Uloga pentadekapeptida BPC 157 i sustava NO u prevenciji incizijskih ventralnih hernija i njihov utjecaj na vlačnu čvrstoću rane

Pajtak, Alen

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:105:820285

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Alen Pajtak

Uloga pentadekapeptida BPC 157 i sustava NO u prevenciji incizijskih ventralnih hernija i njihov utjecaj na vlačnu čvrstoću rane

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Alen Pajtak

Uloga pentadekapeptida BPC 157 i sustava NO u prevenciji incizijskih ventralnih hernija i njihov utjecaj na vlačnu čvrstoću rane

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku Zavoda za tehničku mehaniku Fakulteta strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Predrag Sikirić, dr. med. i prof. dr. sc. Janoš Kodvanj, dipl. ing.

♦ U ♦ I ♦ O ♦ G ♦ D ♦

Zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Predragu Sikiriću i prof. dr. sc. Janošu Kodvanju, koji su svojom neizmjernom energijom, savjetima i pomoći, upravo u trenucima kad je to bilo najpotrebnije, omogućili da ideja postane djelo.

Zahvaljujem prim. dr. sc. Ranku Stare koji mi je, u trenucima kad je život zatvorio vrata, otvorio prozore.

Zahvaljujem i svima onima koje ne spominjem imenom, a svojim su zalaganjem i nesebičnošću pripomogli pri izradi ove disertacije.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji i Mirjani koji su me, na sebi svojstven i meni često nedokučiv način, bodrili na mome putu prema doktoratu znanosti, a svojom vjerom u moja nastojanja zadužili me da u budućemu životu promičem plemenitost i poštenje.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA ... 1
1.1. TEMA ISTRAŽIVANJA ... 1
1.2. PREGLED LITERATURE ... 3
1.2.1. HERNIJE ... 3
1.2.1.1. DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA HERNIJA ... 3
1.2.1.2. ANATOMSKA PODJELA HERNIJA ... 5
1.2.1.3. ETIOLOGIJA HERNIJA ... 9
1.2.1.4. LIJEČENJE HERNIJA ... 11
1.2.2. ANATOMSKA GRAĐA PREDNJEGA TRBUŠNOG ZIDA LABORATORIJSKOGA ŠTAKORA ... 13
1.2.3. CIJELJENJE RANE ... 15
1.2.3.1. UPALNA FAZA CIJELJENJA ... 15
1.2.3.2. PROLIFERACIJSKA FAZA CIJELJENJA ... 17
1.2.3.3. FAZA MATURACIJE ... 18
1.2.3.4. VLAČNA ČVRSTOĆA RANE ... 19
1.2.4. INCIZIJSKE HERNIJE ... 20
1.2.4.1. DEFINICIJA, KLASIFIKACIJA, INCIDENCIJA, FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK ... 20
1.2.4.2. TEORIJA NEADEKVATNOGA RANOG CIJELJENJA ... 23
1.2.4.3. PREVENCIJA INCIZIJSKIH HERNIJA ... 25
1.2.4.4. LIJEČENJE INCIZIJSKIH HERNIJA ... 28
1.2.5. PENTADEKAPEPTID BPC 157 ... 29
1.2.6. NO- SUSTAV ... 31
1.2.7. MEĐUODNOS PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 I NO- SUSTAVA ... 32
1.2.8. VLAČNA ČVRSTOĆA ... 33
1.2.8.1. OSNOVNI POJMOVI I DEFINICIJE ... 33
1.2.8.2. ISPITIVANJE VLAČNE ČVRSTOĆE ... 34
1.2.9. PRIMJENA KORELACIJA DIGITALNE SLIKE ZA ODREĐIVANJE POLJA POMAKA ... 35
1.2.9.1. MJERENJE POMAKA ... 35
1.2.9.2. METODA KORELACIJE DIGITALNE SLIKE ... 36
2. HIPOTEZA ... 38
3. CILJEVI RADA ... 39
4. MATERIJALI I METODE ... 40

4.1. PROTOKOL POKUSA 40
4.2. MJERENJE VLAČNE ČVRSTOĆE UZORAKA I ODREĐIVANJE POLJA POMAKA U PODRUČJU RANE METODOM KORELACIJE DIGITALNE SLIKE 46
4.2.1. PRIPREMA PREPARATA ZA BIOMEHANIČKU ANALIZU I MJERENJE VLAČNE ČVRSTOĆE UZORAKA 46
4.2.2. ODREĐIVANJE POLJA POMAKA U PODRUČJU RANE METODOM KORELACIJE DIGITALNE SLIKE 51
4.3. STATISTIČKA ANALIZA 53
4.4. DOZVOLA ZA IZVOĐENJE POKUSA 55
4.5. ETIČKA NAČELA 56
5. REZULTATI 57
5.1. PRISUTNOST HERNIJE 58
5.2. VELIČINA HERNIJE 61
5.3. PRISUTNOST DEHISCENCIJE 63
5.4. PREZENTACIJA KOŽNOG OŽILJKA 65
5.5. PRISUTNOST TRBUŠNIH PRIRASLICA 67
5.6. VLAČNA ČVRSTOĆA RANE 69
5.7. POLJE POMAKA U PODRUČJU RANE 71
5.8. ETIČKA OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA 72
6. RASPRAVA 73
6.1. NEADEKVATNO RANO CIJELJENJE I MODEL ISTRAŽIVANJA 73
6.2. PENTADEKAPEPTID BPC 157 74
6.3. NO-SUSTAV 77
6.4. MEĐUODNOS PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 I NO-SUSTAVA 81
6.5. KOŽNA RANA I TRBUŠNE PRIRASLICE 86
6.6. VLAČNA ČVRSTOĆA RANE 87
6.7. POLJE POMAKA U PODRUČJU RANE 88
7. ZAKLJUČAK 89
8. KRATAK SADRŽAJ NA HRVATSKOME JEZIKU 90
9. KRATAK SADRŽAJ NA ENGLESKOME JEZIKU 91
10. POPIS LITERATURE 92
11. POPIS SLIKA I TABLICA 111
12. KRATKA BIOGRAFIJA 116

POPIS KRATICA

bFGF - Basic Fibroblast Growth Factor

BPC 157 - Pentadekapeptid BPC 157

DIC - Digital Image Correlation

EHS - European Hernia Society

FELASA - Federation for Laboratory Animal Science Association

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HPLC - High Pressure Liquid Chromatography

IACUC - Institutional Animal Care and Use Committee

IGF-1 - Insuline-like Growth Factor 1

IL-1, IL-8 - Interleukin 1, Interleukin 8

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

µg - mikrogram

ng - nanogram

NO - dušični monoksid

NOS - sintetaza dušičnoga monoksida

PDGF - Platelet-derived growth factor

SSI - Surgical Site Infection

TGFb - Transforming Growth Factor Beta

TNF - Tumor Necrosis Factor

vWF - von Willebrand Factor

WHO - World Health Organisation

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. TEMA ISTRAŽIVANJA

Laparotomijske rane specifični su, kompleksni tip rana koji uključuje kožnu i miofascijalnu komponentu. Te dvije komponente ovih rana različito cijele, s time da vlačna čvrstoća mišićne komponente puno ranije doseže maksimum od vlačne čvrstoće kožne komponente (1,2). *Early wound failure* (hrv. neadekvatno rano cijeljenje, autorov prijedlog prijevoda) je mehanizam kojim, u čovjeka i na animalnim modelima, dolazi do razvoja incizijskih hernija, a koji, unatoč opsežnim istraživanjima, i dalje nije u potpunosti razjašnjen i ne može se objasniti samo mehaničkim silama te biološkom komponentom koje djeluju na ranu (3). Drugim riječima, mehanički i biološki faktori, koji zadovoljavaju adekvatno cijeljenje rana, istovremeno ne znače i prevenciju razvoja hernije. Pokazalo se da stvarni postotak neadekvatnoga ranog cijeljenja laparotomijskih rana u ljudskoj populaciji iznosi i do 11 % te većina tih rana (94 %) završava razvojem incizijske hernije u prve tri godine (4). Hernije se pojavljuju u čak 20 % pacijenata podvrgnutih operativnome zahvatu (5). Međutim, do sada nije u potpunosti razjašnjeno zašto sve laparotomijske rane kod kojih je uočeno neadekvatno rano cijeljenje ne završavaju dehiscencijom i/ili kasnijim razvojem hernije.

S obzirom da je namjerno induciranje neadekvatnoga ranog cijeljenja rana na ljudima u znanstvene svrhe neprihvatljivo, razvijali su se animalni modeli kod kojih bi se pratilo cijeljenje kompleksnih rana poput laparotomijskih i imitiralo neadekvatno rano cijeljenje. Idealnim animalnim modelom pokazali su se štakori kod kojih je moguća opservacija u svim fazama cijeljenja rane, kao i praćenje razvoja incizijskih hernija.

U svrhu ovoga istraživanja na štakorima se izvodio inicijalni operativni zahvat indukcije ranoga neadekvatnog cijeljenja laparotomijske rane. Imitirao se i djelomično

modificirao postupak po Dubayiju koji ima zadovoljavajuću incidenciju nastanka incizijske hernije (80 % u 28 dana od inicijalnoga zahvata) (6,7). Ispitivao se utjecaj pentadekapeptida BPC 157 (BPC 157) (preparata s poznatim i potvrđenim pozitivnim djelovanjem na cijeljenje kompleksnih rana) na prevenciju razvoja incizijskih hernija te utjecaj na vlačnu čvrstoću rane. Analiziralo se prisustvo hernije i dehiscencije, veličina hernije, prezentacija kožnog ožiljka, prisutnost trbušnih priraslica, mjerila se vlačna čvrstoća rane (sila pucanja rane) te vršila analiza pomaka u području oko rane.

Poboljšano cijeljenje niza rana i oštećenja bazira se na utjecaju BPC-a 157 na granulaciju, angiogenezu i organizaciju kolagena putem modulacije NO-sustava. Potvrđena je, *in vitro* i *in vivo*, interferencija BPC-a 157 s NO-sustavom u različitim modelima (8). Kako bi se utvrdio učinak BPC-a 157 na cijeljenje laparotomijskih rana posredovan preko NO-sustava dio životinja također je tretiran NO-agensima (blokatorom (N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME)), prekursorom (L-arginin) i/ili kombinacijom) s ili bez BPC-a 157.

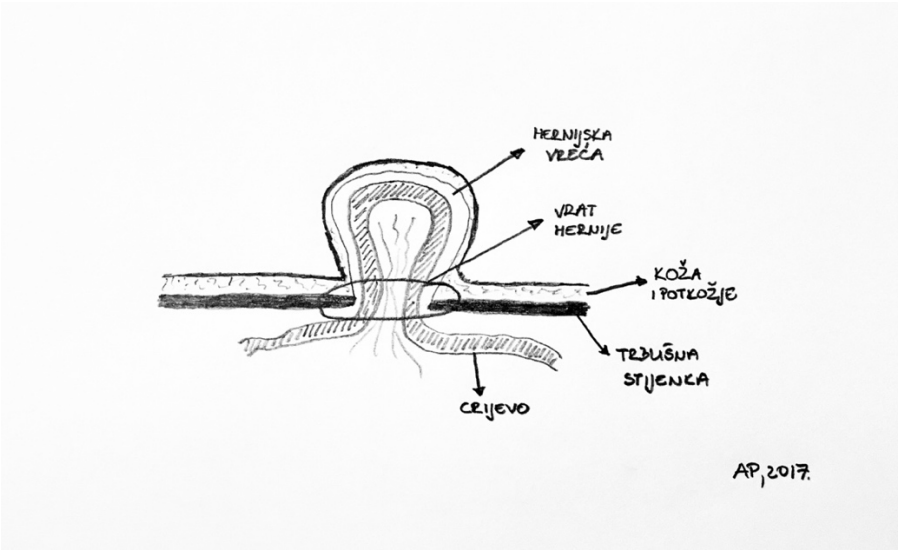
Utjecaj BPC-a 157 na prevenciju nastanka incizijskih hernija otvara mogućnost preporuke primjene preparata kao alternative do sada poznatim metodama prevencije razvoja incizijskih hernija.

1.2. PREGLED LITERATURE

1.2.1. HERNIJE

1.2.1.1. DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA HERNIJA

Hernija je izbočenje trbušnoga sadržaja pod kožu kroz prirodne ili stečene otvore ili uvlačenje trbušnoga sadržaja u peritonealne otvore ili ulegnuća. Ukoliko se radi o izbočenju trbušnoga sadržaja pod kožu, govori se o vanjskim hernijama, dok se kod uvlačenja trbušnoga sadržaja u peritonealne otvore i ulegnuća, govori o unutarnjim hernijama (Slika 1) (5,9).



Slika 1. Prikaz hernije trbušnoga zida

Hernije se, također, mogu podijeliti na prirođene ili stečene. Uzrok nastanka prirođenih hernija nezrelost je anatomskih struktura dok kod stečenih hernija uzroke treba tražiti u slabosti mišićnoga i vezivnoga tkiva ili u povišenome intraabdominalnom tlaku (5,9).

S obzirom na odnos hernijskoga sadržaja prema hernijskoj vreći te mogućnosti repozicije hernijskoga sadržaja razlikuju se reponibilne i ireponibilne hernije. Reponibilnost označava povratak trbušnoga sadržaja u trbušnu šupljinu dok ireponibilnost označuje nemogućnost povratka istoga. Ireponibilne hernije posljedica su uklještenja ili sraštanja hernijskoga sadržaja za hernijsku vreću. Tada se govori o uklještenoj herniji i o sraštenoj herniji (Tablica 1) (5,9).

Tablica 1. Klasifikacija hernija

HERNIJA	vanjska unutarnja
	prirodna stečena
	reponibilna ireponibilna: ukliještena sraštena

Kada se govori o anatomiji hernije, potrebno je razlikovati tri anatomska dijela: hernijski otvor, hernijsku vreću i hernijski sadržaj. Hernijski otvor je otvor u trbušnome zidu kroz koji prolazi hernijska vreća. Hernijsku vreću čini parijetalni peritoneum koji se izbočuje kroz hernijski otvor. Hernijski sadržaj najčešće su mobilni organi iz trbušne šupljine (tanka crijeva, omentum, dijelovi kolona, jajnik, mokraćni mjehur) koji su protrudirali kroz hernijski otvor u hernijsku vreću (Slika 1) (5,9).

Incizijske (postoperativne) hernije specifični su entitet o kojemu će se raspravljati u daljnjemu tekstu.

1.2.1.2. ANATOMSKA PODJELA HERNIJA

Klinički je iznimno važna anatomska podjela hernija, tj. podjela hernija prema anatomskome položaju hernijskoga otvora.

Ingvinalna hernija

Ingvinalna hernija (*hernia inguinalis*) smještena je u ingvinalnome kanalu (*canalis inguinalis*). Točna incidencija ingvinalne hernije u svjetskoj populaciji nije poznata. Iako broj operativnih zahvata varira u različitim zemljama, prosječan broj operativnih zahvata iznosi 100 - 300 operacija na 100 000 ljudi. Iako je ingvinalna hernija prisutna u oba spola, njena incidencija dominira u muškoj populaciji; omjer muškarci - žene iznosi 7,7 % : 1,9 %. Do 20 % ingvinalnih hernija u odrasloj je populaciji bilateralno. Pozitivna obiteljska anamneza povezana je s većim rizikom za razvoj ingvinalne hernije.

Ingvinalna hernija može se podijeliti na direktnu i indirektnu. Hernijski otvor direktne ingvinalne hernije smješten je unutar Hesselbachovoga trokuta - prostora omeđenoga medijalno vanjskim rubom ravnoga trbušnog mišića (*musculus rectus abdominis*), bočno donjim epigastričnim krvnim žilama (*vasa epigastrica inferior*), a kaudalno ingvinalnim ligamentom (*ligamentum inguinale*). Hernijski otvor indirektne ingvinalne hernije lociran je u anatomskome unutarnjem ingvinalnom prstenu (*annulus inguinalis profundus*). Hernijska vreća prolazi kroz ingvinalni kanal (*canalis inguinalis*) i na trbušnoj stijenci pod kožu izlazi kroz vanjski ingvinalni prsten (*annulus inguinalis superfitialis*). Ukoliko se hernijska vreća i njen sadržaj nakon izlaska iz vanjskoga ingvinalnog prstena spuštaju u skrotum kod muškaraca, takvu herniju nazivamo skrotalna hernija (*hernia scrotalis*) (5,9-16).

Femoralna hernija

Femoralna hernija (*hernia femoralis*) je hernija smještena ispod ingvinalnoga ligamenta, gdje se hernijski otvor nalazi na ulazu u femoralni kanal (*canalis femoralis*) - anatomski prostor omeđen naprijed ingvinalnim ligamentom (*ligamentum inguinale*),

medijalno pubičnom kosti (*oss pubis*) i bočno bočnoslabinskim mišićem (*musculus iliopsoas*).

Femoralne hernije čine 5 % svih abdominalnih hernija. Češće su u žena, a incidencija raste s dobi i kod multipara.

Kroz femoralni kanal prolazi neurovaskularni snop prema natkoljenici Pa postoji i dodatna podjela femoralne hernije u odnosu na krvožilne strukture. Tako se razlikuje:

- *Serafinijeva hernija* - hernijska vreća nalazi se iza krvožilnih struktura
- *Velpeauova hernija* - hernijska vreća nalazi se ispred krvožilnih struktura
- *Hesselbachova hernija* - hernijski otvor pozicioniran je lateralno od krvožilnih struktura
- *Laugierova hernija* - hernijska vreća prolazi kroz lakunarni ili pektinealni ligament
- *Cloquetova hernija* - hernijska vreća spušta se do krvnih žila kroz pektinealnu fasciju
- *Becklardova hernija* - hernijska vreća prolazi kroz kribriformnu fasciju i otvor vene safene (5,9,15,17).

Ventralna hernija

Ventralna hernija (*hernia ventralis*) definira se kao hernija prednjega trbušnog zida. Uobičajeni podatak incidencije je 2 % dok statistički podaci u USA govore o incidenciji 15 na 1000 stanovnika, što čini 1,5 %. Razlikuju se epigastrične (*hernia epigastrica*), umbilikalne (*hernia umbilicalis*) i hipogastrične hernije (*hernia hypogastrica*). Epigastrične hernije anatomski su smještene od ksifoida prsne kosti do pupka. Umbilikalna hernija je hernija nastala u području umbilikalnoga prstena bijele linije (*linea alba*). Hipogastrične hernije nalaze se ispod pupka.

Ventralne hernije najčešće su locirane u medijalnoj liniji, tj. nastaju kao posljedica defekta bijele linije, iako se ventralne hernije mogu razviti i na drugim mjestima. U takvim slučajevima ventralne hernije najčešće su stečene (5,9,11,16).

Lumbalna hernija

Lumbalne hernije (*hernia lumbalis*) su hernije u području stražnjega trbušnog zida. Mogu biti kongenitalne ili stečene. Dvije su anatomske lokacije veće slabosti stražnjega trbušnog zida pa tako govorimo i o dva tipa lumbalnih hernija:

- *Grynfelttova hernija (hernia trigonum lumbalis superior)* - hernija nastala u području gornjega lumbalnog trokuta koji je anatomski omeđen dvanaestim rebrom (*costa No XII*), paraspinalnim mišićima (*musculi paraspinales*) i unutarnjim kosim mišićem (*musculus obliquus internus*).
- *Petitova hernija (hernia trigonum lumbalis inferior)* - hernija u području donjega lumbalnog trokuta koji je anatomski omeđen velikim leđnim mišićem (*musculus latissimus dorsi*), vanjskim kosim mišićem (*musculus obliquus externus*) te ilijačnim vrhom (*crista iliaca*) (5,9).

Spigelianova hernija

Spigelianova hernija (*Spigelian hernia*) je hernija lateralnoga dijela trbušnoga zida gdje dolazi do protruzije ispod lučne linije (*linea arcuata*), između ravnoga trbušnog mišića (*musculus rectus abdominis*) i polumjesečaste linije (*linea semilunaris*) (5,9).

Obturatorna hernija

Obturatorna hernija (*hernia obturatoria*) rijetka je hernija koja se javlja zbog slabosti zdjeličnoga dna i protruzije crijevnoga sadržaja u obturatorni otvor (*foramen obturatorius*) (5,9).

Hijatalna hernija

Hijatalna hernija (*hernia hiatalis*) je hernijacija želuca kroz hijatalni otvor dijafragme (*hiatus oesophagus*) u torakalnu šupljinu. Razlikuju se tri tipa hijatalne hernije:

- klizeća hijatalna hernija (*sliding hiatus hernia*) - gastroezofagealno ušće se retrahira u toraks zajedno sa želucem
- kotrljajuća (paraezofagealna) hernija (*rolling hiatus hernia*) – gastroezofagealno ušće ostaje u abdominalnoj šupljini dok se želudac paraezofagealno provlači u torakalnu šuplinu
- kombinirani oblik hijatalne hernije - kao što samo ime govori, radi se o kombinaciji klizeće i kotrljajuće hernije.

Incidencija hijatalne hernije povećava se sa starošću, tako da više od 60 % osoba starijih od 50 godina ima hijatalnu herniju. Svega 9 % hijatalnih hernija je simptomatsko, a čak 95 % hijatalnih hernija klizeće su hijatalne hernije (5,9,18).

Paraduodenalna hernija

Paraduodenalna hernija (*hernia paraduodenalis*) nastaje kao posljedica poremećaja u kongenitalnome razvoju. Razlikuju se lijeva i desna paraduodenalna hernija. Kod lijeve paraduodenalne hernije nije došlo do sljepljivanja mezenterija silaznoga kolona za peritoneum u gornjemu lijevom kvadrantu te se tanko crijevo uvlači kroz Landzertov jarak (*fossa Landzert*). Kod desne paraduodenalne hernije nije došlo do adekvatnoga sljepljivanja mezenterija uzlaznoga kolona za peritoneum te dolazi do uvlačenja tankoga crijeva kroz Waldeyerov jarak (*fossa Waldeyer*) (5,9,11,16).

1.2.1.3. ETIOLOGIJA HERNIJA

Razvoj hernija u ljudskoj populaciji fokus je interesa još od Galena. Astley Cooper 1804. godine ustvrdio je kako povećani intraabdominalni tlak dovodi do razvoja hernija. Naveo je i faktore povećanoga intraabdominalnog tlaka: kašalj, debljina, opstipacija, trudnoća, ascites, dizanje teškoga tereta. Australski pedijatar Robert Hamilton Russell postavio je 1906. godine „sakularnu teoriju". Ustvrdio je da je razvoj hernije moguć jedino ako postoji „divertikul" peritoneuma u trbušnome zidu. Do zaključka je došao proučavajući dječje ingvinalne hernije, no teoriju je proširio na sve abdominalne hernije. U svojemu udžbeniku Zimmerman i Anson 1967. godine ustvrdili su da razvoj hernije može biti posljedica kongenitalne predispozicije dok su Wirtschafter i Bentley prvim pokusima i dokazali da abnormalnost vezivnoga tkiva može dovesti do razvoja hernije. Uočili su povećanu incidenciju hernija u pacijenata koji pate od latirizma, a uspjeli su ponoviti isti fenomen na životinjama (19,20).

U današnje vrijeme proučavanje hernija bazira se više na biomehaničkim aspektima razvoja.

Vjeruje se da je povećana destrukcija vezivnoga tkiva, naročito elastina, važan patogenetski faktor za razvoj aneurizmatske bolesti aorte. U pacijenata s tim bolestima uočena je veća incidencija ingvinalnih, kao i postoperativnih hernija, što upućuje da defekt metabolizma vezivnoga tkiva predstavlja važan etiološki faktor u razvoju hernija (21-24). Pans, Pierard i Albert svojom su studijom potvrdili da je patologija vezivnoga tkiva uključena u razvoj hernija, štoviše, potvrdili su ideju da biomehaničke promjene u fascijama uzrokuju hernijaciju, a ne da su rezultat istih (25). Kod pacijenata s poremećajem kolagena često je promijenjen omjer kolagena tipa I i kolagena tipa III. Visoka razina kolagena tipa III u odnosu na kolagen tipa I dovodi do nepolimeriziranoga topivog kolagena u fascijama. Freidman i suradnici ustvrdili su da nepolimerizirani kolagen bogat tipom III nije dostatan za biomehaničku barijeru te time predisponira razvoj hernija. U svojemu istraživanju potvrdili su značajno manji omjer kolagena tipa I i kolagen tipa III kod pacijenata s hernijama (26).

Danas se smatra da svi u literaturi opisivani faktori rizika (dob, spol, debljina, ascites, pušenje, dizanje teškoga tereta, primjena različitih medikamenata) direktno ili indirektno djeluju na biomehanička svojstva trbušne stijenke te na taj način utječu i na razvoj hernije.

1.2.1.4. LIJEČENJE HERNIJA

Povijest liječenja hernija zapravo je povijest kirurgije. Prvi medicinski zapis koji se referira na hernije jest „Ebersov papirus" iz Egipta nastao otprilike 1552. god. p. n. e. U 70 svezaka zbirke „Corpus Hippocraticum" oca medicine Hipokrata (460. - 377. god. pr. Kr.) prisutni su mnogi anatomski i kirurški opisi dok se hernija spominje tek „u prolazu". Prvi opis operacije hernije dao je Celzus (Aulus Conelius Celsus, ?. - 50. god. po. Kr.). U srednjemu vijeku, zbog utjecaja Crkve i prohibicije „rezanja ljudskoga tijela" kirurgijom su se bavili pretežno brijači - neuki, najčešće i nepismeni ljudi koji su uglavnom šivali rane, reponirali prijelome kostiju i vadili zube. Medicina je napredovala pretežito u muslimanskome svijetu te su iz toga perioda poznati Albinikusovi (Abul Qasim al-Zahrawi, 1013. – 1106.) zapisi o operativnim zahvatima ingvinalne hernije. Za skok kirurgije iz domene ručnoga rada u umijeće odgovoran je Ambroise Pare (1510. – 1590.) koji je liječenju hernija posvetio cijelo poglavlje knjige. Osoba odgovorna za moderno poimanje liječenja hernije jest Edoardo Bassini (1844. – 1924.) koji je u kirurgiju hernija uveo postulat: „Za zbrinjavanje hernija potrebno je u područje hernijskoga otvora vratiti uvjete kakvi su prisutni u normalnim okolnostima" (27).

Danas, u liječenju, tj. kirurškome zbrinjavanju hernija još uvijek vrijedi Bassinijev postulat. Međutim, postulatu je pridodan i pojam „tension-free". Ovim pojmom označuje se važnost rekonstrukcije (vraćanja u uvjete kakvi su prisutni u normalnim okolnostima) gdje ne dolazi do dodatnoga naprezanja i daljnjega oštećenja biološkoga materijala jer se upravo to smatra razlogom recidiva nakon operativnih zahvata. Dakle, rekonstrukciju trbušnoga zida potrebno je učiniti tako da nema dodatnoga naprezanja tkiva (25-27). U postizanju kirurškoga liječenja hernija danas postoje konceptualno dva različita principa liječenja.

U prvome, tzv. konvencionalnome pristupu uspostava uvjeta kakvi su prisutni u normalnim okolnostima postiže se kirurškom rekonstrukcijom hernijskih prostora vlastitim biološkim materijalom. Osnova je ove tehnike liječenja resekcija hernijske vreće te najčešće samo prešivanje anatomskih struktura u području hernije što sličnije izvornome anatomskom položaju i odnosu tkiva. Primjer takvoga popravka

hernija jest Basinijeva operacija ili neke od brojnih modifikacija ove operacije (Shouldice, Ferguson, Halsted, itd.) gdje se po resekciji hernijske vreće pokušava što vjerodostojnije rekonstruirati stražnji ingvinalni zid (25-27).

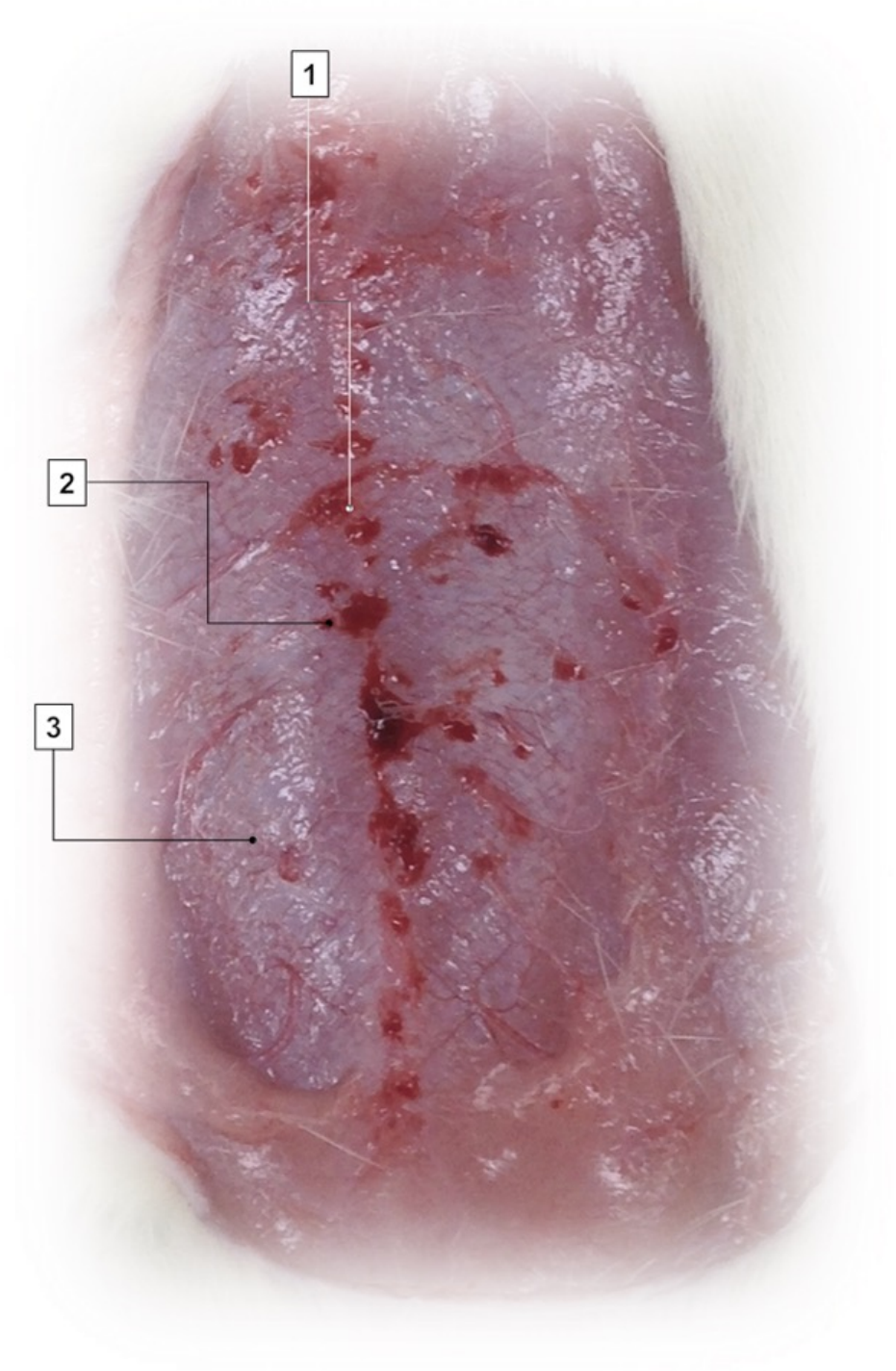
U drugome pristupu suvremenoga liječenja hernija veći je naglasak na smanjenju vlačnih sila koje su potpomogle incijalni nastanak hernije, stoga se takve tehnike nazivaju „tension-free tehnike". Kod ovih tehnika, uz anatomsku rekonstrukciju mjesta nastanka hernije, koriste se i različiti strani materijali koji se ugrađuju u trbušni zid kako bi doveli do smanjenja vlačnih sila na mjesto operirane hernije. Kolokvijalno, ti se sintetski materijali nazivaju „mrežice". Kada se govori o stranim materijalima koji se ugrađuju na mjesto hernije, misli se na biološke i sintetske materijale. Primjeri bioloških mrežica su acelularni hidratizirani dermis i intaktna kolagenska vlakna dok u sintetske materijale spadaju najrazličitije mrežice od polipropilenskih vlakana ili sličnoga materijala. U svjetskoj literaturi još uvijek se vode mnoge rasprave o najprimjerenijemu stranom materijalu, najpogodnijemu načinu postavljanja i položaju toga materijala, načinima zbrinjavanja komplikacija primjene stranoga materijala i slično (25-27).

