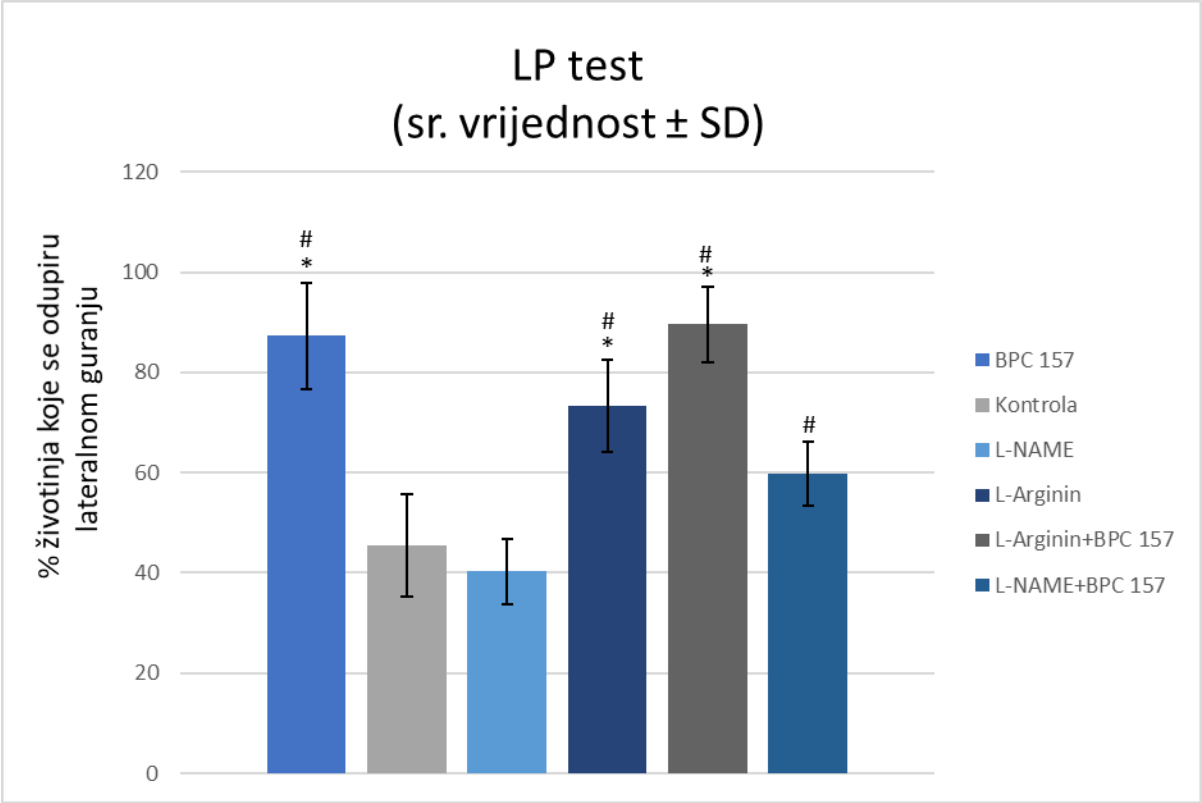
s minimalnom ocjenom jedan i maksimalnom tri, dakle statistički značajno poboljšanje u odnosu na životinje tretirane samo s L-NAME. Administracija L-arginina je djelomično atenuirala deficite nastale uslijed ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda te su životinje imale median rezultata dva, s minimalnom ocjenom jedan i maksimalnom ocjenom četiri (Slika 4.), dakle poboljšanje u odnosu na kontrolu, ali isto tako statistički značajno lošiji srednji rezultata od životinja tretiranih BPC-om 157.



Slika 4. Rezultati testiranja IBW testa, srednja vrijednost ± SD

Na slici su prikazani rezultati testiranja kod IBW testa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, s * su označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0.05$), dok su s # označene vrijednosti koje su statistički značajne u odnosu na grupu tretiranu s L-NAME ($p<0.05$).

LP test služi za procjenu grube snage i postularnog stava kod štakora (71) te je kao takav izveden prije i poslije implementacije modela BCAO. U inicijalnom testiranju niti jedna testirana životinja nije pokazivala nemogućnost odupiranja lateralnom guranju. Nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda sve testirane grupe su pokazale određeni neurološki deficit odnosno gubitak snage (Slika 5.). Obje skupine, skupina tretirana BPC-om 157 i skupina tretirana L-argininom i BPC-om 157, imale su najmanji gubitak snage, odnosno. najmanje testiranih životinja se nije moglo oduprijeti lateralnom guranju (Slika 5.). Tako se u skupini tretiranoj BPC-om 157 87.2 ± 6.4 % životinja uspjelo oduprijeti lateralnom guranju, dok se u skupini tretiranoj L-argininom i BPC-om 157 89.5 ± 7.6 % životinja oduprijelo lateralnom guranju te između te dvije grupe nije nađena statistički značajna razlika u ishodu LP testa. Samostalna aplikacije L-arginina je u 73.2 ± 9.2 % testiranih životinja uspijela sačuvati mogućnost odupiranja lateralnom guranju (Slika 5.), statistički značajno manje u odnosu na samostalnu aplikaciju BPC-a 157 i kombinaciju BPC-a 157 i L-arginina. Životinje tretirane s L-NAME su pokazale najveći gubitak snage nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda te se samo 40.2 ± 6.6 % testiranih životinja uspijelo oduprijeti lateralnom guranju (Slika 5.). Koadministracija L-NAME i BPC-a 157 je poboljšala ishod LP testa, ukupno 59.8 ± 6.4 % životinja se oduprijelo lateralnom guranju što je statistički značajan porast u odnosu na samostalnu administraciju L-NAME (Slika 5.). Kontrolne životinje su se u 45.4 ± 10.3 % slučajeva oduprle lateralnom guranju (Slika 5.), statistički značajno manje u odnosu na skupinu tretiranu BPC-om 157, ali i L-argininom kao i kod životinja tretiranih koadministracijom L-arginina i BPC-157.



Slika 5. Rezultati testiranja LP testa, srednja vrijednost ± SD

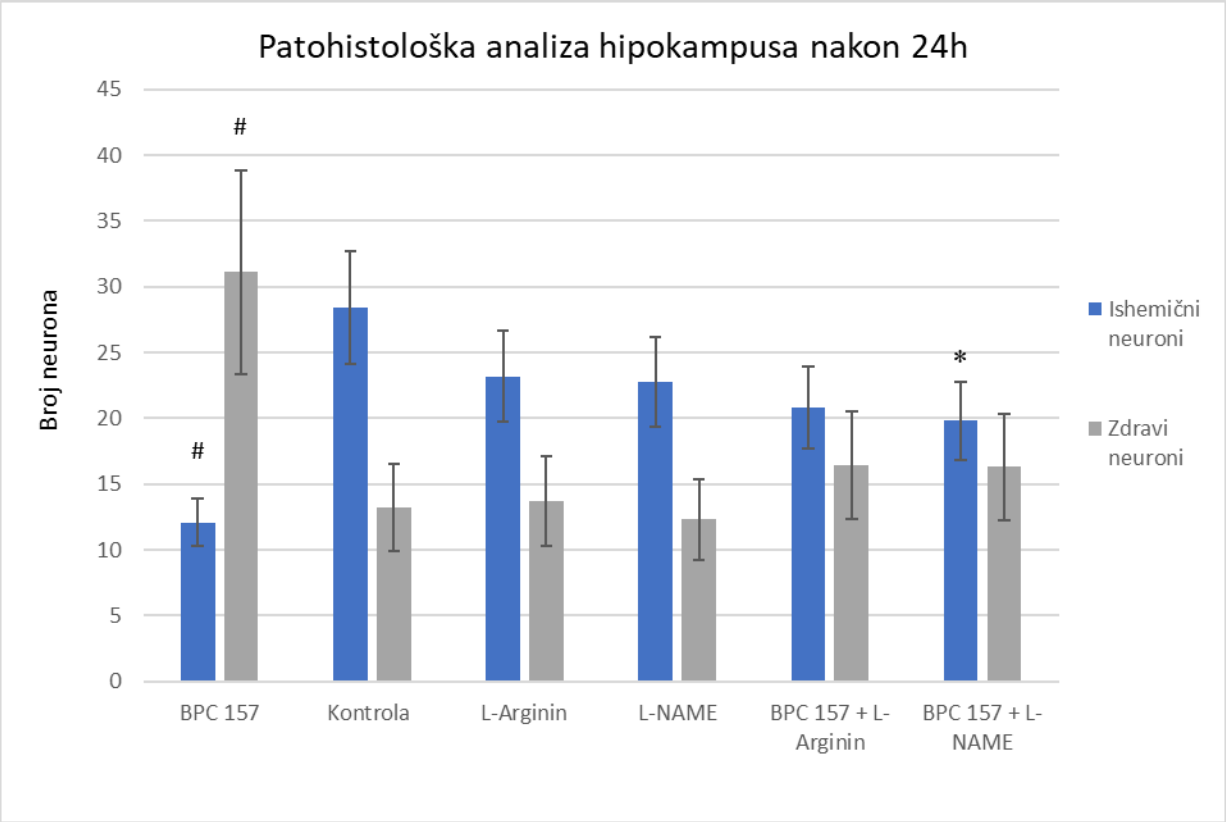
Na slici su prikazani rezultati testiranja kod LT testa. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, s * su označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0.05$), dok su s # označene vrijednosti koje su statistički značajne u odnosu na grupu tretiranu s L-NAME ($p<0.05$).

.

Patohistološkom analizom se pokušalo ustanoviti kakav utjecaj ishemijsko-reperfuzijske ozljede imaju na mozak štakora te kako aplicirane supstance utječu na ishod istih. Poznato je da je hipokampus, neuroni regija CA1-CA2, najpodložniji promjenama koncentracije kisika točnije hipoksičnim ozljedama (53, 60). Nadalje je poznato da je za promjene uzrokovane hipoksijom potrebno i do tri dana da bi bile u potpunosti vidljive (60, 69). Kod svih testiranih grupa je došlo do ishemije i posljedične smrti neurona nakon 24 sata (Slika 6.) te se kod svih testiranih grupa, u različitoj mjeri, vidjela odgođena neuralna smrt nakon 72 sata reperfuzije (Slika 7.). Kontrolna skupina je nakon 24 sata (Slika 6.) poslije indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda, imala 28.4 ± 4.8 ishemično promijenjenih neurona i 13.2 ± 3.7 zdravih neurona, u prosjeku na pet vidnih polja (Slika 8.). Životinje tretirane BPC-om 157 su nakon 24 sata imale 12.1 ± 3.3 ishemično promijenjenih neurona i 31.1 ± 4.9 zdravih neurona (Slika 2., Slika 9.), obje vrijednost statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Tretiranje životinja s L-argininom ili L-NAME nije dovelo do statistički značajnog smanjenja broja ishemičnih neurona na 24 sata u odnosu na kontrolne životinje (Slika 6.) te su tako životinje tretirane s L-argininom nakon 24 sata imale 23.2 ± 3.5 ishemično promijenjenih neurona i 13.7 ± 3.8 zdravih neurona (Slika 10.) dok je grupa tretirana s L-NAME imala 22.8 ± 4.3 ishemično promijenjenih neurona i 12.3 ± 2.9 zdravih neurona (Slika 11., Slika 6.). Grupa tretirana s kombinacijom L-arginina i BPC-a 157 je nakon 24 sata imala 20.8 ± 2.0 ishemično promijenjenih neurona i 16.4 ± 3.9 zdravih neurona (Slika 12., Slika 6.), te je broj zdravih neurona bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu. Tretman kombinacijom BPC-a 157 i L-NAME je doveo do statistički značajne redukcije broja

