

Učinak pentadekapeptida BPC 157 na regeneraciju jetara štakora nakon subtotalne resekcije

Crvenković, Dalibor

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:105:912414>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dalibor Crvenković

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 na
regeneraciju jetara štakora nakon
subtotalne resekcije**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dalibor Crvenković

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 na
regeneraciju jetara štakora nakon
subtotalne resekcije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

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

Mentor: prof.dr.sc. Predrag Sikirić, dr.med.

Su mentor: prof.dr.sc. Žarko Rašić, dr.med. prim.dr.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Predragu Sikiriću i prof. dr. sc. Žarku Rašiću na ukazanoj podršci, nesebičnom trudu, strpljivosti i svesrdnoj pomoći, bez kojih ovaj znanstveni rad ne bi bio moguć.

Posebnu zahvalnost izražavam dr. sc. Marku Severu zbog iznimne pomoći u izvođenju ovog znanstvenog istraživanja.

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica.....	iv
1. UVOD I SVRHA RADA	1
UVOD.....	1
DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA:	3
Regeneracijski faktori.....	3
BPC 157	3
Animalni modeli.....	11
Štakorska jetra	11
Resekcije štakorske jetre	15
Mehanizmi oštećenja i regeneracije jetre	17
Signalne molekule uključene u mehanizme oštećenja i regeneracije jetre.....	23
Stanično - molekularna podloga oštećenja i regeneracije jetre	57
Metode verifikacije oštećenja i regeneracije jetre	62
Analgezija i anestezija laboratorijskih životinja.....	74
2. HIPOTEZA	77
3. CILJEVI RADA.....	78
Opći cilj	78
Specifični ciljevi.....	78
4. MATERIJALI I METODE	79
PROTOKOL ISTRAŽIVANJA	79
PENTADEKAPEPTID BPC 157.....	81
PROTOKOL 70% RESEKCIJE JETRE	81
PROTOKOL ANALIZE MATERIJALA	85
Biokemijska analiza	86
Makroskopska analiza	86

Patohistološka analiza	86
PROTOKOL ANALIZE PRIKUPLJENIH PODATAKA.....	87
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	92
ALBUMIN ŠTAKORA.....	96
Statistička analiza	99
ALT ŠTAKORA	105
Statistička analiza	108
AST ŠTAKORA.....	113
Statistička analiza	117
BILIRUBIN ŠTAKORA	123
Statistička analiza	126
MASA OSTATNE JETRE ŠTAKORA.....	131
Statistička analiza	134
POVRŠINA HEPATOCITA ŠTAKORA	141
Statistička analiza	144
PROMJER JEZGRE HEPATOCITA ŠTAKORA.....	152
Statistička analiza	155
UKUPNA TJELESNA MASa ŠTAKORA.....	157
Statistička analiza	160
OMJER MASE JETRE PREMA UKUPNOJ MASI ŠTAKORA	169
Statistička analiza	172
6. RASPRAVA	179
POZITIVAN UČINAK BPC-a NA OPORAVAK OSTATNE JETRE.....	184
NEOVISNOST UČINKA BPC-a O DOZI I NAČINU APLIKACIJE.....	186
OVISNOST UČINKA BPC-a O TRAJANJU PRIMJENE	187
Albumin.....	189
ALT	192

AST.....	195
Bilirubin.....	198
Masa ostatne jetre štakora	201
Površina hepatocita.....	205
Promjer jezgre hepatocita	208
Ukupna tjelesna masa štakora	211
Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora	215
7. ZAKLJUČAK	218
8. SAŽETAK.....	223
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU.....	225
10. POPIS LITERATURE	227
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	239

Popis oznaka i kratica

engl.	engleski
sin.	sinonim
BPC 157	Body Protecting Compound, želučani pentadekapeptid BPC 157
FLR	Functional Liver Remnant, funkcionalni jetreni ostatak, ostatna jetra
PHLF	Post Hepatectomy Liver Failure, postresekcijska insuficijencija jetre
SFSS	Small For Size Syndrome, sindrom nedostatne jetre
RFA	Radio Frequency Ablation, radiofrekventna ablacija
TACE	Trans Arterial Chemo Embolisation, transarterijalna kemoembolizacija
SIRT	Selective Internal Radio Therapy, selektivna interna radio terapija
PVL	Portal Vein Ligation, ligiranje ogranaka portalne vene
PVE	Portal Vein Embolisation, embolizacija ogranaka portalne vene
IL6, IL10	interleukini
HGF	Hepatocyte Growth Factor), faktor rasta hepatocita
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermalni faktor rasta
EGR-1	Early Growth Response Protein 1, protein rane faze upalnog odgovora
NSAIL	Nesteroidni antiinflamatorni lijekovi
CL	Caudate Lobe, kaudalni režanj štakorske jetre
RLL	Right Liver Lobe, desni režanj štakorske jetre
ML	Median Lobe, srednji režanj štakorske jetre
LLL	Left Lateral Lobe, lijevi lateralni režanj štakorske jetre
CP	Caudate Processus, kaudalni procesus kaudalni režnja štakorske jetre
AC	Anterior Caudate lobe, prednji režnjić kaudalnog režnja štakorske jetre
PC	Posterior Caudate lobe, stražnji režnjić kaudalnog režnja štakorske jetre
SRL	Superior Right Lobe, gornji desni režnjić desnog režnja štakorske jetre
IRL	Inferior Right Lobe, donji desni režnjić desnog režnja štakorske jetre
RML	Right Median Lobe, desni srednji režnjić srednjeg režnja štakorske jetre
LML	Left Median Lobe, lijevi srednji režnjić srednjeg režnja štakorske jetre
RLW/BW	Remnant Liver Weight / Body Weight ratio, odnos mase ostatne jetre prema ukupnoj masi tijela
MOF	Multi Organ Failure, multiorgansko zatajenje
TNF α	Tumor Necrotic Factor α , tumor nekrotizirajući faktor (citokin)

TGF β	Transforming Growth Factor β , transformirajući faktor rasta (citokin)
NO	Nitric Oxide, dušični oksid
L-ARG, LA	L-arginin
L-Cit	L-citrulin
NOS	Nitric Oxide Synthetase, sintetaza dušičnog oksida
nNOS	neuronalna sintetaza dušičnog oksida
eNOS	endotelijska sintetaza dušičnog oksida
iNOS	infekcijska odnosno inducirana sintetaza dušičnog oksida
CaM	kalmodulin
NOSIs	NOS Inhibitors, inhibitori sintetaza dušičnog oksida
L-NAME	L-nitoarginin metilester
GC	gvanilat ciklaza
ShvO ₂	Hepatic venous oxygen saturation, saturacija kisikom krvi hepatalne vene
GSH	reducirani glutation
GSSG	oksidirani glutation
LRR	Liver Regeneration Rate, indeks regeneracije jetre
i.p.	intraperitonealno
p.o.	per os, peroralno
F.O.	fiziološka otopina (0,9% NaCl)
H0	null hipoteza (utvrđene razlike nisu statistički značajne)
H1	alternativna hipoteza (utvrđene razlike su statistički značajne)
K-W	Kruskal – Wallis H test (neparametrijski test za nezavisne uzorke)
M-W	Mann – Whitney U test (neparametrijski test za nezavisne uzorke)

1. UVOD I SVRHA RADA

UVOD

Resekcija je standardna kirurška metoda liječenja, koja se primjenjuje najčešće u terapiji primarnih i sekundarnih neoplastičkih tvorbi jetre.

Razvojem hepatalne kirurgije, operativni se zahvat danas izvodi sa minimalno komplikacija, pogotovo u centrima specijaliziranim za kirurgiju jetre (1,2). Ishod liječenja u velikoj mjeri određuje funkcija ostatne jetre, tj. jetrenog parenhima koji ostaje nakon resekcije, engl. Functional / Future Liver Remnant (FLR), jer se resekcijom osim patološki promijenjenog, odstranjuje i manja ili veća količina funkcionalno vitalnog – intaktnog tkiva. Unatoč toga resekcija jetre se smatra superiornom u odnosu na druge tehnike liječenja primarnih i sekundarnih neoplastičkih tvorbi jetre (sistemska kemoterapija, RFA – radiofrekventna ablacija, TACE – transarterijalna kemoembolizacija, SIRT – selektivna interna radio terapija), koje su za razliku od resekcije, palijativne prirode (1,2,11,3–10). Upravo odstranjenje značajnog volumena intaktnog jetrenog parenhima ograničavajući je faktor resekcija jetre, kako u selekciji bolesnika za zahvat tako i u ishodu liječenja (1,2,4,10–13). Jetreni ostatak mora istovremeno obavljati dvije funkcije: održati postojeću funkciju jetre i nadoknaditi izgubljeni parenhim (4). Ukoliko u tome ne uspije, razvija se postresekcijska insuficijencija jetre, engl. Post Hepatectomy Liver Failure (PHLF), odnosno u slučaju transplantacije sa živog donora sindrom nedostatne jetre, engl. Small For Size Syndrome (SFSS) (1,2,4,10–13). Postresekcijska jetrena insuficijencija nastaje nakon odstranjenja sedamdeset ili više postotaka mase (volumena) zdrave jetre (resekcija jetre zdravog donora) (12), dok tumorom zahvaćena jetra, pogotovo ako je istovremeno prisutna i difuzna bolest jetre (hepatitis, ciroza) razvija dekompenzaciju i nakon manjih resekcija. Sa kirurškog gledišta najviše rizika za razvoj postresekcijske jetrene insuficijencije postoji kod desne hepatektomije (resekcira se oko 70% parenhima) i / ili resekcije radi hepatocelularnog karcinoma (koji se često razvija na podlozi ciroze i / ili hepatitisa) (1,11,12). Sindrom nedostatne jetre (SFSS) je kliničko stanje karakterizirano sa prolongiranom kolestazom, koagulopatijom i ascitesom unutar tjedan dana od parcijalne transplantacije (dio jetre živog donora) uzrokovano neadekvatnom metaboličkom funkcijom uredno vaskulariziranog transplantata u primatelja. Radi procjene

rizika od postresekcijske insuficijencije, a s time povezane i selekcije kandidata pogodnih za operativnih zahvat razvijene su metode prijeoperacijske evaluacije jetrene funkcije i procjene minimalno potrebnog volumena ostatne jetre. Za procjenu funkcije jetre koriste se razne klasifikacije: Child-Pugh klasifikacija, MELD klasifikacija (linearni regresijski model baziran na vrijednostima bilirubina, kreatinina i INR-a), mjerenje retencije zelenog indocijanina (ICG), scintigrafija tehnecijem vezanim na sintetski humani albumin (99m-Tc-GSA), odnos PBA/hipurati 30 min. po davanju PBA, test eliminacije aminokiselina, izdisajni testovi nakon i.v. aplikacije aminopirina ili peroralne primjene fenilalanina, mjerenje serumske koncentracije metabolita MEGX nakon i.v. aplikacije lidokaina, test eliminacije galaktoze nakon i.v.aplikacije, test eliminacije d-sorbitola nakon i.v.aplikacije (12). Za procjenu minimalno potrebnog volumena ostatne jetre prema veličini bolesnika koristi se CT volumetrija i izračunavanje standardiziranog FLR (11). Kada se prijeoperacijskom obradom utvrdi da procijenjeni ostatni dio jetre nije dostatan, bolesnik može biti liječen ili palijativno ili transplantacijom jetre ili ga se može pokušati kondicionirati za resekcijski zahvat ligiranjem ili embolizacijom ogranka portalne vene, engl. Portal Vein Ligation (PVL), Portal Vein Embolisation (PVE) (10,11). Metoda prijeoperacijske hipertrofije jetre, ligiranjem ili embolizacijom ogranka vene porte za dio jetre koji se planira odstraniti resekcijom, rezultira hiperplazijom dijela jetre koji ostaje nakon resekcije. Tim invazivnim postupkom (bilo da se izvodi kirurški ili radiološki), nedovoljan FLR može postati zadovoljavajući, te bolesnik koji predhodno nije bio kandidat za resekcijski zahvat može biti operiran. Međutim za adekvatnu hiperplaziju potrebno je 4-8 tjedana (10,11), tijekom kojih kod cirotične jetre može nastupiti dekompenzacija (10). Za sada ne postoji neinvazivna metoda kojom bi se postigli rezultati kakvi se postižu portalnom venskom embolizacijom, niti pouzdana metoda kojom bi se postiglo adekvatno kondicioniranje poslijeresekcijske jetre.

S obzirom da je na animalnim modelima utvrđeno, da pentadekapeptid BPC 157 pozitivno djeluje na jetru oštećenu različitim agensima, u ovom radu istraživano je, da li BPC 157 pospješuje restituciju funkcije i regeneraciju parenhima u ostatnoj jetri štakora nakon 70% resekcije.

Istraživanje je modelirano slično kao i u već objavljenim radovima, tj. nakon anesteziranja životinja učinjana je resekcija jetre, potom su životinje praćene do trenutka žrtvovanja, kada su uzeti uzorci krvi za laboratorijsku analizu i ekstripirana ostatna jetra za makroskopska mjerenja i analizu tkiva.

DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA:

Regeneracijski faktori

Trenutno ne postoji klinička metoda kondicioniranja jetre farmakološkim putem, iako su na animalnim modelima, provedena brojna istraživanja učinaka raznih proliferacijskih faktora na regeneraciju resecirane jetre: interleukini IL6 i IL10, faktor rasta hepatocita, engl. Hepatocyte Growth Factor (HGF), epidermalni faktor rasta, engl. Epidermal Growth Factor (EGF), faktori rasta fibroblasta, eritropoetin, glukagon i inzulin (14–22).

Primjena eritropoetina, HGF, IL6, IL10 potiče proces regeneracije jetre kod štakora s opsežnom resekcijom jetre (14–21), kao i kombilirana primjena glukagona i inzulina, za razliku od samostalne primjene koja nema učinka (22). Osim proliferativnih faktora, proučavani su i inhibitori stanične proliferacije: citostatik doksorubicin, inhibitor tirozin kinaze AEE788, oktreotid (somatostatin) (23–25). Doksorubicin primjenjen u štakora ne inhibira proces regeneracije jetre (23), inhibitor tirozin kinaze AEE788 koji ima antitumorski učinak u glodavaca ne djeluje na proces regeneracije jetre (24), dok primjena somatostatina kod hepatektomiranih štakora suprimira regeneraciju jetre i smanjuje ukupno preživljavanje (25).

BPC 157

Za istraživanje je kao regeneratorni faktor odabran pentadekapeptid BPC 157, za koji do sada nije proučavano djelovanje na regeneraciju postresekcijske jetre (FLR), iako se radi o opsežno proučavanom polipeptidu, što je vidljivo iz mnoštva dosada objavljenih radova, uključujući i 14 preglednih članaka (26,27,36–39,28–35). Rezultati prikazani u radovima dobijeni su istraživanjima na eksperimentalnim životinjama, najčešće na štakorskom modelu. Međutim usprkos činjenici da je najveći broj istraživanja proveden na eksperimentalnim životinjama, BPC 157 je ušao i u fazu kliničkih ispitivanja u sklopu terapije upalnih bolesti crijeva pod proizvođačkim (Pliva, Hrvatska) nazivom PL 14736, PL 10, PLD-116, poglavito ulceroznog kolitisa (26,28–30,33,34,39–42) i multiple skleroze (26,29). Tijekom kliničkih ispitivanja nisu registrirane nuspojave (28,37,40–42), niti je pretkliničkim pokusima provedenim radi ispunjavanja uvjeta za provođenje kliničkih ispitivanja prve i druge faze utvrđena letalna doza

(LD₁) koja rezultira letalitetom 1% ispitivane populacije eksperimentalnih životinja (28,30,32,37,40–42), kao ni toksični učinak (26,28,30,33,34,39–42).

BPC, engl. Body Protecting Compound, polipeptid ekstrahiran iz želučanog soka, molekulske mase 40 000 (35), ima dokazan citoprotektivni učinak (35). Za učinke BPC-a se smatra odgovorna parcijalna sekvenca od 15 aminokiselina molekulske mase 1418,5 nazvana BPC 157 (35). Dosadašnjim istraživanjima, utvrđeno je da BPC 157 protektivno djeluje na jetru tretiranu visokim dozama nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL), te alkohola, poboljšava cijeljenje ileo-ilealnih i kolo-kolo anastomoza, kao i adaptaciju crijeva pri sindromu kratkog crijeva, te posjeduje snažno antiulkusno djelovanje u cijelom probavnom sustavu (35,40,49,41–48). Između ostalog je utvrđeno, da BPC 157 ima bolji učinak na cijeljenje ulkusa od standardne terapije, zatim na cijeljenje drugih vrsta rana dan lokalno ili sistemski (35,50–55), da kod crijevnih anastomoza poboljšava sve parametre cijeljenja rane (44,45,49), te poboljšava proces epitelizacije, naime BPC 157 potiče ekspresiju gena za protein ranog odgovora rasta, engl. Early Growth Response Protein 1 (EGR-1) koji inducira proizvodnju citokina i faktora rasta, te ranu tvorbu izvanstaničnog matriksa, čime se objašnjava poboljšano cijeljenja rana (43,52,56–58). BPC 157 poništava negativan učinak različitih nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL), pa tako i diklofenaka, utječe i modulira NO sustav, koji je važan kod oštećenja jetre i kod očuvanja integriteta gastrointestinalne sluznice (39,46,65–67,47,48,59–64). Pentadekapeptid BPC 157 poništava alkoholom, CCl₄, inzulinom, induciranom ishemijom i paracetamolom uzrokovana oštećenja jetre, ulceracije sluznice gastrointestinalnog trakta, te potiče angiogenezu i proces cijeljenja različitih tkiva (35,39,48–57,40,58–67,41–47). Kod svih navedenih učinaka potvrđena je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 kod različitih doza (μg/kg odnosno ng/kg tjelesne težine laboratorijske životinje) i različitih načina primjene (per os, intraperitonealno, subkutano).

BPC 157 u kontekstu Robert-ovog i Selye-evog modela

Robert-ov i Selye-ev model predstavljeni u ranim četrdesetima (Selye) odnosno ranim sedamdesetima godinama (Robert) dvadesetog stoljeća, zapravo ne predstavljaju ništa osobito ili nepoznato u modernoj medicini. Oba modela vrlo blisko odgovaraju terminima suficijencije, kompenzacije, insuficijencije i dekompenzacije. Međutim u kontekstu vremena u kojem su nastali i tadašnjeg stupnja razvoja medicine, shvatljivo je zašto su dugo vremena bili inspiracija za veliki broj radova pisanih na temu navedenih modela. Organ ili organizam koji uredno funkcionira u standardnim tj. bazalnim uvjetima (homeostaza), ako je izložen povećanom opterećenju ili noksi pokreće lokalne i/ili sistemske kompenzatorne mehanizme,

kako bi spriječio insuficijenciju što predstavlja adaptaciju na novo stanje. Time postaje suficijentan tj. obnavlja homeostazu, ali na uštrb povećanog iscrpljivanja, koje ukoliko predugo traje ili ako je uzrok presnažan u konačnici rezultira insuficijencijom i dekompenzacijom unatoč aktiviranim kompenzatornim mehanizmima, koji u tom trenutku mogu biti dodatni uzrok ili faktor pogoršanja insuficijencije (iscrpljivanje).

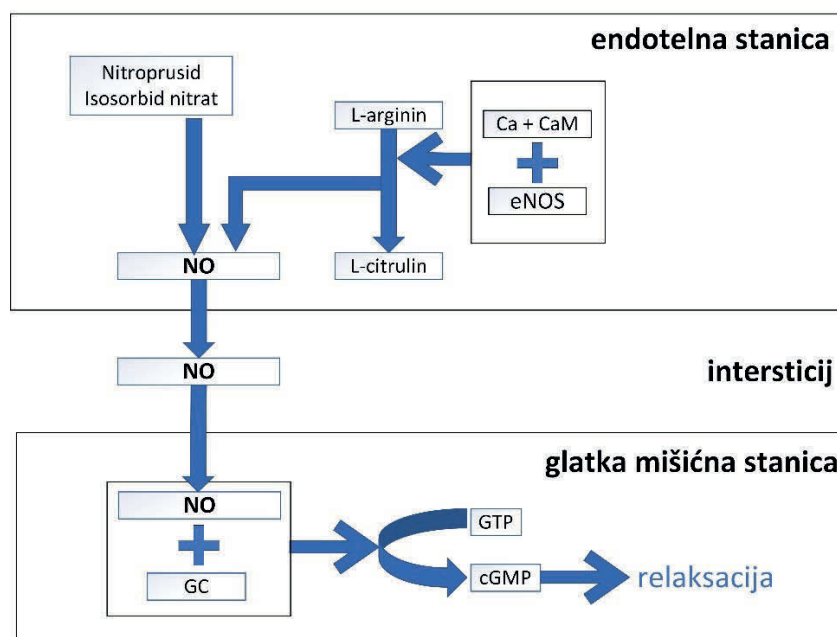
S obzirom na veliki opseg, na animalnim modelima obavljenih istraživanja i prikazanim rezultatima učinaka BPC 157, iz čega je vidljivo da BPC 157 ima univerzalno pozitivan učinak, a krajnje djelovanje ovisi o okolnostima koje treba regulirati kako bi se uspostavila narušena homeostaza, isti se pokušava prikazati kao univerzalni medijator sa zaštitnim djelovanjem u kontekstu Robert-ovog i Selye-evog modela (27,68). Jedan od mogućih razloga predhodno opisane univerzalnosti djelovanja BPC 157 je, na životinjskim, pretežno štakorskim modelima, dokazana povezanost BPC 157 sa regulacijom sinteze dušičnog oksida (26,27,36–39,50,67,69–72,28,73–82,29,83–88,30–35).