Budući da je fokus ove disertacije na incizijskim hernijama, u daljnjemu tekstu detaljnije će se raspravljati o liječenju incizijskih hernija.

1.2.2. ANATOMSKA GRAĐA PREDNJEGA TRBUŠNOG ZIDA LABORATORIJSKOGA ŠTAKORA

Trbušni zid štakora ima sličnu anatomsku građu kao i trbušni zid čovjeka, stoga štakor služi kao pogodan model za proučavanje hernija jer se rezultati mogu preslikati na čovjeka.

Mišići trbušnoga zida štakora mišićne su ploče čija se vlakna prostiru u različitim smjerovima oblikujući čvrstu mišićnu mrežu. Svi ti mišići zajedno djeluju stvarajući pritisak na šupljinu trbuha i nazivaju se „trbušna preša". Vanjski kosi mišić (*m. obliquus externus abdominis*) počinje na rebrenome zidu, a završava kao dvodijelna aponeuroza. Prvi dio aponeuroze završava u ventralnoj medijalnoj abdominalnoj liniji (*linea alba*) kao *lamina abdominalis*, a drugi dio aponeuroze odlazi na zdjelicu (*lamina pelvina*) gdje sudjeluje u oblikovanju ingvinalnoga ligamenta. Unutarnji kosi mišić (*m. obliquus internus abdominis*) ima suprotan smjer vlakana od prethodno opisanoga mišića i proteže se od proksimalnoga dijela ingvinalnoga ligamenta i slabinskih kralježaka do ventralne medijalne linije abdomena. Od njegova kaudalnoga ruba odvaja se snop mišićnih vlakana koji se u mužjaka prihvaća za sjemeno uže čineći *m. cremaster*. Poprečni trbušni mišić (*m. transversus abdominis*) najdublji je mišić trbušne stijenke, ima poprečno usmjerena mišićna vlakna i proteže se od slabinskih kralješaka do bijele linije. U ventralnome dijelu trbuha nalazi se parni ravni trbušni mišić (*m. rectus abdominis*) koji se nastavlja na aponeurozu ravnoga prsnog mišića (*m. rectus thoracis*) i završava na prepubičnoj tetivi (*tendo prepubicus*) zdjeličnoga ulaza (Slika 2) (28).



Slika 2. Anatomija trbušnoga zida štakora. Označene su anatomske strukture trbušne stijenke štakora: *linea alba* /1/, *m. rectus abdominis* /2/ i *m. obliquus externus* /3/

1.2.3. CIJELJENJE RANE

Cijeljenje rane proces je koji se odvija u tri faze. Razlikuju se upalna, proliferacijska i maturacijska faza. Te se tri faze u određenim vremenskim periodima međusobno preklapaju, no zakonitosti najprije upalnoga odgovora iza kojega slijedi proliferacija stanica i izvanstaničnoga matriksa te maturacija ožiljka vrijede za sve rane (29,30).

1.2.3.1. UPALNA FAZA CIJELJENJA

Upalna faza cijeljenja traje prvih nekoliko dana (4 - 6 dana). Ova faza predstavlja pokušaj tkiva da ograniči oštećenje zaustavljajući krvarenje, zatvarajući površinu rane i uklanjajući nekrotično tkivo, debris i/ili mikroorganizme. Karakteristike su ove faze pojačana vaskularna permeabilnost, migracija stanica u ranu postupkom kemotaksije, lučenje citokina, faktora rasta i aktivacija migrirajućih stanica. Hemostaza se postiže aktivacijom koagulacijskih putova i lokalnom vazokonstrikcijom. Prilikom ozljede krvne žile dolazi do izloženosti subendotelnoga kolagena trombocitima što vodi do agregacije trombocita (trombociti adheriraju uz oštećeni endotel) i aktivacije koagulacijskoga puta. Vezanje trombocita rezultira strukturalnim promjenama na samim trombocitima koji su okidač za prijenos intracelularnoga signala i ispuštanje biološki aktivnih proteina (PDGF, TGF-β, IGF-I, fibronektin i vWF). Gusta tjelešca sadrže serotonin i histamin koji uzrokuju pojačanu permeabilnost i vazodilataciju. Kao rezultat tih promjena dolazi do izlaska plazme iz intravaskularnoga u ekstracelularni prostor. U daljnjemu tijeku dolazi do konverzije fibrinogena u fibrin pod utjecajem trombina. Tijekom ispuštanja histamina, serotonina i komplementa C5a te leukotriena B4 dolazi do kemotaksijskoga učinka na neutrofile koji dijapedezom pristižu na mjesto ozljede privučeni nadalje interleukinima IL-1 i TNF-α. Zatim i sami neutrofili luče kemotaksijske faktore iz vlastitih lizosoma te time

pridonose migraciji ostalih neutrofila. Upravo kombinacija pojačane permeabilnosti i vazodilatacije dovodi do poznatih kliničkih znakova upale: *rubor* (crvenilo), *calor* (hladnoća), *tumor* (oteklina), *dolor* (bolnost) i *functio laesa* (umanjena funkcija). Migracija polimorfonukleara prestaje onda kada je kontaminacija rane pod kontrolom, a to je obično unutar prvih par dana nakon ozljede. Sami polimorfonukleari ne preživljavaju dulje od 24 sata. Nakon toga perioda dominantne stanice postaju mononukleari. U slučaju produženoga cijeljenja rane u ovoj fazi može doći do destrukcije normalnoga tkiva, nekroze i formiranja apscesa. Sami polimorfonukleari nisu presudni za cijeljenje rane jer njihovu ulogu u fagocitozi i antimikrobnome odgovoru mogu preuzeti makrofagi. Stanice makrofaga presudne su za cijeljenje rane jer predstavljaju stanice koje koordiniraju i stimuliraju brojnim paralelnim procesima cijeljenja. U oštećeni dio tkiva pristižu kada neutrofili počnu napuštati mjesto ozljede i sami induciraju apoptozu neutrofila. Također, dolaze pod utjecajem kemotaksijskih faktora kao što su bakterijski produkti, trombin, fibronektin, kolagen, itd. Tkivni makrofazi izlučuju proteinaze te metaloproteinaze 1, 2 i 3 koji razgrađuju ekstracelularni matriks i ključni su za uklanjanje stranoga materijala. Također, luče IL-1 koji je citokin akutne faze. Pod utjecajem IL-1 dolazi do aktivacije limfocita te stimulacije hipotalamusa i time febrilnoga odgovora. Sama molekula IL-1 korisna je samo u prvome tjednu cijeljenja rane, međutim, ako se njeno lučenje produži, može otežavati cijeljenje rane te pospješiti prelazak iz akutne u kroničnu ranu. Još jedan važan spoj koji luče makrofazi je TNF koji je bitan za hemostazu, vaskularnu permeabilnost i endotelialnu proliferaciju. Kao i u slučaju IL-1, kod kroničnoga lučenja dovodi do kontraefekta, oštećenja tkiva i nekroze. Makrofazi također luče i faktore rasta od kojih je najvažniji PDGF (29,30).

1.2.3.2. PROLIFERACIJSKA FAZA CIJELJENJA

Proliferacijska faza odvija se u drugome tjednu cijeljenja rane. Kako akutni odgovor hemostazom i upalom počinje jenjavati, mjesto oštećenja spremno je za daljnju reparaciju kroz angiogenezu, fibroplaziju i epitelizaciju. Ovaj stadij karakterizira formacija granulacijskoga tkiva te početna organizacija kolagena, fibronektina i hijaluronske kiseline.

Angiogeneza je proces formacije novih krvnih žila i neophodan je kao podrška cijeljenju rane. Interakcija eksponiranoga endotela i fibroblasta, skupa s faktorima rasta, uzrokuje migraciju endotelnih stanica iz matriksa te formiranje primitivnih endotelijalnih tubula. Radi se o kompleksnome procesu koji uključuje interakcije stanica i matriksa pri čemu integrin β1 igra važnu ulogu kod početnoga stabiliziranja nakupljenih endotelnih stanica u preteče novih krvnih žila. Uz IL-8, angiogenin i fibronektin, važan faktor za angiogenezu je i kolagen koji u *in vitro* uvjetima uzrokuje formiranje tubularnih endotelijalnih formacija u preteče novih krvnih žila. Stanice ekstracelularnoga matriksa proizvode makromolekule poput glukozaminoglikana, kolagena, elastina, fibronektina i laminina. Važne stanice ekstracelularnoga matriksa su fibroblasti. Fibroblasti su specijalizirane stanice koje u uvjetima ozljede tkiva kemotaksijom bivaju privučeni na mjesto ozljede i aktivirani makrofazima, faktorima rasta, citokinima i TGF-beta faktorom. Primarna je funkcija fibroblasta sintetiziranje kolagena u tkivima. Brzina kojom fibroblasti luče kolagen opada nakon 4 tjedna i u tome trenutku rana ulazi u fazu maturacije. Kolagenska vlakna unutar matriksa služe za elastičnost i otpornost. Kolagen koji se rano odlaže u granulacijskome tkivu pripada tipu III (karakterističnome za embrionalnu kožu). Kako vrijeme prolazi, u rani se sve više odlaže kolagen tip I kao predominantni protein ožiljka, zaslužan za čvrstoću i finalni izgled rane (29,30).

1.2.3.3. FAZA MATURACIJE

Faza maturacije posljednja je faza cijeljenja rane te započinje postupnim prijelazom iz faze proliferacije. Dolazi do značajnoga pada broja upalnih stanica, fibroblasta i „nezreloga" matriksa (kolagena tipa III) u ožiljku, a raste količina kolagena tipa I u rani. Dolazi i do postupnoga povećanja vlačne čvrstoće rane (29,30).

1.2.3.4. VLAČNA ČVRSTOĆA RANE

Zašivena rana ima približno 70 % vlačne čvrstoće intaktnoga tkiva, uglavnom zahvaljujući šavovima. U prvome tjednu cijeljenja, krajem upalne faze, vlačna čvrstoća rane je oko 10 % intaktnoga tkiva. U proliferativnoj fazi počinje rapidni rast vlačne čvrstoće rane tijekom sljedeća četiri tjedna. Značajno povećanje vlačne čvrstoće događa se negdje iza 21. dana vjerojatno zahvaljujući tzv. „poprečnome povezivanju" kolagenih fibrila. Porast vlačne čvrstoće rane potom se usporava i približno u trećemu mjesecu stagnira. Po stagnaciji rana ima otprilike 70 – 80 % vlačne čvrstoće neoštećenoga tkiva, što može perzistirati doživotno (29,30).

1.2.4. INCIZIJSKE HERNIJE

1.2.4.1. DEFINICIJA, KLASIFIKACIJA, INCIDENCIJA, FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK

Prema definiciji Korenkova i suradnika incizijska hernija definira se kao svaki otvor abdominalnoga zida na mjestu postoperativnoga ožiljka uočljiv i palpabilan kliničkim pregledom ili nekom dijagnostičkom slikovnom metodom (31). Podjela i klasifikacija incizijskih hernija daleko je kompleksnija od podjele npr. ingvinalnih ili primarnih hernija trbušnoga zida, upravo zbog njihove različitosti, stoga je neophodna adekvatna klasifikacija. *European Hernia Society* (EHS) 2009. godine tako je uveo vlastitu klasifikaciju incizijskih hernija koja je u uporabi i danas (32).

Dva su osnovna kriterija za klasifikaciju incizijskih hernija, a to su anatomski položaj hernije i njena veličina. Kako bi se definirala lokalizacija hernije, trbušni je zid podijeljen na medijalni i lateralni segment. Granice medijalnoga dijela su kranijalno ksifoid i kaudalno pubis dok su lateralne granice medijalnoga segmenta lateralni rubovi ravnoga trbušnog mišića. Granice lateralnoga segmenta su kranijalno rebreni luk, kaudalno ingvinalni ligament, medijalno lateralni rub ravnoga trbušnog mišića, a lateralno lumbalna regija. Dodatno, medijalni segment dijeli se na pet M-zona. Prva M-zona nalazi se 3 cm ispod ksifoida, peta M-zona 3 cm iznad pubisa, treća M-zona 3 cm proksimalno i distalno od umbilikusa, dok se druga M-zona nalazi između prve i treće zone, a četvrta M-zona između treće i pete zone. Također, lateralni segment podijeljen je u četiri L-zone. Medijalni rub prvih triju L-zona lateralni je rub ravnoga trbušnog mišića dok je lateralni rub prednja aksilarna linija. Prva L-zona nalazi se subkostalno između lateralnoga ruba ravnoga trbušnog mišića i prednje aksilarne linije do razine horizontalne linije 3 cm iznad pupka. Druga L-zona nalazi se u prostoru 3 cm iznad i ispod pupka, treća L-zona je u prostoru 3 cm ispod pupka pa do ingvinalnoga ligamenta, a četvrta L-zona nalazi se lateralnije od prednje aksilarne linije. Također, važno je napomenuti kako se hernija, ukoliko prelazi više zona, označuje prema zoni veće važnosti (važnost prema težini zbrinjavanja). Zone se

prema važnosti raspoređuju: M1, M5 > M3 > M2, M4 te L1, L3 > L2 > L4. Za razliku od primarnih ventralnih hernija incizijske ventralne hernije veoma se razlikuju u veličini. Važno je, također, znati da incizijske hernije mogu biti unilokularne (postoji samo jedan hernijski otvor) ili multilokularne (postoji više hernijskih otvora međusobo odijeljenih „zdravim" tkivom). Hernije se opisuju prema svojoj širini (horizontalni razmak između dva najlateralnija dijela hernije) i dužini (vertikalni razmak između najkranijalnijega i najkaudalnijega dijela hernije). Ukoliko se radi o multilokularnim hernijama, tada se mjere definiraju prema najkranijalnijoj, tj. najkaudalnijoj te prema najlateralnijim hernijama. Hernije se u klasifikaciji dodatno dijele u tri skupine veličina prema širini otvora: W1 < 4 cm, W2 ≥ 4 – 10 cm, W3 ≥ 10 cm. U klasifikaciji se, također, smatra potrebnim navesti radi li se o primarnoj (prvoj) incizijskoj herniji ili rekurentnoj incizijskoj herniji (već je ranije operirana incizijska hernija iste lokacije) (32). Uzevši sve ove parametre u obzir, stvorena je klasifikacijska tablica EHS (Tablica 2).

Tablica 2. EHS klasifikacija incizijskih hernija (Prema izvornoj tablici (32))

EHS KLASIFIKACIJA INCIZIJSKIH HERNIJA	
MEDIJALNO	Subksifoidalno M1 Epigastrično M2 Umbilikalno M3 Infraumbilikalno M4 Suprapubično M5
LATERALNO	Subkostalno L1 Bočno L2 Ilijačno L3 Lumbalno L4
RECIDIV	Da Ne
Duljina: cm	**Širina:** cm
ŠIRINA	**W1** (<4cm) **W2** (>4-10cm) **W3** (>10cm)

Ovisno o autorima, na mjestu čak 2 – 20 % incizija trbušnih stijenki nastaje incizijska hernija. Incidencija incizijskih hernija najviša je kod medijalnih laparotomija u odnosu na ostale incizije trbušne stijenke (33).

Faktori rizika za postoperativni razvoj incizijske hernije dijele se na faktore vezane uz pacijenta te faktore vezane uz operativnu tehniku i zahvat. U faktore rizika vezane uz pacijenta ubrajaju se: dob, pretilost (BMI > 25 kg/m^2), pušenje, anemija, pothranjenost i imunosupresivna terapija. Starija životna dob, anemija, pretilost i pothranjenost faktori su rizika na koje se ne može utjecati, a oni povećavaju rizik razvoja incizijske hernije. Pušenje i primjena imunosupresivnih lijekova faktori su na koje se može utjecati. Preporučljiv je prestanak pušenja pred operativni zahvat, kao i kratkoročno obustavljanje imunosupresivne terapije, ukoliko to osnovna bolest dopušta. Smatra se da starija životna dob, anemija, pothranjenost, pušenje i imunosupresivna terapija umanjuju upalnu fazu odgovora organizma što dovodi do neadekvatnoga ranog cijeljenja rane, dok je kod pretilosti prisutan povišeni intraabdominalni tlak što biomehanički koči adekvatno cijeljenje (34-36). Pokazalo se da postoperativna infekcija rane povećava rizik nastanka hernije 1,9 puta (37). Tehnika zatvaranja laparotomijske rane, također, značajno doprinosi razvoju incizijske hernije (38). Pokazalo se da 50 % pacijenata koji postoperativno imaju dehiscencu trbušne rane dugoročno razviju incizijsku herniju (39). Kada se govori o recidivnim incizijskim hernijama, pokazalo se da je dužina hernije neovisan faktor rizika, dok morfologija hernije nema utjecaja na recidiv (40).

1.2.4.2. TEORIJA NEADEKVATNOGA RANOG CIJELJENJA

(engl. *early wound failure*, hrv. neadekvatno rano cijeljenje, autorov prijedlog prijevoda)

Proučavanjem incizijskih hernija sve se više postavljalo pitanje njihova nastanka, i što je to zapravo specifično u ovim ranama.

Kada se generalizira mehanizam cijeljenja rana, moguća su dva ishoda:

- rana zacijeli primarnim, sekundarnim ili tercijarnim cijeljenjem
- rana ne zacijeli, tj. nastane dehiscencija rane (29,30).

Primarno cijeljenje rane (*per primam*) odvija se u rani koja je primarno zatvorena. Rubovi rane položeni su neposredno jedan uz drugi i međusobno slijepljeni samo vrlo uskim slojem novostvorenoga tkiva. Sekundarno cijeljenje rane (*per secundam*) je cijenjenje rane u kojoj je prisutan infekt i/ili koja nije zatvorena. Stijenke rane su razmaknute, a rana secernira. Zatvaranje rane protječe polagano procesom kontrakcije i stvaranjem granulacijskoga tkiva (cijeljenje *per granulationem*). Tercijarno cijeljenje (*per tertiam*) je cijeljenje kod kojega se, nakon sekundarnoga cijeljenja i razrješenja infekta, kirurški intervenira i ranu tretira kao kod primarnoga cijeljenja (29,30).

Laparotomijske rane su specifične. Moguća su tri ishoda cijeljenja:

- rana može zacijeliti jednim od mehanizama cijeljenja
- nastaje dehiscencija rane (što u tome slučaju znači „otvorena” trbušna stijenka i evisceracija)
- rana može neprimjereno (neadekvatno) srasti, iz čega se razvije incizijska hernija.

Objašnjenje ovoga fenomena ponuđeno je kroz teoriju neadekvatnoga cijeljenja (3).

Laparotomijske rane kompleksni su tip rana koji uključuje kožnu i miofascijalnu komponentu. Te dvije komponente ovih rana različito cijele, s time da vlačna čvrstoća mišićne komponente puno ranije doseže maksimum od vlačne čvrstoće kožne komponente zbog veće kinetičke aktivnosti fibroblasta u miofascijalnoj komponenti laparotomijskih rana (41,42). Neadekvatno rano cijeljenje rana mehanizam je kojim, u čovjeka i u animalnih modela, dolazi do razvoja incizijskih hernija, a koji, unatoč opsežnim istraživanjima, i dalje nije u potpunosti razjašnjen i ne može se objasniti samo mehaničkim silama i biološkom komponentom koje djeluju na ranu. Drugim riječima, mehanički i biološki faktori, koji zadovoljavaju adekvatno cijeljenje rana, istovremeno ne znače i prevenciju razvoja hernije. Prema teoriji neadekvatnoga ranog cijeljenja predispozicija za razvoj hernije nastaje još u prvoj (upalnoj) fazi cijeljenja (43,44). Gubitak normalne arhitekture ožiljka inducira razvoj populacije abnormalnih fibroblasta kao i kod kroničnih rana. To bi moglo objasniti ekspresiju kolagena abnormalne strukture te sam razvoj hernije (45-47).

Klinički prepoznato neadekvatno rano cijeljenje rijetko je a u svega 0,1 % dovodi do dehiscencije (48). Pokazalo se da stvarni postotak neadekvatnoga ranog cijeljenja laparotomijskih rana u ljudskoj populaciji iznosi 11 % te većina tih rana (94 %) završava razvojem incizijske hernije u prve tri godine (49). Međutim, do sada nije u potpunosti razjašnjeno zašto sve laparotomijske rane, kod kojih je uočeno neadekvatno rano cijeljenje, ne završavaju dehiscencijom ili kasnijim razvojem hernije. Više od polovice hernija nastaje u prve dvije godine iza operacije. Studije pokazuju da se incizijske hernije mogu pojaviti i desetak godina nakon operativnoga zahvata, no tada se govori o tezi nastanka hernije kasnim kidanjem ožiljka (50,51).

1.2.4.3. PREVENCIJA INCIZIJSKIH HERNIJA

U čak 20 % incizija trbušnih stijenki razvije se incizijska hernija (33). Pretpostavlja se da godišnja incidencija incizijskih ventralnih hernija u Sjedinjenim Američkim Državama iznosi otprilike 400 000, a najmanje je 200 000 pacijenata godišnje operirano zbog ove dijagnoze (43). Budući da je liječenje incizijskih ventralnih hernija skupocjeno, ono predstavlja ozbiljan socioekonomski teret zdravstva i pacijenata. Mnogo se napora, stoga, ulaže u istraživanje prevencije razvoja incizijskih hernija.

S obzirom na poznate faktore rizika za razvoj incizijskih hernija prevencija se bazira na smanjenju ili kompletnome uklanjanju tih faktora. Prevencija se tako može podijeliti na četiri razine:

- prevencija adekvatnom kirurškom tehnikom
- prevencija infekcije
- preventivna primjena sintetskih materijala
- primjena preparata koji potiču cijeljenje.

Prevencija adekvatnom kirurškom tehnikom

Visoka incidencija incizijskih hernija neovisno o kvaliteti zatvaranja trbušne stijenke potaknula je brojna istraživanja koja su trebala dati odgovore na pitanja koja je tehnika šivanja najbolja, koji je konac najbolji, koja je gustoća šavova potrebna te slična pitanja u svakodnevnoj praksi abdominalnih kirurga. Nekoliko kontroliranih randomiziranih studija od 2010. do 2016. godine pokazalo je da je najbolja tehnika šivanja trbušne stijenke sporo apsorbirajućim monofilamentnim produžnim šavom (52). Također, pokazalo se da je za prevenciju razvoja incizijskih hernija bolje koristiti male „zalogaje” s razmakom od 5 mm (53). EHS je 2015. godine na temelju brojnih studija donio preporuke šivanja trbušne stijenke sporo apsorbirajućim monofilamentnim produžnim šavom u jednome sloju, malim „zalogajima”, bez

zasebnoga šivanja peritoneuma, a preporučljiv omjer duljine konca i rane trebao bi biti 4 : 1 (54).

Prevencija infekcije

Postoperativna infekcija kirurške rane povećava rizik nastanka hernije 1,9 puta (37). U anglosaksonskoj literaturi infekcija kirurške rane (engl. *Surgical Site Infection* - SSI) definira se kao prisutnost infekta u području kirurške rane unutar 30 dana od operativnoga zahvata. SSI se dijeli u tri kategorije:

1. površna incizijska infekcija kirurške rane (engl. *Superfitial incisional* SSI)
2. dubinska incizijska infekcija kirurške rane (engl. *Deep incisional* SSI)
3. infekcija organa/prostora kirurške rane (engl. *Organ/Space* SSI).

S aspekta proučavanja incizijskih hernija važne su površna i dubinska incizijska infekcija kirurške rane. Površna incizijska SSI definirana je kao infekt kože i potkožja dok je dubinska incizijska SSI definirana kao infekt koji zahvaća mišić i fasciju.

Važnost prevencije razvoja SSI-a shvaćena je i od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), stoga se redovito izdaju i obnavljaju smjernice o preoperativnim, intraoperativnim i postoperativnim postupcima za prevenciju SSI-a (55). Uz sve preporučene mjere prevencije u kirurškoj praksi pojavila se i primjena šavova koji su prekriveni antimikrobijalnim preparatima poput triklosana, no pokazalo se da takvi šavovi ne daju značajnije rezultate u prevenciji infekcije kirurške rane (52,54).

Preventivna primjena sintetskih materijala

Mnogi znanstveni radovi i meta-analize pokazali su da preventivna primjena sintetskih materijala (mrežica) u pacijenata s visokim rizikom razvoja incizijske hernije može umanjiti incidenciju i do 85 %, stoga je EHS u vlastite smjernice uveo preventivnu primjenu sintetskoga materijala kod zatvaranja trbušnoga zida u pacijenata s aneurizmom abdominalne aorte i pretilih pacijenata (54,56,57).

Primjena preparata koji potiču cijeljenje

U procesu cijeljenja sudjeluju brojni faktori rasta i citokini koji uglavnom djeluju kao promotori cijeljenja. U kliničkim ispitivanjima na ljudima i kao terapija koriste se neki (npr. PDGF-BB, bFGF i GM-CSF), no danas nema nijednoga kliničkog ispitivanja ili kliničke primjene faktora rasta ili citokina u prevenciji razvoja incizijske hernije (58).

Neki od faktora rasta i citokini ispitivani su na animalnim modelima. Uz pomoć poligalaktonskih polimerskih štapića ugrađenih u ranu štakora kao sporootpuštajućih nosača za bFGF pokazao se statistički značajan preventivni učinak bFGF-a na razvoj incizijske hernije (59). Intravenska primjena TGF-β_2 faktora također umanjuje razvoj incizijske hernije u štakora (60). Ispitivana je i vlačna čvrstoća rane štakora nakon primjene faktora rasta i citokina. Nakon ugradnje standardne polipropilenske mrežice i mrežice impregnirane bFGF-om pokazalo se da je vlačna čvrstoća rane nakon primjene mrežice impregnirane s bFGF-om veća (61). *In vitro* testovi i eksperiment na kunićima pokazali su da kombinacija IGF-I, bFGF I TGF-β_2 povećava vlačnu čvrstoću rane (62).

Kod potencijalne primjene ovih preparata u prevenciji incizijske hernije potrebno bi bilo voditi računa o načinu primjene (sistemska ili lokalna primjena) te načinu aplikacije (peroralni unos, intravenozna primjena, lokalna aplikacija). Također, važan je faktor i stabilnost preparata, kao i to je li za aplikaciju potreban nosač ili se preparat može primjenjivati bez nosača. Idealan preparat, koji bi se koristio u prevenciji incizijskih hernija, bio bi stabilan preparat za koji nije potreban nosač, koji se može primjenjivati sistemski, onaj čija je aplikacija neinvazivna (npr. peroralno) te da je bez ili s minimalnim nuspojavama.

1.2.4.4. LIJEČENJE INCIZIJSKIH HERNIJA

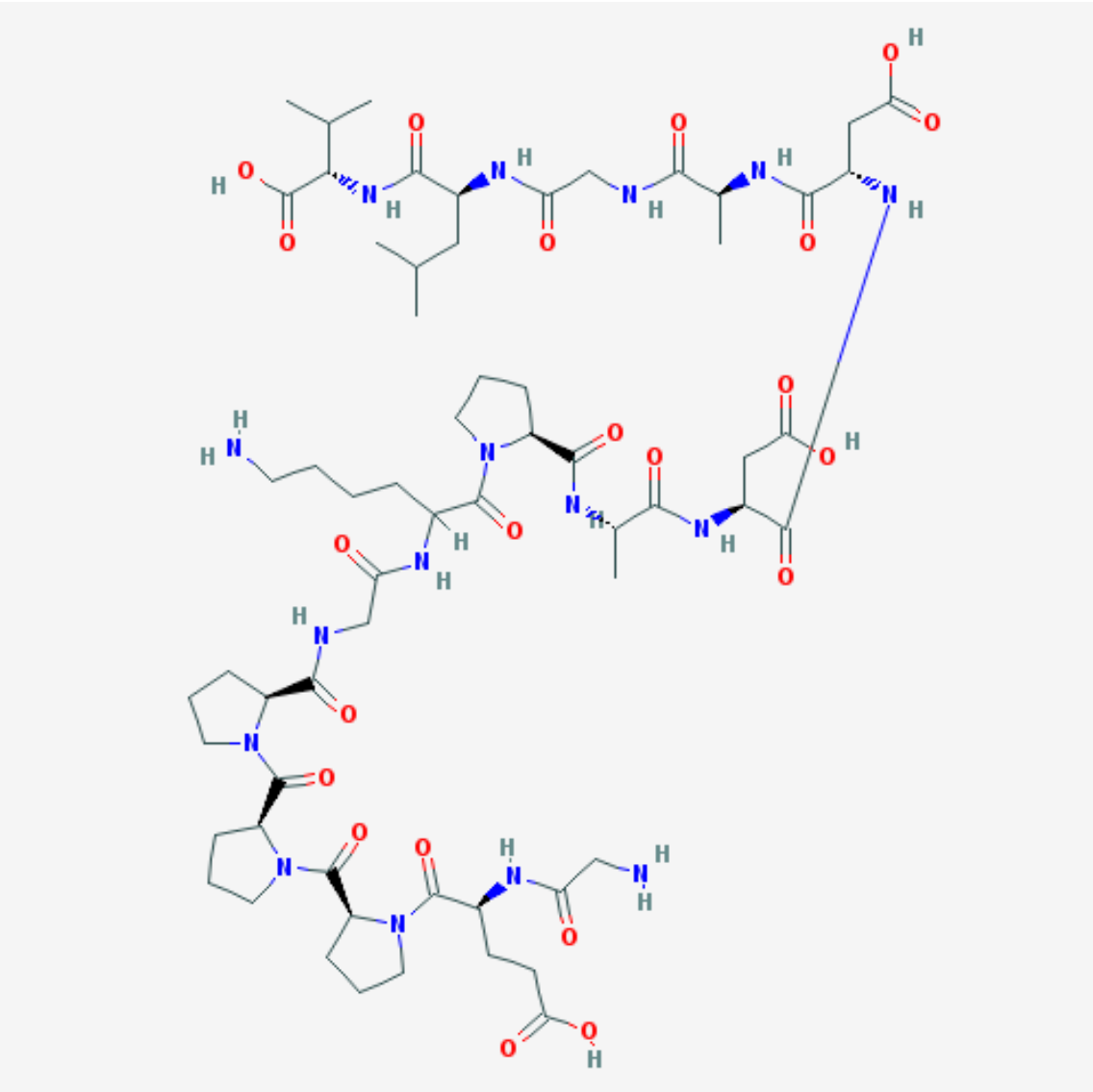
Danas se primjena sintetskoga materijala (mrežica) smatra zlatnim standardom u liječenju incizijskih hernija. Herniorafija (zbrinjavanje hernija resekcijom hernijske vreće i šivanjem trbušne stijenke) neovisno o metodi šivanja ima slabije rezultate, tj. incidencija recidiva značajno je viša u odnosu na primjenu mrežica (63,64).