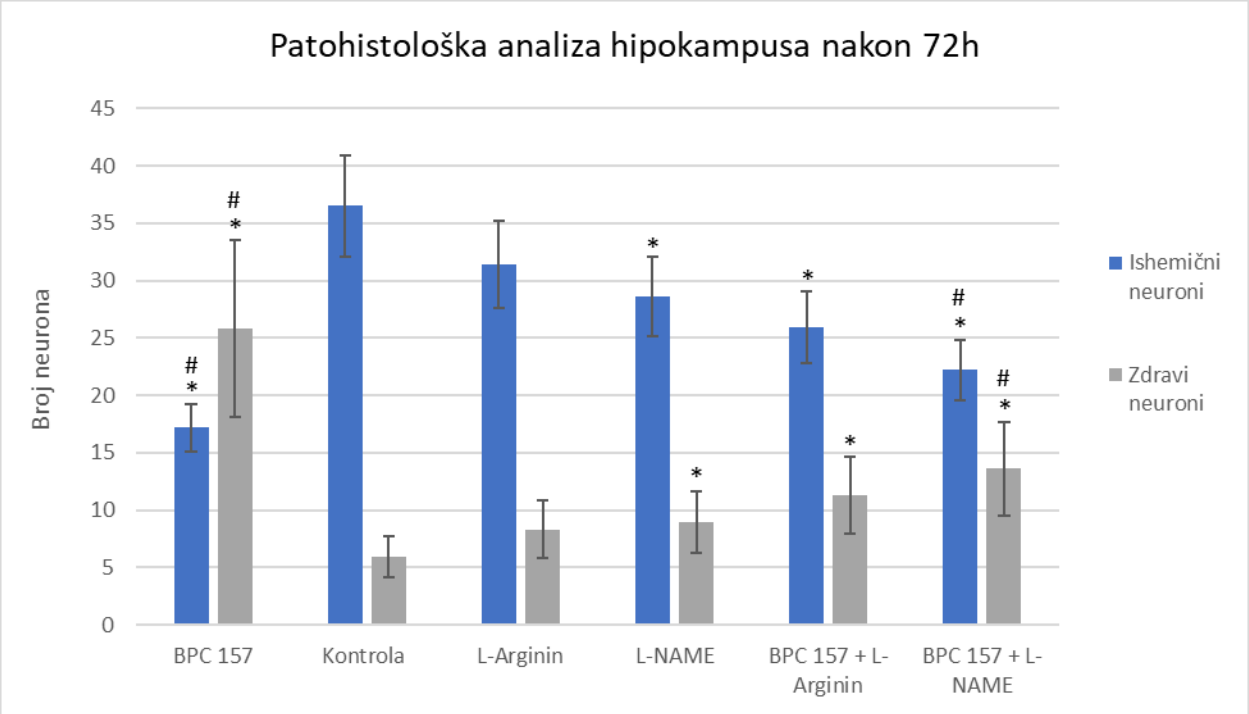
ishemično promijenjenih neurona u odnosu na samostalni tretman s L-NAME (Slika 6.), te je ta grupa imala 19.8 ± 3.1 ishemično promijenjenih neurona i 16.3 ± 4.0 zdravih neurona (Slika 3.). Te vrijednosti patohistološke analize su statistički značajno manje u odnosu na BPC 157 grupu dok u odnosu na kontrolnu skupinu statistički značajne razlika vidljiva samo kod ishemično promijenjenih neurona. U kontrolnoj grupi, nakon 72 sata reperfuzije (Slika 7.), broj ishemičnih neurona je dodatno porastao na 36.5 ± 5.8, dok je broj zdravih neurona dodatno reduciran na 5.9 ± 3.3 (Slika 14.). Nakon 72 sata reperfuzije BPC 157 je uspio reducirati daljnju progresiju smrti neurona te su životinje imale 17.2 ± 3.3 ishemično promijenjenih neurona i 25.8 ± 4.2 zdravih neurona (Slika 15.), obje vrijednosti su isto bile statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Slika 7.). Inicijalna aplikacija L-arginina je nakon 72 sata reperfuzije dovela do pogoršanja odgođene neuralne smrti te je ta skupina imala 31.4 ± 5.3 ishemičnih neurona i 8.3 ± 4.8 zdravih neurona (Slika 7.). Za razliku od toga, postoperativni tretman s L-NAME je smanjio progresiju odgođene neuralne smrti te je ta grupa imala 28.6 ± 4.7 ishemičnih neurona i 8.9 ± 5.1 zdravih neurona, statistički značajno manje od kontrolne skupine, ali i dalje statistički značajno više u odnosu na BPC 157 skupinu (Slika 7.). Tretman kombinacijom L-arginina i BPC-a 157 je abolirao progresiju smrti neurona u razdoblju reperfuzije, s brojem zdravih neurona od 11.3 ± 3.8 i ishemično promijenjenih od 25.9 ± 3.1, predstavlja statistički značajno poboljšanje u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u odnosu na životinje tretirane s BPC-om 157 i dalje statistički značajno manje (Slika 7.). Kombinirani tretman s L-NAME i BPC-om 157 je statistički značajno smanjio odgođenu neuralnu smrt u odnosu na kontrolnu i L-

NAME skupinu (Slika 7.) te je s brojem ishemično promijenjenih neurona od 22.2 ± 3.2 i zdravih od 13.6 ± 3.6 jedina testirana skupina koja nakon 72 sata nije imala statistički značajnu progresiju u odnosu na BPC 157 skupinu.



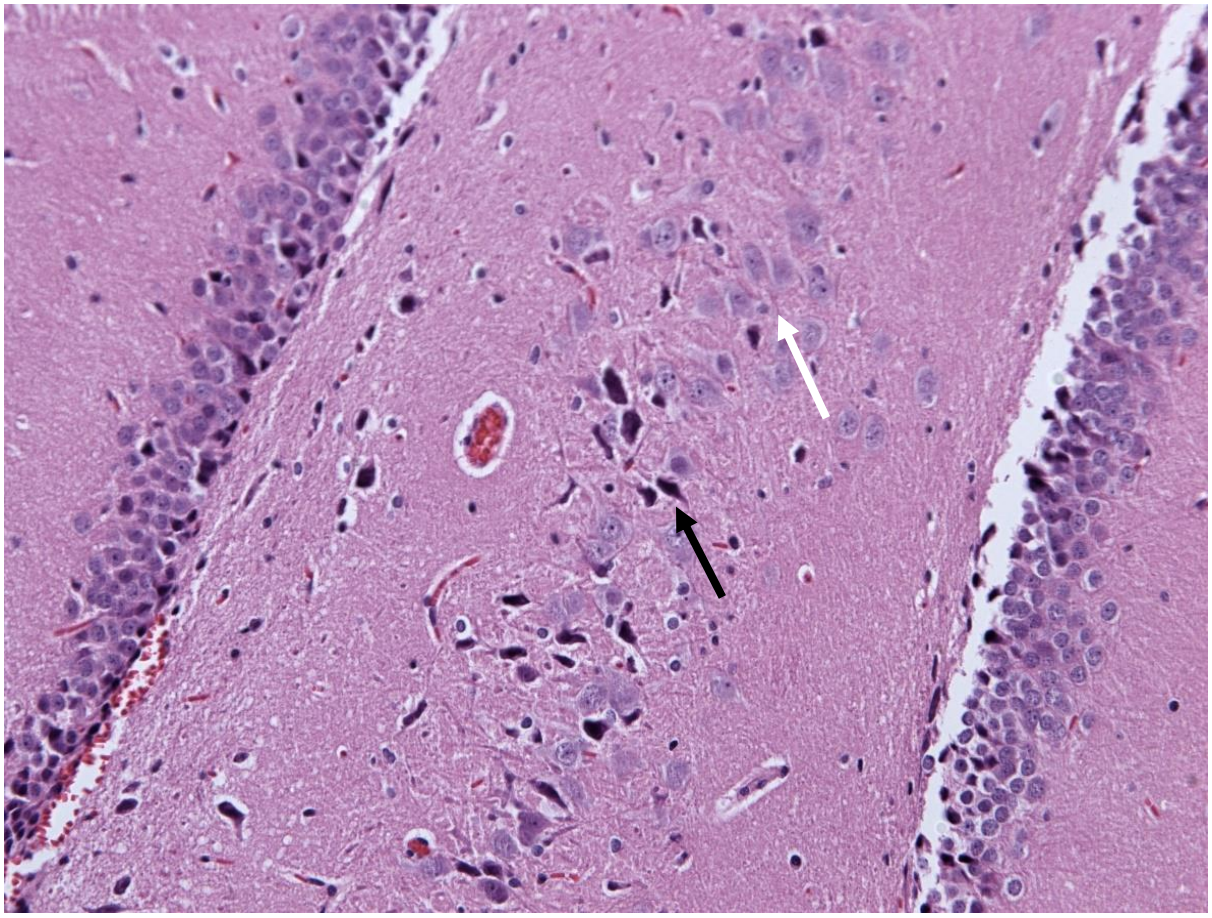
Slika 6. Rezultati patoohistološke analize hipokampusa nakon 24 sata

Na slici su prikazani rezultati patohistološke analize regije CA4 hipokampusa. Rezultati brojanja ishemično promijenjenih neurona i zdravih neurona prikazani su kao vrijednosti izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, dok su * označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata ($p<0.05$), dok su s # označene vrijednosti koje su statistički značajne u odnosu na grupu tretiranu s L-NAME ($p<0.05$).



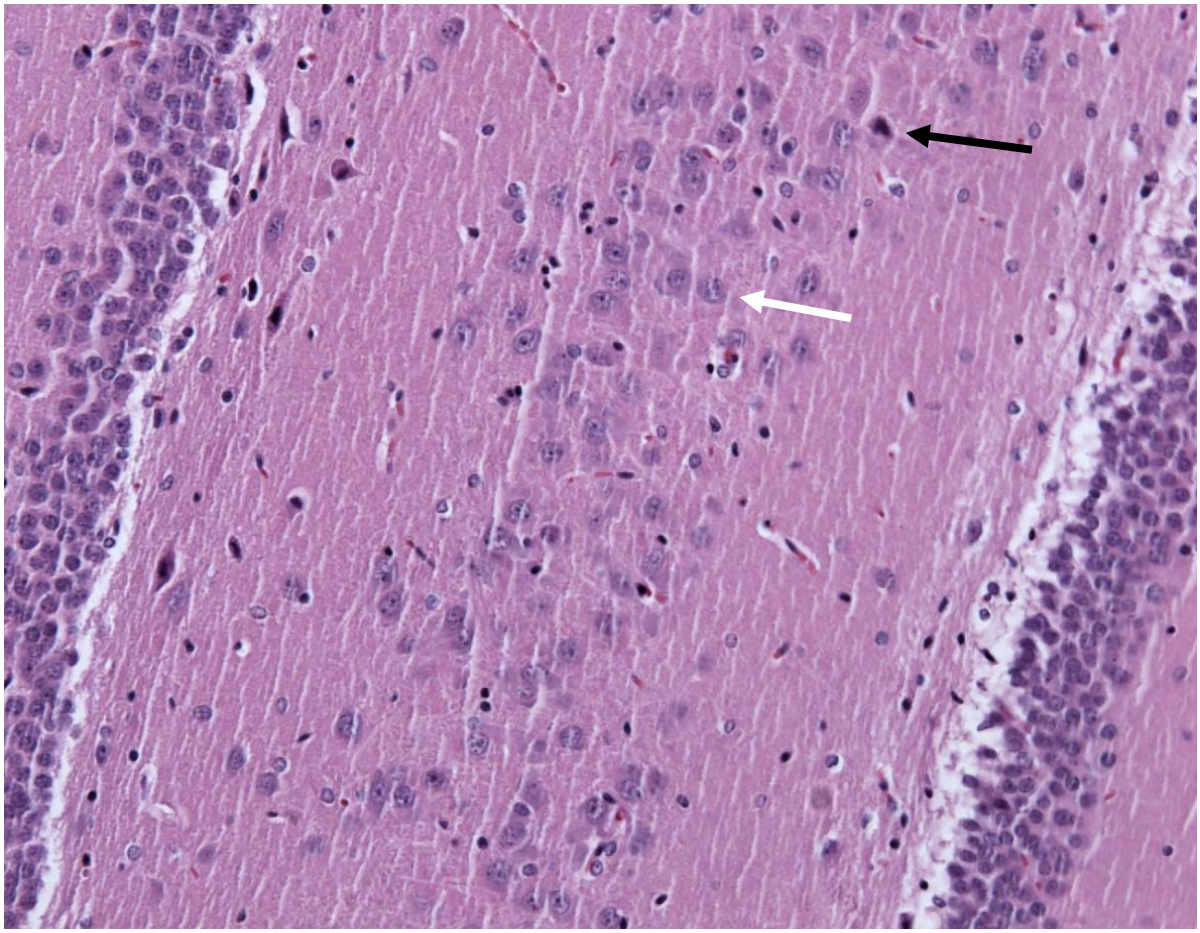
Slika 7. Rezultati patoohistološke analize hipokampusa nakon 72 sata

Na slici su prikazani rezultati patohistološke analize regije CA4 hipokampusa. Rezultati brojanja ishemično promijenjenih neurona i zdravih neurona prikazani su kao vrijednosti izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, sa * su označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 72 sata ($p<0.05$), dok su s # označene vrijednosti koje su statistički značajne u odnosu na grupu tretiranu s L-NAME ($p<0.05$).