Povezanost BPC 157 i dušičnog oksida

Dušični oksid (NO) je plin koji je još donedavno smatran onečišćivačem okoliša (89) koji uzrokuje zamagljenja u sumrak i koji u visokim dozama pogoršava respiratorne tegobe i astmu. Tek je istraživanjima krajem sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća prvi put uočeno njegovo pozitivno djelovanje u organizmu u smislu perifernog vazodilatatora, pa je do tada tzv. endoplazmatski odnosno endotelni faktor relaksacije, engl. Endoplasmatic or endothelial relaxing factor, između ostalih i pokusima na kulturi stanica identificiran kao dušični oksid (90,91). Potom su uslijedila brojna istraživanja (89) kojima se dušični oksid isprofilirao kao važna signalna molekula uključena, ovisno o koncentraciji, u fiziološke ali i patološke procese u organizmu (89,92,93), poglavito relaksaciju glatke muskulature i perifernu vazodilataciju (89,91–93) (prvenstveno relaksacijom arteriola, manje vena), relaksaciju miokarda, stimulaciju angiogeneze, supresiju proliferacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila i supresiju agregacije trombocita (bilo potaknute endotelnim oštećenjem ili infekcijom), erektilnu disfunkciju (91), komplikacije dijabetesa (91), motilitet i sekreciju u gastrointestinalnom sustavu (94), inhibiciju stanične apoptoze, neurotransmisiju i neurodiferencijaciju, reakciju na infekciju virusima, bakterijama, gljivicama i parazitima, te upalu (92,93,95–99) i regeneraciju postresekcijske jetre (100,101). Veliki broj istraživanja bio usmjeren na djelovanje dušičnog oksida u kardiovaskularnim bolestima u smislu prevencije trombogeneze, zatim u terapiji angine pectoris i hipertenzije lijekovima na bazi nitrata, npr. izosorbid dinitrat (ISDN), izosorbid 5-mononitrat (ISMN), gliceriltrinitrat (nitroglicerina), te sprječavanju komplikacija

arterioskleroze inhibicijom oksidacije lipoproteina male gustoće (LDL) u aterosklerotskom plaku i prevencijom oštećenja endotela sa posljedičnom adhezijom trombocita i formiranjem tromba, aktivacijom leukocita i hipertrofijom mišićnog sloja arterija (tunica media). Dušični oksid je hidrofobna molekula, pa lako prolazi kroz stanične membrane i ulazi u citoplazmu stanica, ali kako mu je vrijeme života vrlo kratko, odnosno samo nekoliko sekundi, djelovanje mu je izrazito lokalno u neposrednoj blizini stanice koja ga sintetizira ili na samu stanicu koja ga je sintetizirala (91). Po svojoj kemijskoj strukturi dušični oksid (NO) je slobodni radikal (89), ali za razliku od drugih slobodnih radikala npr. superoksida, dušični oksid djeluje kao antioksidans, vežući neenzimatskom reakcijom superoksida u peroksinitrat (91), što dijelom ima pozitivan učinak (prevencija oštećenja staničnih makromolekula uključujući enzime i DNK), ali u slučaju bakterijskih infekcija i dijelom negativni učinak, jer superoksidi sudjeluju u uništavanju bakterija uspješnije nego peroksinitrat koji ima blaže antibakterijsko djelovanje, ali i manje toksično djelovanje unutar same stanice. Međutim ukoliko u stanici dođe do nakupljanja velikih količina dušičnog oksida odnosno peroksinitrata, moguća su oštećenja ekvivalentna oštećenjima izazvanim drugim slobodnim radikalima. Dušični oksid nastaje intracelularno iz aminokiseline L-arginina (djelovanjem sintetaza dušičnog oksida) ili redukcijom nitrata iz hrane i lijekova, prvenstveno nitrita (NO_3) koji se u citoplazmi (lijekovi) ili lumenu crijeva djelovanjem bakterija (hrana) reduciraju u nitrat (NO_2), a nitrat potom u dušični oksid (NO), koji se opet može reverzibilno oksidacijom konvertirati u nitrat odnosno nitrit (91). Sintetaze dušičnog oksida, engl. Nitric Oxide Synthase (NOS) su zapravo 3 izoproteina (91–93,95–97) koje posjeduju hem kao prostetičku skupinu, (NOS1, NOS2 i NOS3), koji u aktiviranom obliku djeluju kao oksido-reduktivni enzimi koji kataliziraju reakciju oslobađanja molekule dušičnog oksida (NO) transformacijom semiesencijalne aminokiseline L-arginin (L-ARG, sin. LA) u aminokiselinu L-citrulin (L-Cit) (91). L-arginin se u stanicama odraslih ljudi sintetizira iz citrulina djelovanjem arginin sintetaze, engl. Arginine Synthase (AS) (72). Sve forme sintetaza prisutne su u svim vrstama stanica (upalnim, endotelnim, srčanim, glatkomišićnim, epitelnim, živčanim, koštanim itd.), ali su u nekima naglašenije; NOS1 je najviše prisutna u završecima postsinaptičkih aksona, pa se još naziva i neuronalna (nNOS), NOS2 koji je najpotentnija sintetaza (oko 1000 puta produktivnija od NOS1 i NOS3) najviše je prisutna u aktiviranim makrofazima i povezna je sa reakcijom na infekciju i upalnom reakcijom, pa se još naziva infekcijska ili inducirana (iNOS), dok se NOS3 najviše nalazi u endotelnim stanicama i povezna je sa relaksacijom glatkih mišićnih stanica u stijenci krvnih žila, u prvom redu arteriola, manje vena, pa se naziva i endotelijska (eNOS). Aktivnu sintetazu dušičnog oksida (enzim) čine zapravo dvije

sintetaze (dva proteina) međusobno povezane u homodimer, koji funkcionira kao dvije aktivne sintetaze. Aktivacija endotelijske (NOS3, sin. eNOS) i neuronalne sintetaze (NOS1, sin. nNOS) nastaje stimulacijom receptora na staničnoj membrani što pokreće intracelularnu enzimatsku kaskadu, koja rezultira stvaranjem aktivacijskog kompleksa kalcija i kalmodulina. Aktivacija induksijske/infekcijske sintetaze (NOS2, sin. iNOS) nije potaknuta kalcijem, već nastaje transkripcijom odgovarajućeg gena (sinteza de novo) pod djelovanjem citokina i faktora rasta. Aktivacija najviše proučavane sintetaze tj. endotelijske sintetaze (NOS3, sin. eNOS) nastaje stimulacijom acetyl-kolinom, bradikininom ili histaminom putem odgovarajućeg receptora na staničnoj membrani endotelih stanica, koje nisu biološki inaktivno tkivo, već se mogu smatrati endokrinim odnosno parakrinim organom (izlučuju dušični oksid). Navedena stimulacija endotelih stanica rezultira relaksacijom glatke muskulature stijenki krvnih žila i vazodilatacijom, dok npr. stimulacija acetyl kolinom istovjetnog (muskarinskog) receptora direktno na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila izaziva (vazo)konstrikciju. Stimulacija navedenih membranskih receptora endotelih stanica dovodi do oslobađanja kalcija sa endoplazmatskog retikuluma, povećanja njegove intracitoplazmatske koncentracije i vezanja u kompleks sa kalmodulinom. Kompleks kalcija sa kalmodulinom veže se na odgovarajuću domenu sintetaze dušičnog oksida i aktivira ju, što rezultira oslobađanjem dušičnog oksida, iako se vazorelaksacijski učinak može postići i bez aktivacije endotelijske sintetaze primjenom nitratnih lijekova kao donora dušičnog oksida (nitroprusid, isosorbid di i trinitrat). Dušični oksid kao hidrofobna molekula lako prolazi stanične membrane, pa slobodno difundira iz endotelne stanice u okolinu i ulazi u glatke mišićne stanice, u čijoj se citoplazmi veže za hem u prostetičkoj grupi gvanilat ciklaze (GC) koja tako aktivirana ima ulogu drugog glasnika (91) i transformira gvanozin trifosfat (GTP) u ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) koji u stijenci krvnih žila ima nekoliko učinaka (hiperpolarizacija, defosforilacija glavica miozina) koji rezultiraju oslobađanjem miozina od aktina čime nastupa relaksacija glatkih mišićnih stanica (91). Slika 1 shematski prikazuje vazodilataciju posredovanu dušičnim oksidom modelom $NO \rightarrow GC \rightarrow cGMP$.



Slika 1. shematski prikaz dušičnim oksidom posredovane vazodilatacije
NO dušični oksid, eNOS endotelijska sintetaza dušičnog oksida, Ca + CaM kompleks kalcija sa kalmodulinom, GC gvanilat ciklaza, GTP gvanozin trifosfat, cGMP ciklički gvanozin monofosfat

Sličan učinak dušičnog oksida na glatke mišićne stanice, prisutan je i u probavnom sustavu gdje je uključen u regulaciju tonusa glatke muskulature, odnosno crijevnu peristaltiku, antralnu pumpu i proces pražnjenja želuca, relaksaciju sfinktera, ali i regulaciju sekrecije i protoka krvi kroz sluznicu (94), također putem mehanizma cikličkog gvanozin monofosfata. Prilikom pak regeneracije postresekcijske jetre dušični oksid regulira hormonom proliferacije hepatocita, engl. Hepatocyte Growth Factor (HGF) stimuliranu ekspresiju gena za ciklin D1 i D2, blokiranjem S-adenozil metionin sinteteaze (SAdMe) koja je inhibitor ekspresije navedenih gena (17,100). Količinu raspoloživog dušičnog oksida u jetrenom ostatku (FLR) određuje aktivnost citokinima inducirane sintetaze dušičnog oksida (NOS2, sin. iNOS), čija se količina povećava nakon resekcije ekspresijom odgovarajućeg gena, a ukoliko ne dođe do ekspresije gena, pojavljuje se manjak dušičnog oksida što hepatocit vodi u apoptozu (porast kaspaze 3), a jetreni ostatak u eventualnu insuficijenciju (17,100). Smatra se da u fiziološkim uvjetima dušični oksid održava integritet sluznice i tkiva i reparira oštećenja nastala agresivnim agensima, uključujući i cijeljenje peptičkih ulkusa, dok u patološkim (visokim) koncentracijama gubi svoju gastroprotektivnu ulogu (94).

Smanjen učinak sintetaze dušičnog oksida može nastati kao posljedica primjene inhibitora sintetaze (91–93,95–97) ili njenim preopterećenjem visokim intracelularnim koncentracijama

L-arginina (91,97). Inhibitori sintetaze dušičnog oksida, engl. NOS Inhibitors (NOSIs) mogu biti neselektivni kompetitivni analozi L-arginina koji inhibiraju sve tipove sintetaza (NOS1, NOS2, NOS3) ili selektivni kompetitivni inhibitori koji pripadaju strukturno različitim molekulama, koje ne moraju imati strukturnu sličnost sa L-argininom i koji inhibiraju samo neke tipove sintetaza (91). Neselektivni kompetitivni analozi su modificirane molekule L-arginina koje se vežu na sintetazu, ali ih ona ne može modificirati i osloboditi dušični oksid. U tu grupu spadaju N-monometil L-arginin (L-NMMA), L-nitro arginin (L-NOARG, sin. L-NA) i L-nitro arginin metil ester (L-NAME). U grupu selektivnih kompetitivnih inhibitora spadaju 7-nitroindazol (7-Ni) i ARL17477 inhibitori NOS1 (nNOS) sintetaze, te N-iminoetil L-ornitin (L-NIO), N-iminoetil L-lizin (L-NIL), aminoguanidin i S-metilisotioureja (SMITU) inhibitori NOS2 (iNOS) sintetaze. Detaljniji pregled sinteze i djelovanja dušičnog oksida i njegovih sintetaza dan je u odjeljku Signalne molekule uključene u mehanizme oštećenja i regeneracije jetre (poglavlje UVOD I SVRHA RADA: DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA). Dosad provedenim brojnim istraživanjima na animalnim, pretežno štakorskim modelima, utvrđen je utjecaj BPC 157 na regulacijske sisteme posredovane dušičnim oksidom (26,27,36–39,50,67,69–72,28,73–78,80–83,29,84–88,30–35). Prikupljeni podaci upućuju da BPC 157 stimulira sintezu dušičnog oksida, čak i u prisutnosti blokatora sintetaze. Naime davanjem BPC 157 uz istovremenu primjenu neselektivnog kompetitivnog antagonista L-arginina, L-nitro arginin metil estera (L-NAME), odnosno preopterećenjem sintetaze visokim dozama L-arginina, kao i kombinacijom oba modela, simultanim davanjem visokih doza L-arginina i L-nitro arginin metil estera uspjelo se primjenom BPC 157 izbjeći blokadu sintetaze (26,27,36–39,50,67,71,73,76,77,28,78,80,82–88,29–35). Drugim riječima BPC-om 157 posredovano otpuštanje dušičnog oksida razlikuje se od onog posredovanog L-argininom i za razliku od njega je rezistentno na blokadu sa neselektivnim kompetitivnim antagonistom L-nitro arginin metil esterom (67,73,74,84). Kako je veliki broj dosadašnjih istraživanja djelovanja dušičnog oksida usmjeren na njegovo djelovanje u kardiovaskularnom sustavu (periferna vazodilatacija, antiagregacija), različitim modelima proučavani su učinci BPC 157 na kardiovaskularni sistem i koagulaciju posredovani dušičnim oksidom. Utvrđeno je da BPC 157 koji inače nema utjecaja na normalni arterijski tlak (67), održava homeostazu arterijskog tlaka (normalne vrijednosti) u modelima kada je shodno djelovanju dušičnog oksida očekivana hipertenzija blokadom sintetaze primjenom neselektivnog kompetitivnog antagonista (L-NAME), odnosno hipotenzija zbog pojačane sinteze dušičnog oksida primjenom L-arginina u dozama koje ne izazivaju preopterećenje sintetaze (67). Slično homeostatsko djelovanje BPC-a 157 vidljivo je i u kontroli koagulacije pri čemu spriječava

trombozu abdominalne aorte nakon anastomoze, odnosno donje šuplje vene prilikom prolongirane okluzije (69), te krvarenje i trombocitopeniju nakon amputacije repa štakora, neovisno o primjeni ili neprimjeni antikoagulansa (heparin, varfarin, aspirin), za razliku od izolirane primjene L-nitro arginin metil estera (prisutna trombocitopenija) odnosno L-arginina (pojačano krvarenje) (78,79). BPC 157 reducira posljedice kongestivnog zatajenja srca, te aritmije izazvane digitalisom (metildigoxin), dok ih primjena L-nitro arginin metil estera pogoršava, a L-arginin je bez utjecaja (72). Homeostatsko djelovanje BPC 157 posredovano dušičnim oksidom prisutno je i u regulaciji elektrolita (kalij, magnezij). U prevenciji i terapiji hiperkalemije (73) i njezinih posljedica (aritmija, hipertenzija, mišićna slabost i kardijalni arrest) uzrokovanih preopterećenjem kalijevim kolridom (KCl), odnosno hipokalemije (74) i njezinih posljedica (aritmija, mioklonizmi, paraliza i kardijalni arrest) uzrokovanih diuretskim preopterećenjem (furosemid), pozitivni učinci BPC 157 posredovani dušičnim oksidom, neovisni su o L-argininu koji također umanjuje učinke KCl odnosno furosemida i L-nitro arginin metil esteru koji pogoršava hiperkalemiju odnosno hipokalemiju. U prevenciji i terapiji hipermagnezije (84) i njezinih posljedica (stanična depolarizacija, mišićna slabost, hiperkalemija, mišićne i cerebralne lezije) uzrokovanih preopterećenjem magnezijevim sulfatom ($MgSO_4$), pozitivni učinci BPC 157 posredovani dušičnim oksidom, neovisni su o L-argininu i L-nitro arginin metil esteru koji pojedinačno pogoršavaju, ali u kombinaciji umanjuju navedene učinke. Osim predhodno navedenih regulatornih učinaka BPC 157 na aktivnost sinetaze dušičnog oksida u smislu prevencije blokade sintetaze preopterećenjem visokim dozama L-arginina i / ili kompetitivnim antagonistima L-arginina, utvrđen je mogući utjecaj na ekspresiju gena endotelijske sintetaze (NOS3, sin. eNOS), međutim trenutno nije provedeno dovoljno ciljanih istraživanja (26,27,36–39,28–35). Iz gore navedenih primjera vidljivo je da primjena BPC 157 rezultira normalizacijom dušičnog oksida i da BPC 157 održava njegovu homeostazu u tkivima (70,85–87), te time spriječava formiranje slobodnih radikalnih. Dušični oksid je također i izvršni transmitter ekstraautonomnog (neadrenergički i nekolinergički) regulatornog sistema kontrole motiliteta u gornjem abdomenu (relaksacija i kontrakcija donjeg ezofagalnog i piloričnog sfinktera, te inhibicija vagusom stimuliranog želučanog motiliteta) (102). Dopamin je također važan enterički neuromodulator uključen u želučanu, duodenalnu i pankreatičnu sekreciju, gastrointestinalni motilitet, regulaciju submukozne vaskularizacije i protekciju sluznice gastrointestinalnog trakta (103), pa je uveden termin „osovina mozak-crijevo“ (brain-gut axis) kojim se naglašava uloga dopamina, dopaminergičkih neurona, centralnih i perifernih dopaminskih receptora, te dopaminskih agonista (104). Neurololeptici (noviji naziv antipsihotici), tj. lijekovi koji se danas primarno

koriste u terapiji shizofrenije i psihotičnih stanja, iako je njihovo antiemetičko djelovanje najranije otkriveni terapijski učinak, djeluju kao blokatori centralnih i perifernih dopaminskih i/ili centralnih serotoninских receptora, odnosno smanjuju dopaminergičku i/ili serotoninergičku neurotransmisiju. Prilikom proučavanja nuspojava antiemetika iz grupe neuroleptika, čija primjena centralnom i/ili perifernom blokadom dopaminskih receptora (ovisno o odabranom neuroleptiku) izaziva pojavu stres ulkusa kod eksperimentalnih životinja, te njihovog utjecaja na tonus donjeg ezofagealnog i piloričnog sfinktera, utvrđeno je da primjena BPC 157 neutralizira nuspojave ukazujući na pozitivno djelovanje BPC 157 kako na mehanizme posredovane dušičnim oksidom ali i one posredovane dopaminom (87).

Animalni modeli

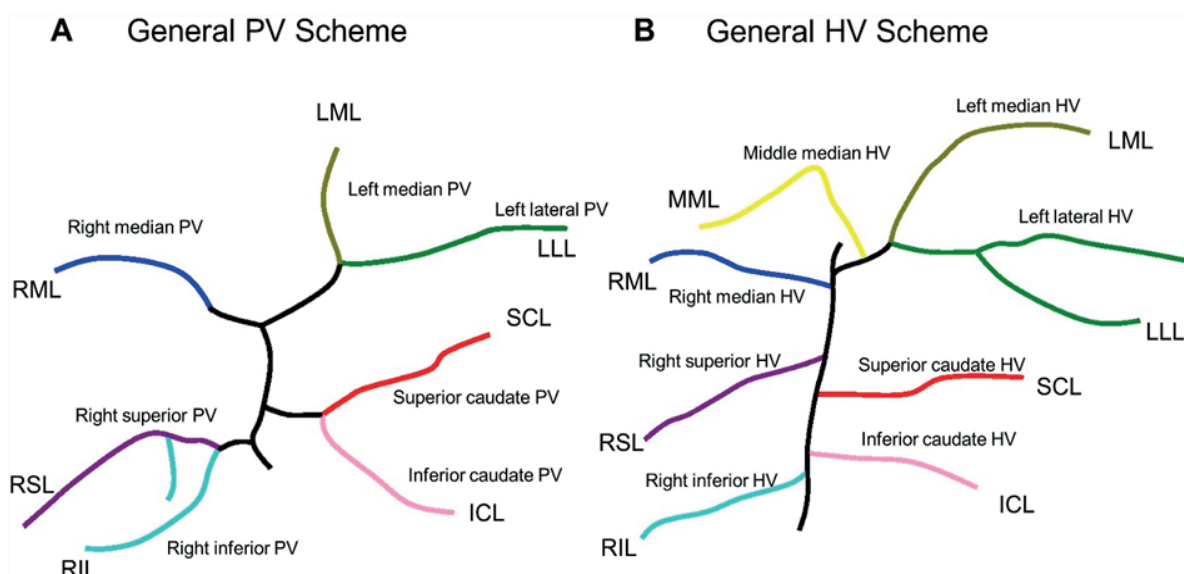
Za istraživanje je odabran Wistar štakor (*Rattus norvegicus f. domestica*), jer su animalni modeli koji koriste štakora kao pokusnu životinju, danas široko prihvaćeni u istraživanju hepatalnih resekcija (10,100,112–120,101,105–111), iako su početna istraživanja u kirurgiji jetre (resekcija, transplantacija) vršena na psima i svinjama (105).

Štakor je u odnosu na druge laboratorijske životinje (kunić, pas, svinja) radi svoje male veličine, niske nabavne cijene, brzog razmnožavanja, nezahtjevnog uzdržavanja i blažih etičkih kriterija najpogodniji za korištenje u animalnim modelima (110,114), tim više što se svako istraživanje provedeno na štakoru može jednostavnije ponoviti nego ako je provedeno na drugim životinjama.

Štakorska jetra

Na temelju istraživanja portalne vaskularizacije, te žučne i venske drenaže, izradom korozivnih preparata i plastičnih 3D modela u smoli (10,108–110), te μ CT analizom sa 3D rekonstrukcijom (111), prihvaćena je podjela štakorske jetre na 4 režnja gdje svaki režanj ima vlastitu biliovaskularnu peteljku i hepatalnu vensku drenažu (10,106,108–114) iako postoje i podjele na 6 sektora odnosno režnjeva (105,110). Dok je makroskopska organizacija štakorske jetre definirana, oko koncepta funkcionalne jedinice štakorske jetre (klasični jetreni režnjić, portalni režnjić, jetreni acinus ili modificirani jetreni režnjić) (113,115) ne postoji konsenzus.

Štakorska jetra je multilobulirana i prema prihvaćenoj nomenklaturi (10,105,106,108–114) ima slijedeće režnjeve: kaudalni (CL - caudate lobe), desni (RLL - right liver lobe), srednji (ML - median lobe) i lijevi lateralni (LLL - left lateral lobe). Kaudalni režanj ima 3 dijela: kaudalni procesus (CP – caudate processus), prednji (AC - anterior caudate) i stražnji (PC - posterior caudate lobe) režnjić. Desni režanj je podijeljen u gornji desni (SRL - superior right lobe) i donji desni režnjić (IRL - inferior right lobe). Srednji režanj je podijeljen u dva dijela desni srednji (RML - right median lobe) i lijevi srednji režnjić (LML - left median lobe). Slika 2 shematski prikazuje grane portalne i hepatalne vene na temelju kojih je formirana podjela štakorske jetre.



Slika 2. shematski prikaz granjanja portalne i hepatalne vene štakora

iz: Sängner C, Schenk A, Schwen LO, Wang L, Gremse F, Zafarnia S, i sur.