Zbrinjavanje incizijskih hernija moguće je laparoskopskom ili otvorenom metodom. Dumainian i Denham smatrali su kako je veličina hernije od 10 cm gornja granica za laparoskopsko zbrinjavanje, no prema smjernicama EHS-a za laparoskopsko zbrinjavanje hernija iz 2014. godine nije postavljena granična veličina hernije za takvo zbrinjavanje (65,66).

Na slobodnome tržištu postoje brojni tipovi sintetskoga materijala, a kako bi se umanjila zbrka, 2012. godine uvedena je sistematizacija mrežica (67). Način plasiranja i položaj sintetskoga materijala još su uvijek predmet brojnih rasprava i istraživanja, pa je tako i autor ovoga teksta predložio vlastitu tehniku zbrinjavanja incizijskih hernija pod nazivom Garestin tehnika (68).

1.2.5. PENTADEKAPEPTID BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 (BPC 157) stabilni je polipeptid molekularne težine 1419 čija je aktivnost prvi puta opisana u preglednome radu „Journal of Physiology“ (Paris) 1993. godine. Aktivna komponenta ovoga polipeptida građena je od 15 aminokiselina (Gly, Glu, Pro, Pro, Pro, Gly, Lys, Pro, Ala, Asp, Asp, Ala, Gly, Leu, Val). Izoliran je primarno iz želučanoga soka te je imunohistokemijski dokazan u želučanoj mukozi i lumenu (Slika 3).



Slika 3. Molekula BPC-a 157

Ovaj je peptid postojan u ljudskome želučanom soku duže od 24 sata dok drugi standardni peptidi (kao EGF ili TGFb) bivaju razgrađeni vrlo brzo. BPC 157 snažan je antiulcerogeni faktor. Jednako je učinkovit bez obzira na dozu (μg/kg ili ng/kg) protiv niza gastrointestinalnih lezija izazvanih različitim ulcerogenim procedurama. Ima snažan efekt zarastanja poslije peroralne, kao i parenteralne primjene, bez obzira na vrlo niske doze. Za razliku od ostalih standardnih polipeptida, koji su aktivni uz dodatak različitih nosača, ovaj postojani peptid učinkovit je bez njih (69,70). Nekolicina studija pokazuje da BPC 157 snažno inhibira alkoholne lezije želuca, kao i druge citotoksične lezije. U gastrektomiranoga štakora svi su standardni agensi aktivni. Poslije sialoadenektomije samo BPC 157 je aktivan i, najvažnije, njegova antiulkusna aktivnost prati oporavak AMP-ADP-ATP sustava u mukozi želuca (70-73). Dokazana je mogućnost korištenja BPC-a 157 u terapiji ulceroznoga kolitisa. Za razliku od sulfasalazina BPC 157 ne ublažuje samo leziju, već u modelu kroničnog kolitisa (cistamin) sprječava recidive bolesti (74). Poboljšanje cijeljenja davanjem BPC-a 157 uključuje razne rane: duboke opekline, lezije laserom, kožne rane, rane u dijabetičara, pseudoartroze, presječene tetive, presječene i konkvasirane mišiće, presječene živce, otkidanje tetiva od kostiju, oštećenja rožnice, peritonitis, ileoilealne anastomoze, kolokolične anastomoze, plućne lezije. U svim ovim terapijskim djelovanjima pentadekapeptid BPC 157 efikasan je bez obzira je li primijenjen lokalno ili sistemski (75-88).

1.2.6. NO- SUSTAV

U sisavaca, pa tako i u čovjeka, NO (dušikov monoksid, dušikov (II) oksid) važna je stanična signalna molekula kratkoga poluvremena raspada, svega nekoliko sekundi. Zbog svoje važnosti u razvoju neuroznanosti, fiziologije i imunologije NO je 1992. godine proglašen „molekulom godine" (89). Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 1998. godine dodijeljena je R. F. Furchgottu, L. J. Ignarrou i F. Muradu upravo za istraživanja vezana uz NO kao signalnu molekulu kardiovaskularnoga sustava (90).

U ljudskome organizmu NO sintetizira enzim NOS (NO sintetaza, sintetaza dušičnoga monoksida). Tri su izoforme NOS-a: endotelijalna NOS (eNOS, NOS-3), neuralna NOS (nNOS, NOS-1) i induktibilna NOS (iNOS, NOS-2). Dok su NOS-1 i NOS-3 ovisne o kalciju, NOS-2 je neovisna o kalciju. NOS oksidira gvanidinsku grupu iz L-arginina čime nastaje NO. Time je L-arginin prekursor NO. N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je analog L-arginina čija je funkcija blokiranje NO sintetaze. Na taj se način iz L-arginina ne može sintetizirati NO te su svi efekti djelovanja L-arginina blokirani što L-NAME čini njegovim antagonistom (91,92). Brojna istraživanja pokazala su utjecaj NO-sustava na cijeljenje rana, a nepobitnu važnost NO-sustava u cijeljenju pokazalo je istraživanje na „knockout" miševima za iNOS (miševima kod kojih ne postoji, unutar DNK-a, gen za stvaranje iNOS-a) (93).

1.2.7. MEĐUODNOS PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 I NO- SUSTAVA

Međuodnos pentadekapeptida BPC 157 i NO-sustava demonstriran je njihovim sudjelovanjem u Mocadinom hemostatskom odgovoru NO-sustava na oštećenje (očuvanje vaskularnog integriteta i kontrola trombocita) (94). Također, brojna plejotropna istraživanja potvrđuju međuodnos pentadekapeptida BPC 157 s L-NAME-om i L-argininom; kolaborativni dokazi postoje kod želučane sluznice i njene protekcije usljed alkoholne lezije (i u uvjetima u kojima L-arginin ne djeluje), kod regulacije krvnog tlaka, akutne i kronične alkoholne intoksikacije, kroničnog srčanog zatajenja, plućne hipertenzije, aritmija, hiperkalemije i hipokalemije te konačno cijeljenja fistula (gastrokutane, duodenokutane, kolokutane, ezofagokutane, kolovezikalne i rektovezikalne fistule) (8,95-110). Nedavno je potvrđeno da BPC 157 također može sudjelovati u miozi kod atropinske midrijaze vjerojatno preko NO-sustava i/ili kolinergičkih mehanizama (111). Dakle, postoje brojni dokazi međuodnosa BPC 157 s NO-sustavom, gdje se BPC 157 suprotstavio nuspojavama primjene L-NAME kao i učincima L-arginina što je indikativno za generalizaciju ovog učinka BPC 157. Važno je naglasiti da se njegova interakcija s ova dva preparata događa neovisno o njihovim efektima, ukoliko se radi o djelovanju putem istih signalnih puteva (8,95-110). Češće je djelovanje L-NAME i L-arginina suprotna patološka reakcija (npr. hipertenzija kod aplikacije L-NAME i hipotenzija kod aplikacije L-arginina i sl.) te se BPC 157 jedako suprotstavlja efektima oba preparata. Rijeđe je efekt primjene L-NAME i L-arginina isti (npr. mioza, trombocitopenija, pogoršanje alkoholne intoksikacije i sl.) te su ti efekti također neutralizirani primjenom BPC 157, s obzirom da se radi o istim putevima djelovanja (8). Ovi efekti posljedica su kompeticije pentadekapeptida BPC 157 s L-argininom na NOS, a antagonizirajući efekt BPC 157 na L-NAME-u jači od onog koji se postiže primjenom L-arginina (8,88). Modulatorni efekt pentadekapeptida BPC 157 na NO-sustav djeluje kako bi osigurao homeostatske uvjete, što se jasno očituje kod kompleksijeg pristupa analizi njegovog efekta (primjena i L-NAME, i L-arginina i njihove kombinacije), s obzirom da su ranija istraživanja NO-sustava bila temeljena na njegovoj jednostavnijoj modulaciji (primjena ili L-NAME ili L-arginina) (8,88,95-111).

1.2.8. VLAČNA ČVRSTOĆA

1.2.8.1. OSNOVNI POJMOVI I DEFINICIJE

Vanjske sile, koje djeluju na čvrsto tijelo, rezultiraju pojavom unutarnjih sila. Uslijed djelovanja vanjskih i unutarnjih sila tijela se deformiraju mijenjajući svoj oblik i dimenzije. Točke tijela promijenit će svoj položaj, a vektor koji spaja početni i konačni položaj neke proizvoljne točke tijela naziva se vektorom pomaka. U općem slučaju vektor pomaka ima komponente *u*, *v* i *w* u smjeru koordinatnih osi *x*, *y, z* te se može zapisati u obliku

$$\vec{\delta} = u\vec{i} + v\vec{j} + w\vec{k} \tag{1}$$

Deformacija tijela opisuje se pomoću linijske i kutne deformacije. Linijska ili duljinska deformacija ε predstavlja promjenu neke dužine na tijelu i definirana je izrazom

$$\varepsilon = \lim_{l \to 0} \frac{\Delta l}{l}. \tag{2}$$

gdje je Δl produljenje u mm, a l početna duljina u mm. Kutna deformacija γ predstavlja razliku kutova između dvije međusobno okomite dužine, prije i nakon deformiranja. Linijska je deformacija pozitivna ako se dužina produljila, dok je kutna deformacija pozitivna ako se pravi kut između dvije dužine smanjio. Deformacija ε_{ij} u nekoj proizvoljnoj točki tijela u potpunosti je određena poznavanjem linijske i kutne deformacije za tri međusobno okomita pravca.

U opterećenome tijelu pored deformacija pojavit će se i naprezanja. Naprezanje u nekoj točki opterećenoga tijela u potpunosti je određeno poznavanjem normalnih i tangencijalnih naprezanja za tri međusobno okomita presjeka. Veza između deformacija i naprezanja u općem slučaju može se definirati izrazima

$$\sigma_{ij} = f\left(\varepsilon_{ij}\right), \qquad \varepsilon_{ij} = f_1\left(\sigma_{ij}\right). \tag{3}$$

Funkcije u gornjim izrazima ovise o materijalu te se za različite materijale određuju eksperimentalno (112,113).

1.2.8.2. ISPITIVANJE VLAČNE ČVRSTOĆE

Rastezanjem epruvete dobiva se dijagram ovisnosti sile F o produljenju Δl. Dijeljenjem sile F s početnom površinom poprečnoga presjeka epruvete S_0 dobiva se naprezanje

$$\sigma = \frac{F}{S_0}, \tag{4}$$

a dijeljenjem produljenja Δl s početnom duljinom l dobiva se duljinska deformacija ε pa dijagram sila – produljenje (F - Δl dijagram) prelazi u dijagram naprezanje – deformacija (σ – ε dijagram) (112).

Vlačna čvrstoća materijala kod jednoosnoga rastezanja određena je izrazom

$$R_m = \frac{F_m}{S_0}, \tag{5}$$

gdje je F_m maksimalna sila u N, S_0 početna površina poprečnoga presjeka u mm^2.

Pored vlačne čvrstoće definira se još jedno važno svojstvo materijala, a to je istezljivost A koja daje relativno produljenje u uzdužnome smjeru u odnosu na početnu duljinu gdje je L_u konačna mjerna duljina epruvete u mm, a L_o početna mjerna duljina u mm (112,113).

$$A = \frac{L_u - L_0}{L_0} \cdot 100\%, \tag{6}$$

1.2.9. PRIMJENA KORELACIJA DIGITALNE SLIKE ZA ODREĐIVANJE POLJA POMAKA

1.2.9.1. MJERENJE POMAKA

Kod ispitivanja mehaničkoga odziva materijala na narinuto opterećenje od fizikalnih veličina obično se mjeri sila i pomak. Pomoću te dvije veličine izračunavaju se ostale, kao što su deformacije, naprezanja i neki karakteristični parametri materijala. Sila se mjeri kalibriranom mjernom dozom koja je sastavni dio ispitnoga uređaja odnosno kidalice, dok se pomak može izmjeriti na više načina, a najčešće se određuje:

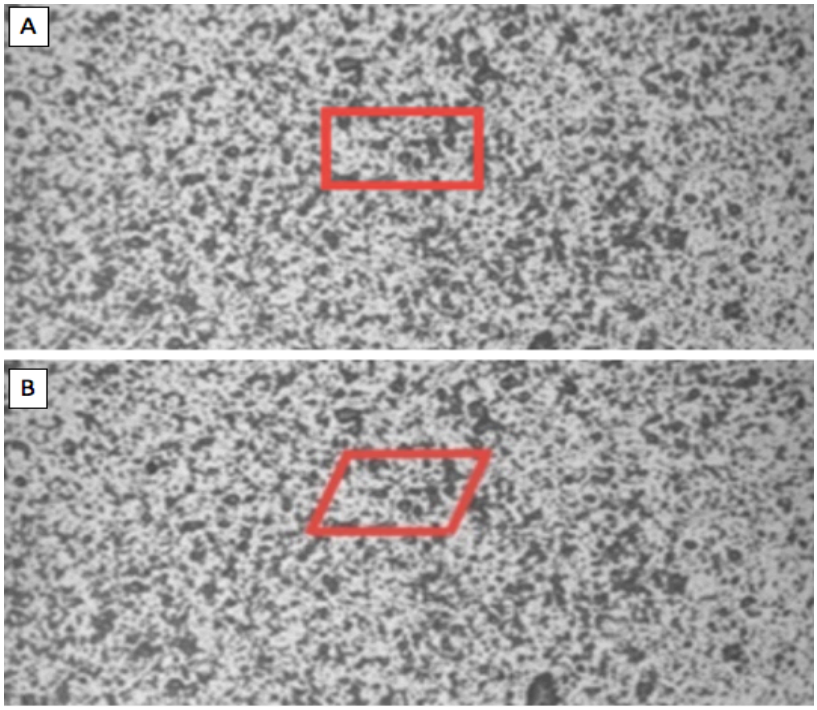
- iz vertikalnoga hoda kidalice
- mehaničkim ekstenzometrom
- laserskim ekstenzometrom
- videoekstenzometrom
- elektrootpornim mjernim trakama
- korelacijom digitalne slike.

Osnovni nedostatak konvencionalnih metoda mjerenja pomaka u odnosu na korelaciju digitalne slike (engl. *Digital Image Correlation* – DIC) je to što se dobiva podatak o pomaku samo u jednoj točki ili između dvije točke (markera) (114).

1.2.9.2. METODA KORELACIJE DIGITALNE SLIKE

Korelacija digitalne slike optička je beskontaktna metoda određivanja polja pomaka i deformacija na površini opterećenih objekata. Metoda se zasniva na praćenju promjene položaja mjernih točaka na površini mjernoga objekta tijekom opterećivanja. Postupak se svodi na slikanje digitalnih slika mjernoga područja opterećivanja pri čemu je prva slika referentna, odnosno slika objekta u neopterećenome stanju.

Digitalne slike diskretiziraju se malim površinama kvadratičnoga ili pravokutnoga oblika veličine nekoliko piksela i nazivaju se fasetama. Središte svake fasete predstavlja mjernu točku čiju promjenu položaja prati algoritam tijekom opterećivanja uzorka. Fasete se međusobno razlikuju po raspodjeli intenziteta sive boje pa je za provedbu mjerenja neophodno da mjerna površina uzorka posjeduje teksturu različitoga intenziteta nijansi sive boje. Kako većina uzoraka nema dovoljno bogatu prirodnu teksturu, na površinu se nanosi umjetna nepravilna tekstura (raster) pomoću crne i bijele boje u obliku crnih točkica na bijeloj podlozi (Slika 4) (114).



Slika 4. Mjerna površina uzorka sa stohastičkim rasterom i definiranom fasetom.
A. Uzorak u referentnome neopterećenom stanju i **B.** Uzorak u opterećenome stanju

Za provedbu mjerenja potrebna je jedna ili više digitalnih kamera, izvor svjetla te odgovarajući algoritam za korelaciju dobivenih digitalnih slika.

Za razliku od konvencionalnih metoda mjerenja pomaka DIC metodom moguće je odrediti cijelo polje pomaka, što omogućuje identifikaciju/validaciju parametara materijala koji pouzdanije opisuju ponašanje materijala pri složenim režimima opterećenja (115).

2. HIPOTEZA

Neadekvatno rano cijeljenje laparotomijskih rana (eng. *early wound failure*) mehanizam je kojim, u čovjeka i na animalnim modelima, dolazi do razvoja incizijskih hernija.

Pentadekapeptid BPC 157 svojim djelovanjem uklanja neadekvatno rano cijeljenje i time sprječava razvoj kliničkoga fenomena incizijske hernije na štakorskom modelu kod kojega se inducira neadekvatno rano cijeljenje laparotomijske rane.

Pentadekapeptid BPC 157 svojim djelovanjem povećava vlačnu čvrstoću rane ispitivanih uzoraka.

Učinak BPC-a 157 na cijeljenje laparotomijskih rana posredovan je preko NO-sustava.

3. CILJEVI RADA

OPĆI/GLAVNI CILJEVI:

- Utvrditi prevenira li BPC 157 svojim djelovanjem razvoj kliničkoga fenomena incizijske hernije na štakorskom modelu kod kojega se inducira neadekvatno rano cijeljenje (engl. *early wound failure*) laparotomijske rane.
- Utvrditi povećava li BPC 157 svojim djelovanjem vlačnu čvrstoću rane.
- Utvrditi je li učinak BPC-a 157 na cijeljenje laparotomijskih rana posredovan preko NO-sustava.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- Potvrditi o dozi zavisan učinak BPC-a 157 na prevenciju incizijske hernije i vlačnu čvrstoću rane.
- Potvrditi učinak BPC-a 157 na cijeljenje kožne komponente rane.
- Potvrditi učinak BPC-a 157 na razvoj trbušnih priraslica.
- Potvrditi učinak BPC-a 157 na vlačnu čvrstoću rane.
- Provjeriti mogućnost primjene metode korelacije digitalne slike na određivanje polja pomaka u području rane.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. PROTOKOL POKUSA

Istraživanje je provedeno na laboratorijskim životinjama, Wistar štakorima, mužjacima tjelesne težine 301 – 331 g koji su uzgojeni u nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. registracije: HR-POK-007).

Medikacija korištena u istraživanju

Medikacija je korištena neposredno po operativnome zahvatu te se primjena nastavila svakoga dana u isto vrijeme, dok je zadnja primjena bila 24 sata prije žrtvovanja.

- Pentadekapeptid BPC 157 (molekularna težina 1419) (Diagen, Ljubljana, Slovenija) pripremljen je s postignutom čistoćom od 99 % izmjerenom metodom HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). U svim postupcima ovoga istraživanja koristio se otopljen u vodi i primijenjen u vodi za piće u različitim koncentracijama (10 µg/kg, 10 ng/kg, 0,16 µg/mL, 0,16 ng/mL, 12 mL/dan/štakor).

- L-arginin i L-NAME (Sigma, St. Louis, MO, USA) korišteni samostalno ili u kombinacijama bili su rastopljeni u fiziološkoj otopini (Pliva, Zagreb, Hrvatska). Primjenjivali su se intraperitonealno: L-NAME - 5 mg/kg i L-arginin - 100 mg/kg, jednom dnevno, 5 mL/kg.

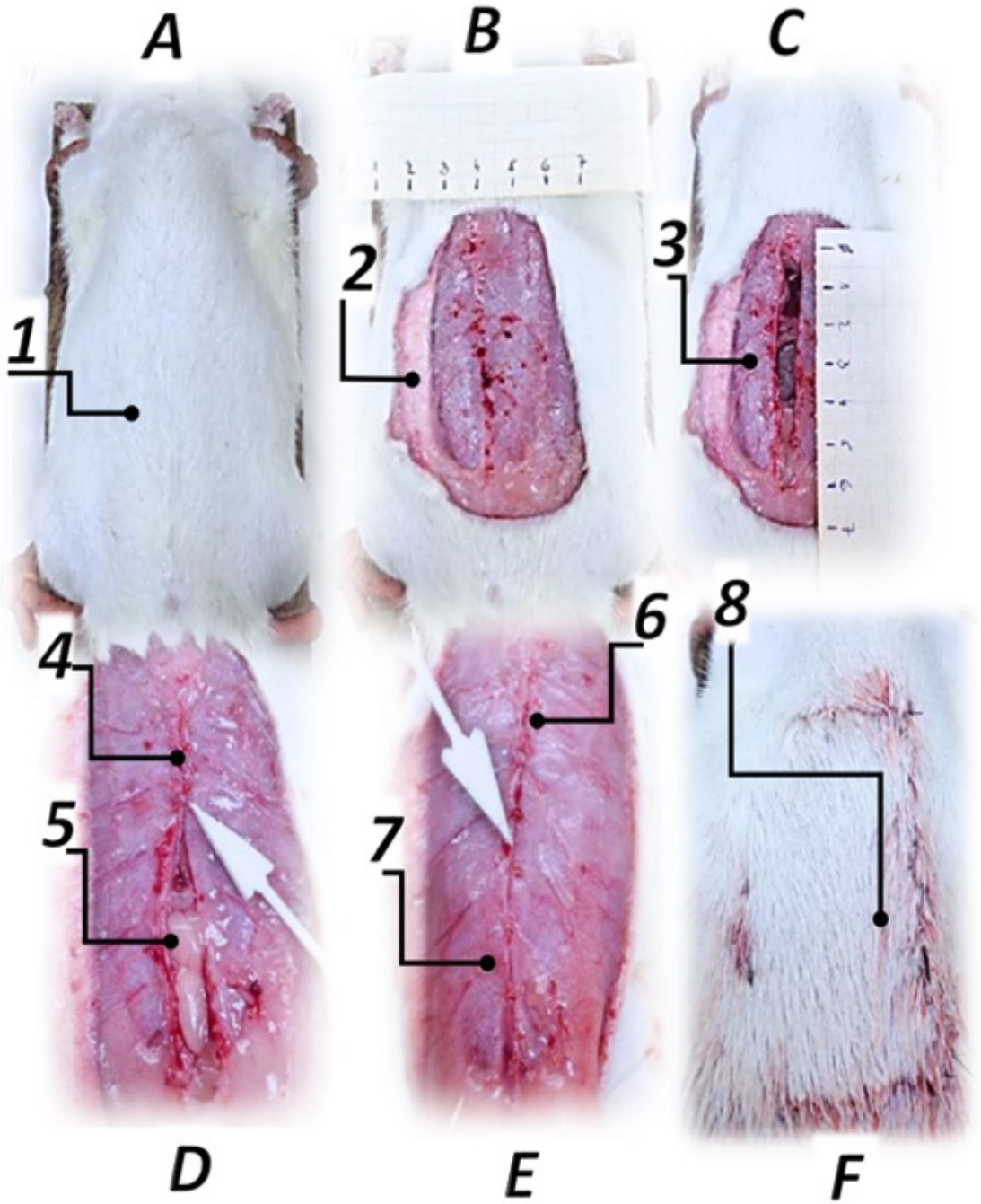
- Kontrolna skupina pije vodu (12 mL/dan/štakor).

Operativni zahvat

Ispitivane životinje bile su podvrgnute inicijalnome operativnom zahvatu indukcije ranoga neadekvatnog cijeljenja laparotomijske rane sa zadovoljavajućom incidencijom nastanka incizijske hernije. Operativni zahvat opisan je od strane Dubayja i suradnika 2004. godine (6,7). Zbog potrebe pribavljanja preparata pogodnih za mehaničku analizu zahvat je bio modificiran u ovome istraživanju kako je opisano u daljnjemu tekstu. Životinje su za vrijeme inicijalne operacije podvrgnute općoj anesteziji u skladu s Postupnikom za primjenu anestezije u pokusnih životinja Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (116). Anestezija se provodila intraperitonealnom primjenom ketamina (Ketanest, Parke Davis GmbH, Berlin, Njemačka) u dozi 20 mg/kg i diazepama (Normabel, Belupo d. d, Koprivnica, Hrvatska) u dozi 6 mg/kg.

Opis operativnoga zahvata

Anestezirane životinje poliježu se na operacijski stolić na leđa te se fiksiraju elastičnim gumicama (Slika 5A, oznaka /1/). Operativni zahvat započinje formiranjem pravokutnoga kožnog zaliska 70 x 30 mm (većih dimenzija u smjeru kranio-kaudalno) incizijom kože 20 mm lateralno od medijalne linije te preparacijom prefascijalne avaskularne zone ispod cijeloga zaliska čime se eksponira bijela linija (Slika 5B, oznaka /2/). Duž bijele linije učini se miofascijalna incizija duljine 60 mm (Slika 5C, oznaka /3/). Kranijalnih 10 mm rane šiva se produžnim šavovima Vycril 5-0 (Ethicon inc., USA) u omjeru dužine konca i rane 4 : 1 čime se dobiva optimalno cijeljenje toga dijela rane sa smanjenom mogućnošću razvoja hernije (Slika 5D, oznaka /4/). Kranijalni dio rane koristio se za analizu vlačne čvrstoće ožiljka. Distalnih 50 mm miofascijalne rane se potom sašije pojedinačnim šavovima Vycril 5-0 (Ethicon inc., USA) u razmacima 5 mm u (Slika 5E, oznaka /7/). Tako opisani model pokazao je incidenciju razvoja incizijske hernije 80 % nakon 28 dana (6,7). Operativni zahvat trajao je u prosjeku 10 - 15 minuta. Postoperativno, životinje su se pratile pod grijaćom lampom do punoga buđenja.
Tijek operativnoga zahvata prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Operativni zahvat.

A. Štakor pripremljen za operativni zahvat /1/, **B.** Formirani kožni zalistak /2/, **C.** Incizija 60 mm duž bijele linije /3/, **D.** Proksimalnih 10 mm zašiveno produžnom tehnikom /4/, preostali dio rane još nezatvoren /5/ (bijela strelica pokazuje granicu proksimalnog dijela rane šivanog produžnom tehnikom i kaudalnog dijela rane), **E.** Kranijalni dio rane zašiven produžnom tehnikom /6/ (vidi /4/), ranije nezatvoreni dio (vidi /5/) sada je zatvoren /7/: fascija zašivena pojedinačnim šavovima u razmacima 5 mm u distalnih 50 mm miofascijalne rane, što predstavlja „*locus minoris resistentiae*" za formiranje hernije u distalnih 50 mm rane /7/ (bijela strelica pokazuje fasciju zašivenu pojedinačnim šavovima u razmacima 5 mm), **F.** Konačni vanjski izgled, zašiven kožni zalistak /8/ (vidi ranije /2/)

Skupine životinja

Prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata životinje su podijeljene u 12 skupina:

- kontrolna skupina
- BPC 157 u mikrogramima
- BPC 157 u nanogramima
- L-NAME
- L-arginin
- L-NAME + BPC 157 u mikrogramima
- L-NAME + BPC 157 u nanogramima
- L-arginin + BPC 157 u mikrogramima
- L-arginin + BPC 157 u nanogramima
- L-NAME + L-arginin
- L-NAME + L-arginin + BPC 157 u mikrogramima
- L-NAME + L-arginin + BPC 157 u nanogramima.

Prema intervalu praćenja životinje su podijeljene u 4 skupine:

- 7 dana
- 14 dana
- 21 dan
- 28 dana.

U svakoj skupini (i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata te prema intervalu praćenja) bilo je 5 životinja (Tablica 3).

Tablica 3. Broj životinja u svakoj skupini prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata te prema intervalu praćenja

SKUPINE ŽIVOTINJA	7 DANA	14 DANA	21 DAN	28 DANA
Kontrola	5	5	5	5
BPC µg	5	5	5	5
BPC ng	5	5	5	5
L-NAME	5	5	5	5
L-arginin	5	5	5	5
L-NAME + BPC µg	5	5	5	5
L-NAME + BPC ng	5	5	5	5
L-arginin + BPC µg	5	5	5	5
L-arginin + BPC ng	5	5	5	5
L-NAME + L-arginin	5	5	5	5
L-NAME + L-arginin + BPC µg	5	5	5	5
L-NAME + L-arginin + BPC ng	5	5	5	5

Postoperativno praćenje, žrtvovanje i analiza preparata

Životinje su se svakodnevno monitorirale, pratila se prisutnost i razvoj hernije i/ili dehiscencije, veličina hernije te prezentacija kožnog ožiljka. Životinje, kod kojih su primijećeni znakovi infekcije rane, isključile su se iz studije. Sve skupine životinja su žrtvovane po završetku intervala praćenja. Žrtvovanje se provodilo u skladu sa „AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition“: primjenom trostruke doze anestetika koji su korišteni u istraživanju (vidi gore) (117). Sve životinje i preparati fotografirani su i evidentirani nakon žrtvovanja.

Evidentirani su sljedeći parametri:

- prisutnost hernije i dehiscencije
- veličina hernije
- prezentacija kožnog ožiljka
- prisutnost trbušnih priraslica
- sila pucanja
- polje pomaka u području rane.