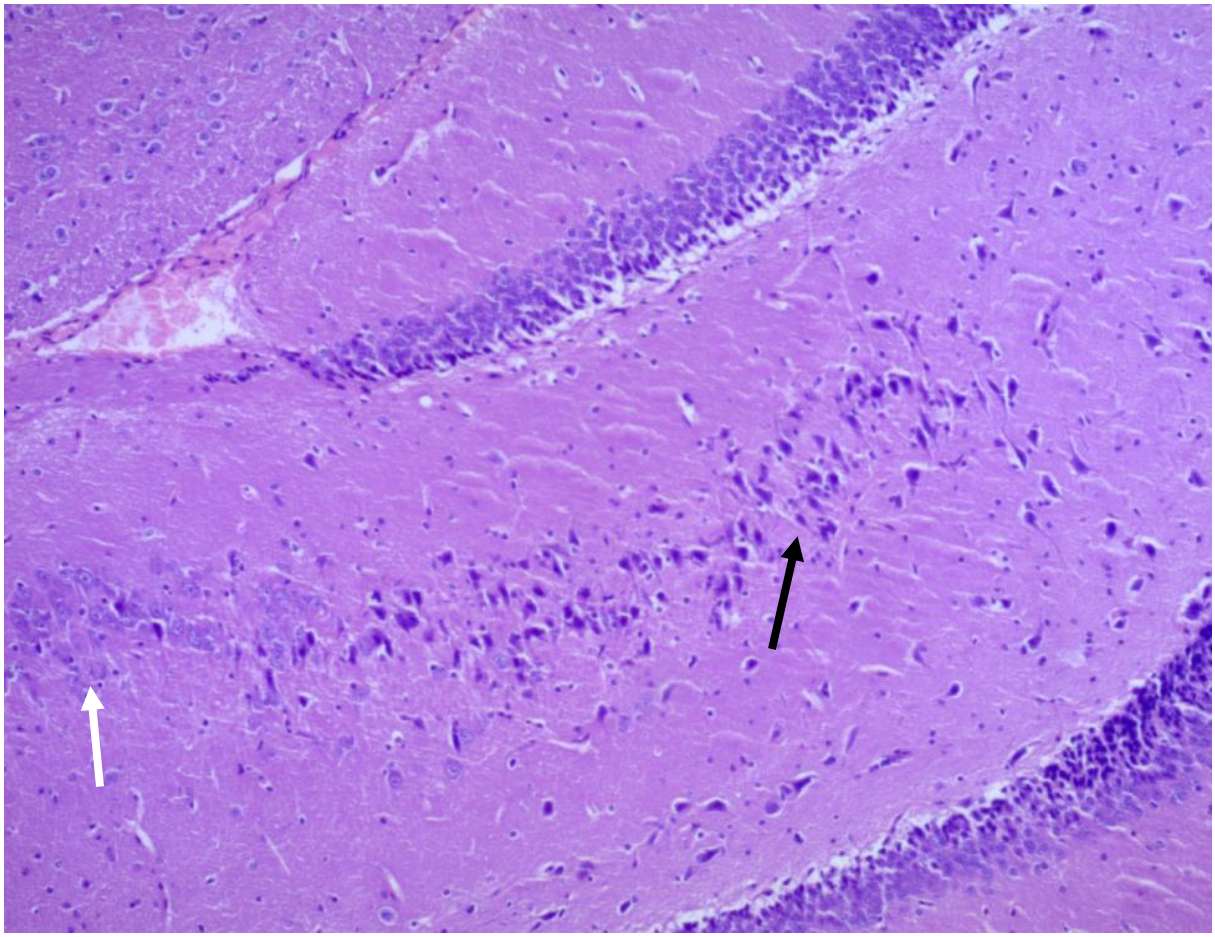
Slika 8. Patohistološki prikaz hipokampusa kontrolne skupine nakon 24 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x200), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana tipična CA4 regija hipokampusa kod kontrolne skupine (1ml 0.9% f.o., i.p.) nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



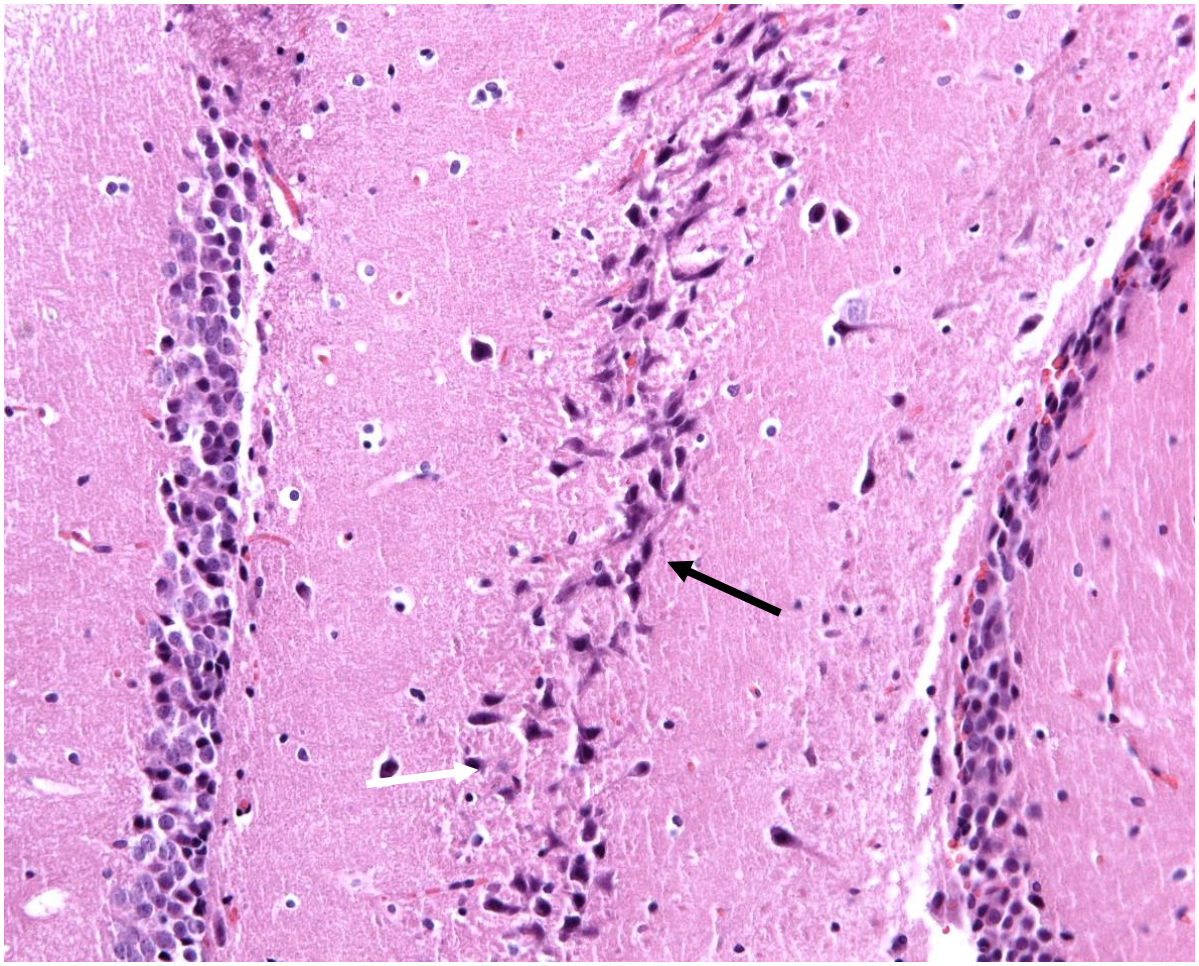
Slika 9. Patohistološki prikaz hipokampusa BPC 157 skupine nakon 24 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, uvećanje x200), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana tipična CA4 regija hipokampusa kod BPC 157 skupine (10 μg/kg i.p.) nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



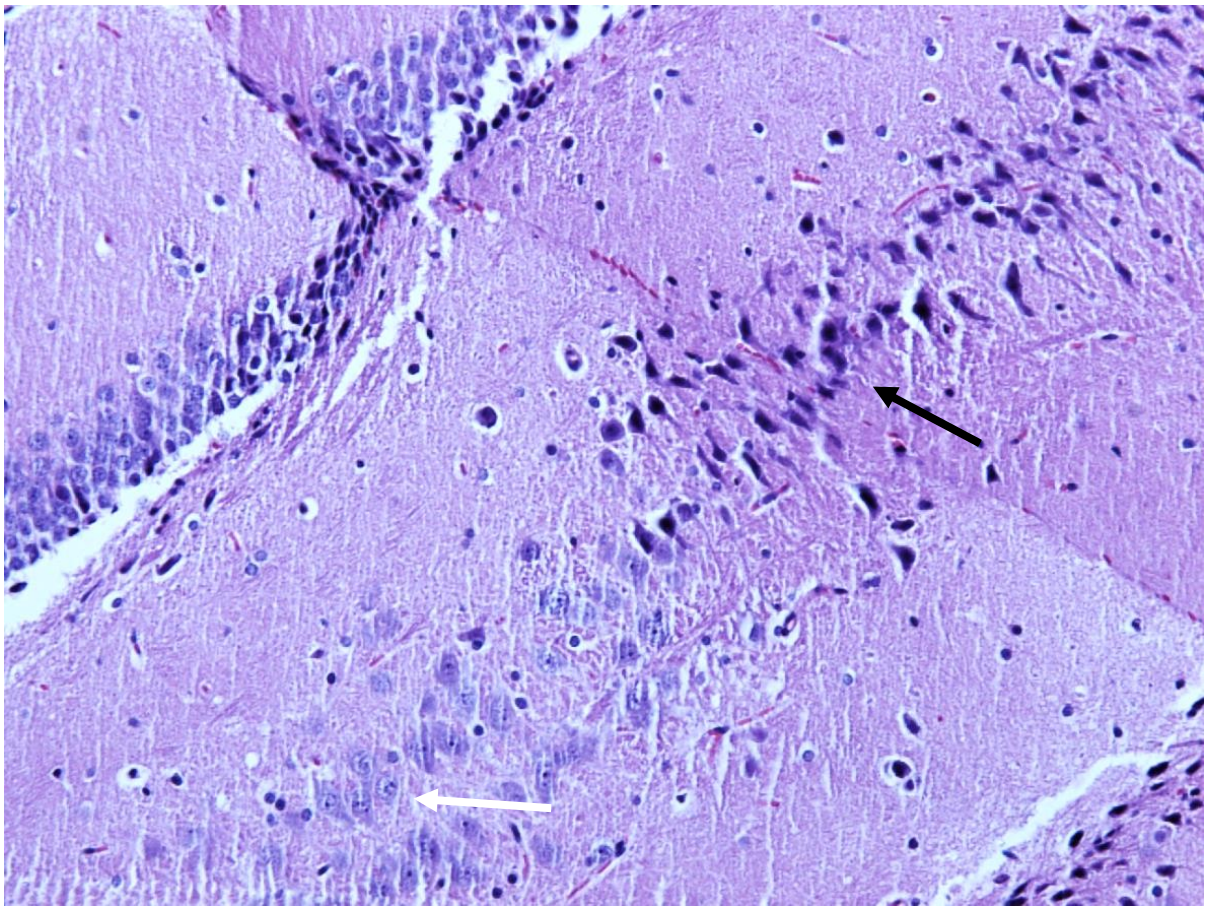
Slika 10. Patohistološki prikaz hipokampusa L-arginin skupine nakon 24 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x100), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana CA4 regija hipokampusa kod L-arginin skupine (100 mg/kg i.p.) nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