Intrahepatic Vascular Anatomy in Rats and Mice - Variations and Surgical Implications. PLoS One. 2015; 10(11)

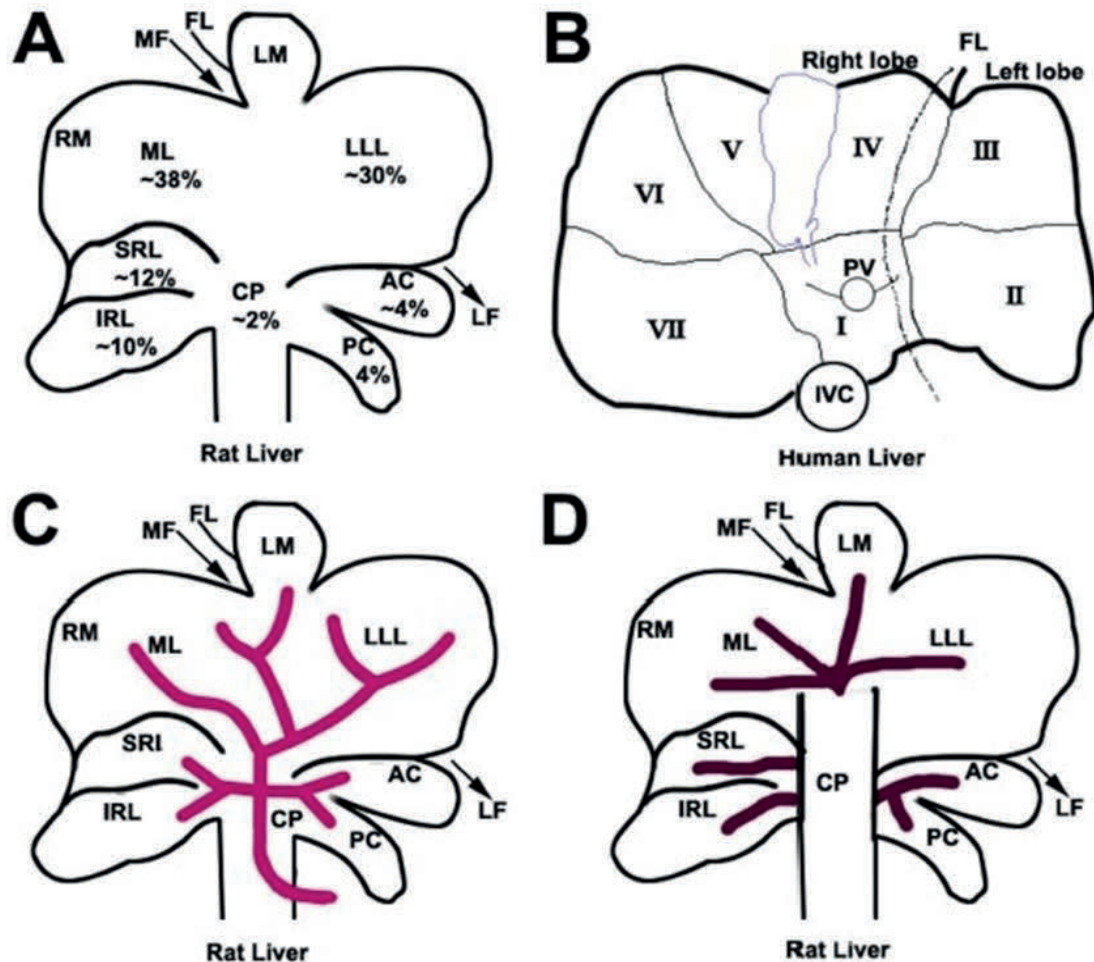
(A) Shema anatomije portalne vene (B) Shema anatomije hepatalne vene. HV hepatalna vena, PV portalna vena, ICL stražnji kaudalni režnjić, LLL lijevi lateralni režanj, LML lijevi srednji režanjić, RML desni srednji režnjić, RIL donji desni režnjić, RSL gornji desni režnjić, SCL prednji kaudalni režnjić

Funkcionalno – histološku jedinicu jetre strukturno čine: centralna vena koja je ogranak hepatalne vene, portalni prostor gdje se u vezivnom tkivu nalazi portalna trijada (ogranak portalne vene, hepatalne arterije, žučni kanalić i limfne žile), te hepatociti između kojih se

skuplja žuč i koji formiraju tračke koji omeđuju entotelom obložene stijenke sinusoidnih kapilara. U sinusoidnim kapilarama miješa se krv iz hepatalne arterije i portalne vene i odvodi u centralnu venu. Razlikuju se tri forme funkcionalno – histološke jedinice: 1. jetreni (klasični) režnjić (heksagonalnog oblika, u središtu sa centralnom venom i periferno 3-6 portalnih prostora), 2. portalni režnjić (oblika istostraničnog trokuta, sa portalnom trijadom u centru i centralnim venama u vrhovima trokuta) i 3. jetreni acinus (oblika romba sa po jednom centralnom venom u suprotnim vrhovima duže dijagonale i po jednom portalnom trijadom u suprotnim vrhovima kraće dijagonale). Forme se temelje na organizaciji drenaže žuči (portalni režnjić - žuč iz svih hepatocita režnjića otječe u isti portalni prostor), organizaciji vaskularizacije (jetreni acinus - hepatociti bliži portalnoj trijadi su najbolje vaskularizirani) i klasični model jetrenog režnjića u kojem krv hepatalne arterije i vene porte sinusoidalnim kapilarama odvodi u centralnu venu, a žuč se od središta režnjića odvodi žučnim kanalićima prema portalnim prostorima.

Između hepatobilijarnog sustava čovjeka i štakora nema funkcionalne razlike, ali postoje manje anatomske razlike (10,105,106,108,110,112,114). Štakor nema žučnjak, donja šuplja vena u štakora je cijela smještena intrahepatično, a postoje i brojne intrahepatalne arterio-portalne anastomoze. Štakorska jetra je jasno lobulirana, za razliku od humane, a režnjevi jetre štakora ne odgovaraju Couinaud segmentaciji humane jetre. Približna korelacija između štakorskih režnjeva i humanih segmenata jetre napravljena je na temelju portobilijarne peteljke i hepatalne drenaže, a ne masenih udjela režnjeva (10,105,108) i prezentira se na slijedeći način: CL= seg.I i seg.IX (kaudalni režanj), LLL = seg.II, LML = seg.III i seg.IV, RML = seg.V i seg.VIII, IRL = seg.VI, SRL = seg.VII. Slika 3 prikazuje skice režnjeva štakorske jetre (sa približnim masenim udjelima) u korelaciji sa segmenatima humane jetre (pogled sa visceralne strane), te portalna i hepatalna ramifikacija štakorske jetre (10).

Međutim sa stanovišta kirurgije, najznačajnija razlika između štakorske i humane jetre postoji u maksimalnom volumenu zdrave jetre koji se može resecirati, a da se omogući preživljenje i uredna regeneracija ostatne jetre. Normalna jetra čini 5% ukupne tjelesne mase štakora (105,110), odnosno 2,5% ukupne tjelesne mase čovjeka (105,110). Kod čovjeka se sigurnom smatra resekcija do 70% parenhima zdrave jetre (12,108), dok se kod štakora sigurno može resecirati (108,109) ili ligirati ogranke vene porte (10) za 90% parenhima. Isto je vidljivo i iz vrijednosti odnosa mase ostatne jetre prema ukupnoj masi tijela (RLW/BW - remnant liver / body weight ratio) potrebnog za preživljenje ($> 0,2\%$ kod štakora, odnosno $> 0,8\%$ kod čovjeka) (109).



Slika 3. Anatomija štakorske i humane jetre

iz: Shi H, Yang G, Zheng T, Wang J, Li L, Liang Y, i sur. A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. Sci Rep. 2015; 5:17567

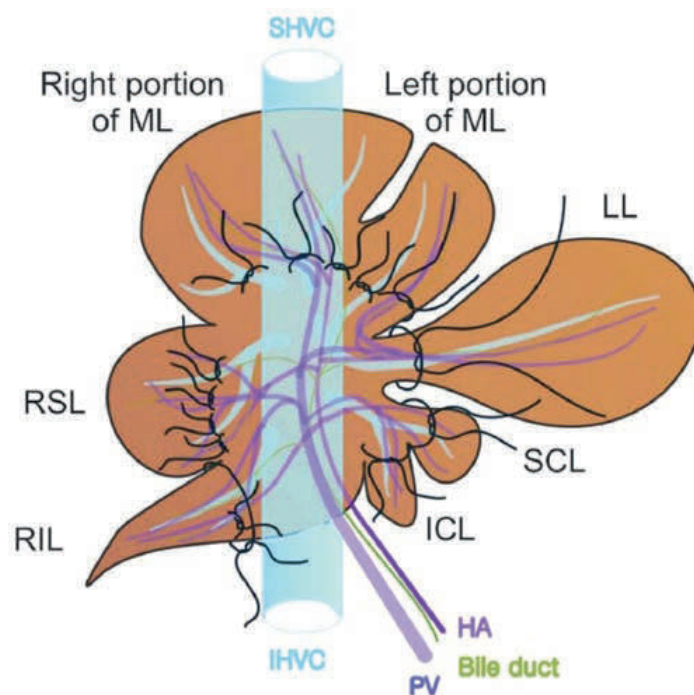
(A) Visceralna površina štakorske jetre sa prikazom režnjeva i njihovih prosječnih udjela u masi jetre. (B) Visceralna površina humane jetre sa prikazom segmenata prema Couinaud-u. (C) Anatomija portalne vene štakora. (D) Anatomija hepatalne vene štakora. CP kaudalni procesus, AC prednji kaudalni režnjić, PC stražnji kaudalni režnjić, SRL gornji desni režnjić, IRL donji desni režnjić, ML srednji režanj, RM desni srednji režnjić, LM lijevi srednji režanjić, LLL lijevi lateralni režanj, MF mediani procijep, LF lijevi procijep, RF desni procijep, FL falciformni ligament, PV vena porte, IVC donja šuplja vena

Resekcije štakorske jetre

Resekcije štakorske jetre, koje se u anglosaksonskoj literaturi češće nazivaju hepatektomije (parcijalna, suptotalna i totalna) (108,109,112) se za razliku od resekcija humane jetre, izvode jednostavno (10,108,110,112,113) i koriste se kao modeli u istraživanjima funkcije, regeneracije i akutnog zatajenja jetre, zatim jetrenih metastaza (direktnom inokulacijom tumorskih stanica u jetru ili inicirenjem u portalnu ili lijenalnu venu), metaboličkog odgovora na ozljedu i pri detekciju sindroma nedostatne jetre tj. nedovoljnog volumena jetre prema veličini tijela (SFSS - Small For Size Syndrome) prilikom resekcija i transplantacija (10,107,108,112). Kao kontrolni kirurški zahvat, prilikom resekcija često se rabi lažna resekcija (sham resection, placebo surgery) (10,100,101,108,112), pri čemu se obično učini samo laparotomija. Nakon brojnih istraživanja anatomije i strukture štakorske jetre, formirani su modeli resekcija namijenjeni pojedinim vrstama istraživanja, sa definiranim kombinacijama režnjeva, koji se odstranjuju po standardiziranim protokolima (107–109,112). Regeneracija jetre istražuje se na standardnoj dvotrećinskoj iliti parcijalnoj (70% ili 80%) resekciji, dok se za insuficijenciju ostatne jetre koriste modeli suptotalne (90%, 95% ili 97%) resekcije (107–109,112). Za istraživanje akutne jetrene insuficijencije koristi se model ahepatičkog štakora (totalna hepatektomija). Izvođenje totalne hepatektomije kirurški je izrazito složeno i zahtijeva formiranje porto-kavalne premosnice, bez koje štakori umiru unutar 20 minuta (108,112).

Preživljavanje štakora nakon resekcije ovisi o vrsti i načinu izvođenja resekcije (10,108,109,112) iako se može povećati davanjem glukoze odmah po resekciji subkutano (112) ili u vodi za piće (108,117). Nakon 70% resekcije mikrokirurškom tehnikom preživljavaju sve životinje (100%), ali ako se ista izvodi klasičnom tehnikom postotak preživljavanja je obično manji (80%). Kod subtotalnih resekcija promatrano je samo sedmodnevno preživljenje: nakon resekcije mikrokirurškom tehnikom, pri 90% resekciji preživljavaju sve životinje (100%), a kod 95% resekcije 66% životinja. Pri 97% resekciji i u slučaju ahepatičkog štakora životinje preživljavaju najviše 4 dana. Kako funkcionalni jetreni ostatak (FLR) čini jetreni parenhim i neparenhimsko tkivo (intrahepatična donja šuplja vena, te ogranci portalne i hepatalne vene, hepatalne arterije i žučnih vodova), udio se neparenhimskog tkiva u jetrenom ostatku povećava sa obimom resekcije (109,112). Opisano je nekoliko tehnika resekcije štakorske jetre (108,109,112,113); klasična sa u bloku podvezivanjem parehnima režnja na bazi (classical technique with ligature en-bloc at the base of the lobes), postavljanje hemostatskih metalnih kvačica na bazu režnja ili pedikul

(haemostatic clip technique), postavljanje hvataljke na bazu režnja ili pedikul i probodna ligatura kroz bazu režnja distalno od hvataljke (vessel-oriented parenchyma preserving technique) i mikrokirurška tehnika kojom se prvo ligiraju portalne peteljke sa portalnom venom i hepatalnom arterijom, a zatim se prilikom resekcije parenhima ispreparira i podveže hepatalna vena (vessel-oriented microsurgical technique). Preporuka je da se resekcije izvode mikrokirurškom tehnikom (108,109,112,113), a ne podvezivanjem jetrenog parenhima kod kojeg postoji opasnost od pada ligature i krvarenja ili kompresije donje šuplje vene, čime se smanjuje preživljenje štakora nakon zahvata. Slika 4 na slijedećoj stranici prikazuje princip resekcije jetrenih režnjeva podvezivanjem odgovarajuće peteljke (vessel-oriented approach) Standardnu dvotrećinsku (parcijalnu) resekciju štakorske jetre kao model u istraživanju regeneracije jetre, prvi su opisali 1931. godine Higgins i Anderson (108,109,112). Izvodi se jednostavno i brzo; u bloku se odstrane medijani (ML) i lijevi lateralni (LLL) režanj nakon predhodnog ligiranja zajedničke biliovaskularne peteljke (vessel-oriented approach, en-bloc resection) čime se postiže približno resekcija 70% parenhima (108,112).



Slika 4. shema resekcije režnjeva štakorske jetre tehnikom podvezivanja vaskularne peteljke

iz: Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal Hepatectomy in the Rat: From Anatomy to Surgery. Ann Surg. 2006; 244(1):89-98.

SCL prednji kaudalni režnjić, ICL stražnji kaudalni režnjić, RSL gornji desni režnjić, RIL donji desni režnjić, ML srednji režanj, LL lijevi lateralni režanj, PV vena porte, SHVC gornja šuplja vena, IHVC donja šuplja vena, HA hepatalna arterija

Mehanizmi oštećenja i regeneracije jetre

Kritični period za bolesnika kojem je učinjena resekcija jetre je prvih 30 dana nakon operacije, a smrtni je ishod najčešće posljedica krvarenja, a rjeđe insuficijencije jetre ili sepse (100). Poboljšanjem kirurške tehnike, smrtnost uzrokovana krvarenjem je znatno smanjena, pa insuficijencija jetrenog ostatka (FLR) predstavlja glavnu opasnost za bolesnika. Točan uzrok nepreživljavanja svih operiranih bolesnika nije poznat pa se navode progresivna jetrena insuficijencija, sepsa i multiorgansko zatajenje, ali je svima u podlozi jetreno zatajenje (100,119). Kliničko - laboratorijski kriteriji kojima bi se definirala postresekcijska jetrena insuficijencija nisu postavljeni (100,119), međutim pojava (ili pogoršanje) žutice,

koagulopatije ili encefalopatije mogu se smatrati znakom insuficijencije ili zatajenja jetrenog ostatka (100). Postresekcijska jetrena insuficijencija može biti prolazna (reverzibilna) i završiti oporavkom bolesnika, međutim češće je progresivna sa kratkotrajnim početnim poboljšanjem koje se manifestira oporavakom bilirubina unutar prvih sedam dana, a potom kontinuiranim pogoršanjem jetrenih nalaza (100,119), dok se kod manjeg broja bolesnika prezentira fluminantnim tijekom (100,119). Resekcije do maksimalnih 75% (sigurno do 50%) parenhima zdrave jetre u većine ljudi izaziva samo tranzitorno pogoršanje jetrene funkcije u vidu porasta bilirubina i smanjenja serumskih proteina (100). Postresekcijska insuficijencija jetre se histopatološki se manifestira u dva oblika, kao kolestaza ili neregeneracija. Kolestaza je karakterizirana povećanjem količine žuči u žučnim kanalićima i fibrozom Dissovih prostora, ali uz vidljivu regeneraciju hepatocita, dok je neregeneracija karakterizirana apoptozom hepatocita (100).

Nakon resekcije, ukoliko se ne radi o preopsežnom zahvatu, u jetrenom se ostatku istovremeno događa propadanje i regeneracija hepatocita. Najčešće regeneracija kvantitativno nadjačava umiranje hepatocita, što dovodi do brze restauracije mase i funkcije jetre. Međutim hepatociti koji su u tijeku diobe, su sa stanovišta metaboličke aktivnosti jetre afunkcionalni, pa ako parenhim ostatne jetre nije dostatan da osigura balans između regenerativnih procesa i funkcionalno - metaboličkih zahtjeva organizma, pojavljuje se sindrom nedostatne jetre, engl. small for size sindrom (SFSS), sa razvojem postresekcijske insuficijencije jetre, koja u konačnici dovodi do smrti bolesnika (100,107,119). Navedena insuficijencija posljedica je neuspjeha regeneracije jetrenog ostatka na kritičnu masu, odnosno pada broja funkcionalnih hepatocita ispod razine koja može održati adekvatnu metaboličku funkciju. Smanjenje broja funkcionalnih hepatocita nastaje ili zbog neadekvatne regeneracije ili zbog ubrzanog propadanja (apoptoza ili nekroza) ili njihove kombinacije (100), uz napomenu da adekvatna regeneracija jetre osim hepatocita uključuje i regeneraciju ostalih jetrenih stanica, te ekstracelularnog matriksa, što je vidljivo i iz kolestatskog oblika insuficijencije jetrenog ostatka, kada je održana regeneracija hepatocita.

Redukcija jetrenog tkiva koja se razvija dugotrajno i postupno (npr. u cirozi) oštećuje mikrocirkulaciju, povećava otpor u hepatalnoj arteriji, smanjuje brzinu portalnog protoka i razvija portalnu hipertenziju, koja se djelomično kompenzira porto - sistemskim spojevima, engl. porto - caval shunt. Kao posljedica navedenih promjena nastaje mikrocirkulatorna ishemija, smanjuje se dotok kisika u jetru i razvija hepatocelularna disfunkcija. S druge strane, jetra je otporna na akutnu kratkotrajnu ishemiju, što je najjasnije vidljivo prilikom jatrogene vaskularne okluzije (parcijalna okluzija Pringlovim zahvatom ili rjeđe izvođena

totalna vaskularna okluzija), međutim prilikom dugotrajne akutne ishemije (npr. u hemoragijskom šoku), nastaju oštećenja jetre koja se mogu verificirati svjetlosnim mikroskopom (periportalna nekroza, upalne infiltracije, žuč između stanica). Za razliku od ciroze, prilikom resekcija, kako štakorske tako i humane jetre, dolazi do naglog porasta portalnog protoka kroz jetreni ostatak (portalna hiperperfuzija jetre) mjereno u mililitrima krvi po minuti po gramu tkiva jetre (ml/min/gr) (100,107,108,112,114), a težina hiperperfuzije ovisio o opsegu resekcije. Zbog nagle redukcije jetrenog parenhima i ogranaka hepatalne arterije i portalne vene (reduciran vaskularni prostor) uz nepromijenjen dotok arterijske krvi hepatalnom arterijom, te venske krvi iz crijeva i slezene portalnom venom, razvija se portalna hipertenzija sa hiperperfuzijom jetrenog tkiva. Povećanje tlaka najizraženije je u žilama periportalnih prostora tj. ograncima vene porte i hepatalne arterije, manje u sinusoidnim kapilarama, a najmanje centrolobularno u ograncima hepatalne vene. Portalna hipertenzija je odgovorna za oštećenje (100,107,108,112,114), ali i za istovremenu stimulaciju regeneracije (10,11,100) ostatne jetre. Hiperperfuzija dovodi do otvaranja porto - sistemskih kolaterala, koje su značajno brojnije u štakorskoj nego humanoj jetri, poremećaja jetrene mikrocirkulacije i oštećenja endotela sinusoida, što u najranijoj fazi rezultira morfološkom i funkcionalnom alteracijom endotelne stanice i hepatocita (107). Ako tlak u sinusoidnim kapilarama nadvlada adhezijske sile između stanica endotela, dolazi do intralobularnog krvarenja praćenog nekrozom hepatocita, što stimulira adheziju leukocita na endotel i aktivira jetrene histiocyte (Kupferove stanice), čime se pokreće upalna reakcija. Sva navedena zbivanja rezultiraju tzv. ishemijsko perfuzijskom ozljedom, koja se trenutno smatra temeljem oštećenja parenhima ostatne jetre (107,108,112,114). Promjene koje nastaju u postresekcijskoj jetri temeljem ishemijsko perfuzijske ozljede, imaju kompleksnu podlogu koja uključuje stimulaciju pojačanje apoptoze hepatocita, te mitohondrijski i mikrocirkulatorni distress, pa se smatra da rana postresekcijska jetrena insuficijencija i sepsom izazvano multiorgansko zatajenje (MOF) dijele sličnu patogenezu u smislu mitohondrijsko - endotelne lezije (107). Naime neposredno po resekciji dolazi do oštećenja endotelne stanice sinusoidnih kapilara, hepatociti ostatne jetre odmah stvaraju proteine akutne faze (C reaktivni protein, α 1-acid glikoprotein, fibrinogen i α 2- makroglobulin), aktiviraju se Kupferove stanice i povećava se produkcija citokina tumor nekrotizirajućeg faktora (TNF α) koji inicira pojačanu apoptozu hepatocita (119). Apoptoza je proces strogo kontroliran i reguliran brojnim stimulacijskim i inhibitornim mehanizmima, uključujući ekstracelularnu stimulaciju apoptoze citokinima npr. beta transformirajućim faktorom rasta (TGF β), tumor nekrotizirajućim faktorom alfa (TNF α), interakcijom Fas liganda i transmembranskog Fas receptora iz proteinske obitelji tumor