Svaka miofascijalna dijastaza u području reza veća od 2 mm smatrala se hernijom. Miofascijalna dehiscencija s evisceracijom crijeva smatrala se, također, hernijom i za potrebe statističke analize, kod dehiscencije, notirala se vrijednost 50 mm. Po verifikaciji hernije notira se dužina hernije (horizontalna duljina hernijskoga vrata), uz vrijednost 50 mm (koja odgovara distalnome dijelu incizije sašivenim pojedinačnim šavovima (vidi operativni zahvat) kao maksimalne vrijednosti (6,7).

Za ocjenu prezentacije kožnog ožiljaka i prisutnosti trbušnih priraslica (koje su se također fotografirale) koristile su se vlastite ordinalne mjerne skale u skladu s dosadašnjim istraživanjima (83,88).

Prezentacija kožnog ožiljka ocijenjena je u skladu s vlastitom ordinalnom skalom tako da je 0 = uredno cijeljenje i ožiljak, 1 = parcijalni defekt cijeljenja, 2 = ulkus kožnoga ožiljka, 3 = dehiscencija (Tablica 4).

Prisutnost trbušnih priraslica ocijenjena je u skladu s vlastitom ordinalnom skalom tako da je 0 = bez priraslica, 1 = priraslice omentuma, 2 = priraslice crijeva, 3 = priraslice crijeva i omentuma (Tablica 5).

Tablica 4. Ordinalna skala prezentacije kožnog ožiljka

PREZENTACIJA KOŽNOG OŽILJKA	Vrijednost na ordinalnoj skali
Uredno cijeljenje i ožiljak	0
Parcijalni defekt cijeljenja	1
Ulkus	2
Dehiscencija	3

Tablica 5. Ordinalna skala prsutnosti trbušnih priraslica

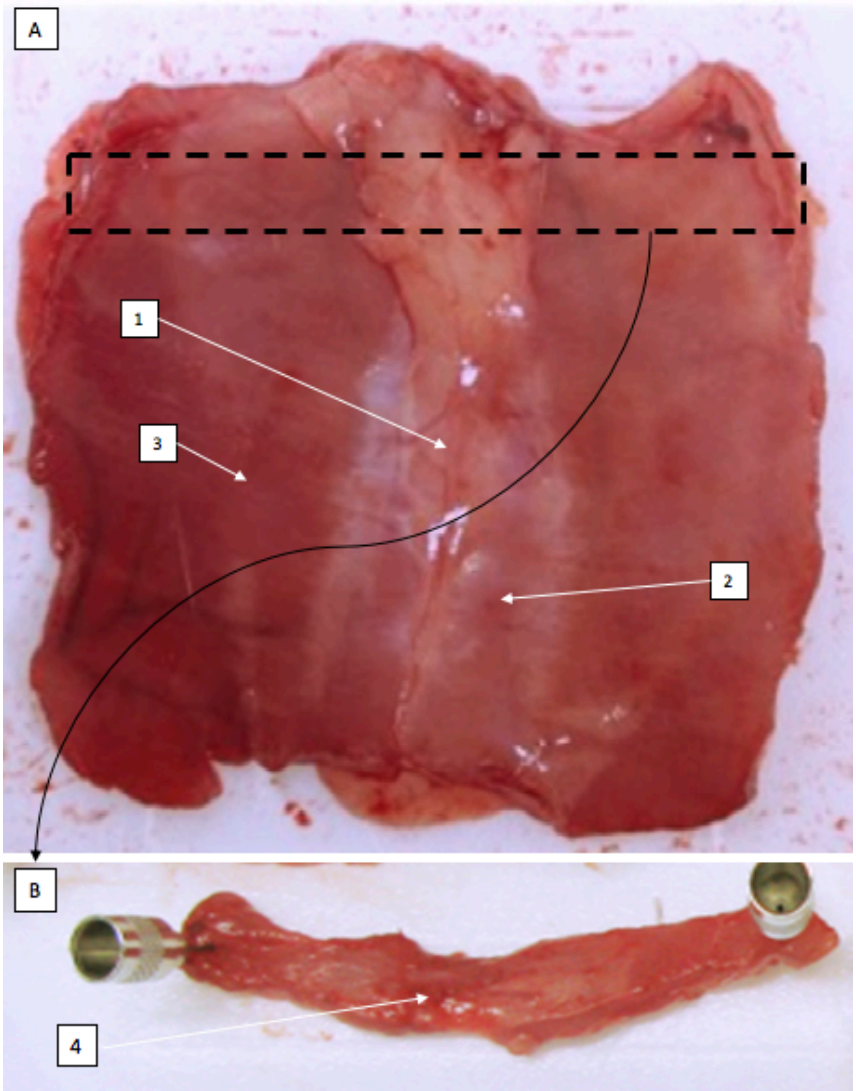
PRISUTNOST TRBUŠNIH PRIRASLICA	Vrijednost na ordinalnoj skali
Bez priraslica	0
Priraslice omentuma	1
Priraslice crijeva	2
Priraslice crijeva i omentuma	3

4.2. MJERENJE VLAČNE ČVRSTOĆE UZORAKA I ODREĐIVANJE POLJA POMAKA U PODRUČJU RANE METODOM KORELACIJE DIGITALNE SLIKE

4.2.1. PRIPREMA PREPARATA ZA BIOMEHANIČKU ANALIZU I MJERENJE VLAČNE ČVRSTOĆE UZORAKA

Priprema preparata za biomehaničku analizu

Ekscidirao se preparat trbušne stijenke (Slika 6A, šavna linija duljine 60 mm u središtu trbušne stijenke /1/) dimenzija 5 mm (kraniokaudalno) x 60 mm (laterolateralno) iz kranijalnog dijela (10 mm šivanih produžnom tehnikom omjera duljine konca i rane 4 : 1) inicijalnom operacijom učinjene rane 60 mm tako da se ispitivano područje (šavna linija od 5 mm učinjena produžnom tehnikom omjera duljine konca i rane 4 : 1) nalazilo u središtu preparata (Slika 6B, šavna linija duljine 5 mm u središtu preparata /4/).

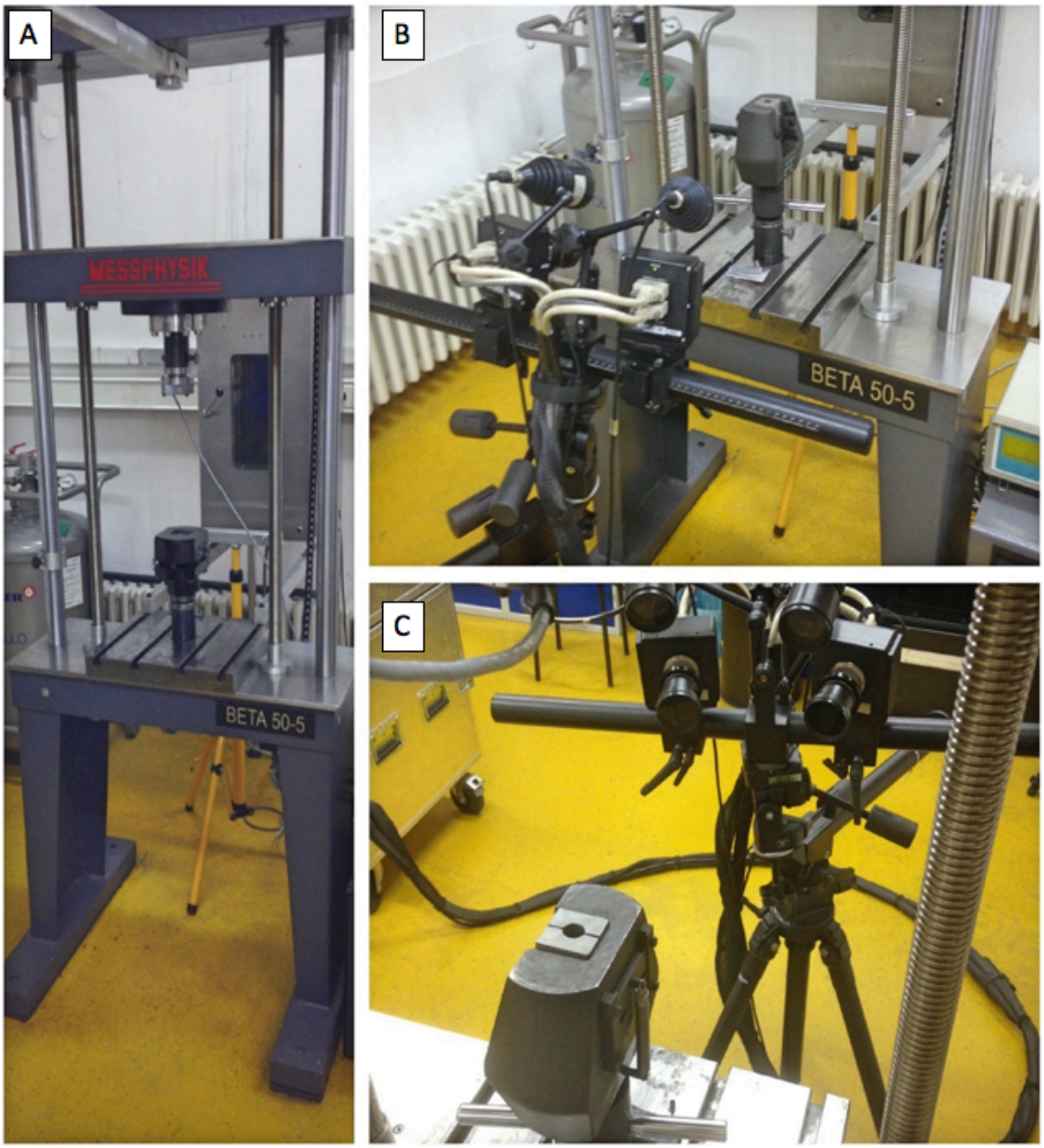


Slika 6. Preparat za biomehaničku analizu.

A. Trbušna stijenka: šavna linija duljine 60 mm u središtu trbušne stijenke /1/, *m. rectus abdominis* /2/, *m. obliquus internus* /3/, **B.** Ekscidirani preparat dimenzija 5 mm x 60 mm sa šavnom linijom duljine 5 mm u središtu preparata /4/

Mjerenje vlačne čvrstoće uzoraka

Eksperimentalni postav za kvazistatičko vlačno ispitivanje uzoraka prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Eksperimentalni postav.
A. Statička kidalica Beta 50-5 (Messphysik, Austrija); **B.**, **C.** Optički beskontaktni mjerni sustav Aramis (GOMmbH, Njemačka)

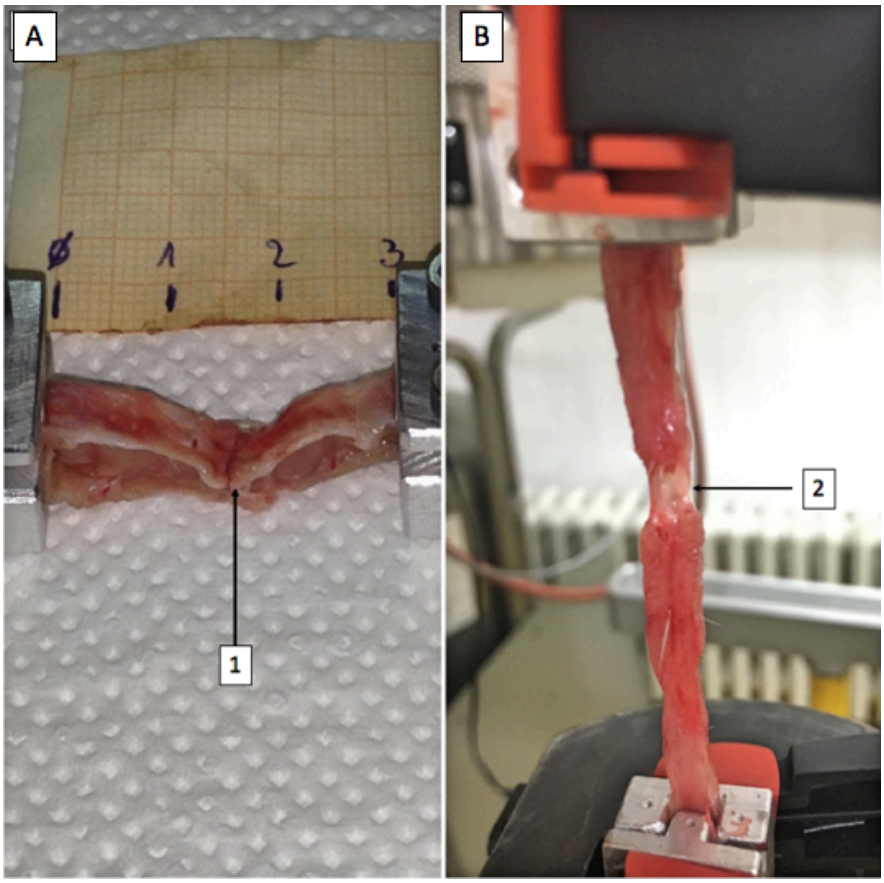
Preparati su se prihvatnim pločicama, postavljenima s obje strane uzorka, fiksirali u čeljusti statičke kidalice Beta 50-5 (Messphysik, Austrija). Prihvat (prihvatne pločice) izrađen za ovo ispitivanje prikazan je na Slici 8.

Slika 8. Prihvatne pločice

Nakon ekscidiranja, preparati dimenzija 5 mm x 60 mm potopili su se u fiziološku otopinu sobne temperature te transportirali do Laboratorija za eksperimentalnu mehaniku Fakulteta strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu gdje su se neposredno po dolasku ispitivali statičkim vlačnim pokusom prema protokolima ispitivanja koje su koristili i opisali Rossi i suradnici 2008. godine (118).

Da bi se eliminirao utjecaj mjesta prihvata uzoraka na ispitivano područje (šavna linija od 5 mm učinjena produžnom tehnikom omjera duljine konca i rane 4 : 1), preparati su se fiksirali tako da se sa svake strane ispitivanog područja ostavilo minimalno 10 mm slobodnoga tkiva (Slika 9A). Ispitivani preparat podvrgnuo se

kvazistatičkome opterećenju brzinom 5 mm/min okomito na ranu do pucanja preparata (Slika 9B).



Slika 9. Ispitivanje vlačne čvrstoće uzorka.
A. Preparat se fiksirao tako tako da se sa svake strane ispitivanoga dijela (rane) ostavilo minimalno 10 mm slobodnoga tkiva (šavna linija u središtu /1/); **B.** Kvazistatičkim opterećenjem brzinom 5 mm/min okomito na ranu dolazi do pucanja preparata (pucanje šavne linije /2/)

Tijekom ispitivanja bilježila se sila opterećenja i pomak na preparatu čime se dobio dijagram sila-pomak iz kojega se mogu očitati vrijednosti sile pri kojem se pojavljuju prva oštećenja, kao i maksimalna sila pri kojoj dolazi do popuštanja i pucanja preparata.

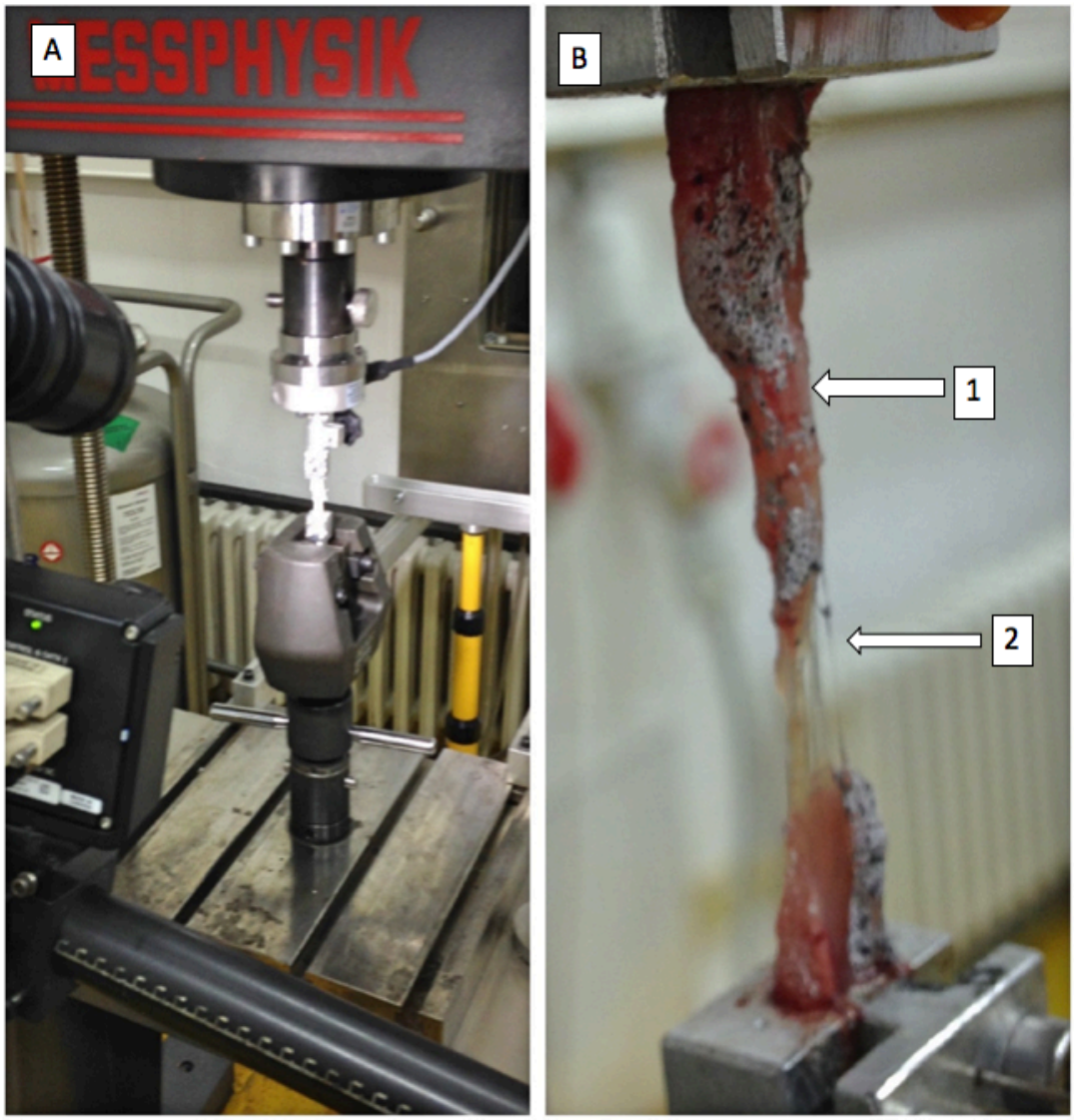
4.2.2. ODREĐIVANJE POLJA POMAKA U PODRUČJU RANE METODOM KORELACIJE DIGITALNE SLIKE

Kako bi se prikupili dodatni parametri za analizu cijeljenja pod utjecajem BPC-a 157 koristila se metoda korelacije digitalne slike za određivanje polja pomaka u području rane. Za tu svrhu koristio se optički beskontaktni mjerni sustav Aramis (proizvođača GOMmbH, Njemačka). Sustav se temelji na principu objektnoga raster postupka za što se preparati bojaju inertnom bijelom i crnom bojom s ciljem dobivanja umjetne teksture na površini uzorka u obliku crnih točaka na bijeloj podlozi (Slika 10).

Slika 10. Obojani preparat

Trodimenzionalno mjerenje provodilo se pomoću dvije digitalne kamere (CCD kamere Dalsa Falcon 4M60 s frekvencijom od 60 do 480 Hz i rezolucijom 2358 × 1728 piksela). Sustav omogućuje mjerenja u realnome vremenu s velikim brojem točaka na površini mjernoga objekta i automatski izračunava 3D površinske

koordinate te 3D pomake u kartezijevo milicilindričnome koordinatnom sustavu (Slika 11).



Slika 11. Određivanje polja pomaka.
A. Optički beskontaktni mjerni sustav Aramis pomoću dvije digitalne kamere (CCD kamere Dalsa Falcon 4M60 s frekvencijom od 60 do 480 Hz i rezolucijom 2358 × 1728 piksela) analizira objektni raster nastao bojenjem preparata (vidi slika 10); **B.** Uočavaju se deformacije rastera točaka na mjernoj površini objekta /1/ (usporedi sa slikom 10), u tijeku vlačnog opterećenja koje dovodi i do pucanja preparata u šavnoj liniji /2/

Deformacije se mogu odrediti s točnošću do 0,01 %. Izmjereni i obrađeni podaci mogu se vizualizirati u programskome paketu sustava ili se eksportiraju u standardne podatkovne formate.

4.3. STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku obradu podataka koristio se program *Statistica 8.0* (*StatSoft Inc.*). Korišteni su statistički testovi u skladu s izborom statističkih testova koje su predložili du Prel i suradnici (119). Vrijednost $p < 0,05$ smatra se statistički značajnom. Podaci su prezentirani tekstualno, tablično i grafički.

PRISUTNOST HERNIJE I DEHISCENCIJE

Prikazan je broj životinja s hernijom i dehiscencijom u svakoj pojedinoj skupini životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata).

Analiza rezultata incidencije hernije i dehiscencije vršena je komparacijom rezultata svake pojedine skupine životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata) s kontrolnom skupinom u odgovarajućem vremenskom intervalu. Analizirana je i suma rezultata skupina životinja prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata sa sumom rezultata kontrolne skupine. Za analizu je korišten *Fisherov egzaktni test.* Statistički značajne p-vrijednosti navedene su ispod tablice.

VELIČINA HERNIJE

Prikazane su srednje vrijednosti veličine hernije za svaku pojedinu skupinu životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata).

Analiza rezultata veličine hernije vršena je komparacijom rezultata svake pojedine skupine životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata) s kontrolnom skupinom u odgovarajućem vremenskom intervalu. Za analizu je korišten *Studentov t-test.* Statistički značajne p-vrijednosti navedene su ispod tablice.

PREZENTACIJA KOŽNOG OŽILJKA I PRISUTNOST TRBUŠNIH PRIRASLICA

Prikazan je min., med. i max. ordinalne skale (opisane u Materijali i metode) za svaku pojedinu skupinu životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata).

Analiza rezultata prezentacije kožnog ožiljka i prisutnosti trbušnih priraslica vršena je komparacijom rezultata svake pojedine skupine životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata) s kontrolnom skupinom u odgovarajućem vremenskom intervalu. Za analizu je korišten *Mann-Whitney test.* Statistički značajne p-vrijednosti navedene su ispod tablice.

VLAČNA ČVRSTOĆA RANE

Prikazane su srednje vrijednosti vlačne čvrstoće rane za svaku pojedinu skupinu životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata).

Analiza rezultata vlačne čvrstoće rane vršena je komparacijom rezultata svake pojedine skupine životinja (i prema intervalu praćenja i prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata) s kontrolnom skupinom u odgovarajućem vremenskom intervalu. Za analizu je korišten *Studentov t-test.* Statistički značajne p-vrijednosti navedene su ispod tablice.

4.4. DOZVOLA ZA IZVOĐENJE POKUSA

Autor ovoga teksta i izvođač istraživanja, prije početka ovoga istraživanja, 19. rujna 2014. godine završio je tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, kategorija LabAnim 3 u trajanju od 80 sati (FELASA cat. C equivalent). Time je autor dobio potvrdu o osposobljenosti za voditelja pokusa i njegova zamjenika s jedinstvenim identifikacijskim brojem OSP 191/001, pod kojim je upisan u evidenciju pri Upravi veterinarstva. Broj potvrde: 110.3-14, HR 191/02/P.

4.5. ETIČKA NAČELA

Istraživanje je provedeno u skladu s Direktivom 2010/63/EU Europskoga parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. godine o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, Zakonom o zaštiti životinja RH (NN br. 135/2006, 37/2013 i 55/2013), FELASA preporukama te preporukama Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (116).

U istraživanju je unaprijed bila definirana primijenjena anestezija, analgezija i „Humane Endpoint" pokusa u skladu s Postupnikom za primjenu anestezije u pokusnih životinja Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i IACUC smjernicama (116,117,120-123).

Etička ograničenja u ovom istraživanju

U ovom istraživanju uočen je negativni efekt primjene NO-agensa (L-NAME, L-arginina i/ili njihove kombinacije) u vidu pojave visoke incidencije dehiscencije u životinja tretiranih tim preparatima.

5. REZULTATI

Ova studija je kroz 28 dana u štakora podvrgnutih operaciji prema Dubayju za induciranje hernije utvrđivala učinkovitost primjene stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 primijenjenog u pijućoj vodi nakon operacije. Isto tako, studija je utvrđivala moguću povezanost ovih učinaka pentadekapeptida BPC 157 s NO-sustavom, i to, shodno ranijim radovima (vidi poglavlja 1.2.5., 1.2.6. i 1.2.7.) uz svakodnevnu primjenu blokatora NOS-a, L-NAME, i L-arginina, supstrata za NOS, bilo samostalno i/ili u kombinacijama. Kao parametre studija je utvrđivala prisutnost hernije, veličinu hernije, pojavu dehiscencije (i time evisceracije), prezentaciju kožnog ožiljka, prisutnost trbušnih priraslica, silu pucanja i polje pomaka u području rane.

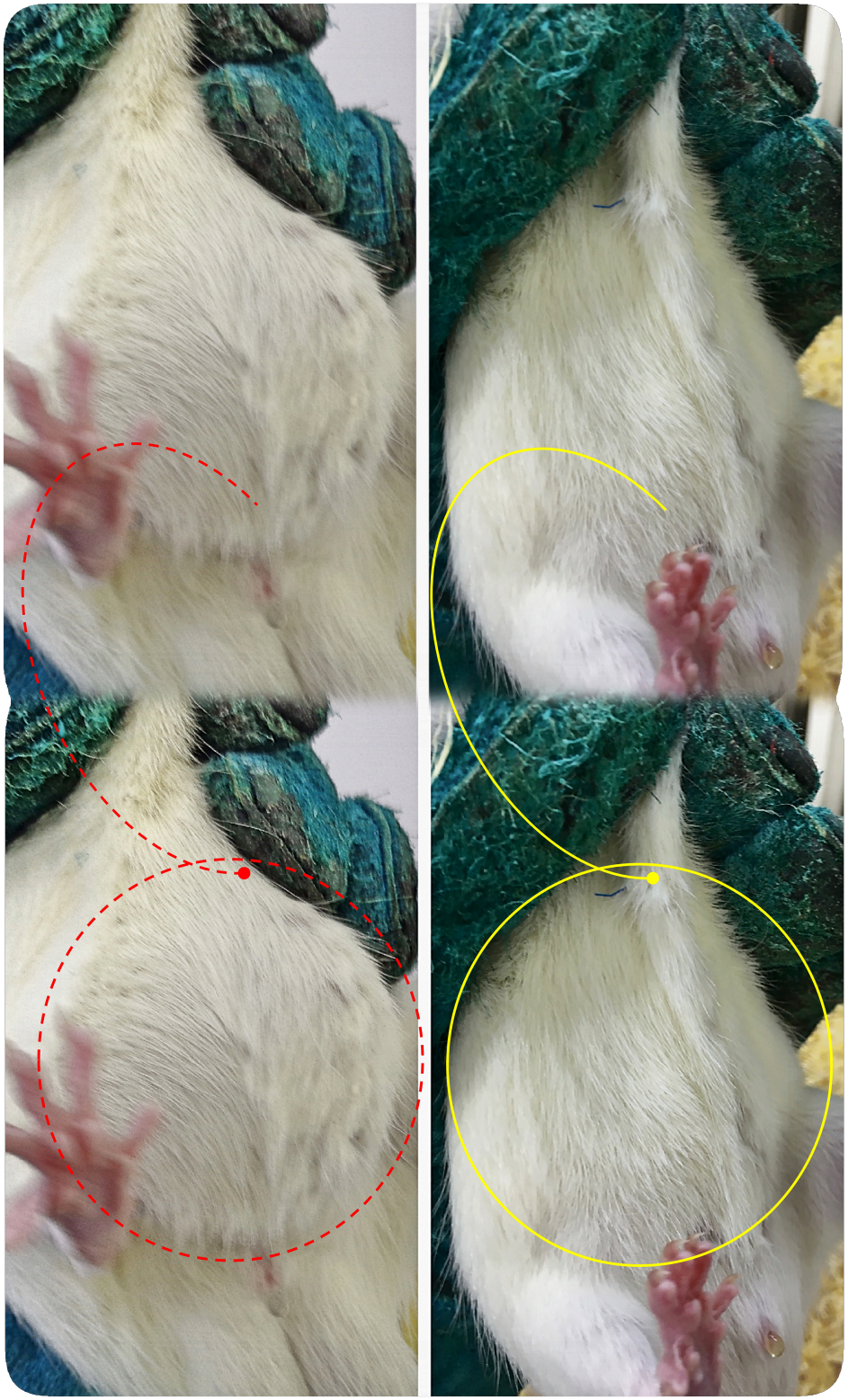
5.1. PRISUTNOST HERNIJE

Bez primjene medikacije, primijenjena je operacija prema Dubayju dovodila do pojave hernije u gotovo svih štakora (Tablica 6, Slika 12, Slika 13). Relativnu vrijednost ovog parametra pokazuje to da takva učestalost jest uzrok činjenice da primjena, samostalna i/ili u kombinaciji, NO-agensa (koji inače dovode do dehiscencije) nije mogla dovesti do još značajno veće učestalosti hernije. S druge strane, time izgleda još vjerodostojnije cijeljenje bez razvitka hernije, i tek izuzetna pojava (tek manje) hernije u obje skupine koje su dobivale BPC 157 u pijućoj vodi. Taj se međutim benefitni učinak na samu pojavnost hernije ne vidi u kombinacijama s NO- agensima.