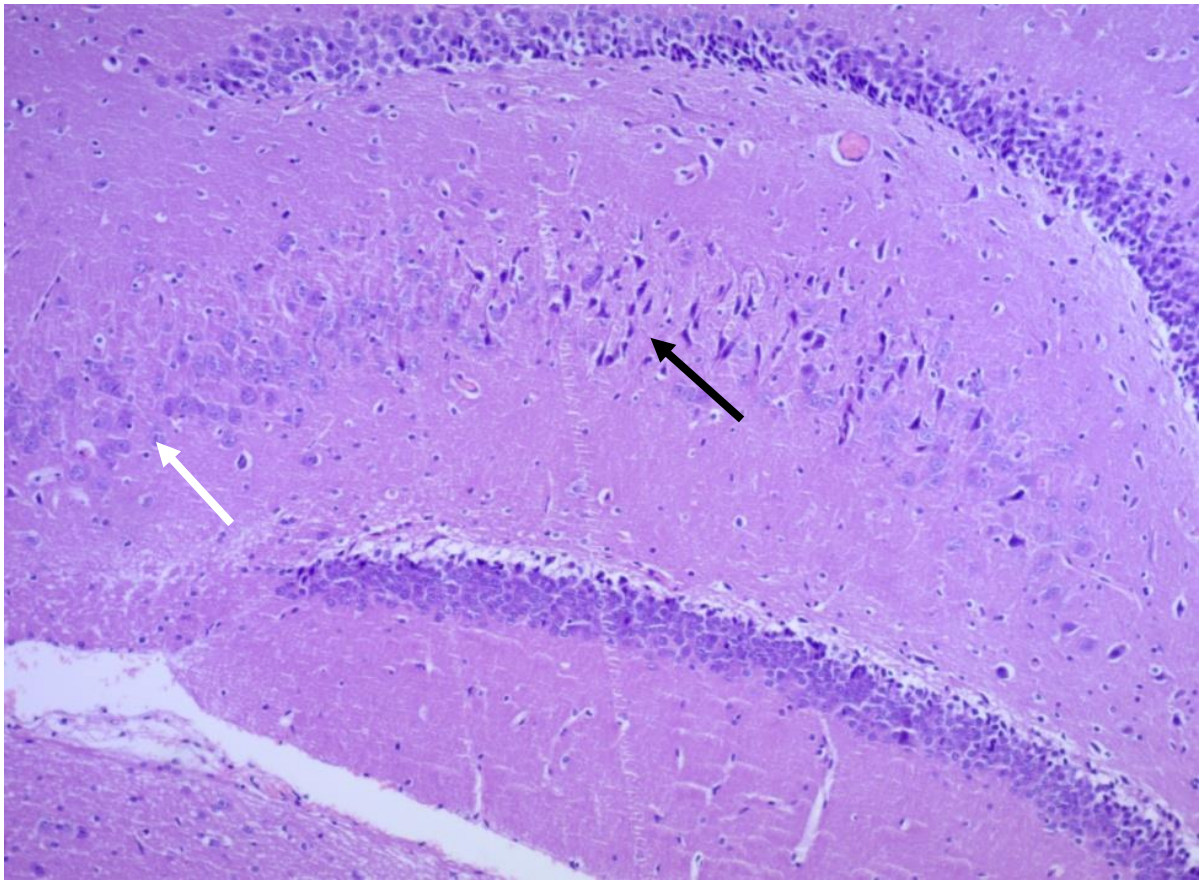
Slika 11. Patohistološki prikaz hipokampusa L-NAME skupine nakon 24 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x200), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana tipična CA4 regija hipokampusa kod L-NAME skupine (5 mg/kg i.p.) nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



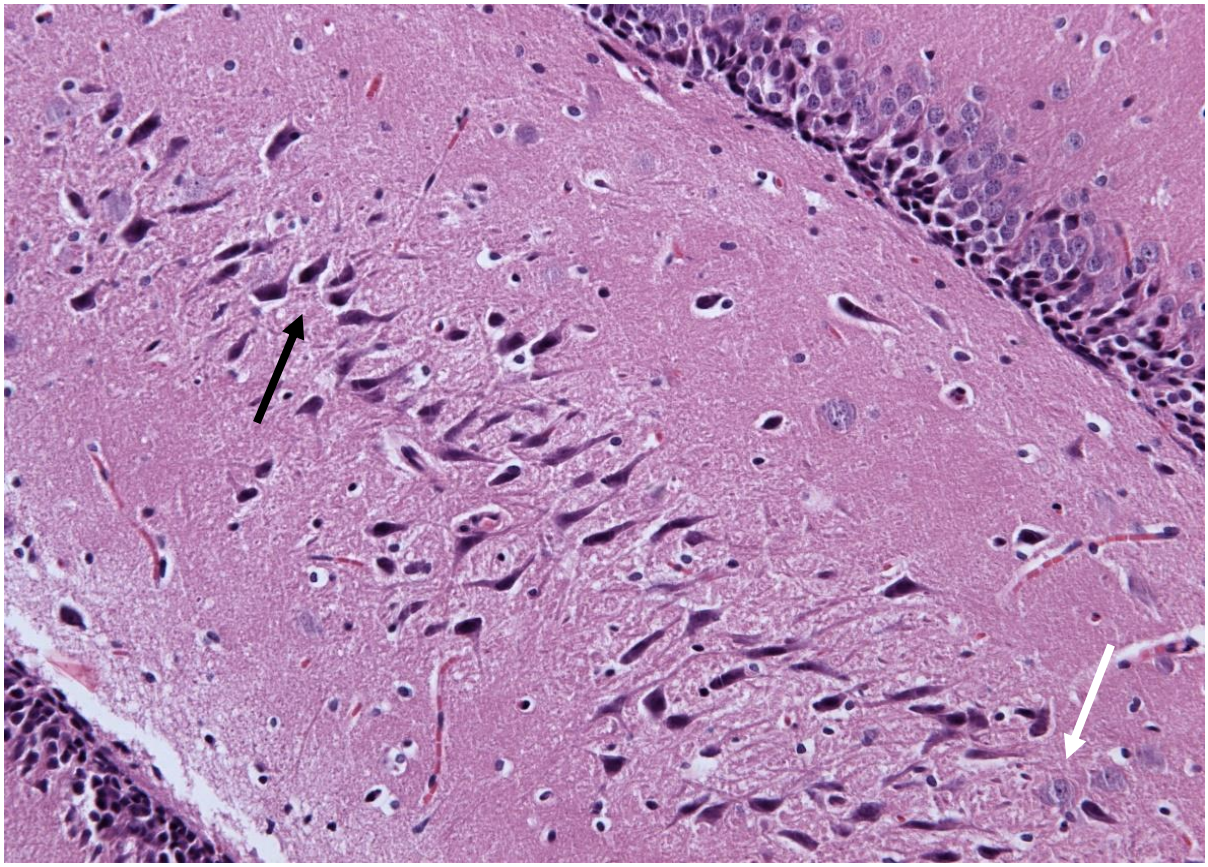
Slika 12. Patohistološki prikaz hipokampusa L-arginin + BPC 157 skupine nakon 24 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x200), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana tipična CA4 regija hipokampusa kod L-arginin (100 mg/kg i.p.) + BPC 157 (10 µg/kg i.p.) skupine nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



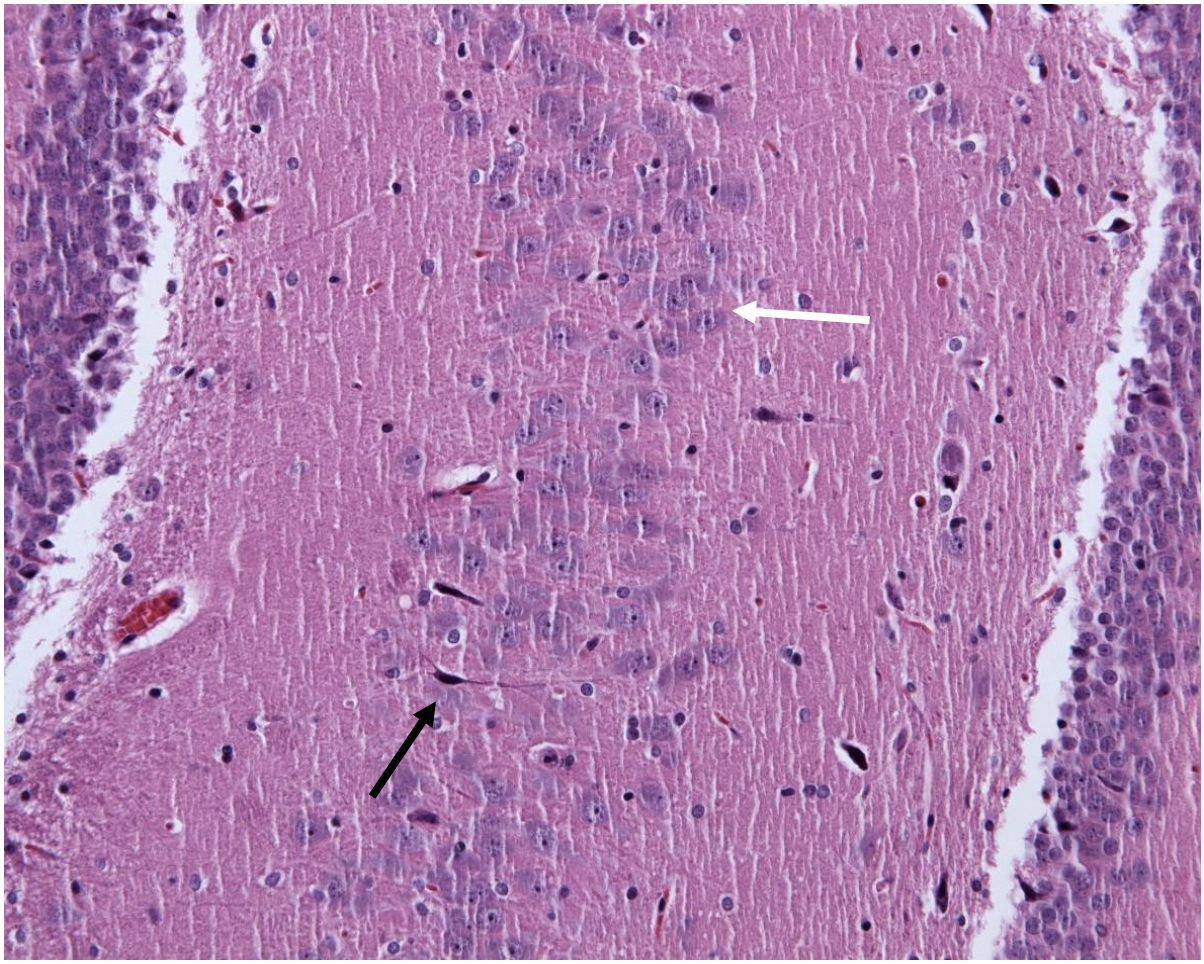
Slika 13. Patohistološki prikaz hipokampusa L-NAME + BPC 157 skupine nakon 24 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x100), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana CA4 regija hipokampusa kod L-NAME (5 mg/kg i.p.) + BPC 157 (10 µg/kg i.p.) skupine nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