nekrotizirajućih faktora (TNF), te utjecajem intracelularnih pro i anti apoptotičkih faktora uključujući regulatore citoplazmatske koncentracije kalcija i mitohondrijske permeabilnosti, npr. proteinima iz obitelji Bcl-2 proteina, pa se smatra da nakon ekstenzivnih resekcija jetre prevladava djelovanje proapoptotičkih nad antiapoptotičkim faktorima (119). Paralelno sa stimulacijom apoptoze u hepatocitima dolazi i do disfunkcije mitohondrija sa oštećenjem oksidativnog metabolizama, koji u kombinaciji sa stresom i aktivacijom endotela, kod ekstenzivnih zahvata čini glavni patofiziološki mehanizam disfunkcije ostatne jetre u ranoj post resekcijskoj fazi. Da su oksidativna lezija tj. oštećenje oksidativnog energetskog metabolizma i funkcijska (manje morfološka) alteracija mitohondrija krucijalne u ranoj pojavi oštećenja jetrenog ostatka, sugeriraju nalazi povećane koncentracije kisika i smanjene koncentracije reduciranog glutaciona (GSH) u krvi hepatalne vene, uz istovremeno nepromijenjenu koncentraciju reduciranog jetrenog glutaciona (107). Glutacion, reducirani (GSH), oksidirani (GSSG) i omjer reduciranog prema oksidiranom glutationu (GSH/GSSG ratio) su etablirani markeri tkivnog oksidativnog stresa (101). Povećana permeabilnost membrane mitohondrija i smanjena oksidativna fosforilacija smanjuju potrošnju kisika u hepatocitima što je vidljivo iz porasta saturacije kisikom krvi hepatalne vene (ShvO₂ - Hepatic venous oxygen saturation) koja je pokazatelj jetrene metaboličke aktivnosti i obrnuto je proporcionalna sa potrošenim kisikom u jetri (manja potrošnja O₂ veća ShvO₂) (107). Smanjenje oksidativne fosforilacije u hepatocitima, dovodi do smanjenje sinteze reduciranog glutaciona (GSH), međutim intrahepatalna koncentracija reduciranog glutaciona (GSH) koji je glavni intracelularni reducens ostaje stabilna jer se smanjuje njegova ekskrecija u krv i žuč (jetra je glavni izvor reduciranog glutaciona za organizam), što pokazuje da u oksidativnom stresu hepatocita prvo dolazi do smanjene sekrecije reduciranog glutaciona (GSH), a tek kasnije pada intracelularne koncentracije, uz povećanje intracelularnih oksidiranih produkata (slobodni radikali, peroksidi itd.) koji se ne mogu reducirati. Pojednostavljeno, resekcija jetrenog parenhima dovodi do porasta vaskularnog opterećenja redukcijom jetrenog parenhima, sa oštećenjem endotela sinusoida, adhezijom leukocita na endotel i oštećenjem hepatocita po tipu oksidativnog stresa koje je u najranijoj fazi (unutar nekoliko sati) samo funkcionalno (107) i predhodi morfološkim oštećenjima koja se registriraju kasnije (unutar 24 sata) (107) i dovode do umiranja hepatocita. Smrt hepatocita, jednako kao i drugih stanica može nastupiti ili apoptozom ili nekrozom, iako u tkivu mogu biti istovremeno prisutna oba procesa. Kliničko značenje apoptoze u jetrenom ostatku je nejasno, tim više što su i apoptoza i nekroza posredovane sličim mehanizmima (signalni putevi, kaskadna aktivacija kaspaza, disfunkcija mitohondrija) i mogu se međusobno izmjenjivati. Međutim trenutno se smatra da

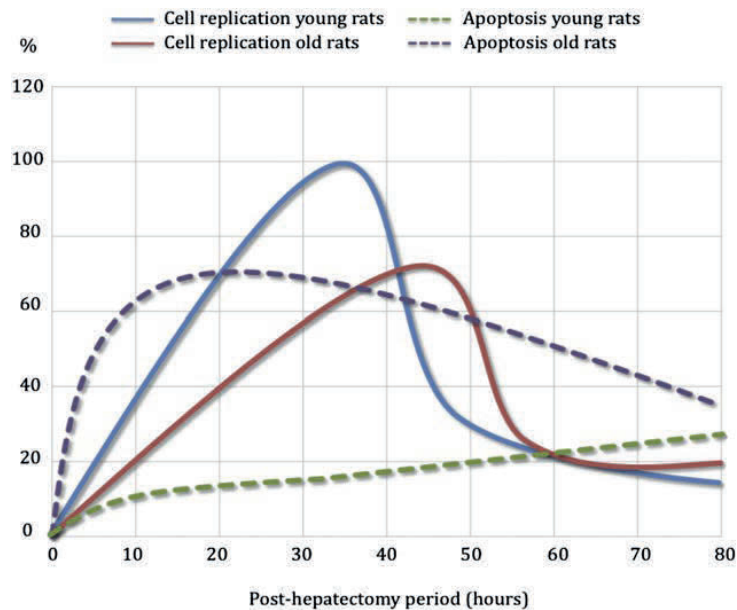
je hepatalna insuficijencija nakon ekstenzivne resekcije, pogotovo u ranoj fazi, posljedica propadanja hepatocita povećanjem apoptoze (i prigušenja regeneracije), a ne nekroze hepatocita (119). Apoptoza je programirana smrt stanice koja ne inducira upalnu reakciju, te prilikom takve stanične smrti sadržaj citoplazme koji je podvrgnut autodigestiji, ostaje unutar stanične membrane, intersticij ostaje intaktan, a ostaci mrtve stanice budu odstranjeni makrofazima. Efikasnost eliminacije apoptotičnih hepatocita ovisi o funkciji Kupferovih i endotelnih stanica. Nekroza je pak posljedica oštećenja stanice vanjskim faktorom, te tom prilikom dolazi do oštećenja stanične membrane i sadržaj citoplazme dolazi u međustanični prostor, što inducira upalnu reakciju, koja potom oštećuje i intersticij u kojem se stanica nalazi kao i okolne stanice. Apoptoza je prirodni (endogeni) proces umiranja „dotrajale“ funkcionalne stanice ili one stanice koja nije uspješno ušla u mitozu, iako i hepatociti oštećeni vanjskim faktorom (virusima, autoimuno, kolestazom, metaboličkim poremećajima, ishemijsko-perfuzijskom ozljedom) mogu umrijeti apoptozom, umjesto nekrozom. Paralelno sa infuzijsko - perfuzijskom ozljedom, teče i proces regeneracije, pa se već nakon 16 sati po resekciji štakorske jetre replicira DNA, za 24 sata masa ostatne štakorske jetre dostiže 45%, a za 72 sata 70%, da bi između 7. i 14. dana postigla 93% mase intaktne jetre. Nakon 3 tjedna (~ 20 dana) masa je u cijelosti vraćena na vrijednost prije 70% resekcije, što je posljedica povećanja ostatne jetre hiperplazijom (10,108,112). Brzina regeneracije štakorske jetre proporcionalna je masi reseciranog parenhima, ukoliko je resektat unutar intervala 30% - 85% mase intaktne štakorske jetre (108).

Regeneracijski proces u jetri čovjeka također nastupa brzo. Prilikom transplantacije desne jetre sa živog donora, udvostručenje mase ostatne (lijeve) jetre nastupa kod donora nakon 7 dana, a kod primatelja nakon 14 dana. Za 2 mjeseca (60 dana) od zahvata i u donora i u primatelja ostatna jetra dosiže početnu masu (neresecirane) jetre, međutim dostizanjem početne vrijednosti mase, proces regeneracije i remodeliranja ostatne jetre ne prestaje (108). U slučaju resekcije humane jetre, smatra se da regeneracija počinje u prva dva tjedna od resekcije (u prvih sedam dana vidljiva je povećana sinteza DNK) i završava za tri mjeseca (100). Sve (visoko) diferencirane stanice, pa tako i hepatocit, su u određenom trenutku funkcionalne ili afunkcionalne, tj. nalaze se u jednom od tri moguća stanja: u mirovanju, u nekoj fazi staničnog ciklusa (interfaza ili mitozu) ili u procesu umiranja (apoptoza ili nekroza), a samo hepatociti koji su u mirovanju (G_0 faza) mogu obavljati svoju funkciju visoko diferencirane stanice (funkcionalni hepatocit). Regeneracija jetre je posljedica indukcije mirnih hepatocita (G_0) da uđu u proces stanične diobe, a prijelaz iz mirovanja u diobu je kompleksan i strogo kontroliran proces koji se zbiva u međusobno povezanim fazama od

indukcije stanice na diobu (G_1), preko sinteze potrebnih molekula i organela koje će se koristiti u mitozu (S , G_2) do samog dijeljenja stanice u mitozu (M). Aktivacija mitoze i sama mitoz, su kompleksni procesi kontrolirani auto, para i endokrinim hepatotropnim faktorima, u čijoj je podlozi ekspresija određenog gena u točno određenom trenutku i točno određenog trajanja, što je regulirano faktorima stimulacije i supresije gena, a bilo koji poremećaj navedenog mehanizma može rezultirati ili nekontroliranom diobom (onkogeni rast) ili apoptozom stanice i neadekvatnom nadoknadom propalih stanica. Regeneracija resecirane jetre započinje aktivacijom staničnog ciklusa, a blokiranje uvođenja hepatocita u stanični ciklus (npr. manjak ili supresija hepatotrofičkih faktora, povećana aktivnost supresora staničnog rasta) ili poremećaj neke faze staničnog ciklusa, vodi jetreni ostatak u insuficijenciju (100).

Osim infuzijsko perfuzijske ozljede, koja se smatra temeljnim patofiziološkim procesom u postresekcijskom jetrenom ostatku, osjetno manji, ali ne i zanemariv značaj ima i utjecaj crijevne mikroflore. Na štakorskom modelu dvotrećinske resekcije jetre pokazano je da antibiotici smanjuju pojavu insuficijencije postresekcijske jetre, dok davanje bakterijskih endotoksina povećava nekrozu, pa se smatra da je za oštećenje hepatocita ali i Kupferovih stanica nakon resekcije dijelom odgovorna i translokacija crijevne mikroflore i bakterijskih endotoksina u portalni krvotok koja se pojavljuje već unutar nekoliko sati od zahvata (100), što pokazuje da Kupferove stanice imaju značajnu ulogu u regeneraciji postresekcijskog jetrenog ostatka, jer odstranjuju bakterije i endotoksine iz portalne cirkulacije i izlučuju citokine koji potiču proliferaciju hepatocita (100).

Zaključno, adekvatan oporavak štakorske jetre nakon 70% resekcije posljedica je ravnoteže između apoptoze i regeneracije što jasno prikazuje graf o hipotetičkom dinamičkom balansu između stanične replikacije i apoptoze hepatocita (slika 5) nastao temeljem istraživanja utjecaja dobi na regeneraciju jetre štakora nakon parcijalne (70%) hepatektomije (101). Bez obzira na razlike između mladih (4 - 7 mjeseci) i starih (24 - 27mjeseci) štakora (101) vidi se, kao i u drugim radovima (10,108,112). da se najbitnije promjene zbivaju u prvih 72 sata od resekcije.



Slika 5. prikaz hipotetičkog dinamičkog balansa između stanične replikacije i apoptoze hepatocita nakon 70% resekcije štakorske jetre
 iz: Sánchez-Hidalgo JM, Naranjo A, Ciria R, i sur. Impact of Age on Liver Regeneration Response to Injury After Partial Hepatectomy in a Rat Model. J Surg Res. 2012; 175(1): e1-e9.

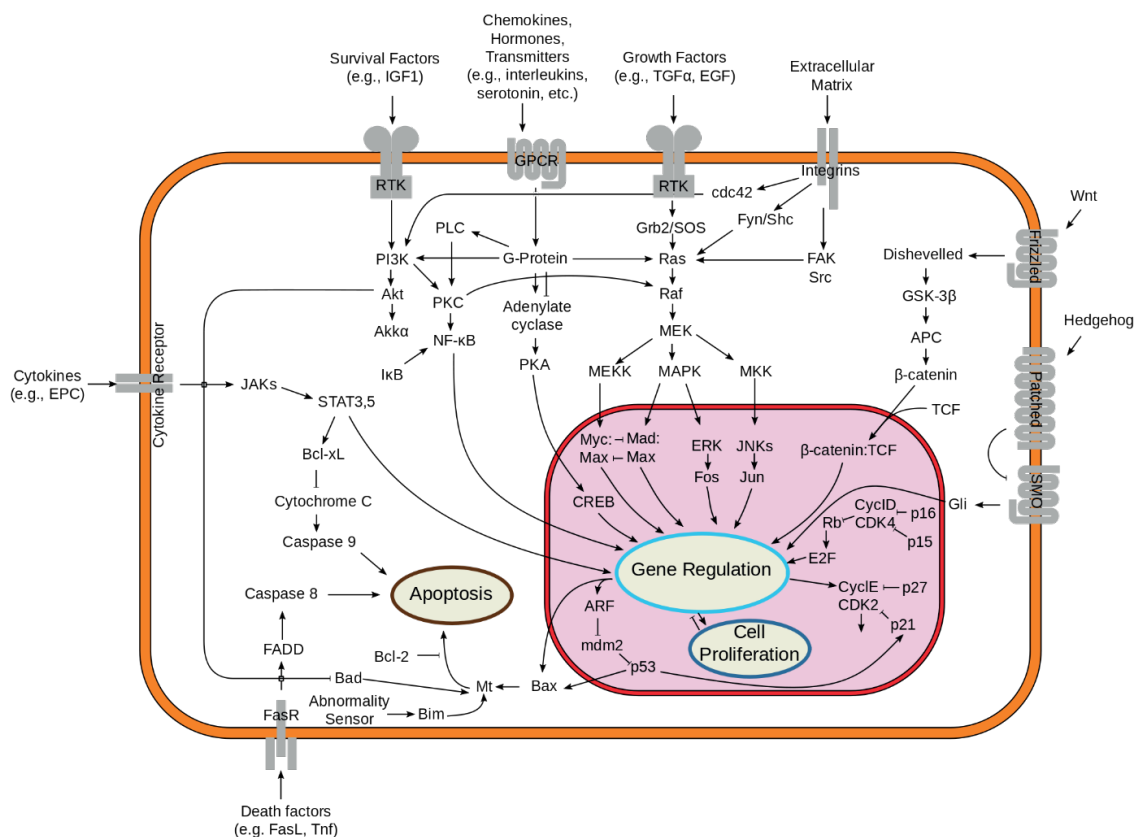
Signalne molekule uključene u mehanizme oštećenja i regeneracije jetre

Razne signalne molekule (proteini) i brojni molekularni putevi, koji se često međusobno preklapaju, sudjeluju u regulaciji regeneracije jetrenog ostatka kontrolom proliferacije i apoptoze hepatocita. Dio molekula je intarcelulano smješten i regulira procese prijenosa signala i staničnog odgovora na podražaj, a dio je ekstracelularan i djeluje na hepatocit preko odgovarajućeg membranskog receptora. Signalne molekule mogu biti presintetizirane i pohranjene u stanici u inaktivnom obliku ili se mogu sintetizirati de novo na odgovarajući podražaj. Djelovanje tih molekula posljedica je njihove aktivacije ili supresije, bilo pokrenutom (ili pojačanom), odnosno smanjenom sintezom, zbog ekspresije, odnosno blokade ekspresije odgovarajućeg gena ili se posttranslacijskom modifikacijom u citoplazmi stanice, predhodno sintetizirane molekule aktiviraju iz inaktivne forme odnosno deaktiviraju u inaktivni oblik. Biokemijsko-molekularni modeli signalnih puteva koji determiniraju sudbinu jetrenog ostatka, baziraju se na regulaciji ekspresije gena (transkripcijski faktori) koji kodiraju sintezu drugih signalnih ili regulatornih molekula, odnosno na regulaciji posttranslacijske

modifikacije signalnih ili regulatornih molekula njihovom aktivacijom (kinaze), razgradnjom (proteaze) ili vezanjem za drugu signalnu ili regulatornu molekulu, pri čemu nastali kompleks može djelovati kao promotor ili supresor nekog signalnog puta. Osim navedenih mehanizama u kontrolu i regulaciju signalnih puteva uključen je i proces razgradnje signalnih proteina, kako u sklopu normalnog životnog ciklusa proteina, tako i prave regulatorne uloge u nekim signalnim putevima (npr. NF- κ B, p53).

U značajne signalne molekule, spadaju poglavito citokini koji imaju važnu ulogu u regeneraciji jetre (100), jer neki direktno potiču hepatocyte na diobu npr. tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNF α), dok drugi npr. interleukin 1 (IL1) suprimiraju regeneraciju stimulirajući upalnu reakciju u jetrenom ostatku i djelujući na Kupferove stanice da smanjeno luče TNF α ; blokadom IL1 postiglo se smanjivanje upalne reakcije i pad transaminaza (100). U molekule koje su uključene u apoptozu stanica spadaju kapsaze, citokrom C oksidaza, protein p53, Ca²⁺, citokini (TNF α preko nutarnjeg puta aktivacije kaspaza, TGF β , Fas receptori i ligandi), proteini iz obitelji Bcl 2 (antiapoptotički Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-x, Bcl-w, Bcl-Xs, BAG i proapoptotički (Bax i Bak, Noxa, Puma, Bcl-10, Bid, Bam, Bad, Bik, Blk, Bim), te NF- κ B i TGF β koji inhibirju apoptozu stanica, prvi kočeći aktivnost c - JunNH₂ terminalne kinaze (JNK), a drugi stimulacijom ekspresije gena za Bcl-XL. Molekule uključene u staničnu proliferaciju čine citokini (TNF α preko kanonske aktivacije NF- κ B), ciklini, G proteini (RAS, EGF i EGFR), transkripcijski faktori Elk1, c-myc, c-FOS, c-Jun, regulatorni putevi NF- κ B, te kinaze uključene u MAPK kaskadu (RAF, MEK, ERK).

Slika 6 prikazuje shemu dijela signalnih molekula i puteva uključenih u apoptozu i proliferaciju stanica, te su neki od njih detaljnije prikazani u nastavku teksta, jer njihovo poznavanje omogućuje razumijevanje procesa i služi kao osnova za dijagnostičke procedure.



Slika 6. signalni putevi uključeni u apoptozu i proliferaciju stanica
 iz https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b0/Signal_transduction_pathways.svg/1000px-Signal_transduction_pathways.svg.png

Kanonski i nekanonski put aktivacije proteina

U literaturi, pogotovo starijeg datuma, često se navode dva načina aktivacije proteina, koji se nazivaju kanonski (Canonical Signaling Pathway) i nekanonski put (Non-Canonical Signaling Pathway), a tipičan primjer je aktivacija NF- κ B. Termin kanonski primjenjuje se za široko prihvaćene, idealizirane ili generalizirane modele kojima se objašnjavaju temeljni ili najčešći principi određenog procesa (koji može biti i visko specifičan), počevši od mehanizma aktivacije, signalnih puteva, do krajnjeg rezultata, dok se termin nekanonski odnosi na modele koji dijelom odstupaju od paradigme kanonskog modela iz kojih su izvorno modelirani, bilo po mehanizmu aktivacije, signalnim putevima ili krajnjem rezultatu. Nekanonski modeli mogu predstavljati alternativane i manje poznate puteve istog procesa, što je posljedica našeg nepotpunog poznavanja bioloških procesa, ali i kronologije otkrivanja i objašnjenja istih (kanonski modeli su u principu ranije definirani modeli). Međutim termini kanonski i nekanonski nisu strogo definirani i koriste se relativno faktuativno, jer se kanonski i

nekanonski modeli preklapaju u većem ili manjem dijelu (signalni putevi nisu vertikalno linearni već izrazito komplicirane mreže sa puno interaktivnih čvorišta) i iako se putevi mogu razlikovati u tipovima stanica koje aktiviraju, aktivacijskim receptorima, citoplazmatskim adapterskim proteinima i brzini aktivacije, ipak u konačnici dijele iste principe: aktivacija signalnog puta počinje stimulacijom stanice ekstracelularnim (rjeđe intracelularnim) stimulansima preko odgovarajućeg receptora, što rezultira aktivacijom signalne kaskade i formiranjem enzimskog kompleksa koji aktivira ciljni protein bilo postranslacijskom transformacijom bilo stimulacijom de novo sinteze.

Proteosom i razgradnja proteina

Razgradnja je dio normalnog životnog ciklusa proteina (eliminacija neispravno sintetiziranih, iskorištenih, blokiranih ili oštećenih proteina), ali se može događati u sklopu regulatorne uloge u nekim signalnim putevima. Proces se zbiva u citoplazmi u nekoliko faza, a započinje tako da stanica, koja razlikuje proteine koje mora razgraditi od proteina koji moraju ostati intaktni, one namijenjene razgradnji prvo označi povezivanjem sa malim polipeptidom (ubikvitin), a potom ih u proteosomu razgrađuje na male peptide, koji mogu djelovati kao regulatorne molekule ili predstavljaju degradaciju regulatornog proteina i mogu se dalje razgrađivati proteazama citoplazme do razine aminokiselina, koje se potom koriste za sintezu novih peptida (proteina), dušičnih baza nukleinskih kiselina ili u energetsom metabolizmu. Proteosom je ATP ovisna, 26 S citoplazmatska struktura (S od Svedberg), građena kao proteinski kompleks od dvije strukturno i funkcionalno različite podjedinice, 20 S proteosoma i (dvije) 19 S podjedinice. 20 S proteosom je proteolitički dio proteosoma koji predstavlja mjesto razgradnje proteina na peptide duljine 7-9 aminokiselina, koji je građen od 4 prstena sa centralnom šupljinom (dva prstena od 7 β polipeptidnih lanaca umetnutih između dva prstena od 7 α polipeptidnih lanaca). 19 S podjedinice su regulatorni dio proteosoma, koje se nalaze na oba kraja 20 S proteosoma, a građene su od α polipeptidnih lanaca i mjesto su vezanja ubikvitina iz označenog proteina. Regulatorne 19 S podjedinice onemogućuju ulaz neoznačenih proteina u 20 S proteosom. Ubikvitinizirani protein koji je najčešće na puno mjesta povezan sa ubikvitinskim polimerom (molekule ubikvitina međusobno povezanih izopeptidnom vezom preko aminokiselina glicin-lizin), veže se na 19 S podjedinicu proteosoma, koja troši ATP na razgradnju trodimenzionalne strukture proteina kako bi mogao ući u šupljinu 20S proteosoma, gdje izopeptidaza odvaja molekule ubikvitina od proteina (ubikvitin se ne razgrađuje nego intaktan vraća u citoplazmu za ponovnu ubikvitinizaciju drugih proteina), a protein razgrađuje na male peptide. Svrha proteosomalne

razgradnje ubikvitiniranog proteina je najčešće eliminacija nepotrebnog, oštećenog ili štetnog proteina, ali može biti i dio regulatornog procesa u različitim signalnim putevima.