Tablica 6. Prisutnost hernije u ispitivanim skupinama životinja

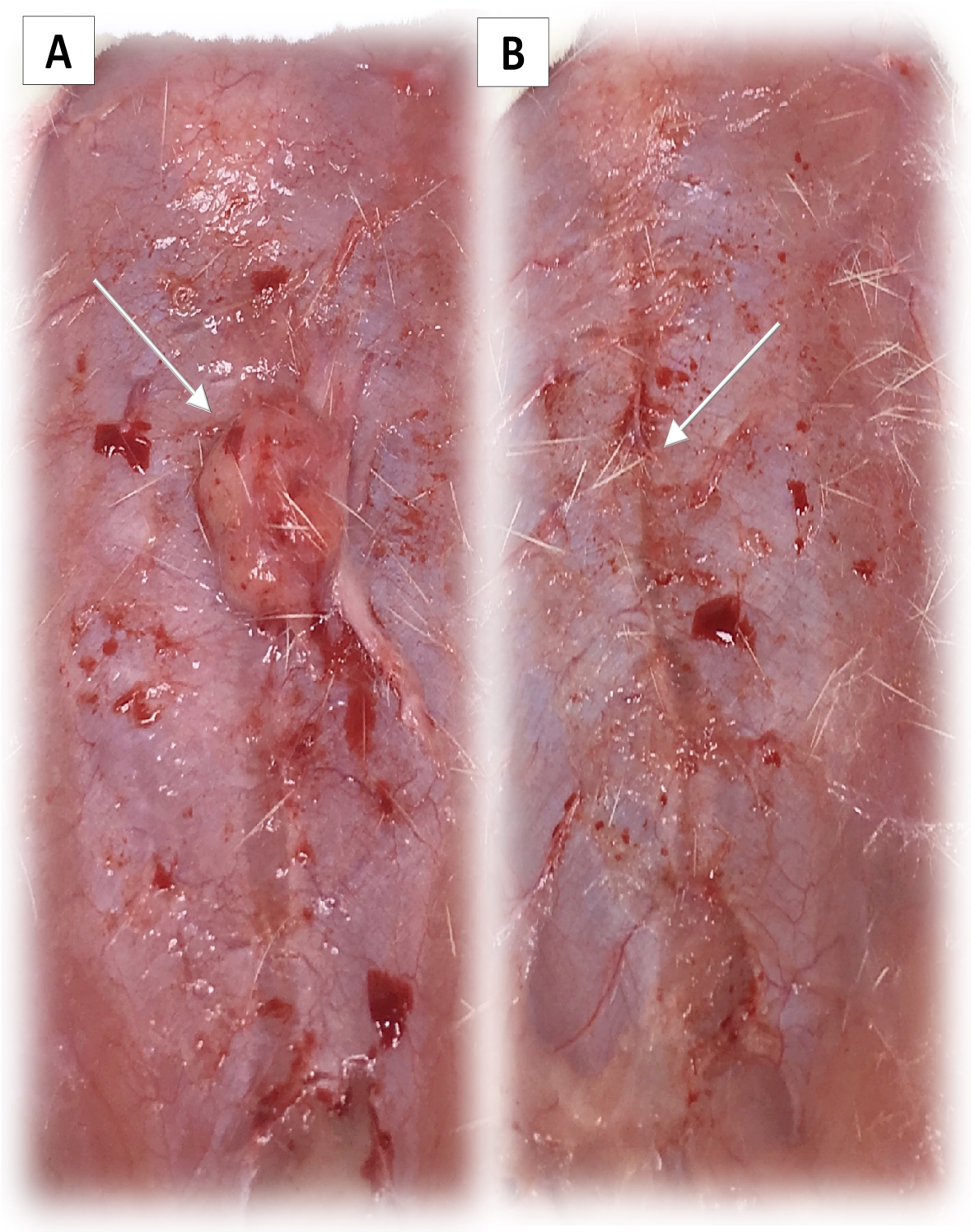
PRISUTNOST HERNIJE					
SKUPINE ŽIVOTINJA	**Broj životinja s hernijom** (postotak životinja s hernijom)				
	7dana	14dana	21dan	28dana	**UKUPNO**
Kontrola	**4**(80%)	**3**(60%)	**4**(80%)	**4**(80%)	**15**(75%)
BPC µg	**0***(0%)	**0**(0%)	**1**(20%)	**1**(20%)	**2***(10%)
BPC ng	**0***(0%)	**0**(0%)	**1**(20%)	**1**(20%)	**2***(10%)
L-NAME	**5**(100%)	**5**(100%)	**5**(100%)	**5**(100%)	**20**(100%)
L-arginin	**4**(80%)	**5**(100%)	**5**(100%)	**5**(100%)	**19**(95%)
L-NAME + BPC µg	**3**(60%)	**2**(40%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**11**(55%)
L-NAME + BPC ng	**3**(60%)	**2**(40%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**11**(55%)
L-arginin + BPC µg	**4**(80%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**13**(65%)
L-arginin + BPC ng	**4**(80%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**13**(65%)
L-NAME + L-arginin	**4**(80%)	**3**(60%)	**5**(100%)	**5**(100%)	**17**(85%)
L-NAME+L-arginin+BPCµg	**3**(60%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**12**(60%)
L-NAME+L-arginin+BPCng	**3**(60%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**3**(60%)	**12**(60%)

***p vrijednosti:** BPCµg, 7 dana = 0.0476; BPCng, 7 dana = 0.0476; BPCµg, ukupno <0.0001; BPCng, ukupno <0.0001.



Slika 12. Hernija.

Ilustrativni prikaz vanjskog izgleda hernije u kontrolnih štakora (lijevo, crveni isprekidani krug) nakon 28 dana, te normalna prezentacija bez vidljive hernije (desno, žuti krug) u štakora koji su dobivali BPC 157 u pijućoj vodi



Slika 13. Ilustrativni prikaz posljedica operacije prema Dubayju na trbušnom zidu.
A. Prikaz hernije u kontrolnih štakora (strelica) nakon 21 dan, **B.** Redovita normalna prezentacija bez vidljive hernije (strelica) u štakora koji su dobivali BPC 157 u pijućoj vodi

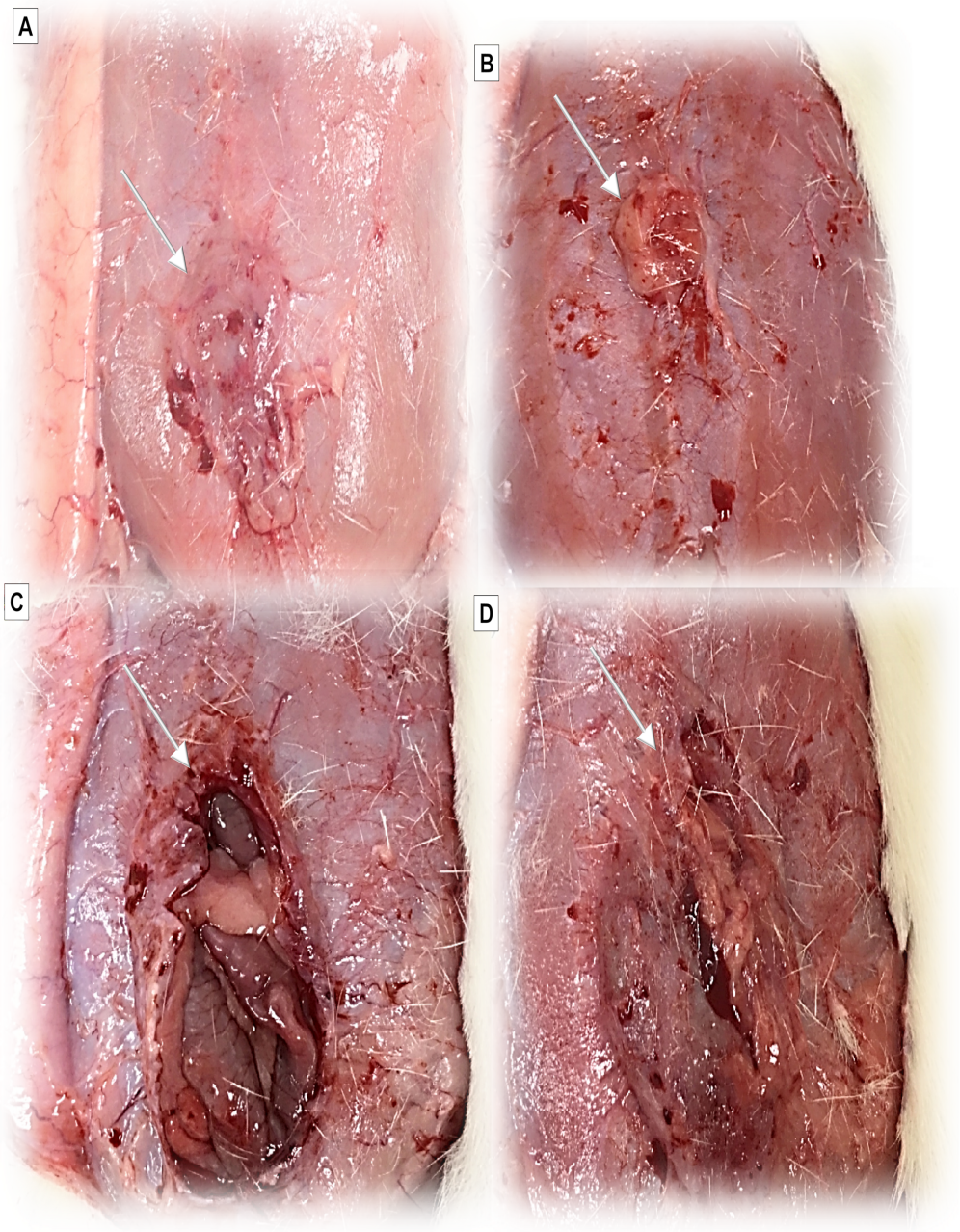
5.2. VELIČINA HERNIJE

Bez primjene medikacije, primijenjena je operacija prema Dubayju dovodila do pojave relativno male hernije u štakora (Tablica 7, Slika 14). Stoga se može vidjeti da hernije postaju veće kod primjene NO- agensa (koji će dovesti i do dehiscencije -vidi u daljnjem tekstu), i to već u prvih 7 dana (primjena L-NAME), te 14 dana (primjena L-arginina), a posebice nakon toga kada kod štakora tretiranih NO-agensima redovito nastaje dehiscencija (i kod L-NAME + L-arginin). Stoga je za parametar „veličine hernije“ zanimljivo da, premda samostalno i L-NAME i L-arginin dovode do agravacije (veće veličine hernije) kod njihove zajedničke primjene (L-NAME + L-arginin) hernije su jednake onima u kontroli u prva dva tjedna, s time da postaju veće od onih iz kontrolne skupine nakon toga (21. i 28. dana, kada se u svih životinja javljaju dehisencije). S druge strane, u obje skupine koje su dobivale BPC 157 u pijućoj vodi, hernije koje se tek izuzetno javljaju, ostaju još manje od onih u kontrolnih životinja. Taj se benefitni učinak vidi kod istovremene primjene BPC 157 s NO-agensima nakon 14 dana, jer izostaje nastanak dehiscencije koji se inače javlja u svih štakora koji su bili tretirani NO-agensima.

Tablica 7. Veličina hernije u ispitivanim skupinama životinja

VELIČINA HERNIJE (mm) - srednja vrijednost ± SD				
SKUPINE ŽIVOTINJA	**7 dana**	**14 dana**	**21 dan**	**28 dana**
Kontrola	8,2 ± 5,2	5,8 ± 5,6	10 ± 6,3	3,8 ± 2,3
BPC µg	**0 ± 0***	**0 ± 0***	**1,4 ± 3,1***	**0,8 ± 1,8***
BPC ng	**0 ± 0***	**0 ± 0***	**1,6 ± 3,6***	**0,8 ± 1,8***
L-NAME	**18,6 ± 4,3***	**24,6 ± 14,3***	**50 ± 0***	**50 ± 0***
L-arginin	8,6 ± 6,1	**40,6 ± 13,4***	**50 ± 0***	**50 ± 0***
L-NAME + BPC µg	13,4 ± 12,3	5,6 ± 7,9	19.4±17.9	22.6±13.6
L-NAME + BPC ng	13,2 ± 21	6 ± 8,3	22.8±21.1	22.4±21
L-arginin + BPC µg	13,4 ± 7,9	22,6 ± 25,6	18±16.8	18.4±17.8
L-arginin + BPC ng	13,4 ± 8,3	22,8 ± 25,5	18.2±17.6	17.4±16.7
L-NAME + L-arginin	21,8 ± 18	21 ± 26,6	**50 ± 0***	**50 ± 0***
L-NAME + L-arginin + BPC µg	17,6 ± 20,6	8,6 ± 8	21.2±19.6	22.6±21
L-NAME + L-arginin + BPC ng	19,8 ± 20,9	10,4±10,1	21.8±21.1	23.4±22.4

***p vrijednosti:** BPCµg, 7 dana = 0,0079; BPCµg, 14 dana = 0,0488; BPCµg, 21 dan = 0,0260; BPCµg, 28 dana = 0,0493; BPCng, 7 dana = 0,0079; BPCng, 14 dana = 0,0488; BPCng, 21 dan = 0,0324; BPCng, 28 dana = 0,0493; L-NAME, 7 dana = 0,0087; L-NAME, 14 dana = 0,0257, L-NAME, 21dan<0.0001; L-NAME 28 dan <0.0001; L-arginin, 14 dana = 0,0007; L-arginin, 21 dan <0.0001; L-arginin, 28 dan <0.0001; L-arginin + L-NAME, 21 dan <0.0001; L-arginin + L-NAME,28 dan <0.0001.



Slika 14. Ilustrativni prikaz posljedica operacije prema Dubayju na trbušnom zidu. **A.** Prikaz veličine hernije u kontrolnih štakora (strelica) nakon 14 dana, **B.** Značajno manja hernija (strelica) u štakora koji su dobivali BPC 157 u pijućoj vodi nakon 21 dan, **C.**, **D.** Redovito značajno veće hernije u (dolje, lijevo, desno) štakora koji su primali svakodnevno NO-agense, L-arginin (C), odnosno L-NAME (D) nakon 14 dana. To u velikoj mjeri objašnjava skori nastanak dehiscencije u tih životinja

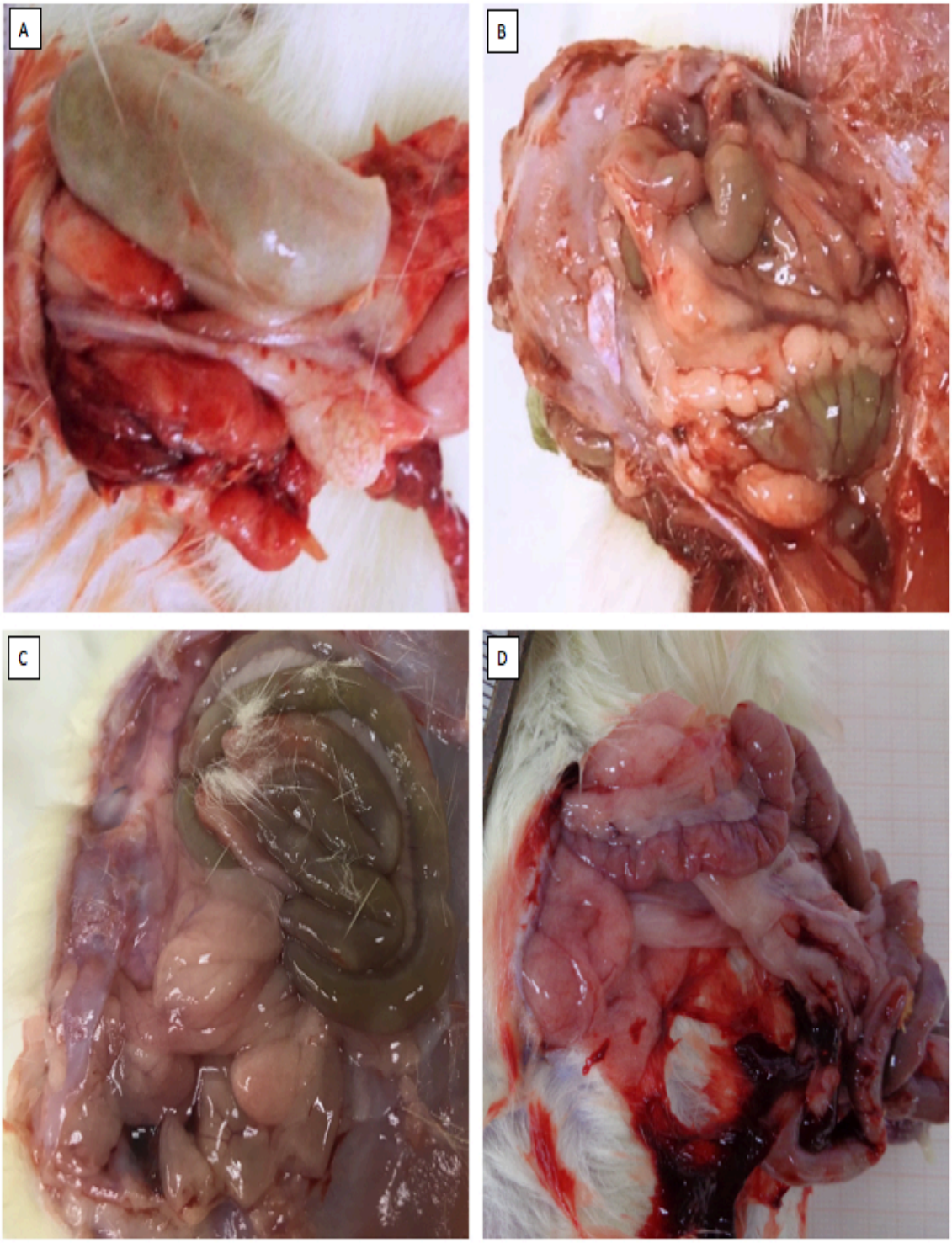
5.3. PRISUTNOST DEHISCENCIJE

Bez primjene medikacije, primijenjena je operacija prema Dubayju dovodila do gotovo redovite hernije u štakora, no relativno male veličine, što je dovelo do toga da do dehiscencije redovito nije dolazilo osim u jednom pojedinačnom slučaju. Nasuprot tome, jasna se agravacija vidi kod primjene NO-agensa (L-NAME, L-arginina i/ili kombinacije). (Tablica 8, Slika 15) Kako hernije postaju veće kod primjene NO-agensa jasno je da kod njih nastaje dehiscencija (i time evisceracija), a posebice nakon 14 dana kada u svih tih štakora redovito nastaje dehiscencija. Stoga je za parametar „pojave dehiscencije“ kao parametar definitvne agravacije, ili nasuprot tome u slučaju antagonizacije (definitivne protekcije) značajno da u u obje skupine koje su dobivale BPC 157 u pijućoj vodi, dehiscencije uopće ne javljaju. Premda se taj učinak čini vjerojatnim imajući u vidu redovito cijeljenje bez hernije, ili ako se i izuzetno pojavi tek vrlo male hernije, treba naglasiti da do dehiscencije jednako tako ne dolazi, tek sporadično, i u kombinaciji s NO-agensima (L-arginin + BPC 157, L-NAME + BPC 157, L-NAME + L-arginin + BPC 157).

Tablica 8. Prisutnost dehiscencije u ispitivanim skupinama životinja

PRISUTNOST DEHISCENCIJE					
SKUPINE ŽIVOTINJA	**Broj životinja s dehiscencijom** (postotak životinja s dehiscijencijom)				
	7 dana	14 dana	21 dan	28 dana	**UKUPNO**
Kontrola	**0**(0%)	**0**(0%)	**1**(20%)	**0**(0%)	**1**(5%)
BPC µg	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)
BPC ng	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)
L-NAME	**0**(0%)	**3**(60%)	**5***(100%)	**5***(100%)	**13***(65%)
L-arginin	**0**(0%)	**3**(60%)	**5***(100%)	**5***(100%)	**13***(65%)
L-NAME + BPC µg	**1**(20%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**1**(5%)
L-NAME + BPC ng	**1**(20%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**1**(5%)
L-arginin + BPC µg	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)
L-arginin + BPC ng	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)
L-NAME + L-arginin	**2**(40%)	**2**(40%)	**5***(100%)	**5***(100%)	**14***(70%)
L-NAME+L-arginin+BPCµg	**1**(20%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**1**(5%)
L-NAME+L-arginin+BPCng	**1**(20%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**0**(0%)	**1**(5%)

***p vrijednosti:** L-NAME, 21 dan = 0.0476; L-NAME, 28 dana = 0.0079; L-NAME, ukupno = 0.0001; L-arginin, 21 dan = 0.0476; L-arginin, 28 dana = 0.0079; L-arginin, ukupno = 0.0001; L-NAME + L-arginin, 21 dan = 0.0476; L-NAME + L-arginin, 28 dana = 0.0079; L-NAME + L-arginin, ukupno = 0.0001.



Slika 15. Ilustrativni prikaz dehiscencije s evisceracijom kao posljedica operacije prema Dubayju i svakodnevne primjene NO-agensa. **A.** Štakor tretian L-argininom 14 dana, **B.** Štakor tretian L-NAME-om 14 dana, **C.** Štakor tretian L-NAME-om 21 dan, **D.** Štakor tretian L-NAME + L-arginin 28 dana

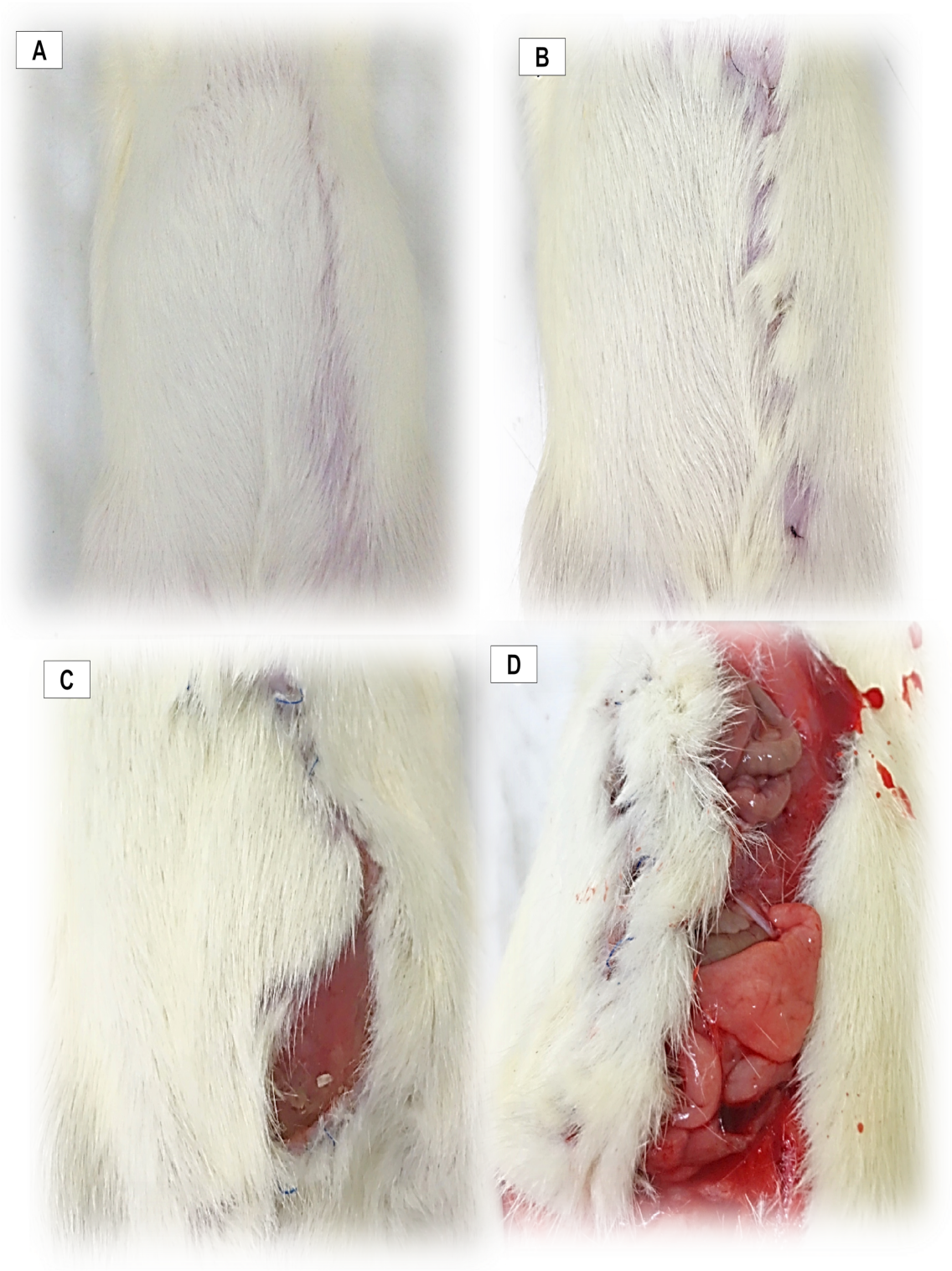
5.4. PREZENTACIJA KOŽNOG OŽILJKA

Bez primjene medikacije, primijenjena operacija prema Dubayju dovodila je do pojave hernije, i to manje veličine, u gotovo svih štakora. Također je dovela do stvaranja kožnog ožiljka uz nastajanje ulkusa (Tablica 9, Slika 16). Relativnu vrijednost ovog parametra pokazuje to da takva prezentacija jest uzrok da primjena NO-agensa (L-NAME, L-arginin i/ili kombinacija) nije mogla dovesti do još lošije prezentacije u prvih 14 dana, sve do zadnjih termina (21 i 28 dana) kada je dolazilo do dehiscencije u svih životinja tretiranih NO-agensima i time do prezentacije značajno lošijih kožnih ožiljaka. S druge strane, u skladu s cijeljenjem bez razvitka hernije, i tek izuzetnom pojavom tek manje hernije, u obje skupine koje su dobivale BPC 157 (kroz 7 i 21 dan) u pijućoj vodi jest i značajno bolje cijeljenje kožnog ožiljka. Taj se međutim benefitni učinak na samu prezentaciju kožnog ožiljka ne vidi u kombinacijama s NO-agensima.

Tablica 9. Prezentacija kožnog ožiljka u ispitivanih skupina životinja

KOŽNA RANA (min./med./max.)												
	7 dana			**14 dana**			**21 dan**			**28 dana**		
SKUPINE ŽIVOTINJA	min	med	max	min	med	max	min	med	max	min	med	max
Kontrola	1	2	2	0	2	2	1	2	3	0	2	2
BPC µg	**0***	**0***	**0***	0	0	0	**0***	**0***	**0***	0	0	1
BPC ng	**0***	**0***	**0***	0	0	0	**0***	**0***	**0***	0	0	1
L-NAME	0	1	2	1	3	3	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***
L-arginin	1	1	2	0	3	3	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***
L-NAME + BPC µg	0	1	3	1	1	2	1	2	3	1	2	3
L-NAME + BPC ng	0	1	3	0	1	2	1	2	3	1	2	3
L-arginin + BPC µg	0	0	3	0	1	3	1	2	3	1	2	3
L-arginin + BPC ng	0	0	3	1	1	3	1	2	3	1	2	3
L-NAME + L-arginin	0	2	3	1	1	3	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***
L-NAME + L-arginin + BPC µg	1	2	3	0	0	1	1	2	3	1	2	3
L-NAME + L-arginin + BPC ng	1	2	3	0	0	1	2	2	3	1	2	3

***p vrijednosti:** BPCµg, 7 dana = 0.01208; BPCµg, 21 dan = 0.01208; BPCng, 7 dana = 0.01208; BPCng, 21 dan = 0.01208; L-NAME, 21 dan = 0.0477; L-NAME, 28 dana = 0.1208; L-arginin, 21 dan = 0.0477; L-arginin, 28 dana = 0.1208; L-NAME + L-arginin, 21 dan = 0.0477; L-NAME + L-arginin, 28 dana = 0.0477.



Slika 16. Ilustrativni prikaz kožnog ožiljka nakon 14 dana od operacije prema Dubayju. **A.** Uredno cijeljenje (u životinja koje su primale BPC 157 u pijućoj vodi), **B.** Parcijalni defekt (kod kontrolne skupine), **C.** Ulkus rane (kod primjene L-arginina), **D.** Dehiscencija (kod primjene L-NAME)

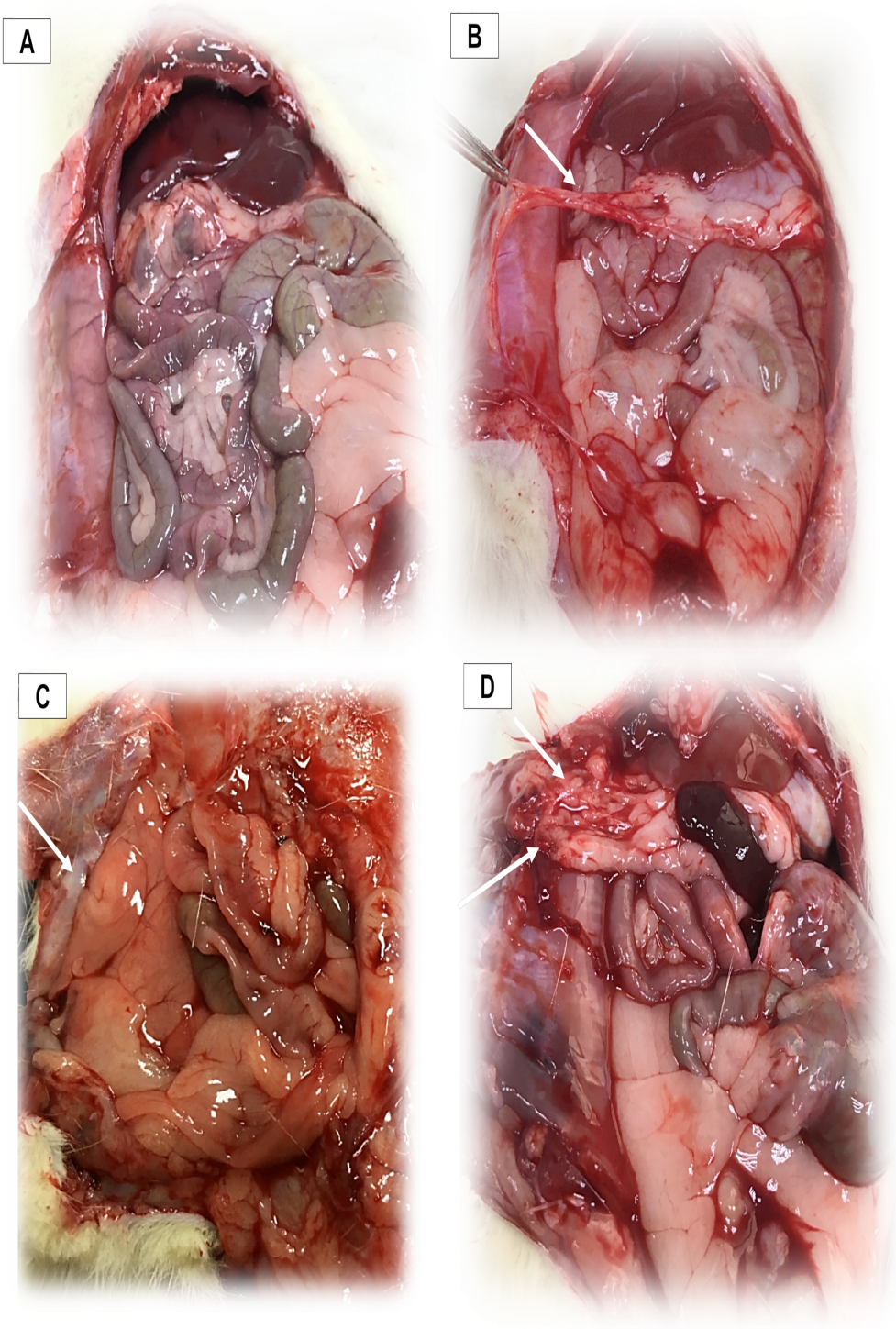
5.5. PRISUTNOST TRBUŠNIH PRIRASLICA

Bez primjene medikacije, primijenjena je operacija prema Dubayju koja je dovodila do pojave hernije, i to manje veličine, u gotovo svih štakora, te ne i do dehiscencije (osim u pojedinačnom slučaju). Također je dovela do stvaranja značajnih trbušnih priraslica (Tablica 10, Slika 17). Primjena NO-agensa (L-NAME, L-arginin i/ili kombinacija) dovela je do stvaranja znatno većih priraslica u prvih sedam dana (L-NAME, L-NAME + L-arginin), kao i u 14 dana (i L-NAME i L-arginin) te 28 dana (L-NAME, L-arginin i L-NAME + L-arginin). S druge strane, u skladu s cijeljenjem bez razvitka hernije, i tek izuzetnom pojavom tek manje hernije, i izostanka dehiscencije u obje skupine koje su dobivale BPC 157 u pijućoj vodi jest i značajno manje stvaranje trbušnih priraslica. Taj benefitni učinak međutim izostaje u kombinacijama s NO-agensima.