Slika 14. Patohistološki prikaz hipokampusa kontrolne skupine nakon 72 sata

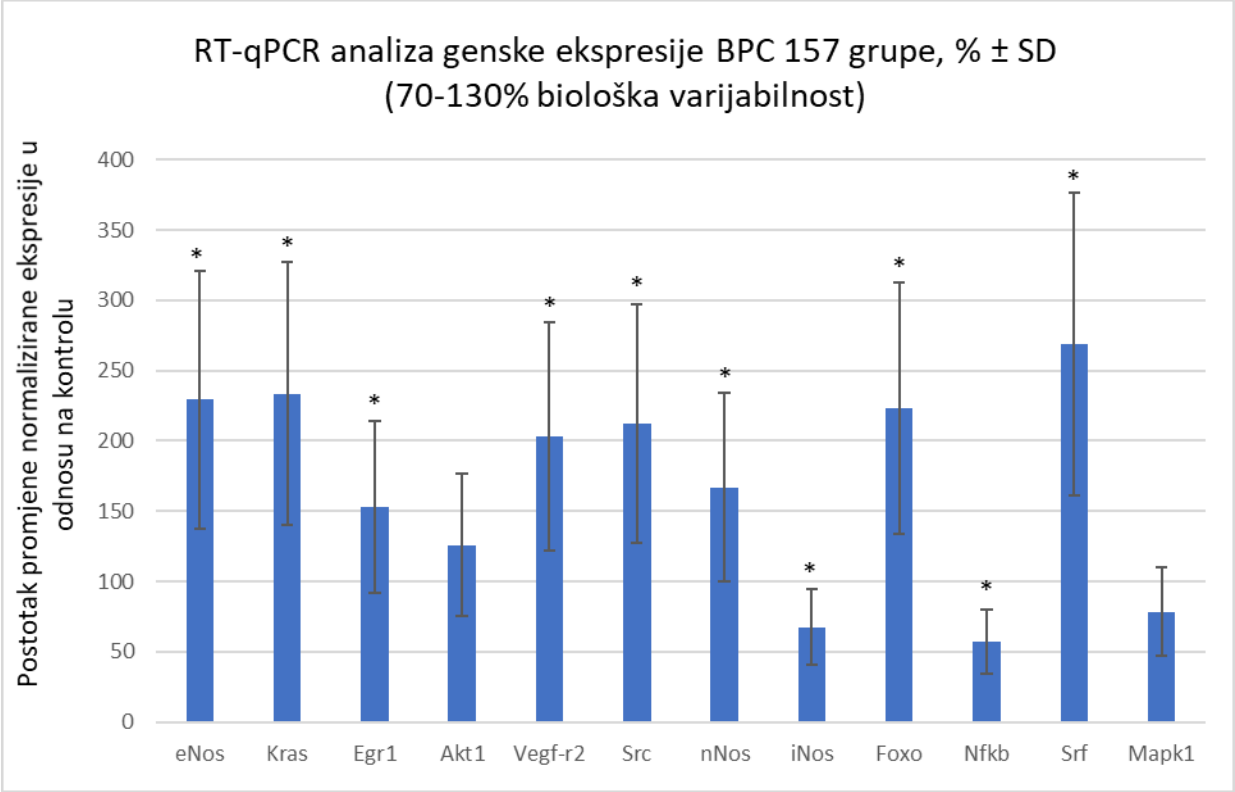
Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x200), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana tipična CA4 regija hipokampusa kod kontrolne skupine (1ml 0.9% f.o., i.p.) nakon 24 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.



Slika 15. Patohistološki prikaz hipokampusa BPC 157 skupine nakon 72 sata

Patohistološki prikaz hipokampusa (bojanje HE, povećanje x200), nakon indukcije ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda modelom BCAO. Na slici je prikazana tipična CA4 regija hipokampusa kod BPC 157 skupine (10 μg/kg i.p.) nakon 72 sata reperfuzije, crnom strjelicom su označeni ishemijski promijenjeni neuroni dok su bijelom strjelicom označeni zdravi neuroni.

Rezultati RT-qPCR genske analize, na razini mRNA, pokazali su kako pentadekapeptid BPC 157 ima snažan učinak na indukciju nekoliko gena (Slika 16.). Skupina tretirana BPC-om 157 je u odnosu na kontrolnu skupinu imala statistički značajno povišene vrijednosti razine mRNA za VEGF-A za 203.3 ± 75.2%. Nadalje, povišene vrijednosti razine ekspresije mRNA otkrivene su za KRAS gen i to za 233.7 ± 143.8%, za gen SRC u vrijednosti od 212.3 ± 180.3%, za gen FOXO u vrijednosti od 223.6 ± 72.7%, za gen SRF u vrijednosti od 268.9 ±117.3%. Svi navedeni geni su imali statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 16.). Gen za ERG1 je imao vrijednost malo iznad razine biološke varijabilnosti, koja se kreće u rasponu od 70 do 130% (72), s vrijednošću od 152.8 ± 59.3%, no i dalje statistički značajne razlike. Dva od ispitivanih gena su imali vrijednosti razine mRNA unutar raspona biološke varijabilnosti (Slika 16.), tako je razina mRNA za gen AKT1 bila 125.9 ± 65.9%, dok je razina mRNA za MAPK1 bila 78.4 ±31.9 %. Od svih ispitivanih gena, jedino je razina mRNA za gen NFKB bila statistički značajno suprimirana u odnosu na kontrolu (Slika 16.), s vrijednošću od 57.2 ± 42.5%. Od testiranih razina vrijednosti za mRNA za sve tri izoforme NO sintetaze, pentadekapeptid je pokazao jedinstveni modulatorni učinak na iste (Slika 16.). Tako je razina mRNA za inducibilnu NO sintetazu bila 67.4 ± 49.9%, što znači da je bila statistički značajno suprimirana u odnosu na kontrolnu skupinu. Razina mRNA za neuralnu NO sintetazu je bila malo iznad razine biološke varijabilnosti, ali ipak statistički značajna razlika, s vrijednošću od 167.1 ± 73.9%. Razina mRNA za endotelnu NO sintetazu je pokazala najveću statistički značajnu indukciju ekspresije s obzirom na kontrolnu skupinu, s vrijednošću od 229.0 ± 101.2%.



Slika 16. RT-qPCR analiza genske ekspresije

Rezultati RT-qPCR analize genske ekspresije grupe tretirane sa BPC 157, prikazani su kao normalizirane vrijednosti ekspresije izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija, dok su * označene sve vrijednosti koje su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nakon 24 sata ($p \leq 0.05$).

6. Rasprava

Moždani udar je liječnicima poznat od antičkih vremena kada su ga opisivali Hipokrat i Galen (73) ali su tek posljednjih dvadesetak godina napravljeni značajni pomaci u razumijevanju patofiziologije moždanog udara, to jest ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda koje se nalaze u podlozi istoga (48). Iako se danas zna, da osim ishemije u patofiziologiji moždanog udara dolazi i do drugih načina oštećenja, kao što je endotoksičnost, neuroinflamacija, oksidativni i nitrosativni stres (47, 48), te da to sve pridonosi lošijem ishodu (74) i dalje postoji veliki broj nepoznanica u tom cijelom procesu (48). Tome u prilog i govori neprestana potraga za novim terapijskim rješenjima te nebrojni neuspjeli klinički pokusi (48) koji su koristili razne pristupe od snižavanja krvnog tlaka, preko minimalno invazivne kirurgije pa sve do hemostatskih i neuroprotektivnih lijekova (75). Iako se novim pristupima i saznanjima uspjelo smanjiti smrtnost od moždanog udara (75), troškovi rehabilitacije i dalje su sve viši te predstavljaju socijalno i ekonomsko opterećenje (48). Većina moždanih udara je ishemijske patogeneze, točnije okluzija krvne žile je podležeći uzrok same ishemije (47), te je to uzrok moždanog udara u više od 87% slučajeva (47). U sklopu te etiopatogeneze, u području zahvćenim ishemijom, od posebnog je interesa područje penumbre (76) jer pravodobnom terapijskom intervencijom možemo smanjiti progresiju infarktom zahvaćenog područja i time poboljšati krajnji ishod (48, 76). Područje penubre je zanimljivo iz razloga što tu neuroni još neko vrijeme ostaju metabolički aktivni te se u procesu reperfuzije u tom području odvijaju procesi endotoksičnosti, neuroinflamacije, oksidativnog i nitrosativnog stresa (48, 76).

Pentadekapeptid je do sada implementiran u nizu različitih modela ozljede, kod različitih vrsta (1, 5), te je pokazao kako sustavno pospješuje cijeljenje ozljede te vraćanje inicijalne funkcije tkiva (3, 4, 19, 20, 37, 46, 77). Dokazano je kako BPC 157 utječe na cijeljenje rana i održavanje integriteta endotela u nizu organskih sustava kao što je koža (46), mišić (32), tetive (32), ligament (33), ali i specifičnih tkiva kao što je korneja (34). Za pentadekapeptid BPC 157 je pokazano kako uspješno održava integritet gastrointestinalne mukoze u nizu različitih modela; izazvanih akutnom i kroničnom administracijom alkohola (39); administracijom haloperidola ali i drugih antipsihotika (9, 10); administracijom celekoksiba i NSAID-ova (28, 78); administracijom ibuprofena ili paracetamola (79, 80), administracijom inzulina (81), ali i citostatika kao što je ciklofosfamid (82). Nadalje pokazano je kako uspješno djeluje u cijeljenju mnogo kompleksnijih vrsta ozljeda, u kojima je involvirano istovremeno cijeljenje različitih tkiva, te je tako uspješno cijelio kolokutane fistule (44), ezofagokutane fistule (45), kolovezikalne fistule (83), duodenokutane fistule (84), kolovaginalne fistule (85) i gastrokutane fistule (86). Na osnovi ovih istraživanja, a uzimajući u obzir univerzalnu mogućnost pospješivanja cijeljenja rana u raznim organskim sustavima, predloženo je da je pentadekapeptid BPC 157 citoprotektivni agens, to jest medijator Robertsove citoprotekcije (3, 77). Premisa da stanice imaju određene mehanizme pomoću kojih preživljavaju te se adaptiraju na utjecaj različitih noksi je osnova Robertsove citoprotekcije (77, 87). Uzimajući u obzir sve navedeno, jasno je zašto se pentadekapeptid BPC 157 smatra potencijalnim medijatorom Robertsonove citoprotekcije. Iako je teorije citoprotekcije dugo prisutna u znanstvenoj zajednici, citoprotekcija neurona je još uvijek relativno nova (88, 89). Implementirajući BPC 157 u

niz različitih neuroloških oštećenja kao što je traumatska ozljeda mozga (21), oštećenje kralježnične moždine (23), oštećenje živca (22), ali i kod oštećenja izazvanim visokim dozama kuprizona (18) pokazalo se kako BPC 157 zadržava benefitan učinak na cijeljenje i u mozgu. Za razliku od dosadašnjih studija prekondicioniranja (90–92), gdje se pokušavalo smanjivanjem učinka ishemije postići smanjivanje reperfuzije, aplikacija pentadekapeptida BPC 157 za vrijeme reperfuzije je već dokazano djelotvorna (25–27). U modelu ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda pentadekapeptid BPC 157 je u više različitih animalnih modela pokazao kako ima povoljan učinak na ishemijsko-reperfuzijske ozljede (25–27). Tako je u modelu duboke venske tromboze pokazano kako BPC 157 dovodi do otvaranja kolateralnih krvnih žila te tako premošćuje defekt okludirane krvne žile (25). Nadalje BPC 157 je održao integritet endotela krvne žile, abolirao učinak oksidativnog stresa te povećao produkciju NO-a čime je uspio spriječiti razvitak Virhovljevog trijasa (25). Kada je BPC 157 bio konfrontiran s podvezivanjem drugih žila, kao što su količna arterija ili pankreatičnoduodenalna vena, pokazao je benefitne učinke na zaustavljanje progresije ishemije (26, 27). Kod podvezivanja količne arterije je zaustavio progresiju kolitisa te održao funkciju crijeva (26), dok je pri podvezivanju pankreatičnoduodenalne vene spriječio nastanak pankreatitisa i održao njegovu funkciju (27), te je u oba slučaja spriječio nastanak daljnjih oštećenja i ubrzao cijeljenje tkiva. Svi navedeni učinci se, barem teorijski, baziraju na njegovim citoprotektivnim učincima (3, 77), ali i na njegovim već dokazanim angioprotektivnim djelovanjem (1, 32). Zanimljivo je da u teoriji citoprotekcije, kao i u najnovijim istraživanjima ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (53, 93, 94), postoje pojmovi protekcije-citoprotekcije i pre-kondicionirane protekcije/citoprotekcije kojima se objašnjavaju pojedini benefitni učinci citoprotektivnih