Ubikvitin

Ubikvitin (Ubiquitin), predhodno poznat kao ATP-dependent Proteolysis Factor 1 (APF-1), je mali (76 aminokiselina, 8,6 kDa) regulatorni, slobodni, citoplazmatski peptid (protein) većine eukariotskih stanica, u inaktivnoj formi, koji se aktiviran povezuje sa drugim citoplazmatskim proteinima i inicira njihovu razgradnju u proteosomu. Sintezu ubikvitina kodiraju 4 gena: UBB, UBC, UBA52(UBCEP2), RPS27A (UBA80, UBCEP1), a naziv je izveden od lat. *ubique* (ubi = gdje, que = svaki, svatko), jer je njegovo postojanje utvrđeno u gotovo svim tipovima stanica (ubikvitaran tj. svugdje prisutan). Posttranslacijska modifikacija ciljanog proteina ostvaruje se vezanjem molekula ubikvitina (ubikvitinacija) na ciljani protein putem kovalentne (izopeptidne) veze (-NH-CO-) između aminokiseline glicina na ubikvitinu i aminokiseline lizina na ciljanom proteinu, pri čemu se ubikvitin veže na protein na jednom ili više mjesta u obliku monomera (jedna molekula) ili češće polimera (više molekula ubikvitina međusobno povezanih izopeptidnom vezom glicin-lizin). Ubikvitinacija je energetski zavisna kaskada (troši se ATP) katalizirana sa 3 enzima: aktivatorskog, engl. Ubiquitin activating enzyme (E1), konjugatorskog, engl. Ubiquitin conjugating / transferring enzyme (E2) i ligaze, engl. Ubiquitin ligase (E3), pri čemu ligaza nema samo ulogu u ubikvitinizaciji, već i u prepoznavanju proteina odrađenog za degradaciju. Kaskada započinje vezanjem aktivatorskog enzima na ubikvitin tioesterskom vezom (-HS-CO-) između aminokiseline cistina na enzimu i karboksilne grupe ubikvitina uz potrošak ATP, potom konjugatorski enzim istiskuje aktivatorski i povezuje se umjesto njega također tioesterskom vezom na ubikvitin bez potroška ATP (zamjena tioesterskih veza) i konačno se na ligazi vrši ubikvitinizacija tj. prvo se povezuje ubikvitin izopeptidnom vezom (glicin-lizin) na ciljani protein, a potom se istim principom polimeriziraju molekule ubikvitina uz oslobađanje konjugatorskog enzima. Ubikvitinom označeni protein se razgrađuje u proteosomu, pri čemu protein određen za degradaciju mora biti ubikvitiniziran sa minimalno 4 molekule ubikvitina. Proteosom dezintegrira označeni protein u kratke peptide uz oslobađanje intaktnih molekula ubikvitina koje služe za ponovnu ubikvitinaciju drugih proteina.

Citokini

Citokini engl. cytokines su proteini ili glikoproteini, kratkog životnog vijeka, koji djeluju kao signalne molekule pretežno između upalnih stanica (u najširjem smislu te riječi), putem receptora na ciljanoj stanici (citokinski receptor) koji ima veliki afinitet za citokine, pa za učinak ne treba se puno citokina. Većinom su male solubilne molekule, dok ih je manji broj

fiksiran za stanične membrane kao membranski proteini tzv. ligandi. Većinom stimuliraju ciljane stanice na diobu (proliferaciju), pa se mogu smatrati faktorima rasta, iako neki djeluju kao aktivatori apoptoze. Ovisno o vrsti citokina oni pripremaju stanice za dijeljenje (aktivacija staničnog ciklusa), potiču sazrijevanje i diferencijaciju stanica za određenu funkciju (npr. limfocit B → plazma stanica), stimuliraju sekreciju citokina, kemotaksijom izazivaju migraciju stanica ili iniciraju apoptozu stanice (vanjski put aktivacije kaspaza). Produciraju ih upalne (monociti, histiociti, limfociti T, limfocit B, mastociti), ali i potporne stanice (fibrociti, stromalne i endotelne stanice), a djeluju uglavnom na maloj udaljenosti od mjesta sekrecije tj. citokin može djelovati na samu stanicu koja ga je izlučila (autokrino, apokrino djelovanje) ili na drugu stanicu u blizini stanice koja ga je izlučila (parakrino, perikrino), dok rjeđe djeluju na mjestima daleko od mjesta sekrecije (endokrino djelovanje). U citokine se ubraja građom i funkcijom široka paleta molekula: interleukini (IL), tumor nekrotizirajući faktori (TNF), interferoni (IFN), faktori stimulacije kolonija (CSF), kemokini i transformirajući faktori rasta (TGF). Trenutno nema jedinstvena podjele, pa se koristi podjela na osnovi: građe polipeptida (4 grupe: polipeptidi sa barem 4 α (alfa) zavojnice, polipeptidi sa cisteinskim čvorovima, polipeptidi familije IL₁, polipeptidi familije IL₁₇), funkcije i kliničko - imunološka podjela na osnovi funkcije u upalnom odgovoru koja ne uključuje sve citokine (2 grupe: TIP 1 koji sudjeluju u staničnoj imunosti (npr. TNF α , IFN γ , IL₁₂) i TIP 2 koji sudjeluju u humoralnoj imunosti tj. produkciji protutijela (npr. TGF β , IL₄, IL₁₀, IL₁₃)). U grubo interleukini (oznaka IL_n - n označava redni broj kada je otkriven) su signalne molekule između leukocita, ali neki djeluju i kao opći faktori rasta, tumor nekrotizirajući faktori (oznaka TNFs - s označava slovo grčke abecede α , β , γ) su slobodne molekule ili su fiksirani na staničnoj membrani makrofaga, mastocita i limfocita T, a reguliraju upalnu reakciju i apoptozu stanica (vanjski put), interferoni (oznaka IFNs - s označava slovo grčke abecede α , β , γ) su produkt virusom zaržene stanice koji stimuliraju zdrave stanice u okolini na sintetizu proteina koji onemogućuju replikaciju virusa, a makrofage na fagocitozu zaražene stanice, faktori stimulacije kolonija (oznaka S - CSF gdje S označava slovo određene loze (M, GM, G) u koštanoj srži potiču razvoj i diferencijaciju pluripotentnih hematopoetičkih stanica u stanice određene loze i osiguravaju da tijelo bude opskrbljeno dovoljnim brojem krvnih stanica, kemokini su mali citokini uključeni tijekom upale u kemotaksiju, migraciju i aktivaciju stanica, posebice fagocita i limfocita, transformirajući faktori rasta (TGF) su velika proteinska obitelj uključena u proliferaciju, diferencijaciju, pokretljivost, adheziju i apoptozu stanica, što se na razini tkiva i organa očituje u cijeljenju rana, fibrozi, angiogenezi, ali i kontroli embrionalnog razvoja kostiju, hrskavice i neurona.

Citokini imaju važnu ulogu u regeneraciji jetre jer neki direktno potiču hepatocyte na diobu, dok drugi (npr. IL1) suprimiraju regeneraciju stimulirajući upalnu reakciju u FLR i djelujući na Kupferove stanice da smanjeno luče TNF α koji djeluje kao proliferacijski faktor za hepatocyte.

Transkripcijski faktori i koaktivatori

Transkripcijski faktori su citoplazmatski proteini koji djeluju kao regulatori ekspresije gena, odnosno ulaze u jezgru stanice gdje se vežu za promotorsku regiju nekog gena (različiti transkripcijski faktori vežu se za različite gene), mijenjaju afinitet promotorske regije za RNK polimerazu 2 (RNAP II) i time omogućuju aktivaciju ili pojačanu ekspresiju, odnosno supresiju dotičnog gena. Promotorska regija omogućuje regrutiranje i vezanje RNK polimeraze 2 za gen i transkripciju gena u odgovarajuću primarnu mRNK, koja se nakon posttranskripcijske maturacije, translata na ribosomu u odgovarajući protein, što u konačnici rezultira sintezom ciljanog proteina (povećanom ili smanjenom ovisno o afinitetu promotorske regije prema RNK polimerazi 2 i mehanizmu djelovanja transkripcijskog faktora). Transkripcijski faktori predstavljaju efektorski dio signalnih puteva, koji se (simplificirano) sastoje od signalne molekule, (najčešće) ekstracelularnog receptora koji obično ima naziv prema signalnoj molekuli, aktivatorske kaskade koja ima ulogu drugog glasnika (second messenger) i transkripcijskog faktora koji u svojoj strukturi između ostalog posjeduje i dijelove (domene) za vezanje za gen i za vezanje za transporter kojim prolazi jezgrinu membranu. Drugi glasnik (aktivator stanice) je sistem citoplazmatskih proteina (u principu enzima) koji međusobnim djelovanjem omogućuju prijenos vanjskog podražaja (signalna molekula) do efektorskog proteina (transkripcijski faktor), pri čemu su neki proteini drugog glasnika uključeni u više različitih signalnih puteva, a i unutar istog signalnog puta mogu djelovati različite varijante istog proteina (obitelj proteina), pa krajnji rezultat aktivacije signalnog puta tj. koji gen će biti reguliran, ovisi o tome koje su komponente drugog glasnika imale dominantnu ulogu. Drugi glasnik može djelovati kao posttranslacijski modifikator presintetiziranih transkripcijskih faktora koji su u citoplazmi u inhibiranom obliku ili kao transkripcijski faktor koji stimulira njihovu sintezu „de novo”. Presintetizirani transkripcijski faktori (npr. NF- κ B) imaju brže djelovanje od onih koji se na podražaj prvo moraju sintetizirati (npr. c-Jun, STAT, jezgreni hormonski receptori). Funkcija proteina koji je produkt regulacije aktiviranog gena, determinira učinak transkripcijskog faktora, pa neki reguliraju sazrijevanje i diferencijaciju stanica, neki pak djeluju kao faktori rasta odnosno promotori stanične proliferacije, uključujući i onkogenezu, jer sudjeluju u regulaciji sinteze proteina staničnog ciklusa (npr. protoonkogeni), dok drugi funkcioniraju kao tumor

supresorski proteini i proapoptotički faktori jer sudjeluju u regulaciji sinteze proteina uključenih u reparaciju DNK, odnosno apoptozu stanice u slučaju neuspjeha reparacije (npr. p53).

Transkripcijski koaktivatori su proteini koji se u jezgri stanice vežu za transkripcijske faktore i određuju za koju promotorsku regiju, odnosno koji gen, će se vezati transkripcijski faktor i koji će biti njegov učinak na promotorsku regiju dotičnog gena. Transkripcijski koaktivatori obično se vežu za manje potentne transkripcijske faktore (npr. C-Fos c-Jun heterodimer).

Leucin zipper proteini

Leucin zipper regulatorni proteini (ZIP), pripadaju transkripcijskim faktorima, specifične trodimenzionalne strukture, koja izgleda kao patentni zatvarač (zip). Građeni su kao dimeri, tj. od dvije međusobno povezane proteinske podjedinice, bilo istovrsne (homodimeri), bilo raznovrsne (heterodimeri). Svaka proteinska podjedinica (polipeptidni lanac) građena je po tipu alfa zavojnice (alfa helix) koji na jednom svojem kraju ima veliki broj molekula leucina u točno određenom ritmu ponavljanja (tzv. leucinska domena), koja omogućuje međusobno spajanje dva polipeptidna lanca u dimer (uglavnom preko leucina). Na suprotnom kraju leucin zipper proteina, polipeptidni su lanci razdvojeni i svaki lanac ima zonu kojom se veže za baze na polinukleotidnom lancu DNK (tzv. osnovna domena). Vezanje osnovne domene za DNK zbiva se kao i kod drugih transkripcijskih faktora u regulatornom dijelu gena tj. izvan kodirajućeg dijela, ali blizu njega. Leucin zipper proteini u principu djeluju kao aktivatori transkripcije ciljanog gena, te sudjeluju u regulaciji normalne stanične diobe i diferencijacije, regulaciji apoptoze, ali i aktivaciji onkogeneze (u slučaju mutacije ili pojačane produkcije). U tu grupu proteina ubrajaju se između ostalih i: MYC (myc, max i mxd1), GADD (GADD153 i GADD45), FOS (c-Fos), JUN (c-Jun), odnosno. transkripcijski faktor AP1 koji predstavlja heterodimer c-fos i c-jun.

Kinaze

Kinaze su široka lepeza proteina (polipeptida) citoplazme većinom uključenih u signalne puteve kao dio drugog glasnika, koji fosforiliraju druge proteine, na način da određenoj aminokiselini u polipeptidnom lancu ciljane molekule, na molekulu kisika hidroksilne grupe dodaju molekulu fosfata koju preuzmu sa adenozin tri fosfata ($ATP \rightarrow ADP + P$). Kinaze mogu biti transmembranski receptori (receptorske kinaze) ili slobodni citoplazmatski proteini, a po svojoj funkciji spadaju u transferaze (prebacuju fosfat). Ovisno o ciljanoj aminokiselini ovisi naziv kinaze: tirozin kinaza, serin-treonin kinaza, tirozin-serin-treonin kinaza. Tirozin kinaze spajaju fosfat na aromatski prsten tirozina pretvarajući ga u fosfotirozin, bilo kao transmembranski receptori tzv. RTK (npr. EGFR) ili kao slobodni citoplazmatski proteini

(npr. Src). Serin-treonin kinaze (npr. RAF) u polipeptidnom lancu drugih proteina fosforiliraju aminokiselinu serin u fosfoserin odnosno aminokiselinu treonin u fosfotreonin, dok tirozin-serin-treonin kinaze (npr. MEK) u polipeptidnom lancu drugih proteina fosforiliraju bilo koju od navedenih aminokiselina. Fosforilacija aminokiselina jedan je od načina posttranslacijske modifikacije proteina i obično rezultira njihovom aktivacijom.

Tirozin kinaze

Tirozin kinaze funkcionalno pripadaju kinazama i sudjeluju kao drugi glasnik u brojnim regulatornim putevima uključenima u proliferaciju i diferencijaciju stanica i apoptozu. Njihova nekontrolirana ekspresija može rezultirati malignom alteracijom (primarna onkogeneza, metastaze, tumorska angiogeneza) Tirozin kinaze mogu biti slobodni citoplazmatski enzimi tzv. nerekceptorske tirozin kinaze (NRTK) ili vezane na stanične membrane kao tzv. receptorske tirozin kinaze (RTK). Primjeri receptorskih tirozin kinaza su Epidermal growth factor receptor (EGFR), Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), Vascular endothelial growth factor receptor (VGFR) i Insulin receptor (InsR). Sarcoma kinase (Src) i Janus kinase (JAK) primjeri su nerekceptorskih tirozin kinaza.

RTK

Receptorske tirozin kinaze odnosno tirozin kinaza receptori, tj. Receptor Tyrosine Kinase (RTK) su transmembranski proteini (jedostavni peptidi), većinom uključeni u signalne puteve kao dio drugog glasnika i funkcionalno pripadaju tirozin kinazama. U tu se ubrajaju receptori epidermalnog faktora rasta, engl. Epidermal growth factor receptor (EGFR), receptori faktora rasta porijeklom iz trombocita, engl. Platelet derived growth factor receptor (PDGFR), receptori vaskularno-endotelnog faktora rasta, engl. Vascular endothelial growth factor receptor (VGFR) i receptor za inzulin, engl. Insulin receptor, (InsR) Na amino (-NH₂) kraju, tj. na vanjskoj strani stanične membrane (intersticij) imaju receptor za aktivacijsku molekulu, engl. Ligand Binding Domain (LBD), a na karboksilnom (-COOH) kraju tj. unutarnjoj strani stanične membrane (citoplazma) enzim tirozin kinazu, engl. Tyrosine Kinase Domain, dok je dio peptida koji prolazi kroz dvosloj fosfolipida stanične membrane građen po tipu alfa zavojnice (alfa helix) sa puno hidrofobnih molekula koje omogućuju „sidrenje“ u hidrofobnoj okolini. Postoji oko 58 različitih humanih tirozin kinaza receptora, podijeljenih u cca. 20 različitih proteinskih familija, ali su strukturno i funkcionalno slični (receptori na koje je nakalamljen enzim tirozin kinaza). Vezanjem odgovarajuće signalne molekule tzv. liganda (npr. epidermalnog faktora rasta (EGF)) na njegov receptorski dio (Ligand Binding Domain), dolazi do strukturne promjene receptora, što omogućuje povezivanje sa drugim jednako podraženim tirozin kinaza receptorom (bilo istom ili drugom istovrsnom ligand molekulom)

preko receptorskih domena u dimer, čime se pokreće (ukrižena) autofosforilacija (trans autophosphorylation) oba receptora: tj. tirozin kinaza svakog receptora prvo fosforilira molekule tirozina u polipeptidnom lancu tirozin kinaze drugog receptora, a potom i ostale molekule tirozina preostalog citoplazmatskog dijela drugog receptora. Fosfotirozin u polipeptidnim lancima citoplazmatskog dijela oba receptora nastao kao posljedica navedene autofosforilacije, služi kao vezno mjesto za druge citoplazmatske proteine, koji u svojoj strukturi posjeduju regije koje služe vezanju za druge proteine tzv. SH domene, npr. Growth factor receptor Binding protein 2 (Gbr2). SH domene su sinonim za engl. SRC Homology Domain, dijelove polipeptidnog lanca koji se nalaze na velikom broju proteina, a prvi put su registrirane u polipeptidnom lancu slobodne citoplazmatske tirozin kinaze (Src). Temeljna uloga SH domena na proteinima je omogućiti vezanje za druge proteine, a na kojem će se mjestu polipeptidnog lanca drugog proteina ostvariti veza ovisi o tipu SH domene: npr. SH2 domena (SRC Homology Domain 2) ima svojstvo vezanja za fosfotirozin (npr. Gbr2 za RTK), a SH3 domena (SRC Homology Domain 3) za vezanje na dijelove polipeptidnog lanca koji imaju u strukturi puno molekula aminokiseline prolin, engl. Prolin domain (Prolin rich region), između ostalih Son of Sevenless (SOS), citoplazmatskog proteina koji je dobio ime prema produktu (Son of) drozofilinog gena Sevenless, a služi kako aktivator G monomernih proteina, kataliziranjem izmjene gvanin nukleotida vezanih na G protein (npr. aktivacija RAS proteina zamjenom GDP sa GTP). Receptorske tirozin kinaze drugi su glasnik brojnih intracelularnih signalnih puteva, između ostalih PI3K - AKT - mTOR, Ras - Raf - MEK - ERK, PLC γ - PKC, koji reguliraju proliferaciju i diferencijaciju stanica, ali mogu potaknuti i onkogenezu.

EGFR

Receptor za epidermalni faktor rasta, engl. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) pripada receptorskim tirozin kinazama (RTK) iz Erb familije. Još se naziva i engl. Human Epidermal Growth Factor Receptor 1 (HER1), a koriste se i kratice Erb1 odnosno ERBB1. EGFR je receptor za epidermalni faktor rasta, engl. Epidermal Growth Factor (EGF), koji funkcionalno pripada faktorima rasta koji uključuju i transformirajuće faktore rasta (TGF α i TGF β), interleukine (IL1 i IL2), tumor nekrotizirajući faktor (TNF α), faktor rasta iz trombocita (PDGF), eritropoetin itd. Epidermalni faktor rasta (EGF) je prototip peptidnih faktora rasta EGF obitelji, koju čini dvanaest proteina: transformirajući faktor rasta alfa, engl. Transforming Growth Factor α (TGF α), amfiregulin iz astrocita, Schwanovih stanica i fibroblasta, engl. Amphiregulin (AREG), pox virus faktori rasta (vakcinije i Shopevog fibroma) engl. Vaccinia Growth Factor (VGF), Shope Fibroma Growth Factor (SFGEF),

miksoma virus faktor rasta, engl. Myxoma virus Growth Factor (MGF), betacelulin engl. BeTaCellulin (BTC), epidermalnom faktoru rasta sličan faktor koji veže heparin, engl. Heparin Binding EGF like growth factor (HBEGF), epiregulin (EREG), neuregulini odnosno heregulini 1-4, engl. NeuReGulins (NRG1, NRG2, NRG3 i NRG4). Proteini obitelji epidermalnih faktora rasta grubo su podijeljeni u 5 grupa prema sklonosti za određeni ErB receptor tj. receptore: EGFR (ErB1), ErbB2 (HER2, Neu), ErB 3 (HER3) i ErB 4 (HER4), pa se tako EGF, TGF α , AREG, VGF, SFGF i MGF vežu za receptor EGFR (ErB 1), NRG1 i NRG2 za receptore ErB 3 i ErB 4, BTC i HBEGF za receptore EGFR i ErB 4, NRG3 i NRG4 se vežu isključivo za receptor ErB 4 i EREG se veže podjednakim afinitetom za receptore EGFR, ErB 3 i ErB 4. EGF, koji se kod čovjeka još naziva i urogastron, može se dokazati u brojnim humanim tkivima i izlučevinama (bubrezi, bronhi, žlijezde slinovnice, mlijeko, urin - odatle i naziv urogastron), izlučuju ga trombociti i makrofazi u ozlijeđenim tkivima, a za EGF iz slinovnica se vjeruje da ima važnu ulogu u zaštiti i oporavku sluznice usta, želuca i jednjaka od djelovanja želučanog soka, žuči, tripsina, pepsina i bakterijskih toksina. Epidermalni faktor rasta (EGF) se sintetizira kao transmembranski glikoprotein i potom posttranslacijskom modifikacijom djelovanjem metaloproteaze ADAM, odvaja kao slobodna molekula i veže na istoimeni receptor (EGFR) na staničnoj membrani ciljne stanice, u kojoj sudjeluje u stimulaciji sinteze DNK, stanične proliferacije, migracije i diferencijacije. U principu nakon aktivacije receptora sa EGF, podraženi receptor stvara homodimer sa drugim aktiviranim EGFR, ali može formirati i heterodimer sa drugim RTK iz ErB familije (npr. Erb2), čime se pokreće unakrsna auto fosforilacija koja rezultira stvaranjem velikog broja fosfotirozina u polipeptidnim lancima citoplazmatskih dijelova oba receptora. ErbB obitelj čine 4 proteina: EGFR (sin. ErbB1, Her1), ErbB2 (sin. Her2, Neu), ErbB3 (sin. Her3) i ErbB4 (sin. Her4) koji strukturno i funkcionalno pripadaju humanim tirozin kinaza receptorima (RTK) kodiranim istoimenim genima, npr. EGFR kodiran je HER1 genom na kratkom (p) kraku sedmog humanog kromosoma (7p12). Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) je prvo otkriveni protein obitelji, koja je dobila naziv prema virusnom onkogenu v-erb-b oncogen 2 (erythroblastic leukemia viral oncogene) koji kodira sintezu strukturno i funkcionalno homolognog receptora u ptičjoj eritroleukemiji (oblik akutne mijeloične leukemije karakterizirane proliferacijom eritroblasta). Nedovoljna ekspresija ErbB gena povezana je sa razvojem neurodegenerativnih bolesti (multipla skleroza, Alzheimer), dok prekomjerna ekspresija može uzrokovati razvoj solidnih tumora (dojka, mokraćni mjehur, ovarij, pluća), pa se tako i EGFR nalazi u cca.60 - 80% malignih stanica kolorektalnih karcinoma.