Tablica 10. Prezentacija trbušnih priraslica u ispitivanih skupina životinja

TRBUŠNE PRIRASLICE (min./med./max.)												
	7 dana			**14 dana**			**21 dan**			**28 dana**		
SKUPINE ŽIVOTINJA	min	med	max	min	med	max	min	med	max	min	med	max
Kontrola	0	1	2	0	2	3	0	3	3	0	2	2
BPC µg	**0***	**0***	**0***	0	0	1	0	0	1	0	0	1
BPC ng	**0***	**0***	**1***	0	0	1	0	0	1	0	0	1
L-NAME	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***	**3***	3	3	3	**3***	**3***	**3***
L-arginin	0	3	3	**3***	**3***	**3***	3	3	3	**3***	**3***	**3***
L-NAME + BPC µg	0	3	3	0	1	2	1	3	3	1	3	3
L-NAME + BPC ng	0	3	3	0	2	1	1	3	3	1	3	3
L-arginin + BPC µg	0	3	3	0	3	3	1	2	3	1	2	3
L-arginin + BPC ng	0	3	3	0	3	3	1	2	3	1	2	3
L-NAME + L-arginin	**2***	**2***	**3***	0	3	3	3	3	3	**3***	**3***	**3***
L-NAME + L-arginin + BPC µg	0	3	3	0	3	3	1	3	3	1	3	3
L-NAME + L-arginin + BPC ng	0	3	3	0	3	3	1	3	3	1	3	3

***p vrijednosti:** BPCµg, 7 dana = 0.0477; BPCng, 7 dana = 0.0477; L-NAME, 7 dana = 0.01208; L-NAME, 14 dana = 0.0477; L-NAME, 28 dana = 0.01208; L-arginin, 14 dana = 0.0477; L-arginin, 28 dana = 0.01208; L-NAME + L-arginin, 7dana = 0.02852; L-NAME + L-arginin, 28 dana = 0.01208.



Slika 17. Ilustrativni prikaz trbušnih priraslica nakon operacije prema Dubayju.
A. Izostanak priraslica (u životinja koje su primale BPC 157 u pijućoj vodi), **B.** Priraslice omentuma (strelica) (kontrolna skupina, 28 dana), **C.** Piraslice crijeva (L-arginin, 7 dana), **D.** Priraslice crijeva i omentuma (L-NAME, 7 dana)

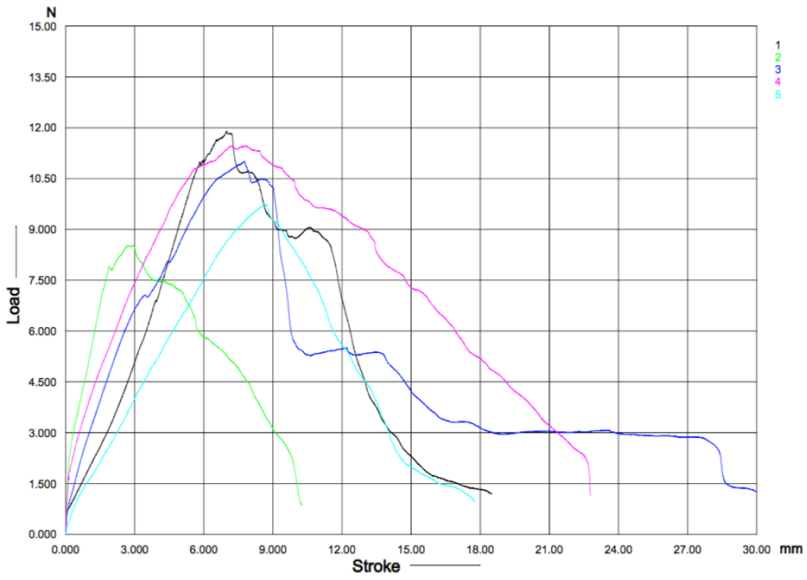
5.6. VLAČNA ČVRSTOĆA RANE

U odnosu na druge do sada ispitivane parametre, zanimljivo je da se u obje skupine koje su dobivale BPC 157 u pijućoj vodi značajno veća sila pucanja pojavljuje tek 28 dana po operaciji. Taj benefitni učinak međutim izostaje u kombinacijama s NO-agensima u ispitivanim skupinama. S druge strane, apsolutna agravacija (pojava dehiscencije u 100 % slučajeva) NO-agensa kroz 21 i 28 dana dovodi do vrijednosti sile pucanja 0±0 (Tablica 11, Slika 18, Slika 19).

Tablica 11. Vlačna čvrstoća rane (sila pucanja rane) u ispitivanih skupina životinja

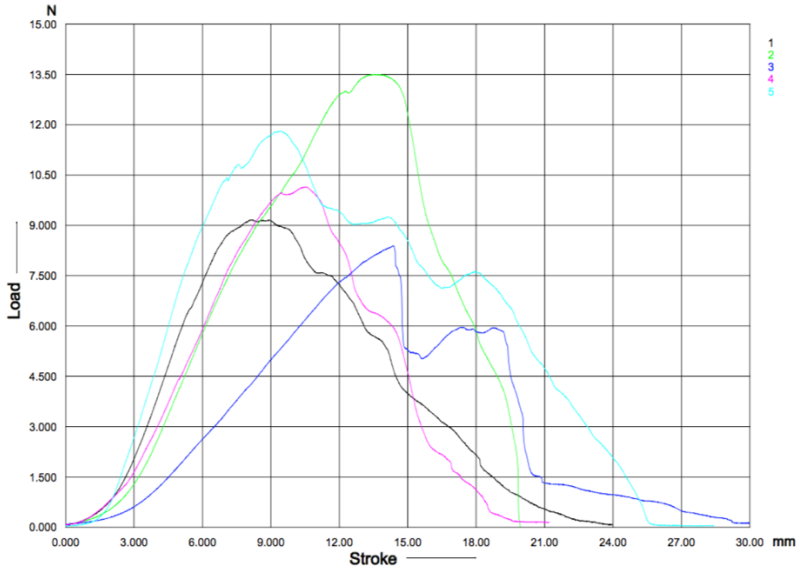
SILA PUCANJA (N): srednja vrijednost sile pucanja ± SD				
SKUPINE ŽIVOTINJA	**7 dana**	**14 dana**	**21 dan**	**28 dana**
Kontrola	8,17 ± 2,6	7,1 ± 0,8	7,25 ± 4,3	10,24 ± 1,7
BPC µg	9,51 ± 2,5	7,46 ± 1,7	10,6 ± 2,1	**12,57 ± 1,5***
BPC ng	10,12 ± 3,5	8,4 ± 1,5	11,47 ± 1,9	**12,44 ± 1,2***
L-NAME	7,61 ± 2,9	4,6 ± 6,3	0 ± 0	0 ± 0
L-arginin	5,5 ± 2,1	4,46 ± 6,2	0 ± 0	0 ± 0
L-NAME + BPC µg	6,02 ± 3,6	7,01 ± 0,4	-	-
L-NAME + BPC ng	6,1 ± 3,7	6,95 ± 0,4	-	-
L-arginin + BPC µg	9,11 ± 1	6,5 ± 5,9	-	-
L-arginin + BPC ng	9,15 ± 0,8	6,5 ± 5,9	-	-
L-NAME + L-arginin	4,17 ± 4,1	6,43 ± 6,2	0 ± 0	0 ± 0
L-NAME + L-arginin + BPC µg	3,58 ± 2,9	8,36 ± 2	-	-
L-NAME + L-arginin + BPC ng	3,49 ± 2,3	8,57 ± 1,5	-	-

***p vrijednost:** BPCµg, 28dana = 0,0498; BPCng, 28 dana = 0,0419.



Slika 18. Dijagram sila-pomak za kontrolnu skupinu 28 dana.

(Izvorno očitanje statičke kidalice Beta 50-5: engl. load= hrv. sila; engl. stroke= hrv. pomak)



Slika 19. Dijagram sila-pomak za skupinu BPC 28 dana.

(Izvorno očitanje statičke kidalice Beta 50-5: engl. load= hrv. sila; engl. stroke= hrv. pomak)

5.7. POLJE POMAKA U PODRUČJU RANE

Vlačna ispitivanja uzoraka pokazala su da stohastički raster dobiven postupkom koji je uobičajen kod uzoraka iz metalnih, polimernih materijala i kod kostiju nije primijenjiv kod ispitivanih uzoraka mekih tkiva. Zbog nedovoljnoga kontrasta teksture dobivene samo crnom ili bijelom bojom za dobivanje teksture korištene su obje boje. Tanki sloj bijele boje nakon sušenja počeo je pucati tijekom opterećivanja uzoraka već pri manjim deformacijama, a pri većim deformacijama došlo je do otpadanja rastera i zadržao se samo na dijelovima uzorka što je vidljivo na Slici 11. Posljedica toga je da pri obradi slika program sustava nije prepoznao iste slike u lijevoj i desnoj kameri te se obrada slika automatski prekinula.

5.8. ETIČKA OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju uočen je negativni efekt primjene NO-agensa (L-NAME, L-arginin i/ili njihova kombinacija) u vidu agravacije hernije i dehiscencije. Stopa dehiscencije rasla je s duljim vremenskim periodom praćenja, tj. produljenom primjenom NO-agensa (L-NAME, L-Arginina i/ili kombinacije). Kod životinja tretiranih s L-NAME, L-argininom i njihovom kombinacijom (L-NAME + L-arginin) na dulji vremenski period (21 dan i 28 dana) uočen je razvoj dehiscencije u 100% životinja. Dodavanje BPC 157 ispitivanim preparatima umanjilo je ukupnu incidenciju dehiscencije u ispitivanih životinja. Time je potvrđen benefit primjene BPC 157 s NOS-agensima. Kako se radi o originalnom istraživanju, gdje se po prvi puta (prema dostupnoj literaturi) primjenjuju NO-agensi (L-NAME, L-arginin i/ili njihova kombinacija) na ovakvom modelu (model formiranja incizijske hernije u štakora kakav je opisao Dubay (6,7)) u tijeku dizajna ustroja istraživanja nije se mogao predvidjeti takav negativni efekt NO-agenasa (prisutnost dehiscencije u 100% životinja tretiranih NO-agensima u periodu od 21 i 28 dana), štoviše, jer Dubay u svojem istraživanju ne navodi prisutnost dehiscencije (životinje nisu tretirane NO-agensima) (6,7). Stoga i jest, u dizajnu ustroja istraživanja, planirana studija u trajanju 28 dana kao maksimalni interval praćenja životinja (kako bi maksimalni vremenski interval praćenja odgovarao onom kakav je opisao Dubay (6,7)).

„Humane Endpoint“ istraživanja

„Humane endpoint“ istraživanja postavljen je u skladu s Mortonovim trećim tipom „Humane Endpoint-a“ (122,123).

U trenutku kada je verificirana dehiscencija kod svih životinja koje su primale NO-agense (L-NAME, L-arginin i/ili njihova kombinacija) - imajući u vidu daljnju poštedu eksperimentalnih životinja i jasni terapijski učinak već pokazan s jedne strane; te potpuni izostanak usporednih skupina (L-NAME, L-arginin, L-NAME + L-arginin) s druge strane - žrtvovane su sve životinje tretirane s BPC 157 u kombinaciji sa NO-agensima (L-NAME, L-arginin i/ili kombinacija) (u skladu s etičkin načelima ovog istraživanja (116,117,120-123); vidi poglavlje 4.5. „Etička načela“).

6. RASPRAVA

6.1. NEADEKVATNO RANO CIJELJENJE I MODEL ISTRAŽIVANJA

Neadekvatno rano cijeljenje (engl. *Early Wound Failure*) je mehanizam kojim u čovjeka i u animalnih modela dolazi do razvoja incizijskih hernija i dehiscencije (3). Prema teoriji neadekvatnoga ranog cijeljenja predispozicija za razvoj hernije i dehiscencije nastaje još u prvoj (upalnoj) fazi cijeljenja (43,44). Prisutnost hernije i dehiscencije kod životinja 7 dana po inicijalnome operativnom zahvatu u ovome istraživanju podržava tu teoriju.

U ovome istraživanju imitiran je i modificiran postupak indukcije neadekvatnoga ranog cijeljenja koji je koristio Dubay i suradnici (6,7).

Dubay je u svojemu istraživanju koristio štakore soja Sprague-Dawley tjelesne težine 275 - 300 g, dok su u ovome istraživanju korišteni štakori soja Wistar tjelesne težine 301 - 331 g. Izabrani su nešto teži štakori kako bi se osigurala zadovoljavajuća veličina štakora za modifikaciju zahvata, dodatni 1 cm miofascijalne incizije. Dubay je kod svojega modela formiranja neadekvatnoga ranog cijeljenja učinio miofascijalnu inciziju u dužini 5 cm te je rana od 5 cm bila objekt analize razvoja incizijske hernije. U ovome istraživanju učinjena je incizija dužine 6 cm te kranijalni 1 cm rane sašiven u skladu s preporukama EHS-a iz 2015. godine (sporo apsorbirajućim monofilamentnim produžnim šavom u jednome sloju, malim „zalogajima”, bez zasebnoga šivanja peritoneuma, omjer duljine konca i rane 4 : 1) kako bi se u gornjemu dijelu rane osigurao najbolji mogući ishod cijeljenja te adekvatan preparat za analizu vlačne čvrstoće (52,54). Time je osigurana jednaka duljina defekta za analizu razvoja hernije (5 cm kaudalnoga dijela rane) kao u Dubayjevom istraživanju.

Dubay je svojim postupkom uspio inducirati herniju u 80 % štakora iz kontrolne skupine dok je u ovome pokusu uspješno induciran razvoj hernije u 75 % štakora iz kontrolne skupine.

Rezultati ovoga istraživanja odgovaraju dosadašnjim istraživanjima te upućuju na ponovljivost ovoga modificiranog modela.

6.2. PENTADEKAPEPTID BPC 157

Premda ova studija to nije posebno ispitivala, korisno je napomenuti da dosadašnji ispitivani preparati, čak i uz pozitivne preventivne utjecaje, nisu zadovoljavali sve kriterije idealnoga preparata (58-62). Isto tako, incizijske hernije predstavljaju ozbiljan ekonomski teret zdravstva, uzevši u obzir činjenice da se smanjenjem incidencije incizijskih hernija za svega 1 % u USA može uštediti 32 milijuna $, a smanjenjem incidencije incizijskih hernija za 5 % u Francuskoj se uštedi oko 4 milijuna € (124-128).

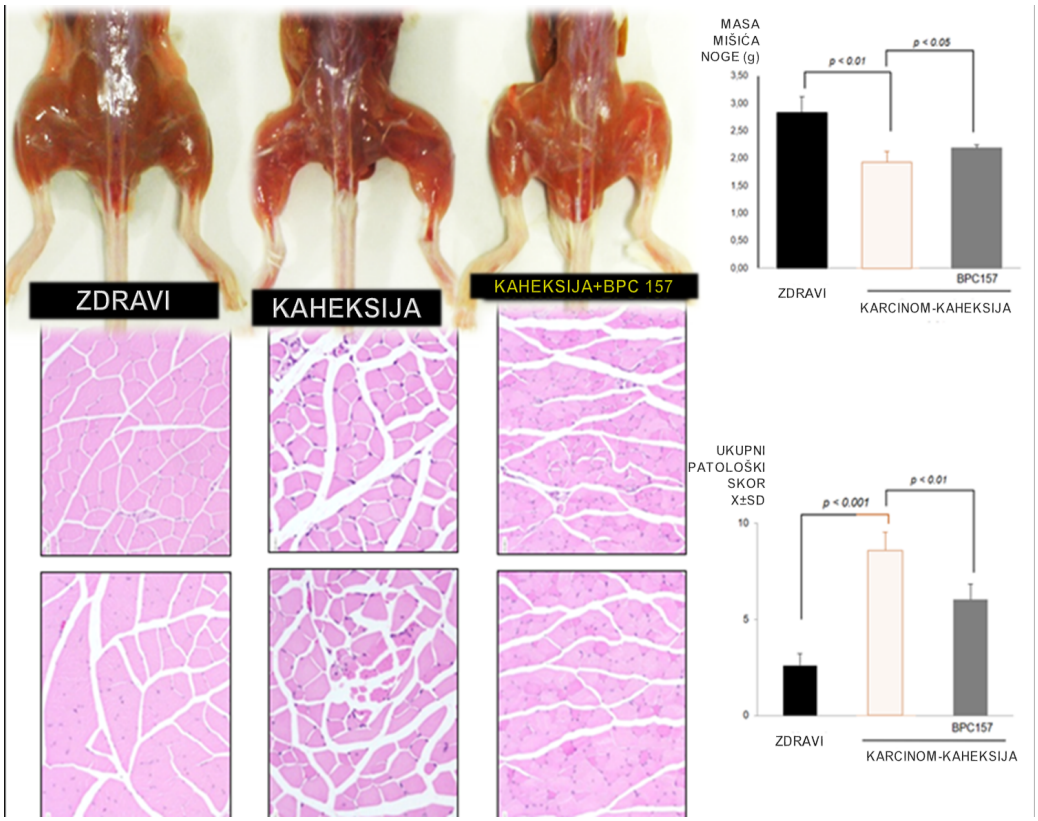
Stoga i na taj način dobiveni rezultati primjenom stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 u pijućoj vodi nakon operacije prema Dubayju izgledaju zanimljivi. Za napomenuti je da se benefitni učinci vide na svim ispitivanim parametrima, pojavi hernije (Tablica 6, Slika 12, Slika 13), veličini hernije (Tablica 7, Slika 14), pojavi dehiscencije (Tablica 8, Slika 15), prezentaciji kožnog ožiljka (Tablica 9, Slika 16), prisutnosti trbušnih priraslica (Tablica 10, Slika 17), te vlačnoj čvrstoći rane (sili pucanja rane) (Tablica 11, Slika 18, Slika 19), i to već poglavito u prvih 7 dana po operaciji prema Dubayju. Tako izgleda da je značajni učinak na sili pucanja koji se vidi tek nakon 28 dana posljedica metodoloških neprilika (primjerice, prisutnosti konca koja izostaje tek u kasnijim terminima, gdje se učinak i pokazuje). I konačno značajni dokaz vjerodostojnosti rezultata i njihovoj praktičnoj primjenjivosti jest činjenica da je jednako pozitivan učinak dobiven primjenom relativno malih doza (mikrograma ili nanograma). Učinkovita primjena mikrogramske i nanogramske doze znači veliki raspon učinkovitosti, s jedne strane, a s druge strane može navoditi i na fiziološko značenje primijenjenog pentadekapeptida. To se posebice može pretpostaviti imajući u vidu da primjena pentadekapeptida BPC 157 kod štakora znači stalno uzimanje vrlo malih količina vode i time minutnih količina supstancije, što može u određenoj mjeri imitirati endogeno lučenje agensa i njegovu potencijalno endogenu djelotvornost (8).

Uzimajući cijeljenje rane abdominalne stijenke kao poseban višesložni fenomen, valja napomenuti da jednaki tretman BPC 157 jest djelotvoran u cijeljenju različitih anastomoza gastrointestinalnog trakta, vanjskih i unutarnjih fistula, te

smanjivanju stvaranja priraslica koje inače nastaju kod takvih zahvata (8,95-106). Isto tako, pentadekapeptid BPC 157 ubrzava cijeljenje kožnih rana, incizionih, kao i opeklinskih (78,79,81). Pri tome je pokazano da pentadekapeptid BPC 157 dovodi do povećane ekspresije Egr-1 gena (odgovornog za stvaranje vezivnog tkiva i krvnih žila) i njegovog korepresornog gena NaB2, te tako stvara posebni povratni učinak (8). Isto tako, pokazano je da pentadekapeptid BPC 157 dovodi do ubrzanog cijeljenja i obnavaljanja funkcije različito oštećenih poprečno prugastih mišića, uključujući i transekciju velikog četveroglavog mišića natkoljenice (77,80). Uz to, za napomenuti je da pentadekapeptid BPC 157 antagonizira i sistemne slabosti mišića, različito izazvane, primjerice kod primjene neurotoskina kuprizona koji predstavlja model multiple skleroze (129). Isto tako, primjena BPC 157 antagonizira mišićne slabosti kod primjene sukcinilkolina i hiperkalijemije (130) ili velike doze KCl i tako izazvane hiperkalijemije (98) ili primjene $MgCl_2$ i tako izazvane hipermagnezemije i hiperkalijemije (131).

Tako gledano, cijeljenje u ovom modelu predstavlja eksperimentalni primjer koji povezuje cijeljenje u probavnom traktu s onim incizione mišićne ozljede (130). Za napomenuti je da pentadekapeptid BPC 157 predstavlja peptid koji za razliku od standardnih peptidnih faktora rasta postiže cijeljenje bez dodatka bilo kojeg nosača („carrier“), te se dobiveni učinak može direktno pripisati samome peptidu (6,7,130). Metodološki to predstavlja bitnu prednost u odnosu na uobičajenu primjenu jednog peptida s različitim nosačima, što otvara jasno problem djelotvornosti (poglavito samo lokalna primjena) i atribucije učinka (da li aktivnost pripada peptidu, nosaču, ili kompleksu peptida i nosača) (132).

Posebice, treba naglasiti da pentadekapeptid BPC 157 antagonizira mišićnu slabost i onda kada nastaje kod tumorske kaheksije (133). Primjena pentadeka-peptida značajno povećava preživljavanje kod aplikacije adenocarcinoma C-26. Isto tako, s antagoniziranjem porasta proinflamatornih citokina (IL-6, TNF-α) značajno imajući u vidu metabolizam mišića relevantan za tumorsku kaheksiju, BPC 157 antagonizira propadanje mišića, antagonizira poremećenu mišićnu proliferaciju i miogenezu, te promjene u ekspresiji FoxO3a, p-AKT, p-mTOR i P-GSK-3β (Slika 20) (133).



Slika 20. Potencijalni molekularni mehanizam djelovanja BPC 157 kod štakora s hernijom i dehiscencijom hernije temeljem nalaza da BPC 157 antagonizira mišićnu kaheksiju koja inače nastaje nakon implantacije tumora (adenokarcinom kolona, C-26). Isto tako, s antagoniziranjem porasta proinflamatornih citokina (IL-6, TNF-α) značajno imajući u vidu metabolizam mišića relevantan za tumorsku kaheksiju, BPC 157 antagonizira propadanje mišića, antagonizira poremećenu mišićnu proliferaciju i miogenezu, te promjene u ekspresiji FoxO3a, p-AKT, p-mTOR i P-GSK-3β (133)

Zaključujući, to bi mogao biti i relevantan molekularni put i kod dobivenog benefitnog učinka BPC 157 u cjeljenju i prevenciji hernije.

I konačno, posebno pitanje predstavlja pojava dehiscencije, koju originalni model operacije prema Dubayju, koji je vjerno prenesen u ovoj studiji, ne navodi (6,7), i koji se ne događa osim u slučaju primjene NO-agensa, i to L-NAME i L-arginina. Taj negativni učinak (zbog kojeg dolazi do potpunog raspada miofascijalne rane i evisceracije) predstavlja vjerojatno nefunckioniranje prirodnog puta, koji jest u potpunosti uklonjen primjenom pentadekapeptida BPC 157. Za napomenuti je da je poznato kako pentadekapeptid BPC 157 u različitim modelima i vrstama interferira s učinicima NO-agensa, i L-NAME i L-arginina (što je objašnjeno u uvodnom dijelu disertacije) (8).

6.3. NO-SUSTAV

Općenito je prihvaćena uključenost NO-sustava u proces cijeljenja, imunoregulacije, vaskularnog odgovora, te njegova dakle dualna uloga (8). Pojednostavljeno, primjerice, primjena L-NAME dovodi do hipertenzije, primjena L-arginina dovodi do hipotenzije (8,109) - vazodilatacija predstavlja primarni odgovor kod cijeljenja, te je stoga učinak primjene L-arginina koristan (134), a učinak primjene L-NAME štetan (8). Imajući u vidu složenost različitih organskih sustava, njihovu međusobnu različitost, i višestruku različitost u uvjetima u kojima se nalaze i prema kojima trebaju reagirati, jasno je da je istraživanje djelovanja i uključenosti NO-sustava vrlo kompleksno, i da je gore navedeni odnos vrlo pojednostavljen, i jasno mora uključiti i druge mogućnosti (primjerice, i primjena L-NAME i primjena L-arginina pojačavaju mišićnu slabost kod primjene velike doze $MgCl_2$ (131) ili primjena L-NAME kao i primjena L-arginina dovode do mioze u štakora i zamorca (111); a takav „paralelni“ učinak pokazuje se i u ovoj studiji). To je u studijama o pentadekapeptidu BPC 157, a posebice u ovoj studiji, redovito bilo razlogom za ispitivanje i učinka NOS-blokade (kod primjene NOS-blokatora: L-NAME), zajedno s učinkom NOS-hiperstimulacije (kod primjene NOS-supstrata: L-arginina), te učinka imobilizacije NO-sustava kod njihove istovremene primjene. S druge strane, jasno je da je ovakvo predstavljanje, premda pruža zapravo potpuni uvid u uključenost NO-sustava, vrlo zahtjevno, te nasuprot tome, golema većina studija provodi „pojednostavljeni“ postupak, koji se temelji na pretpostavljenoj specifičnosti NO-agensa, te se zaključci o cjelokupnoj uključenosti NO-sustava, donose poglavito na temelju primjene samo NOS-blokatora (najčešće upravo L-NAME) (8,135,136) ili rjeđe primjenom samo NOS-supstrata (L-arginina) (8,137-140).

Dakle, stoga nije previše iznenađujuće, da dosada učinak NO-agensa kod operacije prema Dubayju (6,7) nije posebice istraživan. S druge strane, na različitim modelima incizijske hernije, s primjenom različitih prostetičkih materijala, u različitih vrsta, svinja i štakora, ispitivan je učinak L-arginina. Dobiveni su suprotni rezultati (137-140). Studije u štakora, pokazivale su benefitni učinak L-arginina, a L-arginin je

primijenjen u infuzijskoj pumpi, u dozama značano većim nego u našoj studiji. Naime, poznato je da je L-arginin depletiran u području upale i za vrijeme cijeljenja rane (137). Kako su kod implantiranih biomaterijala normalni reparatorni procesi oslabljeni, što konačno može dovesti do loše funkcije implantiranih materijala, i konačne malfunkcije, porast dotoka L-arginina na površinu prostetičkog materijala treba poništiti ranu poremetnju, i smanjiti vrijeme potrebno za potpunu mehaničku funkciju (139,140). Obratno, studije u svinja su pokazivale suprotni negativni učinak L-arginina (L-arginin u infuziji) (137,138). S time u svezi (137-140) treba promatrati dobivene rezultate (imajući u vidu da L-NAME, prema literarnim podacima koji su nam bili dostupni, nije istraživana na modelu incizijske hernije). U ovoj studiji, uzimajući kao referentne parameter prisutnost hernije, veličinu hernije, pojavu dehiscencije (i evisceracije), prezentaciju kožnog ožiljka prisutnost trbušnih priraslica, silu pucanja i polje pomaka u području rane, NO-agensi su pokazali zanimljiv učinak, agravirajući učinak (Tablica 6, Tablica 7, Tablica 8, Tablica 9, Tablica 10, Tablica 11, Slika 12, Slika 13, Slika 14, Slika 15, Slika 16, Slika 17, Slika 18 i Slika 19). Kod parametara gdje se prikazuje njihov agravirajući učinak, vidi se neposredno unutar 7 dana: kod veličine hernije te prisutnosti trbušnih priraslica. U oba slučaja, učinak primjene L-NAME se vidi već u prvih 7 dana, dočim se učinak L-arginina vidi kasnije, 14 dana po operaciji prema Dubayju. Dakle, u odnosu na normalni reparatorni proces (koji se odvija tako da hernija nastaje gotovo redovito, relativno malena, uz značajnije trbušne priraslice) moglo bi se pretpostaviti da kod primjene L-NAME (NOS-blokada) i L-Arginina (NOS-hiperstimulacija) postoje dva agravirajuća procesa, oba zavisna od NO-sustava, raniji (zbog NOS-blokade) i nešto kasniji (zbog NOS-hiperstimulacije). Kako ti procesi premda dovode do istog agravirajućeg učinka, i jesu stoga paralelni, oni ipak ostaju suprotni u odnosu na NO-sustav, i njihova međusobna antagonizacija bi trebala biti bitna za utvrđivanje da se uistinu radi o učinku specifičnom za NO-sustav (8,111). Stoga je zgodno naznačiti da se ta međusobna antagonizacija agravirajućih učinaka uistinu vidi 14 dana nakon operacije prema Dubayju na veličini hernije. Nasuprot većoj veličini hernije u samostalnoj primjeni L-NAME i većoj veličini hernije u samostalnoj primjeni L-arginina, kod njihove zajedničke primjene, veličina hernije postaje jednaka onoj u kontrolnoj skupini (Tablica 7). Takva antagonizacija se ne vidi međutim na primjeru priraslica u trbuhu. To može ukazivati na odgovarajuću specifičnost.