agensa (3, 37, 77). Ishemijsko prekondicioniranje se smatra novim mogućim terapijskim pravcem u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama (93, 94) te je stoga istraživanje uloge pentadekapeptida BPC 157 u istim ozljedama još zanimljivije. Pokazano je isto tako da BPC 157 sprječava povećanje proinflamatornih citokina, kao što su IL-6, TNF-α (95) te smanjuje tumorom uzrokovanu kaheksiju (95) i promjene u ekspresiji gena *Foxo3, Akt1, Mtor,* and *Gsk3b* (95). Daljnjom implementacijom pentadekapeptida BPC 157 u modelu ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda mozga pokazano je da BPC 157 sprječava nastanak težih neuroloških deficita, reducira učinak ishemije i reperfuzije na neurone te smanjuje progresiju odgođene neuronalne smrti. U MWM testu su životinje tretirane s BPC-om 157 pokazale najmanji gubitak memorije, dok su životinje tretirane s agonistima ili antagonistima NO sustava u oba slučaja pokazale veći gubitak memorije. Iako je poznato, da je NO nužno potreban za nastanak i povratak memorije (96), modulatorni učinak BPC-a 157 na NO sustav se pokazao boljim nego agonističko djelovanje L-arginina na NO sustav. Nadalje simultana administracija BPC-a 157 s L-argininom ili L-NAME-om je pokazala bolje rezultate na održavanje memorije, nego administracija samo L-arginina ili L-NAME-a. Modulatorno djelovanje BPC-a 157 na NO sustav je do sada već istraživano te je pokazano kako BPC 157 ima situacijski specifičan učinak, točnije u nekim istraživanjima je djelovao kao agonist NO sustava, a u nekima kao antagonist (24, 36). Pri procijeni grube motoričke snage i postularnog stava, koristeći LP test, kao i pri procjeni lokomotornih sposobnosti, koristeći IBW test, životinje tretirane BPC-om 157 su najbolje skorirane te su pokazale najmanje deficita u ispitivanim testovima. Kombinacija L-arginina a BPC-om 157 ili kombinacija L-NAME s BPC-om je pokazala bolje rezultate, nego administracija samo agonista ili anatagonista NO

sustava, još jednom potvrđujući specifičan učinak BPC-a 157 na NO sustav. Slični rezultati su dobiveni i u patohistološkoj analizi gdje je BPC 157 imao najmanje ishemično promijenjenih neurona te najviše zdravih neurona nakon 24 sata kao i nakon 72 sata. Zanimljivo je kako je antagonizacija NO sustava, pomoću L-NAME, iako je imala lošije rezulatate na neurološkim testovima, djelovala je protektivno na samu ishemiju neurona u usporedbi s aplikacijom samo agonista NO sustava. Daljnjom analizom genske ekspresije kontrolnih životinja i životinja tretiranih BPC-om 157 pokazalo se kako BPC 157 inducira ekspresiju nekoliko gena koji mogu objašnjavati njegov benefitan učinak kod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda. Ovaj eksperiment, kao i nekolicina drugih, pokazali su kako BPC 157 ima jaki učinak na ekspresiju *Egr1* gena (25,46). EGR1 je transkripcijski fak tor koji regulira ekspresiju gena involviranih u rani upalni odgovor (97, 98), ali i drugih funkcija u mozgu (99), te je djelomično zasigurno odgovoran za učinke BPC-a 157 (1, 46). Neka dosadašnja istraživanja su pokazala kako povećana regulacija *Egr1* pogoršava krajnji ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda u mozgu (97, 100), no njihovi rezultati su u diskrepanciji s našim rezultatima, jer je kod njih *Egr1* bio najviše eksprimiran nakon 24 sata te je ostao povišeno eksprimiran sljedećih 5 dana, dok je u našem slučaju *Egr1* bio najviše eksprimiran puno ranije te je nakon 24 sata već bio u padu. Može se pretpostaviti kako je brza i jaka indukcija ekspresije *Egr1* benefitna za ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda, kao što je dokazano u slučaju BPC-a 157 u nizu modela (1, 25, 46), dok produljena pojačana ekspresija dovodi do produljenog upalnog odgovora i samim time lošijeg ishoda ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (97). Protektivna uloga EGR1 u ishemijski ozljedama mozga, sukladno našim rezultatima, potvrđena je u u drugim istraživanjima koja

zagovaraju neuroprotektivnu ulogu *Egr1* gena (101, 102). U prilog tome govori i već potvrđen međuodnos BPC-a 157 i *Egr1* i *Nab2* gena (103), te pretpostavka kako BPC 157 možda služi kao mehanizam povratne sprege te tako kontrolira ekspresiju *Egr1* gena (103). Gen *Src* je bitan za djelovanje neuritskog faktora rasta (104), ali je isto tako dokazano kako direktno djeluje na NMDA receptor preko jedinstvene domene vezanja (105, 106). *Akt1* gen dovodi do poboljšanog neuronskog preživljavanja te blokira kaskadu stanične smrti inducirane ishemijom tako što potiče faktore rasta (53, 107). Rezultati našeg eksperimenta su sukladni istraživanjima drugih grupa jer aktivacija AKT1, i susljedna smanjena regulacija MAPK puta, pridonosi staničnoj protekciji kod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda mozga (108), mehanizam koji je isto tako dokumentiran i kod ishemijskog post-kondicioniranja (108). Aktivacija *Foxo1* gena, preko *Akt1*, isto se tako smatra povoljnom kod ishemijskih ozljeda jer i taj mehanizam je dio ishemijskog pre-kondicioniranja te se smatra neuroprotektivnim (109, 110). Pretpostavlja se kako je AKT1/eNOS signalni put jako benefitan kod ishoda moždanog udara, bilo aktivacijom AKT1 ili posljedičnom aktivacijom eNOS-a (52,108). Unatrag 30-ak godina sve više se prepoznaje uloga dušikovog oksida kao bitnog dijela fiziološkog funkcioniranja organizma, ali i njegova uloga u patofiziologiji mnogih neuroloških bolesti pa tako i moždanog udara (52, 111, 112). NO, produciran od strane jedne od tri izoforme NO sintetaze može imati neurotoksična ili neuroprotektivna svojstva zavisno o tome koja od navedenih izoformi NO sintetaze ga proizvede i u kojoj količini te ovisno u kojoj fazi procesa ishemije se to događa (52, 54). Životinje tretirane BPC-om 157 su imale povišene razine e*Nos* mRNA nakon 24 sata što se smatra povoljnim za krajnji ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda (48, 52, 65, 113). Kod životinja tretiranih BPC-om 157

se primijetila i smanjena ekspresija gena *iNos*, na razini mRNA -a, što je zanimljivo jer aberantna ekspresija i*Nos* dovodi do negativnih učinaka te se smatra jednim od glavnih krivaca kod ishemijskih oštećenja baš zbog povećane produkcije NO-a (52) ali i zbog njegovog utjecaja na ekspresiju tumorskog faktora rasta alfa (TNF-α) i interleukina 1β (IL-1β) te posljedične sekundarne upalne reakcije (114, 115). Rezultati koji pokazuju smanjenu ekspresiju i*Nos* idu u prilog dobivenim rezultatima o smanjenoj ekspresiji *Nfkb1*, jer se baš NFKB1 smatra jednim od glavnih aktivatora iNOS-a i uvelike doprinosi neuronskoj smrti (52) te se smatra jednim od centralnih regulatora neuroinflamatornih bolesti (116) i induktorom oksidativnog stresa i proinflamatornih citokina koju mogu dovesti do nastanka sekundarne neurotoksičnosti (117, 118). Nadalje, ako uzmemo u obzir kako životinje tretirane BPC-om 157 nemaju povećanu ekspresiju *nNos*, to jest imaju razinu ekspresije malo veću od raspona biološke varijabilnosti, utjecaj BPC-a 157 na NO sustav je još zanimljiviji pošto je takav profil ekspresije nNOS-a u kontrastu s dosadašnjim istraživanjima (52). Ovakva specifična interakcija između BPC-a 157 i tri izoforme NO sintetaze je možda i razlog zašto BPC 157 ima tako benefitan učinak na ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Učinak na redukciju oksidativnog stresa (25–27, 29, 36, 82, 119) i smanjenje prokoagulantne stimulacije (25, 31, 120, 121) je već opisano kod primjenjivana terapije pentadekapeptidom BPC 157. Pospješena regulacija gena *Srf,* koji je u direktnoj kontroli nad ranim genskim odgovorom te je esencijalan regulator genske ekspresije inducirane neuronskom aktivnošću (122), isto tako može doprinijeti benefitnom učinku BPC-a 157 iako uloga SRF-a u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama nije do kraja razjašnjena (122). Još jedan način kojim BPC 157 može vršiti svoj koristan učinak je kroz održavanje endotela, kolateralizaciju i angiogenezu (123, 124). Načelno

govoreći, BPC 157 je inducirao pojačanu ekspresiju *Vegfr-2* te time indirektno stimulirao endotelne stanice na poboljšano nicanje krvnih žila, ali je i preko VEGF-a direktno djelovao na različite stanice u mozgu te tako djelovao neuroprotektivno na iste (53). Do sada je već dokazano kako je većina protektivnog učinka VEGF-A na neurone, pri deprivaciji kisika i glukoze (110), endotoksičnosti (125), hipoksičnog prekondicioniranja (126) te generalno protektivni učinak u modelima moždanog udara (127), pripisana aktivaciji *Vegfr-2* (128). Dokazano je kako pentadekapeptid BPC 157 ima izraženo djelovanje na održavanje integriteta endotela krvnih žila te da ima jaki učinak na već postojeću žilnu kolateralizaciju, ali i na stvaranje novih krvnih žila tj. angiogenezu (123, 124), dok najnovija istraživanja pokazuju kako i povećava preživljenje kulture enteričkih neurona i enteričkih glijalnih stanica u ljudi i štakora (129). Sve od navedenoga je benefitno kod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda u mozgu i pomaže u održavanju integriteta krvno-moždane barijere te time dodatno smanjuje oštećenja izazvana narušavanjem i povećanom permeabilnošću krvno-moždane barijere (130).

7. Zaključak

U korištenom modelu, BCAO, pentadekapeptid BPC 157 je pokazao bolji učinak u svim ispitivanjima u odnosu na kontrolnu skupinu. U sva tri provedena funkcionalna neurološka testa su životinje tretirane s BPC 157 imale bolje ocjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje je po prvi put pokazano kako je BPC 157 uspješno smanjio neuralnu smrt u hipokampusu, u oba ispitana vremenska intervala, u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Ovim istraživanjem je po prvi put pokazano kako pentadekapeptid BPC 157 svoje učinke proizvodi preko više različitih molekularnih puteva. U odnosu na kontrolne životinje, životinje tretirane BPC-om 157 su imale povećani izražaj gena VEGF-A, SRC, EGR1, SRF, FOXO i KRAS dok su geni NFKB i MAPK1 imali smanjen izražaj. Nadalje, pokazalo se da BPC 157 značajno povećava ekspresiju eNOS-a, manje povećava ekspresiju nNOS-a, dok ekspresiju iNOS-a značajno suprimira.

Učinci agonista i antagonista NO sustava su ispitani kroz funkcionalne neurološke testove te je pokazano kako L-arginin pokazuje bolji učinku od L-NAME u dva od tri neurološka testa. Kod patohistološke analize hipokampusa se pokazalo kako L-arginin ima tendenciju poticanja apoptoze i odgođene smrti neurona, dok administracija L-NAME pokazuje tendenciju očuvanju neurona i smanjenju progresije kod odgođene neuronalne smrti koja se nije pokazala statistički značajnom.

Grupe tretirane samo s kombinacijom L-arginina i BPC 157 i s kombinacijom BPC 157 i L-NAME su imale bolje rezultate u odnosu na kontrolnu skupinu i na skupinu tretiranu s L-NAME u svim funkcionalnim neurološkim testovima.

Koadministracija L-NAME i BPC 157 je nakon 24 sata statistički značajno smanjila broj ishemičnih neurona u hipokampusu u odnosu na samostalnu aplikaciju L-NAME, dok je nakon 72 sata ta ista kombinacija imala statistički značajno razliku ishemično promijenjenih i zdravih neurona naspram samostalne aplikacije L-NAME.

Pentadekapeptid BPC 157, sam ili u kombinaciji s modulatorima NO sustava, poboljšava ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda, moguće preko svojeg citoprotektivnog učinka na endotel i specifičnim međuodnosom s NO sustavom, što upućuje na mogućnost njegove terapijske primjene u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama.

8. Sažetak

Uvod. Ishemijsko-reperfuzijske ozljede, koje se nalaze u podlozi svakog kardiovaskularnog inzulta (CVI), indirektno su vodeći se uzrok dugoročne invalidnosti i treći uzrok smrti u svijetu. Pentadekapeptid BPC 157, sa svojim dokazanim citoprotektivnim učincima, učincima na održavanje integriteta krvnih žila, benefitnim učinkom na cijeljenje niza različitih ozljeda te njegove interakcije s NO sustavom, čini se obećavajućim agensom kada je u pitanju patofiziologija ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda.