JAK

Janus kinaza, engl. Janus Kinase (JAK) je obitelj četiri transmembranska proteina (JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2), čija je sinteza kodirana odgovarajućim genima, a koji su uključeni u signalne puteve kao dio drugog glasnika i funkcionalno pripadaju tirozin kinazama. Na vanjskoj strani stanične membrane protein ima receptor za aktivacijsku molekulu koja može biti eritropoetin, trombopoetin, prolaktin, leptin ili najčešće neki od citokina npr. interleukin, interferon ili faktor rasta kolonija granulocita i monocita, engl. Granulocyte - Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Stimulacija receptorskog dijela (ekstracelularne domene) Janus kinaze odgovarajućom signalnom molekulom, uzrokuje povezivanje sa drugom stimuliranom Janus kinazom u dimer, konformacijske promjene u oba proteina i unakrsnu autofosforilaciju citoplazmatskog dijela oba proteina koji onda služe kao mjesto vezanja i fosforilacije za druge citoplazmatske proteine uključene u drugog glasnika signalnih puteva koji reguliraju ekspresiju gena, npr. AKT, Ras-BRAF-MEK, STAT, što u konačnici rezultira formiranjem odgovarajućeg transkripcijskog faktora koji iz citoplazme ulazi u staničnu jezgru i aktivira transkripciju odgovarajućeg gena. Značenje Janus kinaza očituje se u regulaciji imunološkog odgovora na stimulaciju citokinima putem JAK-STAT signalnog puta (diferencijacija pomoćnih T limfocita (JAK3), sekrecija interferona (JAK1)), ali i u njihovoj ulozi u onkogenezi (mutacije JAK2 (točkaste ili translokacije kromosoma) uključene su u podlogu brojnih hematoloških poremećaja (policitemije rubre vere, leukemije, limfoma, mijelodisplazije, mijelofibroze i trombocitoze).

G proteini

G proteini odnosno s gvanozinom povezani proteini, engl. G proteins, Guanine nucleotide binding proteins, G protein linked receptors, G protein linked 2nd messengers, G protein coupled receptors (GPCRs), su obitelj intracitoplazmatskih proteina, prisutnih samo u eukariotskim stanicama, koji pripadaju membranskim enzimima, funkcionalno ovisnim i povezanim sa gvaninskim nukleotidima (odatle i G u nazivu). Gvaninski nukleotidi mogu biti u obliku tri ili bi fosfata, tj. gvanozin trifosfat (GTP) ili gvanozin difosfat (GDP), a o stupnju fosforilacije povezanog gvanozina ovisi enzimsko aktivnost G proteina; enzim vezan sa gvanozin di fosfatom (GDP) je u inaktivnom, a sa gvanozin tri fosfatom (GTP) u aktivnom stadiju. Funkcionalo su G proteini su ATPaze koji su kao drugi glasnici uključeni u prijenos podražaja sa receptora na staničnoj membrani putem brojnih intracelularnih signalnih puteva, a strukturno su heterotrimeri tj. građeni su od tri polipeptidne jedinice α , β i γ (β i γ su čvrsto povezane, dok je α na njih labilno vezana) ili monomeri (obitelj RAS proteina) građeni samo od jedne α polipeptidne jedinice. G proteini su lokalizirani sa unutrašnje strane stanične

membrane, za koju su ukotvljeni lipidnim izdancima i u tijesnom su kontaktu sa transmembranskim receptorima, čije podraživanje ekstracelularnim stimulansom (ligand) izaziva konformacijske promjene u G proteinu, pri čemu α podjedinica na koju je u inaktiviranom obliku vezan gvanozin difosfat, prihvati gvanozin trifosfat (umjesto gvanozin difosfata), te putuje duž nutarnje strane stanične membrane i dalje vezana za nju lipidnim izdancima do ciljanog proteina kojeg aktivira, uz napomenu da ukoliko se radi o heterotrimeru, nakon podraživanja odgovarajućeg receptora tzv. G protein coupled receptors (GPCRs), aktivirana α podjedinica se odvaja od β - γ kompleksa. Aktivnost G proteina određuju faktori koji utječu na sposobnost vezanja gvanozin trifosfata na α podjedinicu, odnosno aktivnost GTP-aza tj. enzima hidrolaza koje defosfatiraju na α podjedinici vezani gvanozin trifosfat u gvanozin difosfat, čime deaktiviraju enzimatsku funkciju G proteina. Efekti aktiviranog G proteina su brojni i ovise o vrsti α podjedinice, pa npr. $\text{S}\alpha$ aktivira adenilat ciklazu koja katalizira prijetvorbu adenozin tri fosfata (ATP) u ciklički adenozin mono fosfat (cAMP) koji aktivira protein kinazu A (PKA) uključenu u fosforilaciju (aktivaciju) brojnih transkripcijskih faktora, $\text{Q}\alpha$ aktivira membransku fosfolipazu C (PLC) koja hidrolizira lipid fosfatidilinositol bisfosfat (PIP₂) stanične membrane u slobodni inositol trifosfat (IP₃) koji se veže za endoplazmatski retikulum i otvara kalcijске kanale što rezultira povećanjem intracitoplazmatske koncentracije kalcija i njegovog vezanja u kompleks sa kalmodulinom što predstavlja ključni korak u aktivaciji endotelijske sintetaze dušičnog oksida (NOS₃, eNOS), dok α podjedinica RAS-a omogućuje fosfatzi 2A (PP2A) i tirozin kinazi (Src) aktiviranje RAF-a, što dovodi do pokretanja MAPK kaskade i aktivacije transkripcijskih faktora cFos, cJun i cMyc. Značenje G proteina u modernoj medicini očituje se i u pretpostavci da su uključeni u mehanizam djelovanja cca. 40% lijekova koji su danas u upotrebi.

STAT

Aktivator transkripcije i provođenja / pretvaranja signala, engl. Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT) je obitelj sedam citoplazmatskih proteina (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6), kodiranih odgovarajućim genima, koji djeluju kao transkripcijski faktori. Inaktivne molekule koje se nalaze u citoplazmi stanica, aktiviraju se fosforiliranjem npr. Janus (JAK) ili sarkoma (SRC) kinazom, nakon čega se stvaraju homodimeri (spoj dvije istovjetne aktivirane STAT molekule) ili heterodimeri (spoj dvije raznovrsne aktivirane STAT molekule). Homodimer ulazi iz citoplazme u staničnu jezgru i aktivira transkripciju odgovarajućeg gena (većinom uključenih u stanično preživljavanje), vežući se na aktivacijsko mjesto, engl. Gene Activating Sequence Element

(GAS Elements). Značenje pretvarača signala i aktivatora transkripcije (STAT) očituje se u regulaciji imunološkog odgovora na stimulaciju citokinima kao drugog glasnika JAK-STAT signalnog puta (diferencijacija pomoćnih T limfocita (STAT4, STAT6), mobilizacija leukocita (STAT5), aktivacija NK limfocita (STAT4)).

MAPK (RAS, RAF, MEK, ERK)

Mitogenima aktivirane kinaze proteina, engl. Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK, sin. MAP kinase) odnosno intracelularna enzimska kaskada $RAS \rightarrow RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK$ je proces aktivacije citoplazmatskih kinaza, potaknut izvanstaničnim stimulansom aktivacije RAS citokinima EGF i $TGF\alpha$ putem EGFR receptora i proteina SOS i Gbr2, odnosno unutarstaničnim regulatorima RAF-a (Src, protein 14-3-3, HSP 90 i PAK sin. p21), koji u konačnici rezultira aktivacijom transkripcijskih faktora u jezgri stanice (cFos, cJun, cMyc) čija je uloga reguliranje ekspresije gena uključenih u proliferaciju (diobu) i diferencijaciju (sazrijevanje) stanica.

RAS

Protoonkogeni štakorskog sarkoma engl. RAt Sarcoma (RAS) je obitelj 4 za staničnu membranu fiksirana citoplazmatska proteina, kodiranih sa 3 istoimena gena: NRAS, HRAS i KRAS, koji spadaju u grupu G monomernih proteina. Dok geni NRAS i HRAS kodiraju odgovarajući polipeptidni lanac, gen KRAS kodira dvije varijante polipeptidnog lanca (KRAS4a i KRAS4b), ovisno o posttranskripcijskoj modifikaciji primarne mRNK KRAS gena. RAS su citoplazmatski proteini fiksirani sa nutarnje strane stanične membrane pomoću dugačkih lipidnih lanaca, građenih polimerizacijom tzv. farnesilnih grupa (spoj 3 molekule izoprena), koji su vezani na aminokiselinu cistein obično pri kraju polipeptidnog lanca RAS molekule (farnesilacija proteina). RAS sudjeluje u ekstracelularnim faktorima stimuliranoj indukciji ekspresije gena uključenih u staničnu proliferaciju i diferencijaciju, a naziv su dobili izvedenicom od RAt Sarcoma, jer su otkriveni prilikom proučavanja onkovirusima uzrokovanih sarkoma štakora. Ubrajaju se u protoonkogene, jer je prekomjerna aktivnost uzrokovana mutacijom RAS gena prisutna u velikom broju humanih tumora, pogotovo adenokarcinom gušterače, debelog crijeva, dojke i pluća. Inicijalno RAS je u inaktivnom stanju (tijesno vezan sa GDP), a aktivira se citokinima aktiviranim kompleksom RTK-Gbr2-SOS: epidermalni faktor rasta (EGF) se ekstracelularno kao ligand veže na istoimeni receptor (EGFR) koji pripada transmembranskim kinazama (RTK), što omogućuje povezivanje sa drugim tako aktiviranim receptorom u dimer, čime se pokrene autofosforilacija intracitoplazmatskog dijela dimera i povezivanje sa slobodnim citoplazmatskim proteinom (Gbr2), na koji se potom veže Son of Sevenless (SOS), slobodni citoplazmatski protein koji je

aktivator G monomernih proteina i omogućuje vezanje kompleksa RTK+Gbr2+SOS na RAS. Son of Sevenless (SOS) uzrokuje konformacijske promjene u RAS, te RAS otpušta GDP i zamjenjuje ga sa GTP čime se RAS aktivira i odvaja od SOS, odnosno aktivacijskog kompleksa (RTK+Gbr2+SOS). Aktivirani RAS omogućuje da intracitoplazmatski enzimi protein fosfatza 2A (PP2A) i tirozin kinaza (Src) aktiviraju RAF, a oslobođeni aktivacijski kompleks RTK+Gbr2+SOS može aktivirati drugi inaktivni RAS.

RAF

Faktor rapidnog ubrzanja fibrosarkoma, engl. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF) odnosno engl. Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK, sin. MAP3K) je obitelj 3 slobodna citoplazmatska proteina (ARAF, BRAF i CRAF, sin. RAF1) koji su inaktivne serin/treonin kinaze, kodirani istoimenim genima. Inaktivnost je uzrokovana proteinom 14-3-3 vezanim na fosforilirane inhibitorne domene RAF. Vezanjem inaktivnog RAF za aktivirani RAS (RAS povezan sa GTP), dolazi do konformacijske promjene u RAF koja omogućuje da fosfataza PP2A (Protein Phosphatase 2A) defosforilira inhibitorne domene, čime se od RAF odvaja inhibitorni protein 14-3-3, a slobodna citoplazmatska tirozin kinaza iz obitelji Src kinaza fosforilira ekcitiacijske domene i aktivira RAF koji potom djeluje kao kinaza koja fosforilira aminokiseline serin i treonin unutar polipeptidnog lanca MEK kinaze koja se time aktivira.

MEK

Ekstracelularno regulirana kinaza mitogenima aktivirane kinaze engl. Mitogen activated protein kinase Ekstracellular regulated kinase Kinase (MEK) odnosno engl. Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (MAPKK, sin. MAP2K) je obitelj 2 slobodna citoplazmatska proteina (MEK1 i MEK2) koji su inaktivne tirozin/serin/treonin kinaze, koje se aktiviraju fosforilacijom aminokiseline serina u aktivnom dijelu molekule pomoću RAF i potom kao aktivne kinaze fosforilacijom aminokiselina tirozina ili treonina unutar polipeptidnog lanca ERK kinaze istu aktiviraju.

MAPK sin. ERK

Ekstracelularno regulirana kinaza, engl. Ekstracellular Regulated Kinase (ERK) odnosno engl. Mitogen Activated Protein Kinase II (MAPK, sin. MAP Kinase) je obitelj 2 slobodna citoplazmatska proteina (ERK1 i ERK2) koji su inaktivne kinaze, koje nakon aktivacije fosforilacijom tirozina ili treonina kinazom MEK, ulaze u jezgru stanice i djeluje kao aktivator brojnih slobodnih transkripcijskih faktora. ERK fosforilira između ostalih transkripcijskih faktora inaktivne Elk1 i c-myc. Aktivirani (fosforilirani) Elk1 veže se za promotorsku regiju gena za sintezu c-Fos proteina pojačavajući njegovu sintezu, koji sa

slobodnim c-Jun proteinima u jezgri tvori heterodimere koji djeluju kao i c-myc na ekspresiju gena povezanih sa proliferacijom i diferencijacijom stanica.

GADD proteini

Oštećenjem DNK inducirani proteini koji koče staničnu diobu, engl. Growth Arrest and DNA Damage inducible (GADD) su obitelj citoplazmatskih transkripcijskih faktora, koji strukturno pripadaju leucin zipper proteinima. Ti proteini u koje se ubrajaju između ostalih i GADD153 i GADD45, imaju svojstvo da u slučaju oštećenja stanične DNK koče diobu (proliferaciju) stanica. U proteine iz obitelji GADD45 spadaju (u zagrada stari nazivi) GADD45A (gadd45), GADD45B (MyD118) i GADD45G (CR6). Ti proteini postaju aktivni u stanicama izloženima stresu koji primarno oštećuje DNK, te se u takvim situacijama registrira povećanje transkripcijske aktivnosti njihovih gena (dijelom stimulirano sa p53). U kontroli staničnog odgovora na DNK oštećenje, GADD45 proteini djeluju u interakciji sa drugim regulatornim proteinima (PCNA, p21, Cdc2/ciklinB1, MEKK4, p38). Protein GADD153 (sin. CHOP, DDIT3) poznat i kao C/EBP-u sličan protein, engl. C/EBP Homologous Protein (CHOP), odnosno oštećenjem DNK inducirani transkript 3, engl. DNA Damage Inducible Transcript 3 (DDIT3), pripada obitelji transkripcijskih faktora koji se vežu na promotorske dijelove gena sa specifičnim slijedom nukleotida u DNK lancu (citozin-citozin-adenozin-adenozin-timidin), pa se engl. nazivaju CCAAT enhancer binding proteins (C/EBP). Kodiran je istoimenim genom (GADD153, sin. CHOP, DDIT3) lociranim na dugom (q) kraku 13 humanog kromosoma (12q13.3) i uključen je u blokiranje staničnog ciklusa i aktiviranje apoptoze stanica kao odgovor na stanični stres. Produkcija proteina odnosno ekspresija gena je slabo izražena u proliferirajućim stanicama ali je dominantna u stanicama podvrgnutima stresu (hipenergoza, oštećenja UV zračenjem), a poglavito u stanjima koja oštećuju endoplazmatski retikulum (ER-stress). Stanični stres pojačava ekspresiju GADD153 i njegovu akumulaciju u jezgri stanice, gdje formira heterodimere sa drugim transkripcijskim faktorima iz obitelji C/EBP mijenjajući njihov afinitet (stimulira ili inhibira) za promotorsku regiju ciljnih gena koji pripadaju genima uključenima u stanično preživljavanje i staničnu smrt, te tako djeluje kao transkripcijski supresor ili aktivator. Ekspresija GADD153 gena zaustavlja stanični ciklus (odnosno diobu u mnogim tipovima stanica i stimulira apoptozu stanica (inhibira ekspresiju gena za antiapoptotički protein Bcl2), te se smatra da je ER-stresom inducirana (pojačana) apoptoza posredovana sa GADD153 odgovorna za mehanizam nekih bolesti uključujući diabetes i neurodegeneraciju. Svojstvo GADD proteina da se aktiviraju prilikom staničnog oštećenja koristi se u molekularnoj dijagnostici, pa se fluorescentno oznčena protutijela na GADD45A koriste u detekciji potencijalnih onkogenih na staničnim kulturama, a GADD153 u

istraživanima ER-stresom inducirane apoptoze (mjeranjem mRNA ili registracijom samog proteina protutijelima Western blotting metodom ili imunohistokijski).

Tumorski protein P53

Tumorski protein P53 ili skraćeno p53 (protein 53) je transkripcijski faktor, tj. regulira ekspresiju gena (stimulacija p21, GADD45, ciklin G1, mdm2, Bax, Fas i inhibicija Rb, MDR, Bcl2), a aktivira se prilikom oštećenja DNK. Kodiran je istoimenim genom lokaliziranim na kratkom (p) kraku sedamnaestog humanog kromosoma (17p13.1), a po kemijskoj strukturi je fosfoprotein koji globalno djeluje kao čuvar genoma. Djeluje kao tumor supresorski protein i proapoptotički faktor, jer aktivira reparaciju DNK, zaustavlja dijeljenje stanica (stanični ciklus) i aktivira mitohondrijima odnosno citokrom C oksidazom, kontroliranu apoptozu (nutarnji put aktivacije kaspaza) stanice, ukoliko stanica nije uspjela reparirati DNK. Stanica kontinuirano proizvodi p53, ali se većinom odmah deaktivira i razgrađuje povezivanjem sa proteinom mdm2 (posttranslacijska modifikacija). Aktivaciju p53 omogućuje njegova fosforilacija koja spriječava vezanje mdm2, serin / treonin kinazama, engl. Checkpoint Kinase (ChK1 i ChK2) koje su u trenutku kada se u stanici registrira oštećenje DNK, aktivirane pomoću također drugih serin / treonin kinaza tzv. ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated) i ATR (Ataxia Teleangiectasia and Rad3 related protein). Checkpoint Kinase (ChK1 i ChK2) koriste se prilikom indirektnog dokazivanja aktivnosti p53. Aktivirani (fosforilirani) p53 povezuje se sa drugim aktiviranim p53 u teramer (4 molekule), ulazi u staničnu jezgru i djeluje kao promotor (transkripcijski faktor) gena za sintezu proteina koji su neophodni za reparaciju DNK, proteina p21 (PAK) koji djeluje kao snažan tumor supresorski protein jer zaustavlja stanični ciklus (nema smisla prenositi oštećenje DNK u stanice kćeri) i proteina Puma i Noxa, proapoptotičkih faktora iz familije Bcl-2 regulatornih proteina u slučaju neuspjeha reparacije DNK. Puma i Noxa aktiviraju mitohondrijima odnosno citokrom C oksidazom, kontroliranu apoptozu (nutarnji put aktivacije kaspaza), blokirajući intracelularne antiapoptotičke proteine iz familije Bcl-2 regulatornih proteina (Bcl-2, Bcl-xl), sprečavajući ih time, da inhibiraju stvaranje pora (Bak - Bax kompleks) na vanjskoj mitohondrijskoj membrani. Osim naziva Tumor Protein P53 odnosno p53, u literaturi su u upotrebi i sinonimi: Cellular Tumor Antigen P53, Phosphoprotein P53, Antigen NY-CO-13, Transformation-Related Protein 53, Mutant Tumor Protein 53, P53 Tumor Suppressor, Tumor Suppressor P53, BMFS5, TRP53, BCC7 i LFS1 3.

mdm2

Mdm2 je protein koji se veže na p53 protein onemogućujući njegovu transkripcijsku funkciju na dva načina; vezanjem za p53 spriječava polimerizaciju p53 proteina u tetramere i

omogućuje vezanje ubikvitina na kompleks mdm2-p53, koji inicira razgradnju p53 u proteosomu.