Međutim, prema našem mišljenju, najvažniji je agravirajući učinak onaj koji se vidi na dehiscenciji, i posljedičnoj evisceraciji koja nastaje, i javlja se u odmah nakon 14 dana terapije s L-NAME, L-arginin, odnosno L-NAME + L-arginin u svih štakora podvrgnutih operaciji prema Dubayju. Taj fenomen jest zanimljiv jer nije opisan kao moguća agravacija u originalnim studiji (6,7), i isto tako, u ovoj studiji, u štakora podvrgnutih operaciji prema Dubayju, koji nisu primali nikakvu medikaciju (kontrola), nije se javljala (osim u jednom sporadičnom slučaju). Stoga se može pretpostaviti da je ta agravacija specifična upravo za primjenu L-NAME kao i za primjenu L-arginina. Kako kod međusobne zajedničke primjene ne dolazi do antagonizacije (izostanka nastanka hernije), nego dehiscencija dapače nastaje i uz prethodno povećanje veličine hernije (vidi gore), čini se da je poremetnja koja nastaje kod primjene L-NAME i NOS-blokade, kao i poremetnja koja nastaje kod primjene L-arginina i NOS-hiperstimulacije, definitivna, i da se ne može popraviti međusobnim antagoniziranjem. S druge strane, to može govoriti i o prisutnosti odgovarajućeg drugog sustava, koji ostaje poremećen i u slučaju da je NO-sustav imobiliziran međusobnom antagonizacijom učinaka L-NAME (NOS-blokada) i L-arginina (NOS-hiperstimulacija), i stoga jednako nastaje dehiscijecija.

Jedno od mogućih objašnjenja ovog fenomena koji se javlja i kod L-NAME kao i kod primjene L-arginina, moglo bi uključivati učinak NO na ekspresiju VEGF-gena, esencijalnog faktora koji modulira mnoge procese, proadhesivne, proinflamatorne i protrombotske gene kod vaskularne ozljede (141,142). U malim koncentracijama NO povećava aktivnost VEGF-gena povećavajući aktivnost HIF-1. S druge strane, velike koncentracije NO generiraju ekspresiju NOS-2 i time inhibiraju aktivnost HIF-1, te indukciju VEGF-gena u glatkim mišićima krvnih žila (142). To dakle, može objasniti, u odgovarajućoj mjeri negativni učinak i L-NAME i L-arginina i njihove kombinacije.

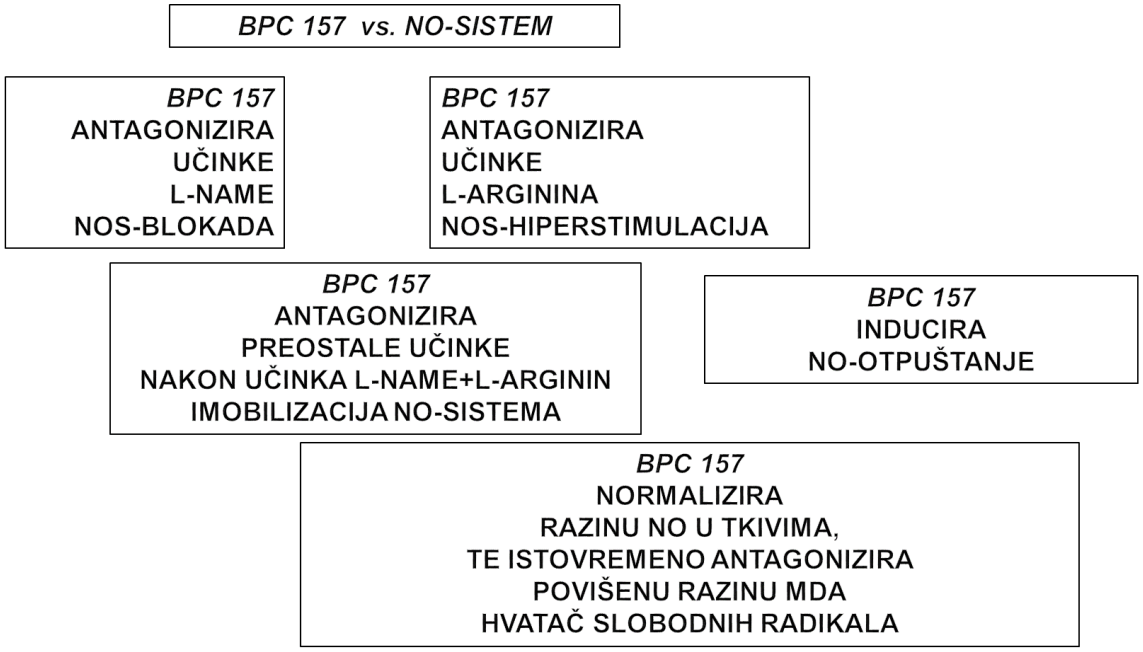
S druge strane, valja napomenuti, da je u našim dosadašnjim radovima, koji su pokazivali „paralelni“ učinak L-NAME i L-arginina, kod njihove zajedničke primjene redovito slijedila međusobna antagonizacija učinaka (131,111). Primjerice, mioza kod zajedničke primjene L-NAME i L-arginina trajala je značajno kraće nego kod njihove samostalne primjene (111). Isto tako, kod pojačane mišićne slabosti koja nastaje kod primjene L-NAME i primjene L-arginina, u štakora nakon primjene velike doze $MgCl_2$ dolazilo je do međusobne antagonizacije kod njihove zajedničke primjene (131). Međutim, ta antagonizacija ipak nije bila potpuna. Primjerice, primjena L-NAME kao i

primjena L-arginina antagonizira midrijazu izazvanu s atropinom, no kod njihove zajedničke primjene, atropinska midrijaza je bila jednako antagonizirana kao i kod njihove samostalne primjene (111).

Zaključujući, ovi podaci pokazuju kompleksnost učinaka NO-sustava, u različitim organskim sustavima, i njihovu isto tako kompleksnu interakciju s različitim drugim molekularnim sustavima. Stoga istraživanje interakcije pentadekapeptida BPC 157 s NO-sustavom može imati posebno značenje u ovoj studiji (vidi dalje) (8).

6.4. MEĐUODNOS PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 I NO-SUSTAVA

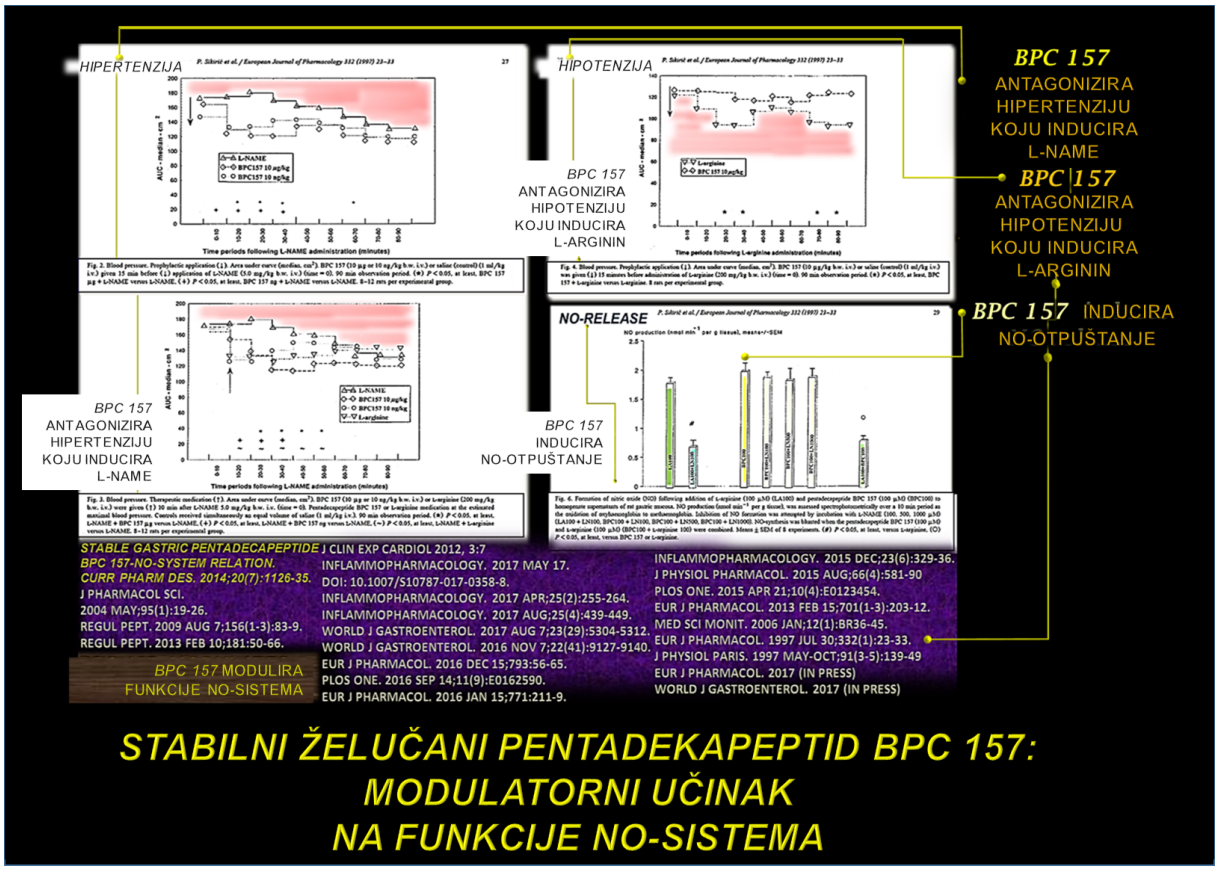
Imajući u vidu, nakon što su štakori operirani prema Dubayju (razloženi eksperimentalni model vidi ranije), te posebice, razloženi benefitni učinak pentadekapeptida BPC 157 s jedne strane (na sve ispitivane parametre, a posebice na izostanak dehiscencije) (vidi ranije), te agravirajući učinak NO-agensa, L-NAME (NOS-blokatora) kao i L-arginina (NOS-hiperstimulacija) i njihove kombinacije s druge strane (imobilizacija NO-sustava) (vidi ranije), od posebnog značenja izgleda njihova interakcija i uklanjanje inače neizbježne dehiscencije kao krajnje komplikacije (Slika 21).



Slika 21. Ilustracija kako benefitno djelovanje BPC 157 nadjačava negativni učinak i NOS-blokade (L-NAME + BPC 157), i negativni učinak NOS-(hiper)stimulacije (L-arginin + BPC 157), kao i negativni učinak imobilizacije NO-sustava kod zajedničke primjene NOS-blokade i NOS-(hiper)stimulacije (L-NAME + L-arginin + BPC 157) te uspostavlja svoje primarno djelovanje (izostanak dehiscencije)

Kako je razloženo u preglednom radu (8), hipoteza jest da BPC 157 (budući da se formira u želučanoj mukozi, stabilan u ljudskom želučanom soku, zajedno s značenjem NO-sintaze i formiranja NO u želučanoj mukozi, više nego što se vidi u drugim tkivima) pokazuje na općoj razini, efektivno kompetiranje s analozima L-arginina (primjerice, L-NAME) kao i s L-argininom, i da to ima određeno fiziološko značenje (NO-generacija). Takva postavka potvrđuje njegovo djelovanje koje ilustira povezanost BPC 157 i NO-sustava, i to posebice u želučanoj stijenci i zaštiti mukoze, nakon alkoholnih lezija u tijeku citoprotekcije, oslobađanja NO-a, i regulaciji krvnog tlaka; kod alkoholne akutne i kronične intoksikacije, i ustezanja; kod kardiovaskularnih poremetnji, kronične srčane insuficijencije, plućne hipertenzije i aritmija; kod poremetnji nakon hipokalijemije i hiperkalijemije, i poremetnji stanične membrane izazvane kalijem; i konačno, kod kompleksih poremetnji cijeljenja, kao što su to fistule, kolokutane ili ezofagokutane (8). U međuvremenu pokazane su i daljnje interakcije, kod različitih modela, primjerice tiopentalske anestezije (144), ezofagogastričke anastomoze (145), primjene sukcinilkolina (130), ciklofosfamida (146), neuroleptika (147) ili velike doze $MgCl_2$ (131), vaskularne okluzije (148,149). Isto tako pokazano je da pentadekapeptid BPC 157 dovodi do normalizacije razina NO u tkivima (146-149), te smanjuje razinu MDA, znači ima ulogu i hvataća slobodnih radikala (146-149).

Stoga se može uistinu tvrditi da je njegov modulatorni učinak u odnosu na NO-sustav potkrijepljen brojnim primjerima na različitim modelima i vrstama (8). Tumačenje modulatornog učinka se odnosi na pojam uspostavljanja homeostaze, što odgovara pravilnoj funkciji NO-sustava u potrebnom okviru (bilo inhibicija, bilo stimulacija, dovodi do ispada) (8). Ilustrativni primjer (Slika 22) jest primjerice antagonizacija suprotnih učinaka, i hipertenzije koju izaziva L-NAME, kao i hipotenzije koju izaziva L-arginin (109), bez učinka na normalni krvni tlak (8,109); isto tako, ilustrativan je primjer i antagonizacija paralelnih učinaka; BPC 157 antagonizira miozu koju izazivaju L-NAME i L-arginin, kao i atropinsku midrijazu, bez učinka na normalnu pupilu. Pri tome, antagonizacija nije potpuna, te se odvija na redovito poseban način, jer BPC 157 antagonizira kako je navedeno učinak L-NAME i L-arginina na miozu, ali ne antagonizira njihov antagonizirajući učinak na atropinsku midrijazu (111).



Slika 22. Ilustracija učinaka pentadekapeptida BPC 157 jest primjerice antagonizacija suprotnih učinaka; i hipertenzije koju izaziva L-NAME, kao i hipotenzije koju izaziva L-arginin, bez učinka na normalni krvni tlak, uz indukciju NO iz želučanih homogenata (8)

Dakle, u ovoj studiji, moguća antagonizacija se odnosila na prisutnost hernije, veličinu hernije, pojavu dehiscencije (i time evisceracije), prezentaciju kožnog ožiljka, prisutnost trbušnih priraslica, silu pucanja i polje pomaka u području rane: NO-agensi su pokazali zanimljiv učinak - agravirajući učinak. Parametri kod kojih se pokazuje njihov agravirajući učinak, neposredno već unutar prvih 7 dana, jest kod veličine hernije te prisutnosti trbušnih priraslica. U oba slučaja, učinak primjene L-NAME se vidi već u prvih 7 dana, dočim se učinak L-arginina vidi kasnije, unutar 14 dana po operaciji prema Dubayju. Međusobna antagonizacija se vidjela kod veličine hernije nakon drugog tjedna. BPC 157 antagonizira povećanu veličinu hernije u štakora koji su primali L-NAME kao i u štakora koji su primali L-arginin. Ne postoji međutim antagonizacija ostatnog učinka u štakora koji su istovremeno primili L-NAME i L-arginin. S druge strane benefitni učinak BPC 157 nestaje u slučaju pojavnosti hernije,

trbušnih priraslica i kožnog ožiljka kod primjene L-NAME i L-arginina. To bi s jedne strane moglo pokazati na specifičnost učinka (veličina hernije) nasuprot ostalim parametrima (pojavnosti hernije, prezentaciji kožnog ožiljka i prisutnosti trbušnih priraslica). Za napomenuti je, međutim, da se u ovoj studiji BPC 157 davao u pijućoj vodi, dočim se u drugim studijama (gdje je antagonizacija učinaka potpunija) radilo o primjeni bolus injekcije BPC 157 istovremeno sa bolus injekcijom L-NAME i/ili injekcijom L-arginina, odnosno neposredno nakon njih (8), što bi u odgovarajućoj mjeri moglo utjecati na dobivene međuodnose.

S druge strane, ostavljajući po strani gore navedeno, kod primjene BPC 157 s NO-agensima (L-NAME + BPC 157, L-arginin + BPC 157, L-NAME + L-arginin + BPC 157), od primjerenog je značenja potpuno uklanjanje dehiscencije – a pokazali smo da je nastanak dehiscencije fenomen koji se može dosta jasno vezati za primjenu bilo L-NAME, bilo L-arginina nakon što su štakori operirani prema Dubayju, budući da redovito i bez izuzetka nastaje nakon 14 dana u svih tih štakora (vidi ranije).

Činjenica da se isti fenomen kompletne antagonizacije vidi u obje skupine koje primaju BPC 157 u pijućoj vodi, te da se radi o vrlo velikom rasponu doza, µg do ng, govori u prilog konzistentnosti učinka. Jednako tako, kako međusobno neantagoniziranje nastanka dehiscencije hernije kod primjene NO-agensa (koji imaju u odnosu na NO-sustav suprotni učinak, NOS-blokada odnosno NOS-(hiper)stimulacija – i time inhibiraju NO-sustav) može pripisati ostatni učinak poremetnji nekog drugog sustava, tako i antagoniziranje toga ostatnog učinka opisanom primjenom BPC 157 može pripisati značajnu ulogu u oporavljanju tih dodatnih mehanizama upravo samom sustavu BPC 157. U ovom slučaju, benefitno djelovanje BPC 157 nadjačava negativni učinak i NOS-blokade (L-NAME + BPC 157), i negativni učinak NOS-(hiper)stimulacije (L-arginin + BPC 157), kao i negativni učinak imobilizacije NO-sustava kod zajedničke primjene NOS-blokade i NOS-(hiper)stimulacije (L-NAME + L-arginin + BPC 157) i uspostavlja svoje primarno djelovanje (izostanak dehiscencije) koje se vidi u obje skupine koje primaju BPC 157 u pijućoj vodi.

Konačno, za pravilno utvrđivanje mogućeg značenja učinka interakcije BPC 157 s NO-sustavom, valja napomenuti da su nedavni radovi pokazali kompleksnu interakciju s različitim molekularnim sustavima, gdje se posebice ističe pokazatelj da BPC 157 modulira aktivaciju VEGF-gena (150-154).

Isto tako, na kraju, imajući u vidu potencijalno negativnu intepretaciju dobivenih rezultata, ulazeći u esencijalno značenje angiogeneze na ovom modelu (6,7), što u ovoj studiji nije posebice elaborirano, i time potencijalni negativni učinak u slučaju prisutnosti tumora, treba ponovo naglasiti da pentadekapeptid BPC 157 antagonizira mišićnu slabost i onda kada ona nastaje kod tumorske kaheksije (vidi ranije). Primjena pentadeakpeptida značajno povećava preživljavanje kod aplikacije adenocarcinoma C-26. Isto tako, s antagoniziranjem porasta proinflamatornih citokina (IL-6, TNF-α) značajno imajući u vidu metabolizam mišića relevantan za tumorsku kaheksiju, BPC 157 antagonizira propadanje mišića, antagonizira poremećenu mišićnu proliferaciju i miogenezu, te promjene u ekspresiji FoxO3a, p-AKT, p-mTOR i P-GSK-3β (131). Značenje ovih rezultata u odnosu na već opisanu interakciju BPC 157 s NO-sustavom, očekuje daljnja istraživanja. Nedavno je međutim pokazano da pentadekapeptid BPC 157 ima poseban učinak na aktivaciju krvnih žila, te može dovesti do brze aktivacije kolateralne cirkulacije, koja zaobilazi okluziju krvnih žila, i uspostavlja integritet cirkulacije (148,149).

6.5. KOŽNA RANA I TRBUŠNE PRIRASLICE

Analizom kožne rane i trbušnih priraslica uočena je statistički značajna razlika u kvaliteti izgleda kožne rane životinja tretiranih BPC-om 157 u smislu pretežno urednoga cijeljenja kožne rane, kao i značajno manje priraslica što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima utjecaja preparata BPC 157 na kožnu ranu i trbušne priraslice (74, 79, 81, 83, 88). S obzirom na činjenicu da 67 – 93 % pacijenata razvije trbušne priraslice nakon operativnoga zahvata i čak 1/3 tih pacijenata biva rehospitalizirana zbog problema vezanih uz trbušne priraslice, postoji potencijalna primjena preparata BPC 157 zbog njegova pozitivnog preventivnog efekta na trbušne priraslice (155-157).

6.6. VLAČNA ČVRSTOĆA RANE

Preparati životinja, koje su tretirane BPC-om 157 tijekom 28 dana, pokazali su statistički značajno veću vlačnu čvrstoću od kontrolne skupine. Sašivena rana u prvoj fazi cijeljenja ima približno 70 % vlačne čvrstoće intaktnoga tkiva, uglavnom zahvaljujući šavovima, a značajno povećanje vlačne čvrstoće događa se negdje iza 21. dana, vjerojatno zahvaljujući tzv. „poprečnome povezivanju" kolagenih fibrila (29, 30). U istraživanju su korišteni resorptivni šavovi pa se može pretpostaviti da je jednaka vlačna čvrstoća (sila pucanja) u prve tri vremenske točke ispitivanja (7., 14. i 21. dan) posljedica utjecaja šavova na vlačnu čvrstoću ispitivanih preparata. Djelomičnom apsorpcijom šava do 28. dana eliminiran je utjecaj šava te se demonstrirao pozitivan utjecaj BPC-a 157 na cijeljenje, a time i na vlačnu čvrstoću (silu pucanja) ispitivanih preparata.

6.7. POLJE POMAKA U PODRUČJU RANE

U ovome istraživanju nije se uspjelo odrediti polje pomaka u području rane. Preparati su bili pripremani u skladu s ranijim istraživanjima no, zbog poteškoća u dobivanju odgovarajuće teksture na površini uzoraka, iz rezultata mjerenja algoritam mjernoga sustava nije mogao odrediti polje pomaka i deformacija.

Polje pomaka i deformacija na površini opterećenih uzoraka može se odrediti metodom korelacije digitalne slike, ukoliko površina ima kontrastnu prirodnu ili umjetnu teksturu (114,115,158). Površina većine materijala za algoritam korištenoga mjernog sustava nema dovoljno izraženu prirodnu teksturu. U tome slučaju na površinu se nanosi bijela i crna boja kako bi se dobila umjetna tekstura u obliku crnih točkica na bijeloj podlozi. Takav način pripreme površine uzorka primjenjiv je kod bioloških tkiva kao što je koštano tkivo ili svinjska aorta (114,159). Kod kostiju deformacije su, zbog velike čvrstoće, male tako da tijekom opterećivanja uzorka ne dolazi do oštećenja tankoga sloja bijele podloge. Deformacije kod aorti znatno su veće, međutim, kako su svijetle boje, umjetna tekstura može se dobiti nanošenjem samo crne boje na površinu uzorka. Na taj se način tijekom deformiranja ne oštećuje tanki sloj bijele boje koja služi kao podloga.

Kako je površina uzoraka ispitivanih u okviru ovoga rada bila pretamna, za dobivanje umjetne teksture korištene su obje boje. Zbog velikih deformacija tijekom ispitivanja uzoraka došlo je do pucanja tankoga sloja bijele boje što je rezultiralo gubitkom, za algoritam, prepoznatljivih mjernih točaka (vidi Slika 10. i Slika 11.). Posljedica toga je da pri obradi slika program sustava nije prepoznao iste slike u lijevoj i desnoj kameri te se obrada slika automatski prekinula.

7. ZAKLJUČAK

Životinje tretirane BPC-om 157 imale su nižu incidenciju hernije i statistički značajno manju herniju u odnosu na životinje iz kontrolne skupine. Uočena je statistički značajna razlika u kvaliteti izgleda kožne rane u smislu pretežno urednoga cijeljenja kožne rane kod životinja tretiranih BPC-om 157. Također, životinje tretirane BPC-om 157 u µg/kg tijekom 7, 14 i 21 dana imale su značajno manje priraslica, kao i životinje tretirane BPC-om 157 u ng/kg tijekom 14 i 21 dana. Preparati analizirani iz životinja, koje su tretirane BPC-om 157 (i µg/kg i ng/kg) tijekom 28 dana, pokazali su statistički značajno veću vlačnu čvrstoću od preparata životinja iz kontrolne skupine.

Kod životinja tretiranih L-NAME-om i L-argininom te njihovom kombinacijom bio je prisutan visok postotak dehiscenci koji je dodatno rastao s duljim vremenskim periodom praćenja. Također, životinje tretirane L-NAME-om imale su veću herniju od životinja iz kontrolne skupine, kao i životinje tretirane L-argininom 14 dana i na dulji vremenski period. Životinje tretirane L-NAME-om imale su značajno više priraslica, kao i životinje tretirane kombinacijom L-NAME + L-arginin te životinje tretirane L-argininom tijekom 14 dana i na dulji vremenski period.

Ovim istraživanjem potvrđen je preventivni učinak BPC-a 157 na razvoj incizijske hernije i dehiscencije te pozitivan učinak na povećanje vlačne čvrstoće rane. S obzirom da je BPC 157 stabilan preparat koji se može primjenjivati peroralno, otopljen u vodi, uz dosad nepoznate nuspojave, BPC 157 pokazao se kao perspektivan preparat u prevenciji incizijske hernije. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost i potrebu za dodatnim istraživanjima i, u konačnici, primjenu preparata BPC 157 u prevenciji incizijske hernije.

8. KRATAK SADRŽAJ NA HRVATSKOME JEZIKU

Dosadašnjim istraživanjima dokazano je pozitivno djelovanje BPC-a 157 na cijeljenje kožnih rana i mišićno-tetivnih oštećenja, no nije ispitan njegov utjecaj na prevenciju razvoja incizijskih hernija (IH).

Ispitivao se utjecaj BPC-a 157, L-NAME-a i L-arginina na prevenciju razvoja IH-a, veličinu IH-a (VIH), prezentaciju kožnog ožiljka (PKO), trbušne priraslice (TP) i vlačnu čvrstoću rane (VČR) u četiri vremenske točke (7, 14, 21 i 28 dan) na štakorima soja Wistar kod kojih je induciran razvoj IH-a. Sukladno eksperimentalnome protokolu štakorima je kontinuirano davan BPC 157 (0,16 µg/mL ili 0,16 ng/mL, po.), L-NAME (5 mg/kg ip.), L-arginin (100 mg/kg ip.) te njihove kombinacije.

BPC 157 smanjio je incidenciju IH-a (p(µg) < 0,0001, p(ng) < 0,0001) kao i VIH-a. Životinje tretirane L-NAME-om i L-argininom imale su veće IH od životinja iz kontrolne skupine. Životinje tretirane BPC-om 157 imale su urednu PKO, kao i manje TP, dok su životinje tretirane L-NAME-om, L-argininom te kombinacijom imale više TP. Životinje tretirane BPC-om 157 tijekom 28 dana imale su veću VČR (p(µg) = 0,0498, p(ng) = 0,0419).

BPC 157 pokazao je preventivni učinak na razvoj i veličinu IH-a te pozitivan dugoročni učinak na VČR, što predstavlja potencijal primjene ovoga preparata u prevenciji razvoja IH-a.

Ključne riječi: incizijska hernija, BPC 157, neadekvatno ran ocijeljenje, vlačna čvrstoća

9. KRATAK SADRŽAJ NA ENGLESKOME JEZIKU

The Role of Pentadecapeptide BPC 157 and NO-system on Incisional Ventral Hernia Prevention and Wound Tensile Strength Impact

Alen Pajtak, 2018.

Positive BPC 157 effect on skin wounds and muscle-tendon is known. Effect on incisional hernia (IH) prevention has not been studied.
BPC 157, L-NAME and L-arginineffect on IH development and IH size (IHS), cutaneous wound appearance (CWA), abdominal adhesions (AA) and tensile strength (TS) was monitored for 7, 14, 21, and 28 days on Wistar rats. Ratswere continuously treated with BPC 157 (0,16 µg/mL or 0,16 ng/mL, per os), L-NAME (5 mg/kg ip), L-arginin (100 mg/kg ip) and combinations.
BPC 157 reduced the incidence of IH (p(µg) < 0,0001, p(ng) < 0,0001) as well as IHS. Animals treated with L-NAME and L-arginine had larger IHS than control group animals. Animals treated with BPC 157 differed in CWA- predominantly regular healing, as well as less AA, while animals treated with L-NAME, L-arginine and combination had more AA. Animals treated with BPC 157 for 28 days had greater TS (p(µg) = 0,0498, p(ng) = 0,0419).
BPC 157 presented preventive effect on IH development, IHS, and long-term positive TS effect. This implies potential usage in IH prevention.

Keywords: Incisional Hernia, BPC 157, Early Wound Failure, Tensile Strength

10. POPIS LITERATURE

1. Dubay DA, Wang X, Kirk S, Adamson B, Robson MC, Franz MG. Fascial fibroblast kinetic activity is increased during abdominal wall repair compared to dermal fibroblasts. Wound Repair Regen 2004;12:539-45.

2. Franz MG, Smith PD, Wachtel TL i sur. Fascial incisions heal faster than skin: a new model of abdominal wall repair. Surgery 2001;129:203-8.

3. Michael G. Franz. The Biology of Hernia Formation. Surg Clin North Am. 2008; 88: 1–15.

4. Pollock AV, Evans M. Early prediction of late incisional hernias. Br J Surg 1989; 76:953-4.

5. Townsend CM. Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practice, 18th Edition, Saunders; 2008, str. 1155-1180.

6. Dubay DA, Wang X, Kuhn MA, Robson MC, Franz MG. The prevention of incisional hernia formation using a delayed - release polymer of basic fibroblast growth factor. Ann Surg 2004;240:179-86.

7. DuBay DA, Wang X, Adamson B, Kuzon WM Jr, Dennis RG, Franz MG. Progressive fascial wound failure impairs subsequent abdominal wall repairs: a new animal model of incisional hernia formation. Surgery 2005;137:463-71.

8. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Stabile gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. Curr Pharm Des 2014; 20: 1126-35.

9. Šoša T.,ur. Kirurgija, Zagreb: Naklada Ljevak; 2007, str. 396-408.

10. Fitzgibbons RJ, Greenburg AG.,ur. Nyhus and Condon's Hernia. 5. izd. Lippincott Williams and Wilkins; 2001, str. 55-79.

11. Kingsnorth AN, LeBlanc KA.,ur. Management of abdominal hernias. 3. izd. London: Springer Science; 2003, str. 40-47.

12. Burchart J, Pedersen M, Bisgaard T i sur. Nationwide prevalence of groin hernia repair. PloS One 2013; [pristupljeno 2016 Aug 12] 8(1): e54367.

13. Primatesa P, Goldacre MJ. Inguinal hernia repair: incidence of elective and emergency surgery, readmission and mortality. Int J Epidemiol 1996;25:835-39.

14. Burchart J, Pommergraad HC, Rosenberg J. The inheritance of groin hernia: a systematic review. Hernia 2013; 17:183-189.

15. Sucandy I, Kolff JW. Incarcerated femoral hernia in men: incidence, diagnosis, and surgical management. N Am J Med Sci 2012;4:617-8.

16. Kingsnorth AN, LeBlanc KA.,ur. Management of abdominal hernias. 3. izd. London: Springer Science; 2003, str. 47-53.

17. Whalen HR, Kidd GA, O'Dwyer PJ. Femoral hernias. BMJ 2011; [pristupljeno 2017 Feb 14] 343: d7668

18. Šoša T., ur. Kirurgija, Zagreb: Naklada Ljevak; 2007, str. 408-423.