Materijali i metode. Učinak peptida BPC 157 je istražen na modelu BCAO (engl. „bilateral carotide artery occlusion“), u štakora soja Wistar. Nakon okluzije od 20 min i izazivanjem ishemije, životinje su nasumično raspoređene u grupe te je tretirana skupina, odmah poslije okluzije, primila BPC 157 (10µg/kg), dok je kontrolna skupina primila jednaki volumen fiziološke otopine (1ml, 0.9% NaCl), a ovisno o kojoj terapijskoj skupini je riječ je apliciran agonisti i/ili antagonisti NO sustava, sve neposredno poslije same okluzije. Kao agonist NO sustava je korišten L-arginin (100 mg/kg) dok je kao antagonist korišten L-NAME (5 mg/kg), a različitim kombinacijama sva tri agensa involvirana u NO sustav je ispitan njihov međuodnos i utjecaj na krajnji ishod ishemijsko-reprefuzijskih ozljeda.

Rezultati. Nakon 24 sata procijenjen je neurološki status pomoću Morris water maze testa, Inclined beam walk testa i Lateral push testa te su rezultati testova pokazali benefitan učinak BPC-a 157 na neurološki ishod. Nadalje su uzorci mozga, prikupljeni za patohistološku analizu nakon 24 sata i 72 sata, dodatno potvrdili povoljan učinak BPC 157 na ishemiju neurona, kojih je bilo značajno manje kod tretiranih životinja.

Uzorci za analizu ekspresije gena prikupljeni nakon 24 sata pokazali su kako BPC 157 ima izravan učinak na gensku ekspresiju.

Zaključak. Ovim istraživanjem je istražen i potvrđen benefitan učinak BPC-a 157 na ishod ishemijsko-reperfuzijskih ozljeda. Daljnjim istraživanjem bi se trebalo razjasniti točne molekularne mehanizme kojima BPC 157 sprovodi svoje učinke te time otvoriti mogućnost aplikacije BPC 157 u terapijske svrhe.

Ključne riječi: BPC 157, ishemija, reperfuzija, moždani udar, citoprotekcija

9. Summary

The effect of pentadecapeptide BPC 157 on ischemic/reperfusion injuries in rat brain

Jakša Vukojević, 2020.

Introduction. Ischemic/reperfusion injuries are the basis of cardiovascular insult (CVI) while pentadecapeptide BPC 157, is already been proven to affect vessel integrity, it is a mediator of Robert's cytoprotection, it has beneficial effects on various injuries and interacts with the NO system, making it a promising agent for cerebral ischemic/reperfusion injuries.

Materials and methods. The effect of BPC 157 was examined using an animal model of bilateral carotid artery occlusion (BCAO), in Wistar rats. After an occlusion of 20 min, the rats were randomly divided into groups, treated group was administered BPC 157 (10μg/kg) while the control group was given saline (1ml, 0.9%NaCl), and depending on the group the animals received an agonist and/or antagonist of NO system (L-arginine and/or L-NAME). After 24 hours, the neurological assessment was performed using the Morris water maze test, inlined beam walk test and lateral push test and tissue samples were taken for pathohistological and RT-qPCR gene expression analysis.

Results. The neurological assessment showed that BPC 157 has beneficial effects on the neurological outcome, while the pathohistological analysis and gene expression analysis further confirmed the beneficial effects of BPC 157.

Conclusion. This experiment has revealed the beneficial effect of BPC 157 and thereby opened the possibility of using BPC 157 as a therapeutical agent in ischemic/reperfusion injuries.

Keywords: BPC 157, ischemia, reperfusion, stroke, cytoprotection

10. Popis literature

1. Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B i sur. BPC 157 and Standard Angiogenic Growth Factors. Gastrointestinal Tract Healing, Lessons from Tendon, Ligament, Muscle and Bone Healing. Curr Pharm Des. 2018;24(18):1972–89.
2. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des. 2011;17(16):1612–32.
3. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. Curr Pharm Des. 2010;16(10):1224–34.
4. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem. 2012;19(1):126–32.
5. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Brain-gut Axis and Pentadecapeptide BPC 157: Theoretical and Practical Implications. Curr Neuropharmacol. 2016;14(8):857–65.
6. Pawlow JP, Schumowa-Simanowskaja EO. Beitrage zur Physiologie der Absonderungen. Die Innervation der Magendrusen beim Hunde. Arch Anat Physiol. 1895;54–69.
7. Szabo S, Glavin GB. Hans Selye and the concept of biologic stress. Ulcer pathogenesis as a historical paradigm. Ann N Y Acad Sci. 1990;597:14–6.
8. Wilhelmsen I. Brain-gut axis as an example of the bio-psycho-social model. Gut. 2000 Dec;47 Suppl 4:iv5-7; discussion iv10.

9. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. Eur J Pharmacol. 1999 Aug;379(1):19–31.

10. Bilic I, Zoricic I, Anic T i sur. Haloperidol-stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC 157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. Life Sci. 2001 Mar;68(16):1905–12.

11. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R i sur. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. Biol Psychiatry. 1998 Apr;43(7):511–9.

12. Sikiric P, Marovic A, Matoz W i sur. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophyridine. J Physiol Paris. 1999 Dec;93(6):505–12.

13. Sikiric P, Separovic J, Buljat G i sur. Gastric mucosal lesions induced by complete dopamine system failure in rats. The effects of dopamine agents, ranitidine, atropine, omeprazole and pentadecapeptide BPC 157. J Physiol Paris. 2000;94(2):105–10.

14. Tohyama Y, Sikiric P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. Life Sci. 2004 Dec;76(3):345–57.

15. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. Eur J Pharmacol. 2005 Apr;512(2–3):173–9.
16. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R i sur. The effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on development of tolerance and physical dependence following repeated administration of diazepam. Chin J Physiol. 1999 Sep;42(3):171–9.
17. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A i sur. Anxiolytic effect of BPC-157, a gastric pentadecapeptide: shock probe/burying test and light/dark test. Acta Pharmacol Sin. 2001 Mar;22(3):225–30.
18. Klicek R, Kolenc D, Suran J i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. J Physiol Pharmacol. 2013 Oct;64(5):597–612.
19. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. Surg Today. 2008;38(8):716–25.
20. Gwyer D, Wragg NM, Wilson SL. Gastric pentadecapeptide body protection compound BPC 157 and its role in accelerating musculoskeletal soft tissue healing. Cell Tissue Res. 2019 Mar;
21. Tudor M, Jandric I, Marovic A i sur. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. Regul Pept. 2010 Feb;160(1–3):26–32.
22. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, et al. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. Regul Pept. 2010 Feb;160(1–3):33–41.

23. Perovic D, Buljat G, Kolenc D, Drmic D, Seiwerth S, Sikiric P. Spinal Cord Injury in Rat–Therapeutic Effect of Pentadecapeptide BPC 157. FASEB J. 2015;29(1_supplement):615–7.
24. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. Curr Pharm Des. 2014;20(7):1126–35.
25. Vukojevic J, Siroglavic M, Kasnik K i sur. Rat inferior caval vein (ICV) ligature and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Vascul Pharmacol. 2018 Jul;106:54–66.
26. Duzel A, Vlainic J, Antunovic M i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in the treatment of colitis and ischemia and reperfusion in rats: New insights. World J Gastroenterol. 2017;23(48).
27. Amic F, Drmic D, Bilic Z i sur. Bypassing major venous occlusion and duodenal lesions in rats, and therapy with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157, L-NAME and L-arginine. World J Gastroenterol. 2018 Dec;24(47):5366–78.
28. Drmic D, Kolenc D, Ilic S i sur. Celecoxib-induced gastrointestinal, liver and brain lesions in rats, counteraction by BPC 157 or L-arginine, aggravation by L-NAME. World J Gastroenterol. 2017 Aug;23(29):5304–12.
29. Drmic D, Samara M, Vidovic T i sur. Counteraction of perforated cecum lesions in rats: Effects of pentadecapeptide BPC 157, L-NAME and L-arginine. World J Gastroenterol. 2018 Dec;24(48):5462–76.
30. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. J R Soc Med. 1999 Apr;92(4):164–9.

31. Stupnisek M, Kokot A, Drmic D i sur. Pentadecapeptide BPC 157 Reduces Bleeding and Thrombocytopenia after Amputation in Rats Treated with Heparin, Warfarin, L-NAME and L-Arginine. PLoS One. 2015;10(4):e0123454.
32. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwerth S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. J Physiol Pharmacol. 2009 Dec;60 Suppl 7:191–6.
33. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L i sur. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. J Orthop Res. 2010 Sep;28(9):1155–61.
34. Masnec S, Kokot A, Zlatar M, Kalauz M, Kunjko K, Radic B, et al. Perforating corneal injury in rat and pentadecapeptide BPC 157. Exp Eye Res. 2015 Jul;136:9–15.
35. Whittle BJ, Boughton-Smith NK, Moncada S. Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. Ann N Y Acad Sci. 1992;664:126–39.
36. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol. 1997 Jul;332(1):23–33.
37. Becejac T, Cesarec V, Drmic D i sur. An endogeous defensive concept, renewed cytoprotection/adaptive cytoprotection: intra(per)-oral/intraastric strong alcohol in rat. Involvement of pentadecapeptide BPC 157 and nitric oxide system. J Physiol Pharmacol. 2018 Jun;69(3).

38. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z i sur. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. Med Sci Monit. 2006 Jan;12(1):BR36-45.
39. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. Eur J Pharmacol. 2004 Sep;499(3):285–90.
40. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS i sur. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci. 2004 May;95(1):19–26.
41. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M i sur. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. Regul Pept. 2009 Aug;156(1–3):83–9.
42. Barisic I, Balenovic D, Klicek R i sur. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. Regul Pept. 2013 Feb;181:50–66.
43. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I i sur. Mortal furosemide-hypokalemia-disturbances in rats NO-system related. Shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 more than with L-arginine. J Clin Exp Cardiol. 2012;3:201.
44. Klicek R, Sever M, Radic B i sur. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of

colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. J Pharmacol Sci. 2008 Sep;108(1):7–17.

45. Cesarec V, Becejac T, Misic M i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. Eur J Pharmacol. 2013 Feb;701(1–3):203–12.

46. Huang T, Zhang K, Sun L i sur. Body protective compound-157 enhances alkali-burn wound healing in vivo and promotes proliferation, migration, and angiogenesis in vitro. Drug Des Devel Ther. 2015;9:2485–99.

47. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW i sur. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2018 Mar;137(12):e67–492.

48. Chamorro A, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. Lancet Neurol. 2016 Jul;15(8):869–81.

49. Muller GJ, Stadelmann C, Bastholm L, Elling F, Lassmann H, Johansen FF. Ischemia leads to apoptosis--and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus. Brain Pathol. 2004 Oct;14(4):415–24.

50. Mukandala G, Tynan R, Lanigan S, O'Connor JJ. The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. Brain Sci. 2016 Feb;6(1).

51. Chen X, Chen H, Xu M, Shen J. Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. Acta Pharmacol Sin. 2013 Jan;34(1):67–77.

52. Liu H, Li J, Zhao F, Wang H, Qu Y, Mu D. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. Rev Neurosci. 2015;26(1):105–17.

53. Li S, Hafeez A, Noorulla F i sur. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. Prog Neurobiol. 2017 Oct;157:79–91.

54. Estrada C, DeFelipe J. Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. Cereb Cortex. 1998;8(3):193–203.

55. Guo H, Zhou H, Lu J, Qu Y, Yu D, Tong Y. Vascular endothelial growth factor: an attractive target in the treatment of hypoxic/ischemic brain injury. Neural Regen Res. 2016 Jan;11(1):174–9.

56. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cell Signal. 2007 Oct;19(10):2003–12.

57. Yang J, Yao Y, Chen T, Zhang T. VEGF ameliorates cognitive impairment in in vivo and in vitro ischemia via improving neuronal viability and function. Neuromolecular Med. 2014 Jun;16(2):376–88.

58. Zhou D-G, Shi Y-H, Cui Y-Q. Impact of G-CSF on expressions of Egr-1 and VEGF in acute ischemic cerebral injury. Exp Ther Med. 2018 Sep;16(3):2313–8.