TNF

Tumor nekrotizirajući faktor, engl. Tumor Necrosis Factor (TNF) je obitelj proteina koji funkcionalno pripadaju citokinima, a imaju brojne uloge u upalnoj reakciji, imunološkom odgovoru, kontroli proliferacije stanica i kontroli apoptoze. Toj obitelji pripadaju Fas (receptori i ligandi), koji sudjeluju u inaduciranju apoptoze ciljane stanice djelovanjem citotoksičnih limfocita T, TNF- α koji ovisno o aktiviranom putu izaziva apoptozu, odnosno proliferaciju, TNF- β (novi naziv limfotoksin alfa, engl. LymphoToxin alfa (LT α , sin. LTA)) koji je kod ljudi kodiran LTA genom lociranom na kratkom kraku šestog kromosoma (6p21), pa je u tijesnoj vezi sa genima tkivne snošljivosti engl. Major Histocompatibility Complex (MHC), tj. Human Leukocit Antigen (HLA), a uključen je u regulaciju stanične proliferacije, preživljavanja, diferencijacije i apoptoze, te igra važnu ulogu u iniciranju imunološke reakcije na tumore i kočenju njihovog rasta i destrukciji. U istu obitelj proteina ubrajaju se i ligandi odnosno slobodne molekule i njihovi receptori koji aktiviraju NF- κ B, engl. Receptor Activator of NF- κ B (RANK, RANKL - L od ligand), limfocite B engl. B-cell activating factor (BAFF, BAFFR - R od receptor), poznat u literaturi i pod sinonimima: Tumor Necrosis Factor ligand SuperFamily member 13B (TNFSF13B), B Lymphocyte Stimulator (BLyS), engl. TNF and APO1 related Leukocyte expressed Ligand 1 (TALL-1), Dendritic cell derived TNF like molecule (CD257 antigen), potom receptori za limfotoksin beta, engl. LymphoToxine β Receptor (LTBR), tumor nekrotizirajući faktor 12A i njegov receptor (TWEAK, TWEAKR - R od receptor), engl. Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily member 12A (TNFRSF12A), receptori za ligande na T, engl. T Cell Receptor (TCR), odnosno B limfocitima, engl. B Cell Receptor (BCR), ligandi i receptori vezani na limfocite CD30, CD40, CD27, gdje CD označava razvojnu lozu limfocita (od engl. Cluster of Differentiation). U literaturi se često ne radi strinktna distinkcija termina Tumor Necrosis Factor (TNF), pa se isti koristi za naziv slobodne cirkulirajuće signalne molekule, signalne molekule vezane kao ligand na staničnoj membrani podražajne stanice (npr. limfocita), za naziv transmembranskog receptora na staničnoj membrani ciljane stanice, ali i za nazive (različitih) gena koji kodiraju sintezu signalne molekule (liganda), odnosno transmembranskog receptora. Kako je po novoj nomenklaturi humanog genoma, naziv za protein odnosno gen za tumor nekrotizirajući faktor beta, engl. Tumor Necrosis Factor beta (TNF β) zamijenjen terminom limfotoksin alfa, engl. Lymphotoxin alfa (LT α), promijenjen je i naziv za protein (gen) Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α) u Tumor Necrosis Factor (TNF), jer više nije bilo potrebe za sufiksom α u nazivu

proteina (gena), pa se sada termin Tumor Necrosis Factor (TNF) koristi i za naziv proteina (gena) TNF α , ali i cijele TNF proteinske obitelji.

TNF α

Tumor nekrotizirajući faktor alfa, engl. Tumor Necrosis Factor α (TNF α), odnosno kahektin engl. cachectin, kaheksin engl. cachexin ili po novoj nomenklaturi samo Tumor Necrosis Factor (TNF) je citokin iz obitelji TNF proteina, uključen u apoptozu sranica, sistemski upalni odgovor i regulaciju imunološkog odgovora, te stanično preživljavanje i proliferaciju. Dio je proteina akutne faze i kao endogeni pirogen izaziva povišenu temperaturu, a kao citokin, pripada primarno imunomodulatorima, pa sudjeluje u induciranju upale, kaheksije (odadle i naziv kahektin odnosno kaheksin) i može se pojaviti se kao odgovor na sepsu stimulacijom interleukina jedan i šest (IL1 i IL6), te uzrokovati endotoksemiju i septički šok. U ciljnim stanicama može djelovati i kao inhibitor onkogeneze i replikacije virusa, te inducirati apoptozu. Gen za humani TNF nalazi se na kratkom kraku (p) šestog kromosoma (6p21.3) i sadrži 4 eksona, s tim da je zadnji ekson zajednički i za limfotoksin alfa (LT α , sin. LTA) odnosno tumor nekrotizirajući faktor beta (TNF- β) po staroj nomenklaturi. TNF α sintetiziraju makrofazi, u manjoj mjeri i limfociti (CD4+, NK stanice), leukociti (neutrofili, eozinofili), mastociti, ali i druge stanice (npr. neuroni), u formi transmembranskog trimera (ligand), a djelovanjem metaloproteaze TACE (engl. TNF Alpha Converting Enzyme), poznate i kao metaloproteaza ADAM17, može se odvojiti od stanične membrane i djelovati kao slobodna (solubilna) cirkulirajuća molekula (slobodni citokin). Na ciljne stanice djeluje u formi trimera preko istoimenih membranskih receptora, engl. Tumor Necrosis Factor α Receptor 1 (TNFR 1) i Tumor Necrosis Factor α Receptor 2 (TNFR 2), koji također pripadaju obitelji TNF proteina. Značajna uloga koju TNF α ima u upalnom i imunološkom odgovoru, osim pozitivnog, može rezultirati i štetnim djelovanjem, npr. u vidu autoimunih poremećaja, pa se TNF α dovodi u svezu sa reumatoidnim artritismom, ankilozantnim spondilitisom, psorijazom, upalnim bolestima crijeva, supurativnim hidradenitisom i refrakternom astmom. Navedena stanja pokušavaju se liječiti TNF inhibitorima, koji blokirajući receptor, onemogućuju vezanje TNF na ciljnu stanicu ili se inhibitor, (monoklonalna protutijela na TNF α), veže direktno na TNF molekulu (slobodno cirkulirajuću ili ligand). Takva tzv. biološka terapija, može rezultirati i pogoršanjem kliničke slike ili razvojem nove autoimune bolesti. Disregulacija (porast) proizvodnje TNF smatra se komponentom razvoja nekih humanih bolesti, npr. Alzheimer, tumori (bubrega, dojke, ovarija, gušterače), depresije, psorijaze i upalnih bolesti crijeva. Sekundarna paraneoplastička hiperkalcijemija, prisutna u nekim tumorskim stanjima povezana je sa ektopičnom proizvodnjom TNF-a u kombinaciji sa paratiroidnim hormonom.

Biološka terapija tumora bubrega, dojke, ovarija i gušterače inhibitorima TNF-a pokazuje samo ograničene učinke. Receptori za TNF su transmembranski proteini stanične membrane ciljnih stanica, koji na ekstracelularnoj strani (intersticij) imaju receptor za TNF α , dok na intracelularnoj strani (citoplazma) imaju aktivatorski dio tzv. death domenu, engl. DEath Domain (DED), na koju je u nepodraženom receptoru povezan inaktivatorski protein engl. Silencer Of Death Domain (SODD). Puno istraživaniji receptor tipa 1, engl. TNF receptor type 1 (TNFR1, sin. CD120a, p55/60) nalazi se na staničnoj membrani brojnih stanica i veže se i za slobodni TNF i TNF ligande, za razliku od receptora tipa 2, engl. TNF receptor type 2 (TNFR2, sin. CD120b, p75/80) koji je manje istraživani i koji se uglavnom nalazi na imunostanicama, a veže se samo za TNF ligande. Stimulacija supresorskih T limfocita putem TNFR2 receptora može imati imunosupresivni učinak. Signalni putevi u koje je uključen TNF receptor tipa 1 (TNFR1) započinju vezanjem TNF molekule (slobodnog citokina ili liganda) u formi trimera za odgovarajući receptor (monomer) na ciljnoj stanici. Tako aktiviran receptor, sa na isti način aktiviranim drugim TNFR1 receptorima, formira strukture građene od 3 receptora (trimeri) pri čemu dolazi do konformacijskih promjena i oslobađanja inhibitorskog proteina SODD od intracelularne domene receptora, tzv. DED domene, što rezultira vezanjem citoplazmatskog adapterskog proteina, engl. Tumor necrosis factor Receptor 1 Associated Death Domain protein (TRADD) na navedenu DED domenu. Time je omogućeno vezanje drugih citoplazmatskih proteina i pokretanje jednog od nekoliko mogućih signalnih puteva u koje je kao prvi glasnik uključen TNF α , npr. aktivacija NF- κ B (inhibicija apoptoze, proliferacija upalnih stanica, produkcija citokina, imuni odgovor, upala i stimulacija stanične proliferacije), MAPK, tj. RAS, RAF, MEK, ERK kaskada (stanična proliferacija i diferencijacija) ili vanjski put aktivacije kaspaza (apoptoza). Prilikom aktivacije NF- κ B signalnog puta na TRADD adapterski protein veže se drugi citoplazmatski adapterski protein, engl. TNF Receptor Associated Factor 2 (TRAF 2), pa potom nastali kompleks tj. TNF receptor 1 u formi trimera preko svojih DED domena povezan sa adapterskim proteinima TRADD i TRAF 2, (kompleks TNFR 1+TRADD+TRAF 2) veže se slobodne citoplazmatske proteine, engl. Inhibitor of APoptosis (IAP) i serin treonin kinazu RIP, engl. Receptor Interacting Protein Kinase (RIP, RIPK). Proteinski kompleks TRAF 2 i RIP sudjeluju u regrutiranju i aktivaciji (fosforilaciji) kinaze inhibitora NF- κ B (IKK), koje aktivirane fosforiliraju inhibitor NF- κ B (I κ B α), koji u nestimuliranoj stanici blokira NF- κ B svojim vezanjem za njega. Fosforilirani inhibitor NF- κ B (I κ B α) odvaja se od NF- κ B i razgrađuje, a oslobođeni (aktivirani) NF- κ B formira u citoplazmi sa drugim oslobođenim (aktiviranim) NF- κ B monomerima, heterodimere koji se translociraju u jezgru stanice i djeluju kao

transkripcijski faktor za gene koji kontroliraju sintezu brojnih proteina uključenih u staničnu proliferaciju, upalni odgovor i blokadu apoptoze (stanično preživljavanje). Prilikom indukcije signalnih puteva koji vode ciljanu stanicu u apoptozu na TRADD adapterski protein veže se drugi citoplazmatski adapterski protein, engl. Fas Associated Death Domain (FADD adapter protein), koji u drugom dijelu svoje molekule ima domenu za vezanje prokaspaze, engl. Death Effector Domain (DED). Nastali kompleks tj. TNF receptor 1 u formi trimera preko DED domena povezan sa adapterskim proteinima TRADD i FADD i jednom od inicijatorskih prokaspaza vanjskog puta (kompleks TNFR 1+TRADD+ FADD+prokaspaza 8 ili 10), aktivira povezanu kaspazu koja sa drugom tako aktiviranom kaspazom formira slobodni citoplazmatski dimer, koji funkcionira kao proteaza koja aktivira druge kaspaze (inicijatorske i efektorske) koje su u citoplazmi u inaktivnoj formi, čime započinje apoptoza stanice. Proapoptotičko djelovanje nije dominantna funkcija TNF α , pogotovo u usporedbi sa ostalim članovima obitelji TNF citokina (npr. Fas) ili sa ulogom TNF α u indukciji upalnog procesa, tim više što je i taj blagi učinak, često suprimiran aktivacijom antiapoptotičkog puta putem NF- κ B.

Fas receptori i FAS ligandi

Fas receptori (Fas, FasR), sinonim apoptotički antigen 1, engl. Apoptosis antigen 1 (APO-1, APT) su transmembranski proteini stanične membrane, koji pripadaju citokinima iz obitelji tumor nekrotizirajućih faktora (TNF). Sudjeluju u inaduciranju apoptoze posredovane citotoksičnim limfocitima T (CD95), putem vanjskog puta aktivacije kaspaza, pa se ubrajaju u grupu tzv. death receptora. Fas receptori i FAS ligandi (engl. sin. FASLG, ALPS1B, APT1LG1, APTL, CD178, CD95-L, CD95L, FASL, TNFSF6, TNLG1A) kodirani su odgovarajućim genima tj. kod čovjeka FAS receptor genom na dugom (q) kraku desetog kromosoma (10q23), FAS ligand genom na dugom (q) kraku prvog kromosoma (1q23). Na vanjskoj strani stanične membrane ciljane stanice nalazi se receptorski dio (Fas domena), za koju se veže induktorska molekula (FAS ligand), koja ne predstavlja slobodnu cirkulirajuću molekulu, već je dio stanične membrane citotoksičnog T limfocita, koji se na taj način pripoji na ciljanu stanicu (zaražena virusom ili rjeđe tumorski promijenjena). Time dolazi do promjene u konformaciji unutarnjeg dijela Fas receptora, engl. Fas Associated Death Domain (FADD) ili kraće Death Domain i vezanja njegove FADD domene za istoimenu domenu citoplazmatskog adapterskog proteina (engl. FADD adapter protein), koji u drugom dijelu svoje molekule ima domenu za vezanje prokaspaze, engl. Death Effector Domain (DED), čime nastaje dimer FADD sa aktiviranim DED dijelom na koji se sa svojim DED dijelom veže jedna od prokaspaza vanjskog puta aktivacije (kaspaza 8 ili 10). Nastali kompleks, engl.

Death Inducing Signaling Complex (DISC), odnosno FAS ligand, Fas receptor povezan preko FADD dimera na adaptorski protein, koji je opet preko DED dimera povezan na prokaspazu 8 ili 10, aktivira povezanu kaspazu koja sa drugom tako aktiviranom kaspazom formira slobodni dimer koji funkcionira kao proteaza koja aktivira druge kaspaze (inicijatorske i efektorske) koje su u citoplazmi u inaktivnoj formi, čime započinje apoptoza stanice. Naziv FAS je izveden od engl. FS-7 Associated Surface antigen, jer su prvi put detektirani korištenjem monoklonalnih protutijela iz miševa imuniziranih sa FS-7 staničnim linijama (od engl. Foreskin), odnosno stanicama iz prepucija (humanog).

NF- κ B

Nuklearni faktor lakih (kapa) lanaca aktiviranih B limfocita, engl. Nuclear Factor kappa light - chain enhancer of activated B Cells (NF- κ B) nije jedan protein, već obitelj (NF- κ B/ Rel) transkripcijskih faktora brojnih tipova stanica (iako su prvotno otkriveni u imunološkim procesima), koji reguliraju ekspresiju mnogih gena uključenih u apoptozu, replikaciju, onkogenezu, reakciju na stres (npr. radioaktivno zračenje), autoimune reakcije i upalu (aktivacija limfocita T i B, produkcija citokina). NF- κ B je sastavni dio normalnih fizioloških procesa, ali je zanimljivija njegova uloga u aktivaciji gena koji kodiraju proteine uključene u upalu kao odgovor na ozljedu. Smatra se da je NF- κ B glavni kontrolor upalnog odgovora u smislu aktivacije, proliferacije, te spriječavanja apoptoze imunoloških stanica. S druge strane mutacije gena koji kodiraju sintezu proteina uključenih u NF- κ B signalni put mogu rezultirati razvojem tumora (prvenstveno hemoblastoza) i širokom paletom imunoloških disfunkcija u smislu autoimunih bolesti. NF- κ B su citoplazmatski proteini primarno blokirani inhibitornim molekulama, koji moraju ući u jezgru stanice i vezati se na DNK, a da bi to uspjeli prvo se moraju osloboditi od blokatora, te potom proći nekoliko faza posttranslacijske modifikacije. Svojstvo NF- κ B proteina da presintetizirani „čekaju“ u citoplazmi omogućuje im brzi odgovor na stimulaciju, a „primarna“ blokiranost onemogućuje autonomno stimuliranje upale i onkogeneze. Iako je NF- κ B prvotno otkriven u aktiviranim B limfocitima, te je smatran regulatorom gena za sintezu lakih kapa lanaca (u strukturi protutijela su dva kapa ili dva lambda laka lanca), danas se zna da NF- κ B nije regulator sinteze lakih kapa lanaca, te da se primarno nalazi u citoplazmi, a tek po aktivaciji ulazi u jezgru, pa nije nuklearni faktor u striktnom smislu. Također je prisutan u svim tipovima stanica, odnosno nije specifičan samo za B limfocite, pa široko prihvaćeni naziv Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B Cells (NF- κ B) nije terminološki najispravniji. Obitelj NF- κ B (Rel) proteina sastoji se od 5 proteina, RelA (sin. p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (sin. p50) i NF- κ B2 (sin. p52), koji imaju svojstvo stvaranja dimera (homo i hetero), te djeluju kao transkripcijski faktori, a

kodirani su odgovarajućim genima; RELA (RelA, sin. p65), RELB (RelB), REL (c-Rel), NF- κ B1 (p105 koji je prekursor NF- κ B1, sin. p50), NF- κ B2 (p100 koji je prekursor NF- κ B2, sin. p52). Svi NF- κ B proteini imaju dio (domenu) koja omogućuje povezivanje sa DNK, engl. Rel Homology Domain (RHD), pri čemu proteini RelA (sin. p65), RelB i c-Rel posjeduju transkripcijsku aktivacijsku RHD domenu, engl. Transcriptional (Transmisional) Activation Domain (TAD), pa stimuliraju ekspresiju gena, dok proteini NF- κ B1 (sin. p50) i NF- κ B2 (sin. p52) inhibiraju ekspresiju gena jer nemaju transkripcijsku aktivacijsku RHD domenu. U citoplazmi su NF- κ B transkripcijski faktori (podjedinice p50, p52, p65, c-Rel i Rel B) povezani u dimere (najčešće p50-p65, p50-p50 i p65-p65) i vezani za inhibitorne proteine (I κ B). Djelovanje NF- κ B proteina je u nestimuliranoj stanici blokirano primarnim inhibitornim proteinima iz obitelji inhibitora NF- κ B, engl. Inhibitor of kappa B (I κ B), koju čine slijedeći proteini: I κ B α , I κ B β , I κ B2, I κ B ϵ , Bcl-3, p100 (prekursor NF- κ B2, sin. p52) i p105 (prekursor NF- κ B1, sin. p50). Oni sa NF- κ B proteinima u citoplazmi nepodraženih stanica formiraju inaktivni heterodimer, dok se u stimuliranoj stanici inhibitori NF- κ B (I κ B), fosforiliraju djelovanjem I κ B kinaza, engl. Inhibitor of nuclear factor Kappa B Kinase (IKK), što rezultira odvajanjem inhibitora (I κ B podjedinice) od NF- κ B. Fosforilacija inhibitora NF- κ B (I κ B) pomoću I κ B kinaze (IKK) omogućuje aktivaciju NF- κ B. Aktivirani NF- κ B dimeri imaju oslobođenu domenu, engl. Nuclear Localisation Signal (NSL) koja služi vezanju za citoplazmatski protein (Importin), koji omogućuje translokaciju dimera iz citoplazme u jezgru, gdje onda dolazi do vezanja za promotorsku regiju odgovarajućeg gena. Transkripcijsko djelovanje NF- κ B dimera u jezgri ograničeno je ulaskom inhibitora NF- κ B (I κ B) u jezgru i njegovim ponovnim vezanjem za NF- κ B, čime se na nastali kompleks veže protein (Exportin) koji potpomaže translokaciju dimera iz jezgre natrag u citoplazmu. Aktivacija NF- κ B može se shematski prikazati: nepodražena stanica (kompleks I κ B+NF- κ B) $\rightarrow$ podražaj stanice $\rightarrow$ aktivacija IKK $\rightarrow$ fosforilacija I κ B $\rightarrow$ odvajanje I κ B od NF- κ B $\rightarrow$ aktivacija NF- κ B signalnog puta $\rightarrow$ translokacija NF- κ B dimera u jezgru $\rightarrow$ vezanje NF- κ B dimera na promotorsku regiju ciljanog gena $\rightarrow$ transkripcija ciljanog gena. U kinaze inhibitora NF- κ B ubrajaju se katalitičke podjedinice IKK α (IKK1) i IKK β (IKK2), te regulatorna podjedinica, engl. NF- κ B Essential MOdulator (IKK γ , tj. NEMO), koje u citoplazmi formiraju multiproteinske IKK komplekse. Signalni putevi NF- κ B pripadaju molekularnim putevima u koje je prilikom aktivacije uključen proces ubikvitinizacije, a opisana su dva načina: kanonski (klasični) i ne-kanonski (alternativni) put, engl. Canonical and Non-Canonical NF- κ B Signaling Pathway, koji se razlikuju u tipovima stanica koje aktiviraju, aktivacijskim receptorima, citoplazmatskim adaptorskim proteinima i brzini aktivacije (nekanonska

aktivacija je vrlo spor proces i traje satima), te multiproteinskim IKK kompleksima koji reguliraju odvajanje I κ B podjedinice. Međutim kanonski i nekanonski modeli preklapaju se u većem ili manjem dijelu (signalni putevi nisu vertikalno linearni već izrazito komplicirane mreže sa puno interaktivnih čvorišta) i dijele iste principe: aktivacija NF- κ B signalnog puta počinje stimulacijom stanice ekstracelularnim (rjeđe intracelularnim) stimulansima preko odgovarajućeg receptora, što rezultira aktivacijom kinaznog kompleksa (IKK) koje fosforiliraju NF- κ B inhibitore (I κ B), omogućujući time ubikvitinaciju i potom dezintegraciju u proteosomu dotičnog inhibitora (I κ B). Time se oslobađaju u citoplazmi blokirani NF- κ B proteini koji u formi dimera ulaze u staničnu jezgru i aktiviraju gene koji dovode do sinteze faktora koji imaju pro ili protu upalnu funkciju, stimuliraju diferencijaciju stanica imunološkog sustava, reguliraju sazrijevanje i preživljavanje brojnih tipova stanica, uključujući kardiomiocite, sudjeluju u patofiziologiji endotelne disfunkcije, te time i nestabilne angine pectoris, akutnog kardijalnog infarkta i srčanog zatajenja. NF- κ B signalni putevi mogu biti aktivirani brojnim ekstracelularnim, ali i intracelularnim stimulansima, koji uključuju slobodne radikale, komplement, hipoksiju, pro upalne citokine, oksidativni stres, bakterije, viruse i ishemiju. Indukcija kojom se pokreće kaskada koja rezultira aktivacijom NF- κ B, najčešće je posljedica stimulacije jednog od brojnih transmembranskih receptora, u prvom redu receptora iz obitelji tumor nekrotizirajućih faktora (TNF), koji uključuju. receptor za tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNFR1) putem upalnih citokina TNF α i IL1, receptor za limfotoksin beta (LTBR), CD40 i CD30 receptore za ligande na limfocitima CD 40 odnosno CD 30, receptor za ligande koji aktiviraju NF- κ B (RANKL), receptor za faktor koji aktivira B limfocite (BAFFR), receptore za ligande na T (TCR), odnosno B (BCR) limfocitima, receptor za tumor nekrotizirajući faktor 12A (TWEAKR) itd. Nakon odgovarajućeg podražaja, aktivirani transmembranski receptori mobiliziraju neki od adaptorskih proteina: TNF receptor associated factors (TRAFs), NF- κ B Induction Kinasis (NIK), Receptor interactive proteins (RIPs) itd., koji omogućuju fosforilaciju i aktivaciju kinaza (IKK) koje potom fosforiliraju inhibitore NF- κ B proteina (I κ B). Aktivirani nekanonski put, engl. Non-Canonical NF- κ B Signaling Pathway, karakterizira povišenje citoplazmatske koncentracije NF- κ B induksijske kinaze (NIK), što rezultira aktivacijom kinaze NF- κ B protein inhibitora IKK α i posljedičnom formacijom aktivnog NF- κ B proteinskog heterodimera (p52 i RelB), koji se translocira u staničnu jezgru i regulira aktivnost tzv. nekanonskih NF- κ B signalnih gena, engl. Non-Canonical NF- κ B Signaling Genes, tj. ekspresiju antiapoptotičkih Bcl2 i Bcl-XL i supresiju proapoptotičkog Bim gena. Nekanonski put aktivacije NF- κ B uključen je u procese sazrijevanja B limfocita, diferencijaciju osteoklasta i limfatičku organogenezu, a mutacije