19. Fitzgibbons RJ, Greenburg AG.,ur. Nyhus and Condon's Hernia, 5. izd. Lippincott: Williams and Wilkins; 2001, str. 3-8.

20. Wirtschafter ZT, Bentley JP. Hernias as a collagen maturation defect. Ann Surg 1964;160:852.

21. Adze B, Luna G. Incidence of abdominal wall hernia in aortic surgery. Am J Surg 1998; 175:400-02.

22. Cannon DJ, Casteel L, Read RC. Abdominal aortic aneurysm, Lerische's syndrome, Inguinal herniation, and smoking. Arch Surg 1984; 119:387-89.

23. Lehnerr B, Wdouh F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysm. Ann Vasc Surg 1992 6:134-37.

24. Stevick CA, Long JB, Jamashbi B i sur. Ventral hernia following abdominal aortic reconstruction. Am Surg 1998; 54:287-89.

25. Pans A, Pierard GE, Albert A i sur. Adult groin hernias: new insight into their biomechanical characteristics. Eur J Clin Invest 1997; 27:863-68.

26. Freidman DW, Boyd CD, Norton P i sur. Increases in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. Ann Surg 1993; 218:754-60.

27. Fitzgibbons RJ, Greenburg AG.,ur. Nyhus and Condon's Hernia, 5. izd. Lippincott: Williams and Wilkins; 2001, str. 17-43.

28. Lucić H.,ur. Anatomija laboratorijskih životinja: Anatomija štakora, Skripta Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 15-17.

29. Townsend CM., ur. Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practice, 18. izd., Saunders; 2008, str. 191-216.

30. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL., ur. Osnove patologije, prema američkom petom izdanju. Zagreb,Školska knjiga; 2000, str. 47-60.

31. Korenkov M, Paul A, Sauerland S i sur. Classification and surgical treatment of incisional hernia. Results of an experts' meeting. Langenbecks Arch Surg 2001; 386:65-73.

32. Muysoms FE, Miserez M, Berrevoet F i sur. Classification of primary and incisional abdominal wall hernias. Hernia 2009; 13: 407–14.

33. Le Huu Nhr O, Mege D, Ouaïssi M, Sielezneff I, Sastre B. Incidence and prevention of ventral incisional hernia. J Visc Surg, 2012;149:3-14.

34. Hoer J, Lawong G, Klinge U, Schumpelick V. Factors influencing the development of incisional hernia. A retrospective study of 2,983 laparotomy patients over a period of 10 years. Chirurg 2002; 73: 474-80.

35. Sorensen LT, Hemmingsen UB, Kirkeby LT, Kallehave F, Jorgensen LN. Smoking is a risk factor for incisional hernia. Arch Surg 2005; 140: 119-123.

36. George CD, Ellis H: The results of incisional hernia repair: a twelve-year review. Ann R Coll Surg Engl 1986; 68:185.

37. Murraz BW, Cioher DJ, Pham T, Anthony T. The impact of surgical site infection on the development of incisional hernia and small bowel obstruction in colorectal surgery. Am J Surg. 2011; 202:558-60.

38. Ceydeli A, Rucinski J, Wise L. Finding the best abdominal closure: an evidence- based review of the literature. CurrSurg 2005;62: 220-5.

39. Grace RH, Cox SJ: Incidence of incisional hernia following dehiscencije of the abdominal wound. Proc R Soc Med 1973; 66:1091-2.

40. Dietz UA, Winkler MS, Hartel RW i sur. Importance of recurrence rating, morphology, hernial gap size, and risk factors in ventral and incisional hernia classification. Hernia 2014;18:19-30.

41. Dubay DA, Wang X, Kirk S, Adamson B, Robson MC, Franz MG. Fascial fibroblast kinetic activity is increased during abdominal Wall repair compared to dermal fibroblastos. Wound Repair Regen 2004;12:539-45.

42. Franz MG, Smith PD, Wachtel TL i sur. Fascial incisions heal faster than skin: a new model of abdominal wall repair. Surgery 2001;129:203-8.

43. Michael G. Franz. The Biology of Hernia Formation. Surg Clin North Am. 2008; 88: 1–15.

44. Xing L, Culbertson EJ, Wen Y, Franz MG. Early laparotomy wound failure as the mechanism for incisional hernia formation. J Surg Res. 2013; 182:35-42.

45. DuBay DA, Wang X, Adamson B i sur. Progressive fascial wound failure impairs subsequent abdominal wall repairs: a new animal model of incisional hernia formation. Surgery 2005; 137:463.

46. Franz MG, Smith PD, Wachtel TL i sur. Fascial incisions heal faster than skin: a new model of abdominal wall repair. Surgery. 2001;129:203.

47. Benjamin M, Hillen B. Mechanical influences on cells, tissues and organs–mechanical morphogenesis. Eur J Morphol 2003;41:3.

48. Santora TA, Roslyn JJ. Incisional hernia. Surg Clin North Am. 1993;73:557-70.

49. Pollock AV, Evans M. Early prediction of late incisional hernias. Br J Surg. 1989; 76:953-4.

50. Regnard JF, Hay JM, Rea S, Fingerhut A, Flamant Y, Maillard JN. Ventral incisional hernias: incidence, date of recurrence, localization and risk factors. Ital J Surg Sci 1988;18:259-65.

51. Mudge M, Hughes LE. Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. Br J Surg 1985;72:70-1.

52. Heger P, Pianka F, Diener MK, Mihaljevic AL. (Current standards of abdominal wall closure techniques: Conventional suture techniques). Chirurg 2016; 87:737-43.

53. Deerenberg EB, Harlaar JJ, Steyerberg EW i sur. Small bites versus large bites for closure of abdominal midline incisions (STITCH): a double-blind, multicentre, randomised controlled trial. Lancet 2015;386: 1254-60.

54. Muysoms FE, Antoniou SA, Bury K i sur. European Hernia Society guidelines on the closure of abdominal wall incisions. Hernia 2015;19:1-24.

55. Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection. Geneva: World Health Organization; 2016. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK401132/

56. Timmermans L, de Goede B, Eker HH, van Kempen BJ, Jeekel J, Lange JF. Meta-analysis of primary mesh augmentation as prophylactic measure to prevent incisional hernia.Dig Surg 2013;30:401-9.

57. Bhangu A, Fitzgerald JE, Singh P, Battersby N, Marriott P, Pinkney T. Systematic Review and Meta-Analysis of Prophylactic Mesh Placement for Prevention of Incisional Hernia Following Midline Laparotomy. Hernia 2013;17: 445-55.

58. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 2008;16:585-601.

59. Dubay DA, Wang X, Kuhn MA, Robson MC, Franz MG. The prevention of incisional hernia formation using a delayed-release polymer of basic fibroblast growth factor. Ann Surg 2004;240:179-86.

60. Franz MG, Kuhn MA, Nguyen K, Wang X, Ko F, Wright TE, Robson MC. Transforming growth factor beta(2) lowers the incidence of incisional hernias. J Surg Res 2001;97:109-16.

61. Heybeli T, Kulacoglu H, Genc V i sur. Basic fibroblast growth factor loaded polypropylene meshes in repair of abdominal wall defects in rats. Chirurgia (Bucur) 2010;105:809-16.

62. Plencner M, East B, Tonar Z i sur. Abdominal closure reinforcement by using polypropylene mesh functionalized with poly-ε-caprolactone nanofibers and growth factors for prevention of incisional hernia formation. Int J Nanomedicine 2014;9:3263-77.

63. den Hartog D, Dur AH, Tuinebreijer WE, Kreis RW. Open surgical procedures for incisional hernias. Cochrane Database Syst Rev. 2008 Jul 16;(3):CD006438. Dostupno na: doi: 10.1002/14651858.CD006438.pub2.

64. Luijendijk RW, Hop WCJ, van den Tol MP i sur. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. N Eng J Med 2000; 343:392-8.

65. Dumainian GA, Denham W. Comparison of rapair techniques for major incisional hernias. Am J Surg 2003;185:61-5.

66. Bittner R, Bingener-Casey J, Dietz U i sur. Guidelines for laparoscopic treatment of ventral and incisional abdominal wall hernias. Surg Endosc 2014;28:2-29.

67. Klinge U, Klosterhalfen B. Modified classification of surgical meshes for hernia repair based on the analyses of 1,000 explanted meshes. Hernia 2012;16: 251–58.

68. Pajtak A, Stare R, Biskup I, Lukic A, Skorjanec S, Hrzenjak K. A modified open intraperitoneal mesh (Garestin) technique for incisional ventral hernia repair. Asian J Surg 2017; 40:278-84.

69. Sikiric P, Petak M, Rucman R i sur. A new gastric juice peptide, BPC-an overview of stomach-stress- organoprotection hypothesis and BPC beneficial effects. J Phisiol (Paris) 1993; 87:313-27.

70. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. Inflammopharmacology 2006;14:214-21.

71. Dobric I, Drvis P, Petrovic I i sur. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC157. Pharmacol Sci. 2007;104:7-18.

72. Petrovic I, Dobric I, Drvis P i sur. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. J Pharmacol Sci 2006 Nov;102:269-77.

73. 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;499:285-90.

74. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials of inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatis) heals ileoileal anastomosis in the rat. Surg Today 2007;37:768-77.

75. 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;22:225-30.

76. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. J Orthop Res. 2006;24:1109-17.

77. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. J Orthop Res 2006;24:982-9.

78. Lazic R, Gabric N, Dekaris I, Bosnar D, Boban-Blagaic A, Sikiric P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. Coll Antropol 2005;29:321-5.

79. Bilic M, Bumber Z, Blagaic AB, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P. The stable gastric pentadecapeptide BPC 157, given locally, improves CO2 laser healing in mice. Burns 2005;31:310-15.

80. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. J Orthop Res 2003;21:976-83.

81. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S i sur. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. Burns 2003; 29:323-34.

82. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates chronic amphetamine-induced behavior disturbances. Acta Pharmacol Sin 2002;23:412-22.

83. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S i sur. Pentadecapeptide BPC 157 cream

improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. Burns 2001;27:817-27.

84. Stancic-Rokotov D, Slobodnjak Z, Aralica J i sur. Lung lesions and anti-ulcer agents beneficial effect: anti-ulcer agents pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, omeprazole and atropine ameliorate lung lesion in rats. J Physiol Paris 2001;95:303-8.

85. Stancic-Rokotov D, Sikiric P, Seiwerth S i sur. Ethanol gastric lesion aggravated by lung injury in rat. Therapy effect of antiulcer agents. J Physiol Paris 2001;95:289-93.

86. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G i sur. Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. J Physiol Paris 2001;95:283-8.

87. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. J Physiol Paris 2001;95:261-70.

88. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Focus on ulcerative colitis: Stabipe gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem 2012;19:126-132.

89. Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. Science 1992; 258:1862-5.

90. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/ [pristupljeno 2016 Aug 16].

91. Mehler AH. Amino, Nitroso, Nitro and Related Groups. John Wiley & Sons, Ltd, 2003; str: 973-977.

92. Whittle BJ, Boughton-Smith NK, Moncada S. Biosynthesis and role of the endothelium derived vasodilatator, nitric oxide in gastric mucosa. Ann NY Acad

Sci 1992;664:126-39.

93. Kitano T, Yamada H, Kida M, Okada Y, Saika S, Yoshida M. Impaired Healing of a Cutaneous Wound in an Inducible Nitric Oxide Synthase- Knockout Mouse. Dermatol Res Pract. 2017; [pristupljeno 2017 Oct 22]: 2184040.

94. 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: [pristupljeno 2017 Nov 02]: e0123454.

95. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des 2011;17:1612-32.

96. 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;12:36-45.

97. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević 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;332:23-33.

98. Barisic I, Balenovic D, Klicek R i sur. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The lifesaving effect of pentadecapeptide BPC 157. Regul Pept 2013;181:50-66.

99. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I i sur. Mortal furosemidehypokalemia-disturbances in rats NO-system related shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 peptide More Than With L-Arginine. J Clin Exp Cardiolog 2012;3:201.

100. 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;108:7-17.

101. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS i sur. Doxorubicinecongestive heart failure increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci 2004;95:19-26.

102. 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;54:46-56.

103. 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;66:581-90.

104. Cesarec V, Becejac T, Misic M i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. Eur J Pharmacol 2013;701:203-12.

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

106. Baric M, Sever AZ, Vuletic LB i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals rectovaginal fistula in rats.Life Sci. 2016;148:63-70.

107. 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 7;156:83-9.

108. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B i sur. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. J Physiol Paris 1997; 91:139-49.

109. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević 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;332:23-33.

110. Turkovic B, Sikiric P, Seiwerth S i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. Gastroenterology 2004;126:287.

111. Kokot A, Zlatar M, Stupnisek M i sur. NO system dependence of atropine-induced mydriasis and L-NAME- and L-arginine-induced miosis: reversal by the pentadecapeptide BPC 157 in rats and guinea pigs. European J Pharmacol 2016;771:211-219.

112. Alfirević I, ur. Nauka o čvrstoći I. Zagreb: Tehnička knjiga, 1995.

113. Jecić S, ur. Jednadžbe teorije elastičnosti, udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, 2001.

114. Surjak M. Validacija numeričkih modela mehaničkoga ponašanja životinjskih i ljudskih kostiju. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje, 2015.

115. Tomičević Z. Identification of the mechanical properties of nodular graphite cast iron via multiaxial tests. Dvojni doktorat, Sveučilište u Zagrebu, École normale supérieure de Cachan, 2015.

116. Pravilnici kojih se potrebno pridržavati u istraživanjima koja se rade na pokusnim životinjama. Dostupno na: http://mef.unizg.hr/znanost/eticka-povjerenstva/povjerenstvo-za-dobrobit-zivotinja

117. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Dostupno na: https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf

118. Rossi LF, Ramos RR, Kestering Dde M, Soldi Mda S, Ely JB, d'Acampora AJ. Tensile strengthstudy of the abdominal wall following laparotomy synthesis using three types of surgical wires in Wistar rats. Acta Cir Bras 2008;23:73-7.

119. du Prel JB, Röhrig B, Hommel G, Blettner M. Choosing Statistical Tests. Dtsch Arztebl Int 2010; 107(19):343-8.

120. https://iacuc.upenn.edu/Documents/iacuc/guidelines/iacucguideline-humaneendpoints-8%2023%2011.pdf

121. http://www.research.psu.edu/policies/research-protections/iacuc/iacuc-guideline-xx

122. Morton DB. A Systematic Approach for Establishing Humane Endpoints. ILAR Journal. 2000; 41:80-86

123. Hendriksen CFM, Morton DB., ur. Humane endpoints in animal experiments for biomedical research. U: Proceedings of the internacional conference. Laboratory animals supplement Zeist, Netherlands: Royal Society of Medicine Press Limited, 1998.

124. Wahl W, Menke H, Schnütgen M i sur. Die Fasciendehiscenz -Ursache und Prognose. Chirurg 1992;63:666–671.

125. Gislason H, Grønbech JE, Søreide O. Burst abdomen and incisional hernia after major gastrointestinal operations - comparison of three closure techniques. Eur J Surg 1995;161:349–354.

126. Penninckx FM, Poelmans SV, Kerremans RP i sur. Abdominal wound dehiscence in gastroenterological surgery. Ann Surg 1979;189:345–352.

127. Poulose BK, Shelton J, Phillips S i sur. Epidemiology and cost of ventral hernia repair: making the case for hernia research. Hernia 2012;16:179-83.

128. Gillion JF, Sanders D, Miserez M, Muysoms F. The economic burden of incisional ventral hernia repair: a multicentric cost analysis. Hernia 2016; 20:819-830.

129. Kliček 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;64:597-612.

130. Stambolija V, Stambolija TP, Holjevac JK i sur. BPC 157: The counteraction of succinylcholine, hyperkalemia, and arrhythmias. Eur J Pharmacol. 2016;781:83-91.

131. Medvidovic-Grubisic M, Stambolija V, Kolenc D i sur. Hypermagnesemia disturbances in rats, NO-related: pentadecapeptide BPC 157 abrogates, L-NAME and L-arginine worsen. Inflammopharmacology. 2017;25:439-449.

132. 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: 1972-89.

133. Kang EA, Han YM, An JM i sur. BPC157 as potential agent rescuing from cancer cachexia. Curr Pharm Des. 2018; 24: 1947-56.

134. Tomlinson RE, Shoghi KI, Silva MJ. Nitric oxide-mediated vasodilation increases blood flow during the early stages of stress fracture healing. J Appl Physiol (1985). 2014;116:416-24.

135. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. Inflamm Res. 2011; 60:347-56.

136. Tomiosso TC, Nakagaki WR, Gomes L, Hyslop S, Pimentel ER. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. Cell Tissue Res. 2009; 337:235-42.

137. Hamilton C, Saqib N, Howdieshell TR. Unexpected wound effects of local arginine infusion: reduced granulation tissue formation and elevated homocysteine concentrations .Wounds. 2008; 20:325-33.

138. Heffernan D, Dudley B, McNeil PL, Howdieshell TR. Local arginine supplementation results in sustained wound nitric oxide production and reductions in vascular endothelial growth factor expression and granulation formation. J Surg Res 2006; 133:46-54.

139. Arbos MA, Ferrando JM, Quiles MT i sur. Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration. Biomaterials. 2006;27:758-68.

140. Arbos MA, Ferrando JM, Vidal J i sur. Early effects of exogenous arginine after the implantation of prosthetic material into the rat abdominal wall. Life Sci 2000;67:2493–512.

141. Albina JE, Mills CD, Henry Jr.WL, Caldwell MD. Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. J Immunol 1990;144:3877–80.

142. Schweighofer B, Schultes J, Pomyje J, Hofer E. Signals and genes induced by angiogenic growth factors in comparison to inflammatory cytokines in endothelial cells, Clin Hemorheol. Microcirc 2007; 37 : 57–62.

143. Hsieh MJ, Liu HT, Wang CN i sur. Therapeutic potential of pro-angiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and up-regulation. J Mol Med (Berl). 2017; 95:323-333.

144. Zemba M, Cilic AZ, Balenovic I i sur. BPC 157 antagonized the general anaesthetic potency of tiopental and reduced prolongation of anaestesia induced by L-NAME/thiopental combination. Inglammopharmacology. 2015; 23:329-36.

145. Djakovic Z, Djakovic I, Cesarec V i sur. Esophagogastric anastomosis in rats: Improved healing by BPC 157 and L-arginine, aggravated by L-NAME. World J Gastroenterol. 2016;22:9127-9140.

146. 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; 25:255-264.

147. Belosic Halle Z, Vlainic J, Drmic D i sur. Class side effects: decreased pressure in the lower oesophageal and the pyloric sphincters after the administration of dopamine antagonists, neuroleptics, anti-emetics, L-NAME, pentadecapeptide BPC 157 and L-arginine. Inflammopharmacology. 2017; 25:511-522.

148. Vukojević J, Siroglavić M, Kašnik K i sur. Rat inferior caval vein (ICV) ligature and particular new insights with the stabile gastric pentadecapeptide BPC 157. Vascul Pharmacol. 2018; 106:54-66.

149. Duzel A, Vlainic J, Antunovic M i sur. Stabila gastric pentadecapeptide BPC 157 in the treatment of colitis and ischemia and reperfusion in rats: New insights. World J Gastroenterol. 2017; 23:8465-8488.

150. Hsieh MJ, Liu HT, Wang CN i sur. Therapeutic potential of proangiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and upregulation. J Mol Med (Berl) 2017; 95: 323-33.

151. 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.

152. Chang CH, Tsai WC, Hsu YH, Pang JH. Pentadecapeptide BPC 157 enhances the growth hormone receptor expression in tendon fibroblasts. Molecules 2014; 19: 19066-77.

153. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Pang JH. The promotingeffect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. J Appl Physiol(1985) 2011; 110: 774-80.

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

155. Liakakos T, Thomakos N, Fine PM, Dervenis C, Young RL. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Dig Surg 2001; 18:260–273.

156. Ellis H, Moran BJ, Thompson JN i sur. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. Lancet 1995; 3533:1476–1480.

157. Lower AM, Hawthorn RJ, Ellis H, O'Brien F, Buchan S, Crowe AM. The impact of adhesions on hospital readmissions over ten years after 8849 open gynaecological operations: an assessment from the Surgical and Clinical Adhesions Research Study. BJOG 2000;107:855–862.

158. Aramis User Manual – Software, GOM mbH, Njemačka 2009.

159. Deplano V, Boufi M, Boiron O, Guivier-Curien C, Alimi Y, Bertrand E. Biaxial tensile tests of the porcine ascending aorta. J Biomech 2016;49:2031-37.

11. POPIS SLIKA I TABLICA

SLIKE:

Slika 1. Prikaz hernije trbušnoga zida

Slika 2. Anatomija trbušnoga zida štakora. Označene su anatomske strukture trbušne stijenke štakora: *linea alba* /1/, *m. rectus abdominis* /2/ i *m. obliquus externus* /3/

Slika 3. Molekula BPC 157

Slika 4. Mjerna površina uzorka sa stohastičkim rasterom i definiranom fasetom. **A.** Uzorak u referentnome neopterećenom stanju i **B.** Uzorak u opterećenome stanju

Slika 5. Operativni zahvat. **A.** Štakor pripremljen za operativni zahvat /1/, **B.** Formirani kožni zalistak /2/, **C.** Incizija 60 mm duž bijele linije /3/, **D.** Proksimalnih 10 mm zašiveno produžnom tehnikom /4/, preostali dio rane još nezatvoren /5/ (bijela strelica pokazuje granicu proksimalnog dijela rane šivanog produžnom tehnikom i kaudalnog dijela rane), **E.** Kranijalni dio rane zašiven produžnom tehnikom /6/ (vidi /4/), ranije nezatvoreni dio (vidi /5/) sada je zatvoren /7/: fascija zašivena pojedinačnim šavovima u razmacima 5 mm u distalnih 50 mm miofascijalne rane, što predstavlja „*locus minoris resistentiae*" za formiranje hernije u distalnih 50 mm rane /7/ (bijela strelica pokazuje fasciju zašivenu pojedinačnim šavovima u razmacima 5 mm), **F.** Konačni vanjski izgled, zašiven kožni zalistak /8/ (vidi ranije /2/)

Slika 6. Preparat za biomehaničku analizu. **A.** Trbušna stijenka: šavna linija duljine 60 mm u središtu trbušne stijenke /1/, *m. rectus abdominis* /2/, *m. obliquus internus* /3/, **B.** Ekscidirani preparat dimenzija 5 mm x 60 mm sa šavnom linijom duljine 5 mm u središtu preparata /4/

Slika 7. Eksperimentalni postav. **A.** Statička kidalica Beta 50-5 (Messphysik, Austrija); **B.**, **C.** Optički beskontaktni mjerni sustav Aramis (GOMmbH, Njemačka)

Slika 8. Prihvatne pločice

Slika 9. Ispitivanje vlačne čvrstoće uzorka. **A.** Preparat se fiksirao tako tako da se sa svake strane ispitivanoga dijela (rane) ostavilo minimalno 10 mm slobodnoga tkiva (šavna linija u središtu /1/); **B.** Kvazistatičkim opterećenjem brzinom 5 mm/min okomito na ranu dolazi do pucanja preparata (pucanje šavne linije /2/)

Slika 10. Obojani preparat

Slika 11. Određivanje polja pomaka. **A.** Optički beskontaktni mjerni sustav Aramis pomoću dvije digitalne kamere (CCD kamere Dalsa Falcon 4M60 s frekvencijom od 60 do 480 Hz i rezolucijom 2358 × 1728 piksela) analizira objektni raster nastao bojenjem preparata (vidi slika 10); **B.** Uočavaju se deformacije rastera točaka na mjernoj površini objekta /1/ (usporedi sa slikom 10), u tijeku vlačnog opterećenja koje dovodi i do pucanja preparata u šavnoj liniji /2/

Slika 12. Hernija. Ilustrativni prikaz vanjskog izgleda hernije u kontrolnih štakora (lijevo, crveni isprekidani krug) nakon 28 dana, te normalna prezentacija bez vidljive hernije (desno, žuti krug) u štakora koji su dobivali BPC 157 u pijućoj vodi

Slika 13. Ilustrativni prikaz posljedica operacije prema Dubayju na trbušnom zidu. **A.** Prikaz hernije u kontrolnih štakora (strelica) nakon 21 dan, **B.** Redovita normalna prezentacija bez vidljive hernije (strelica) u štakora koji su dobivali BPC 157 u pijućoj vodi

Slika 14. Ilustrativni prikaz posljedica operacije prema Dubayju na trbušnom zidu. **A.** Prikaz veličine hernije u kontrolnih štakora (strelica) nakon 14 dana, **B.** Značajno manja hernija (strelica) u štakora koji su dobivali BPC 157 u pijućoj vodi nakon 21 dan, **C.**, **D.** Redovito značajno veće hernije u (dolje, lijevo, desno) štakora koji su

primali svakodnevno NO-agense, L-arginin (C), odnosno L-NAME (D) nakon 14 dana. To u velikoj mjeri objašnjava skori nastanak dehiscencije u tih životinja

Slika 15. Ilustrativni prikaz dehiscencije s evisceracijom kao posljedica operacije prema Dubayju i svakodnevne primjene NO-agensa. **A.** Štakor tretian L-argininom 14 dana, **B.** Štakor tretian L-NAME-om 14 dana, **C.** Štakor tretian L-NAME-om 21 dan, **D.** Štakor tretian L-NAME + L-arginin 28 dana

Slika 16. Ilustrativni prikaz kožnog ožiljka nakon 14 dana od operacije prema Dubayju. **A.** Uredno cijeljenje (u životinja koje su primale BPC 157 u pijućoj vodi), **B.** Parcijalni defekt (kod kontrolne skupine), **C.** Ulkus rane (kod primjene L-arginina), **D.** Dehiscencija (kod primjene L-NAME)

Slika 17. Ilustrativni prikaz trbušnih priraslica nakon operacije prema Dubayju. **A.** Izostanak priraslica (u životinja koje su primale BPC 157 u pijućoj vodi), **B.** Priraslice omentuma (strelica) (kontrolna skupina, 28 dana), **C.** Piraslice crijeva (L-arginin, 7 dana), **D.** Priraslice crijeva i omentuma (L-NAME, 7 dana)

Slika 18. Dijagram sila-pomak za kontrolnu skupinu 28 dana. (Izvorno očitanje statičke kidalice Beta 50-5: engl. load= hrv. sila; engl. stroke= hrv. pomak)

Slika 19. Dijagram sila-pomak za skupinu BPC 28 dana.(Izvorno očitanje statičke kidalice Beta 50-5: engl. load= hrv. sila; engl. stroke= hrv. pomak)

Slika 20. Potencijalni molekularni mehanizam djelovanja BPC 157 kod štakora s hernijom i dehiscencijom hernije temeljem nalaza da BPC 157 antagonizira mišićnu kaheksiju koja inače nastaje nakon implantacije tumora (adenokarcinom kolona, C-26). Isto tako, s antagoniziranjem porasta proinflamatornih citokina (IL-6, TNF-α) značajno imajući u vidu metabolizam mišića relevantan za tumorsku kaheksiju, BPC 157 antagonizira propadanje mišića, antagonizira poremećenu mišićnu proliferaciju i miogenezu, te promjene u ekspresiji FoxO3a, p-AKT, p-mTOR i P-GSK-3β (133)

Slika 21. Ilustracija kako benefitno djelovanje BPC 157 nadjačava negativni učinak i NOS-blokade (L-NAME + BPC 157), i negativni učinak NOS-(hiper)stimulacije (L-arginin + BPC 157), kao i negativni učinak imobilizacije NO-sustava kod zajedničke primjene NOS-blokade i NOS-(hiper)stimulacije (L-NAME + L-arginin + BPC 157) te uspostavlja svoje primarno djelovanje (izostanak dehiscencije)

Slika 22. Ilustracija učinaka pentadekapeptida BPC 157 jest primjerice antagonizacija suprotnih učinaka; i hipertenzije koju izaziva L-NAME, kao i hipotenzije koju izaziva L-arginin, bez učinka na normalni krvni tlak, uz indukciju NO iz želučanih homogenata (8)

TABLICE:

Tablica 1. Klasifikacija hernija

Tablica 2. EHS klasifikacija incizijskih hernija (Prema izvornoj tablici (32))

Tablica 3. Broj životinja u svakoj skupini prema korištenim preparatima i kombinacijama preparata te prema intervalu praćenja

Tablica 4. Ordinalna skala prezentacije kožnog ožiljka

Tablica 5. Ordinalna skala prsutnosti trbušnih priraslica

Tablica 6. Prisutnost hernije u ispitivanim skupinama životinja

Tablica 7. Veličina hernije u ispitivanim skupinama životinja

Tablica 8. Prisutnost dehiscencije u ispitivanim skupinama životinja

Tablica 9. Prezentacija kožnog ožiljka u ispitivanih skupina životinja

Tablica 10. Prezentacija trbušnih priraslica u ispitivanih skupina životinja

Tablica 11. Vlačna čvrstoća rane (sila pucanja rane) u ispitivanih skupina životinja

12. KRATKA BIOGRAFIJA

Rođen sam 24. siječnja 1983. u Varaždinu. Završio sam opću gimnaziju u Varaždinu. Diplomirao sam 2008. godine na Medicinskome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Pripravnički staž završio sam u OB Varaždin. U srpnju 2009. primljen sam na radno mjesto liječnika „sekundarca“. U travnju 2010. započeo sam specijalizaciju iz opće kirurgije, u kolovozu 2012. specijalizaciju iz abdominalne kirurgije u OB Varaždin te 24. kolovoza 2017. položio specijalistički ispit i stekao naslov - specijalist abdominalne kirurgije.

U studenome 2009.: suradničko zvanje asistenta Visoke škole na Sveučilištu Sjever.

U svibnju 2017.: suradničko zvanje predavača Visoke škole na Tekstilno-tehnološkome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Godine 2013. upisao sam poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskome fakultetu u Zagrebu.

U rujnu 2014. godine završio sam tečaj za osposobljavanje treće kategorije osoba koje rade s pokusnim životinjama.

U svibnju 2014. izabran te u svibnju 2018. reizabran za člana Upravnoga odbora HDEK-a, u listopadu 2017. za člana Upravnoga odbora CroERAS-a.

Završio sam brojne stručne i znanstvene tečajeve, sudjelovao sam na brojnim nacionalnim i međunarodnim kongresima i sastancima.

Autor sam tri izvorna znanstvena rada u CC časopisima, dva kongresna priopćenja u CC časopisu te 20 sažetaka u zbornicima skupova. Suradnik sam u izradi veleučilišnoga udžbenika kirurgije.