59. Liu B, Zhang S, Xiong X, Ling L, He R, Wang M, et al. Lipo-prostaglandin E1 modifies cognitive impairment in ratswith vascular cognitive impairment by promoting angiogenesis via the VEGF/VEGFR pathway. Mol Med Rep. 2017;16(3):3117–24.

60. Block F. Global ischemia and behavioural deficits. Prog Neurobiol. 1999 Jun;58(3):279–95.

61. Vorhees C V, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc. 2006;1(2):848–58.

62. Gordan ML, Jungwirth B, Ohl F, Kellermann K, Kochs EF, Blobner M. Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: a comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. Behav Brain Res. 2012 Nov;235(1):7–20.

63. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. Brain Res. 1981 Apr;211(1):67–77.

64. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. 1986;17(3):472–6.

65. Gulati P, Singh N, Muthuraman A. Pharmacologic evidence for role of endothelial nitric oxide synthase in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. J Surg Res [Internet]. 2014;188(1):349–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.12.015

66. Sakai S, Takaishi H, Matsuzaki K i sur. 1-Alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 inhibits osteoclastogenesis through IFN-beta-dependent NFATc1 suppression. J Bone Miner Metab. 2009;27(6):643–52.

67. Berti R, Williams AJ, Moffett JR i sur. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2002 Sep;22(9):1068–79.
68. Ellison D, Love S, Chimelli L i sur. A reference text of CNS pathology: neuropathology. London: Elsevier Mosby. UK; 2013.
69. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003 Apr;30(4):266–72.
70. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA: RStudio, Inc.; 2015. Available from: http://www.rstudio.com/
71. Kaur I, Kumar A, Jaggi AS, Singh N. Evidence for the role of histaminergic pathways in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. Fundam Clin Pharmacol. 2017 Aug;31(4):456–70.
72. Maul TM. Mechanobiology of stem cells: implications for vascular tissue engineering. University of Pittsburgh; 2008.
73. Munster AB, Thapar A, Davies AH. History of Carotid Stroke. Stroke. 2016 Apr;47(4):e66-9.
74. Pan J, Konstas A-A, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. Neuroradiology. 2007 Feb;49(2):93–102.
75. Hankey GJ. Stroke. Lancet (London, England). 2017 Feb;389(10069):641–54.
76. Thirugnanachandran T, Ma H, Singhal S i sur. Refining the ischemic penumbra with topography. Int J Stroke. 2018 Apr;13(3):277–84.

77. Sikiric P, Rucman R, Turkovic B i sur. Novel Cytoprotective Mediator, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Vascular Recruitment and Gastrointestinal Tract Healing. Curr Pharm Des. 2018;24(18):1990–2001.

78. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Pharm Des. 2013;19(1):76–83.

79. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K i sur. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). J Physiol Pharmacol. 2010;61(2):241–50.

80. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K i sur. Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats. Eur J Pharmacol. 2011 Sep;667(1–3):322–9.

81. Ilic S, Brcic I, Mester M i sur. Over-dose insulin and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Attenuated gastric ulcers, seizures, brain lesions, hepatomegaly, fatty liver, breakdown of liver glycogen, profound hypoglycemia and calcification in rats. J Physiol Pharmacol. 2009 Dec;60 Suppl 7:107–14.

82. Luetic K, Sucic M, Vlainic J i sur. Cyclophosphamide induced stomach and duodenal lesions as a NO-system disturbance in rats: L-NAME, L-arginine, stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Inflammopharmacology. 2017 Apr;25(2):255–64.

83. Grgic T, Grgic D, Drmic D i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals rat colovesical fistula. Eur J Pharmacol. 2016 Jun;780:1–7.

84. Skorjanec S, Kokot A, Drmic D i sur. Duodenocutaneous fistula in rats as a model for “wound healing-therapy” in ulcer healing: the effect of pentadecapeptide BPC 157, L-nitro-arginine methyl ester and L-arginine. J Physiol Pharmacol. 2015 Aug;66(4):581–90.
85. Baric M, Sever AZ, Vuletic LB i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals rectovaginal fistula in rats. Life Sci. 2016 Mar;148:63–70.
86. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I i sur. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. Dig Dis Sci. 2009 Jan;54(1):46–56.
87. Tarnawski A, Ahluwalia A, Jones MK. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. Curr Pharm Des. 2013;19(1):126–32.
88. Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. Cardiovasc Res. 2007 Jul;75(2):327–38.
89. Di Santo S, Fuchs A-L, Periasamy R, Seiler S, Widmer HR. The Cytoprotective Effects of Human Endothelial Progenitor Cell-Conditioned Medium Against an Ischemic Insult Are Not Dependent on VEGF and IL-8. Cell Transplant. 2016;25(4):735–47.
90. Danduga RCSR, Reddy DS, Seshadri SM, Has KSS, Kumar KP. Effect of combination therapy with pramipexole and n-acetylcysteine on global cerebral ischemic reperfusion injury in rats. Iran J Basic Med Sci. 2018 Jun;21(6):569–76.

91. Yang D-Y, Pan H-C, Chen C-J, Cheng F-C, Wang Y-C. Effects of tissue plasminogen activator on cerebral microvessels of rats during focal cerebral ischemia and reperfusion. Neurol Res. 2007 Apr;29(3):274–82.
92. Sobrado M, Lopez MG, Carceller F, Garcia AG, Roda JM. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. Neuroscience. 2003;118(1):107–13.
93. Pan J, Li X, Peng Y. Remote ischemic conditioning for acute ischemic stroke: dawn in the darkness. Rev Neurosci. 2016 Jul;27(5):501–10.
94. Bell JD, Cho J-E, Giffard RG. MicroRNA Changes in Preconditioning-Induced Neuroprotection. Transl Stroke Res. 2017 Dec;8(6):585–96.
95. Kang EA, Han Y-M, An JM i sur. BPC157 as potential agent rescuing from cancer cachexia. Curr Pharm Des. 2018;24(18):1947–56.
96. Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. Behav Brain Res. 2015 May;285:200–7.
97. Tureyen K, Brooks N, Bowen K, Svaren J, Vemuganti R. Transcription factor early growth response-1 induction mediates inflammatory gene expression and brain damage following transient focal ischemia. J Neurochem. 2008 May;105(4):1313–24.
98. Rayner BS, Figtree GA, Sabaretnam T i sur. Selective inhibition of the master regulator transcription factor Egr-1 with catalytic oligonucleotides reduces myocardial injury and improves left ventricular systolic function in a preclinical model of myocardial infarction. J Am Heart Assoc. 2013;2(4):e000023.

99. Knapska E, Kaczmarek L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? Prog Neurobiol. 2004;74(4):183–211.

100. Yang L, Jiang Y, Wen Z i sur. Over-expressed EGR1 may exaggerate ischemic injury after experimental stroke by decreasing BDNF expression. Neuroscience. 2015 Apr;290:509–17.

101. Zhai K, Kong X, Liu B, Lou J. Bioinformatics analysis of gene expression profiling for identification of potential key genes among ischemic stroke. Medicine (Baltimore). 2017 Aug;96(34):e7564.

102. Ducruet AF, Sosunov SA, Visovatti SH i sur. Paradoxical exacerbation of neuronal injury in reperfused stroke despite improved blood flow and reduced inflammation in early growth response-1 gene-deleted mice. Neurol Res. 2011 Sep;33(7):717–25.

103. Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K i sur. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. Eur J Pharmacol. 2007 Sep;570(1–3):212–21.

104. Kremer NE, D'Arcangelo G, Thomas SM, DeMarco M, Brugge JS, Halegoua S. Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of src and ras actions. J Cell Biol. 1991 Nov;115(3):809–19.

105. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu Rev Cell Dev Biol. 1997;13:513–609.

106. Yu H, Li X, Marchetto GS i sur. Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. J Biol Chem. 1996 Nov;271(47):29993–8.
107. Xie R, Cheng M, Li M i sur. Akt isoforms differentially protect against stroke-induced neuronal injury by regulating mTOR activities. J Cereb Blood Flow Metab. 2013 Dec;33(12):1875–85.
108. Zhou J, Du T, Li B, Rong Y, Verkhratsky A, Peng L. Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. ASN Neuro. 2015;7(5).
109. Zhan L, Li D, Liang D i sur. Activation of Akt/FoxO and inactivation of MEK/ERK pathways contribute to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by delayed hypoxic postconditioning in adult rats. Neuropharmacology. 2012 Oct;63(5):873–82.
110. Maiese K. FoxO proteins in the nervous system. Anal Cell Pathol (Amst). 2015;2015:569392.
111. Maher A, Abdel Rahman MF, Gad MZ. The Role of Nitric Oxide from Neurological Disease to Cancer. Adv Exp Med Biol. 2017;1007:71–88.
112. Gulati P, Singh N. Evolving possible link between PI3K and NO pathways in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. Mol Cell Biochem. 2014 Dec;397(1–2):255–65.
113. Gursoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. Stroke. 2004 Jun;35(6):1449–53.

114. Foncea R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. Biol Res. 2000;33(2):89–96.
115. Trickler WJ, Mayhan WG, Miller DW. Brain microvessel endothelial cell responses to tumor necrosis factor-alpha involve a nuclear factor kappa B (NF-kappaB) signal transduction pathway. Brain Res. 2005 Jun;1048(1–2):24–31.
116. Niranjan R. Molecular basis of etiological implications in Alzheimer's disease: focus on neuroinflammation. Mol Neurobiol. 2013 Dec;48(3):412–28.
117. Block ML, Zecca L, Hong J-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci. 2007 Jan;8(1):57–69.
118. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. Mech Dev. 1993 Oct;43(2–3):135–47.
119. Sever AZ, Sever M, Vidovic T i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in the therapy of the rats with bile duct ligation. Eur J Pharmacol. 2019 Jan;847:130–42.
120. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D i sur. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. Thromb Res. 2012 May;129(5):652–9.
121. Hrelec M, Klicek R, Brcic L i sur. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. J Physiol Pharmacol. 2009 Dec;60 Suppl 7:161–5.
122. Knoll B, Nordheim A. Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. Trends Neurosci. 2009 Aug;32(8):432–42.

123. Vukojević J, Siroglavić M, Kašnik K i sur . Rat inferior caval vein (ICV) ligature and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Vascular Pharmacology. 2018;
124. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB i sur. BPC 157 and blood vessels. Curr Pharm Des. 2014;20(7):1121–5.
125. Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A i sur. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. FASEB J. 2001;15(7):1218–20.
126. Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. J Neurosci. 2002 Aug;22(15):6401–7.
127. Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 Aug;18(8):887–95.
128. Greenberg DA, Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. Cell Mol Life Sci. 2013 May;70(10):1753–61.
129. Wang X-Y, Qu M, Duan R i sur. Cytoprotective Mechanism of the Novel Gastric Peptide BPC157 in Gastrointestinal Tract and Cultured Enteric Neurons and Glial Cells. Vol. 35, Neuroscience bulletin. Singapore; 2019. p. 167–70.
130. Jiang X, Andjelkovic A V, Zhu L i sur. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. Prog Neurobiol. 2018 Apr;163–164:144–71.

11. Kratki životopis

Rođenje:

15.6.1989., Zagreb, Hrvatska

Radno mjesto:

Klinika za psihijatriju “Vrapče”

Akademski curriculum:

Od 2017. specijalizant psihijatrije pri Klinici za psihijatriju „Vrapče”, Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje:

2015.-2109. Poslijediplomski doktorski studij Neurozananosti, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

2008.- 2014. Medicinski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

2004.- 2008. Privatna klasična gimnazija, Zagreb, Hrvatska

Istraživački projekti: -

Odgovornosti/organizacijske vještine:

2018. Organizacijski odbor Brainhacka Zagreb, dio globalnog Brainhacka, Zagreb, Hrvatska

2018 Organizacijski odbor Simpozija o spavanju i poremećajima spavanja, Zagreb, Hrvatska

Publikacije:

Autor i koautor devet znanstvenih radova u recenziranim časopisima (PubMed). Devet radova je objavljeno u CC indeksiranim časopisima. Do sada ima 59 citata po Google Scholar-u.

Članstva:

Hrvatska liječnička komora (HLK), Hrvatsko psihijatrijsko društvo (HPD), Hrvatsko društvo za shizofrenije i poremećaje iz spektra shizofrenija, European college on neuropsychopharmacology (ECNP), Hrvatsko društvo za psihoanalitičku psihoterapiju (HDPP).