unutar toga puta izazivaju poremećaje imunološkog sustava, između ostalog autoimune bolesti i limfome (mb. Hodgkin, difuzni B limfom). U nestimuliranoj stanici nekanonski put je inaktivan niskom razinom citoplazmatske koncentracije NF- κ B induksijske kinaze, engl. NF- κ B Induction Kinasis (NIK) i zarobljavanjem NF- κ B proteina RelB u citoplazmi u inaktivnom heterodimeru sa proteinom p100. Protein p100, funkcionalno pripada grupi primarnih inhibitora NF- κ B (IkB), iako je on prekursor NF- κ B2 (sin. p52). Induksijska kinaza NF- κ B (NIK) povezana je u kompleks sa adaptorskim proteinima TNF receptora, engl. TNF Receptor Associated Factor (TRAF3 i TRAF2) i inhibitorima apoptoze, engl. celular Inhibitor of Apoptosis (cIAP1 i cIAP2). U tom kompleksu (NIK+TRAF3+TRAF2+cIAP1+cIAP2) inhibitori apoptoze (cIAP1 i cIAP2) potpomažu ubikvitinizaciju NF- κ B induksijske kinaze (NIK) i njeno permanentno razgrađivanje u proteosomu. Stimulacijom transmembranskih TNF receptora (CD40, BAFFR, LTBR) odgovarajućim ligandima (limfocitima CD 40, BAFF, cititiksičnim limfocitima, RANKL, TWEAK) dolazi do migracije i vezanja adaptorskih proteina TNF receptora (TRAF2 i TRAF3) i inhibitora apoptoze (cIAP1 i cIAP2) na citoplazmatski dio TNF receptora i oslobađanja od NF- κ B induksijske kinaze (NIK), te ubikvitinizacije adaptorskog proteina TNF receptora (TRAF3) inhibitorima apoptoze (cIAP1 i cIAP2) i razgradnje adaptorskog proteina TNF receptora (TRAF 3) u proteosomu, što u konačnici rezultira porastom koncentracije NF- κ B induksijske kinaze (NIK) u citoplazmi. Slobodna NF- κ B induksijska kinaza (NIK) fosforilira IkB kinazu IKK α (kinaza inhibitora NF- κ B proteina), koja u heterodimeru p100 i RelB fosforilira IkB protein p100 (primarni inhibitor NF- κ B proteina), što izaziva ubikvitinizaciju p100 i njegovu razgradnju u proteosomu na protein p52 i ostatak koji se degradira. Protein p52 je aktivni NF- κ B2 protein koji sa oslobođenim NF- κ B proteinom RelB formira heterodimer (p52 i RelB). Navedeni heterodimer ulazi u jezgru stanice i djeluje kao transkripcijski faktor tzv. nekanonskih NF- κ B signalnih gena izazivajući ekspresijau antiapoptotičkih Bcl2 i Bcl-XL i supresiju proapoptotičkog Bim gena, što uz blokadu aktivnosti c - JunNH2 terminalne kinaze, engl. c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) u konačnici koči apoptozu ciljnih stanica (limfocita). Aktivirani kanonski put, engl. Canonical NF- κ B Signaling Pathway, karakterizira fosforilacija beta kinaze (IKK β), kinaznog kompleksa (IKK α + IKK β + IKK γ tj. NEMO). Fosforilacija IKK β rezultira aktivacijom navedenog kinaznog kompleksa, koji potom u citoplazmi fosforilira inhibitor NF- κ B (IkB α ili IkB ϵ), a kao posljedica nastaje aktivni NF- κ B proteinski heterodimer (p50 i RelA, sin. p65), koji se potom translocira u staničnu jezgru i regulira aktivnost tzv. kanonskih NF- κ B signalnih gena, engl. Canonical NF- κ B Signaling Genes. U nestimuliranoj stanici kanonski put je inaktivan blokiranjem NF- κ B heterodimera p50 + RelA,

sin. p65, primarnim inhibitorom NF- κ B (IkB α ili IkB ϵ). te inaktivnom IkB kinazom, tj. IKK kompleksom IKK α + IKK β + IKK γ tj. NEMO. Stimulacijom transmembranskih receptora odgovarajućim ligandima npr. TNF receptora TNFR1 citokinima TNF α ili IL1, Toll Like Receptora bakterijskim i gljivičnim polisaharidima, TNF receptora CD40, CD30, BAFFR, BCR i TCR odgovarajućim limfocitima, TNF receptora LTBR citokinom TNF β (sin. LB), TNF receptora TWEAKR tumor nekrotizirajućim faktorom 12A, TNF receptora RANKL ili pak direktnim podražajem stanice zračenjem ili virusima, fosforilira se IkB kinaza IKK β u IKK kompleksu, čime se aktivira navedeni kompleks, koji fosforilira inhibitor NF- κ B proteina IkB α ili IkB ϵ unutar p50 + RelA (sin. p65) + IkB α ili IkB ϵ kompleksa. Na fosforilirani NF- κ B inhibitor (IkB α ili IkB ϵ) veže se ligaza E3 (ubikvitin aktivatorski enzim), čime se ubikvitinizira NF- κ B kompleks (p50 + RelA (sin. p65) + IkB α ili IkB ϵ), koji ulazi u proteosom, gdje se oslobađa aktivni NF- κ B dimer (p50 + RelA, sin. p65), a inhibitor NF- κ B proteina (IkB α ili IkB ϵ) degradira. Na u proteosomu, oslobođenom (aktiviranom) NF- κ B dimeru postaje dostupna NSL domena, odgovorna za vezanje importerskog proteina (eng. Importin) koji omogućuje ulazak NF- κ B dimeru (p50 + RelA, sin. p65) u jezgru.

Bcl-2

Bcl-2 (engl. B-cell lymphoma 2) je intracelularni antiapoptotički protein iz familije Bcl-2 regulatornih proteina, kodiran BCL2 genom i smješten u citoplazmi i na vanjskoj strani membrane mitohondrija. Navedeni gen (zajedno sa genima za Bcl-XL i Bim) spada u tzv. nekanonske NF- κ B signalne gene (engl. Non-Canonical NF- κ B Signaling Genes) čija ekspresija je pod kontrolom transkripcijskog faktora NF- κ B proteina (heterodimer p52 i RelB) koji izaziva ekspresiju antiapoptotičkih Bcl2 i Bcl-XL gena i supresiju proapoptotičkog Bim gena. Familija Bcl-2 regulatornih proteina kontrolira mitohondrijским oštećenjima (citokrom C oksidazom) inaduciranu apoptozu (nutarnji put aktivacije kaspaza), bilo kao inhibitori apoptoze (antiapoptotički proteini Bcl-2, Bcl-XL) ili stimulatori apoptoze (proapoptotički proteini Bim, Bax, Bak, Puma, Noxa). Naziv Bcl-2 potječe od istraživanja proteina u stanicama folikularnog limfoma B (prvotno su smatrani onkoproteinima), jer je otkriven drugi po redu (kasnije je cijela obitelj regulatornih proteina kojima pripada dobila isto ime). Iako ne može potaknuti onkogenezu, smatra se da u maligno alteriranim stanicama B limfoma, pojačana ekspresija BCL2 gena (uzrokovana translokacijom sa 18. na 14. kromosom), prigušenjem apoptoze, dodatno remeti balans između (patološke) proliferacije i umiranja stanica, što u konačnici rezultira razvojem tumora. Točan mehanizam inhibicije apoptoze (bilo u normalnim, bilo u tumorskim stanicama) nije dokazan, ali se povezuje sa kontrolom otpuštanja Ca²⁺ sa endoplazmatskog retikuluma, kočenju autofagije i

antagonizmom sa proapoptotičkim Bcl-2 proteinima (Bax i Bak) u kontroli izlaska citokrom C oksidaze iz mitohondrija u citoplazmu (onemogućuje stvaranje Bak-Bax kompleksa). Osim navedenog imena u literaturi su u upotrebi i sinonimi: BCL2, PPP1R50, B-cell CLL/lymphoma 2, apoptosis regulator, BCL2 apoptosis regulator, uz ponovnu napomenu da se termin Bcl-2 koristi i za naziv antiapoptotičkog proteina, ali i cijele obitelji proteina, od kojih su neki antiapoptotički (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-x, Bcl-w, Bcl-Xs, BAG) a drugi proapoptotički (Bax i Bak, Noxa, Puma, Bcl-10, Bid, Bam, Bad, Bik, Blk, Bim).

Bax, Bak

Bax i Bak su intracelularni proapoptotički proteini iz familije Bcl-2 regulatornih proteina smještenih na vanjskoj strani membrane mitohondrija (Bak), odnosno u citoplazmi (Bax) koji reguliraju mitohondrijima (citokrom C oksidazom) kontroliranu apoptozu (nutarnji put aktivacije kaspaza), ali mogu potaknuti i onkogenezu. Točan mehanizam stimulacije apoptoze nije dokazan, ali se povezuje sa kontrolom otpuštanja Ca^{2+} sa endoplazmatskog retikuluma i stvaranja pora (Bak-Bax kompleks) na vanjskoj mitohondrijalnoj membrani, što omogućuje izlazak citokrom C oksidaze u citoplazmu.

Puma, Noxa

Puma (engl. p53 upregulated modulator of apoptosis) i Noxa (od lat. oštećenje) su proapoptotički proteini iz familije Bcl-2 regulatornih proteina. Pojavljuju u stanici koja nije uspjela reparirati svoju oštećenu DNK stimulacijom sinteze aktiviranjem odgovarajućeg gena transkripcijskim faktorom p53. Puma i Noxa reguliraju mitohondrijima (citokrom C oksidazom) kontroliranu apoptozu (nutarnji put aktivacije kaspaza) blokirajući intracelularne antiapoptotičke proteine iz familije Bcl-2 regulatornih proteina (Bcl-2, Bcl-XL), spječavajući ih time, da inhibiraju stvaranje pora (Bak-Bax kompleks) na vanjskoj mitohondrijskoj membrani.

SMP-30

SMP-30 (engl. calcium-binding protein Senescence Marker Protein-30) je intracelularni antiapoptotički protein koji veže slobodni Ca^{2+}

Intracelularni Ca^{2+}

Slobodni intracelularni Ca^{2+} je proapoptotički faktor, čija citoplazmatska homeostaza ovisi o permeabilnosti stanične membrane, otpuštanju sa endoplazmatskog retikuluma (kontrolirano interakcijom Bcl-2, Bax i Bak), te vezanja na intracelularni protein SMP-30. Slobodni citoplazmatski kalcij se smatra značajnim faktorom u razvoju apoptoze stanica (kako nutarnjim tako i vanjskim putem) jer oštećuje membrane mitohondrija i omogućuje izlazak citokrom C oksidaze u citoplazmu, a izaziva i poremećaje transkripcije DNK.

Citokrom C oksidaza

Citokrom C oksidaza (CytC) je enzim oksidativne fosforilacije, smješten na unutarnjoj membrani mitohondrija, koja je važan intracelularni proapoptotički faktor u mitohondrijskim oštećenjima aktivirane apoptoze (nutarnji put aktivacije kaspaza). Prilikom oštećenja mitohondrijske membrane ili stvaranjem pora na vanjskoj mitohondrijalnoj membrani (kompleks proapoptotičkih proteina Bax i Bak), citokrom C oksidaza izlazi u citoplazmu stanica, gdje se povezuje sa proteinom APAF1 (engl. Apoptotic Protease Activation Factor) oslobađajući pri tome dio molekule APAF1 tzv. CARD domenu (engl. CASpase Recruitment Domain), što omogućuje formiranje apoptosoma, prstenaste citoplazmatske strukture formirane od 7 pojedinačnih kompleksa CytC-APAF1 povezanih CARD domenama. Apoptosom svojim CARD domenama veže na sebe prokaspazu 9 koja jedina od svih kaspaza posjeduje CARD domenu, čime aktivira povezanu kaspazu koja sa drugom tako aktiviranom kaspazom 9 formira slobodni dimer koji funkcionira kao proteaza koja aktivira druge kaspaze (inicijatorske i efektorske) koje su u citoplazmi u inaktivnoj formi, čime započinje apoptoza stanice.

Kaspaze

Caspase (engl. Cystein dependent ASpartate directed Protease) su citoplazmatski proteini (enzimi), tj. familija cisteinskih proteaza (ukupno 12) koje imaju esencijalnu ulogu u apoptozi, nekrozi i upali, a dijele se na temelju građe i funkcije koju obavljaju tijekom apoptoze u inicijatorske (kaspaze 1, 2, 8, 9 i 10) i efektorske (kaspaze 3, 6 i 7). Uloga inicijatorskih kaspaza je aktivacija drugih kaspaza iz inaktivnih (prokaspaze) u aktivne kaspaze, dok efektorske kaspaze djeluju kao proteolitički enzimi koji razgrađuju stanične proteine i aktiviraju nukleaze koje fragmentiraju DNK. Sve su kaspaze osim funkcionalno (proteaze) i strukturno slične, tj. sastavljene od tri dijela odnosno domene: 1. predomene (dijela koji se mora proteolitički odvojiti od ostalog dijela molekule kako bi iz neaktivne prokaspaze postala aktivna kaspaza), 2. duge domene i 3. kratke domene (koja omogućuje spajanje dvije aktivirane molekule iste vrste kaspaze u dimer). Dimer (dvije duge domene spojene preko dvije kratke domene) funkcionira kao proteaza koja cijepa sve polipeptidne lance (uključujući i druge kaspaze) u području aspartata (engl. ASpartate directed Protease) vežući se svojim aktivnim mjestom na cisteinu (engl. Cystein dependent). Rezultat djelovanja kaspaza je degradacija citoplazmatskih proteina i aktivacija nukleaza (efektorske kaspaze) ili aktivacija drugih kaspaza (inicijatorske kaspaze) koje su u citoplazmi u inaktivnoj formi. Proteolitičkim djelovanjem (aktiviranih) kaspaza na neaktivirane (prokaspaze), omogućeno je da mala količina aktiviranih inicijatorskih kaspaza, rezultira u konačnici velikim brojem

aktivnih kaspaza (pozitivna povratna sprega). Inicijatorske kaspaze osim tri navedene domene, imaju i 4. domenu koja omogućuje njihovo vezanje za molekule koje ih inicijaliziraju prije aktivacije; DED domena (engl. Death Effector Domain) kod kaspaza 8 i 10 (vanjski put aktivacije apoptoze), koja omogućuje vezanje prokaspaze na aktivatorski kompleks tzv. Death Inducing Signaling Complex (DISC), odnosno FAS ligand + Fas receptor + adapterski protein, odnosno CARD domena (engl. Caspase Recruitment Domain) kod kaspaze 9 (nutarnji put aktivacije apoptoze) koja omogućuje vezanje prokaspaze na aktivatorski kompleks tzv. apoptosom, prstenastu citoplazmatsku strukturu formiranu od 7 pojedinačnih kompleksa CytC-APAF1 (citokrom C oksidaza + Apoptotic Protease Activation Factor).

Ciklini

Ciklini (cyclin A, D, E, B), ciklin zavisne kinaze, engl. Cyclin Dependent Kinase (CDK, Cdk) i inhibitori ciklin zavisnih kinaza, engl. Cyclin dependent Kinase Inhibitor (CKI), npr. protein p21, su produkt ekspresije odgovarajućih gena i glavni regulatori staničnog ciklusa. Te molekule ne iniciraju diobu, ne sudjeluju u replikaciji DNK, niti u mitozu stanica, ali su esencijalne kako bi na diobu aktivirane stanice, mogle prelaziti iz jedne u drugu fazu staničnog ciklusa ($G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$) i konačno ući u mitozu. Ciklini sa pripadajućim ciklin zavisnim kinazama stvaraju komplekse koji fosforiliraju druge signalne molekule i / ili omogućuju ekspresiju gena koji kontroliraju sintezu proteina neophodnih za diobu stanice. Prema dominirajućem kompleksu (jer su svi prisutni u svim fazama), arbitrarno mogu podijeliti u podgrupe prema fazama staničnog ciklusa: na početku G1 faze kompleks Cdk4 i Cdk6 i ciklina D fosforilira Rb protein i oslobađa ga od E2F proteina (transkripcijski faktor), dok na kraju faze kompleks Cdk2 i ciklina E omogućuje prijelaz stanice u S fazu, u kojoj dominira kompleks Cdk1 i Cdk2 i ciklina A, omogućujući prijelaz u G2 fazu u kojoj kompleks Cdk1 i ciklina B omogućuju ulaz u mitozu (M faza), u kojoj MPF kompleks (M phase maturation promotion factor) koji uključuje i Cdk1 i cikline B1 i B2 omogućuju kaskadu mitoze. O količini raspoloživih kompleksa (ciklina i Cdk) ovisi dioba: nedostatna količina onemogućuje diobu i aktiviranu stanicu vodi u smrt apoptozom, a prekomjerna može izazvati nekontrolirano dijeljenje stanice i pokrenuti onkogenezu.

Ki67

Ki67 je protein, kodiran genom MKI67 lociranom na q kraku 10. kromosoma (10q), usko povezan sa staničnom proliferacijom i transkripcijom ribosomske RNK (rRNK), koji se koristi kao indirektni pokazatelj replikacije DNK. Prisutan je u stanicama koje su u diobi (interfaza ili mitozu), dok ga se u mirnim stanicama (G0 faza) ne može dokazati. U interfazi

(G1, S, G2) se nalazi u staničnoj jezgri, a u mitozu (M) u citoplazmi vezan za kromosome (mitotičke stanice nemaju formiranu jezgru). Prvi je put izoliran pomoću monoklonalnih protutijela imunizacijom miševa jezgrama stanica Hodgkinovog limfoma, a ime je složeno naziva grada (Kiel, Njemačka) i rednog broja mikrotitarske pločice u kojoj je dobijena pozitivna reakcija. Osim navedenog imena u upotrebi su i sinonimi: MKI67 (engl. Marker of proliferation Ki-67), KIA, MIB-, MIB-1, PPP1R105 (engl. Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 105), antigen identified by monoclonal antibody Ki-67. Dokazuje se specifičnim monoklonalim protutijelima imunocitokemijski (kultura stanica, citološki razmaz) ili imunohistokemijski (tkivni preparati), a u kliničkoj praksi se koristi se kao proliferacijski indikator tumora prostate, dojke, nefroblastoma, neuroendokrinih tumora (tzv. Ki-67 labelling index – udio stanica sa pozitivnim nalazom).

PCNA

Jezgreni antigen proliferirajućih stanica, engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) je protein smješten u jezgri stanica u proliferaciji, kodiran PCNA genom lociranim na p kraku 20. kromosoma (20p), koji se koristi kao indirektni pokazatelj replikacije DNK. Prisutan je u stanicama koje su u diobi (interfaza ili mitozu), dok ga se u mirnim stanicama (G0 faza) ne može dokazati. U interfazi se pojavljuje u G1 fazi i najveću koncentraciju postiže u kasnoj G1 i S fazi, te se snižava tijekom G2 faze i u mitozu (M). Strukturno je homotrimer (građen od 3 identične makromolekule), a djeluje kao kofaktor za DNK polimerazu delta, omogućavajući joj da polimerizira polinukleotidni lanac, pa je neophodan za replikaciju i popravak DNK, remodeliranje kromatina i epigenetske procese. Osim navedenog imena u upotrebi su i sinonimi: Cyclin, DNA Polymerase Delta Auxiliary Protein i ATLD2, a u kliničkoj praksi se koristi se kao proliferacijski indikator kojim se grupiraju meningeomi prema udjelu PCNA+ stanica.

Dušični oksid

Dušični oksid (NO) engl. Nitric Oxide, je plin koji djeluje kao važna signalna molekula uključena, ovisno o koncentraciji, u fiziološke ali i patološke procese u organizmu, poglavito relaksaciju glatke muskulature i perifernu vazodilataciju (prvenstveno relaksacijom arteriola ali i vena), relaksaciju miokarda, stimulaciju angiogeneze, supresiju proliferacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila i supresiju agregacije trombocita (bilo potaknute endotelnim oštećenjem ili infekcijom), erektilnu disfunkciju, komplikacije dijabetesa, inhibiciju stanične apoptoze, neurotransmisiju i neurodiferencijaciju, reakciju na infekciju virusima, bakterijama, gljivicama i parazitima, upalu, te regeneraciju jetre. Dušični oksid je hidrofobna molekula, pa lako prolazi kroz stanične membrane i ulazi u citoplazmu stanica, ali kako mu je vrijeme

života samo nekoliko sekundi (vrlo kratko), djelovanje mu je izrazito lokalno ili na stanice u neposrednoj blizini stanice koja ga sintetizira (parakrino) ili na samu stanicu koja ga je sintetizirala (autokrino). Po svojoj kemijskoj strukturi dušični oksid (NO) je slobodni radikal, jer posjeduje nespareni elektron u atomu dušika (trovalentni dušik vezan je dvostrukom kovalentnom vezom na dvovalentni kisik). Za razliku od drugih slobodnih radikala npr. superoksida, dušični oksid djeluje kao antioksidans, vežući neenzimatskom reakcijom superoksida u peroksinitrat (ONOO^-), što dijelom ima pozitivan učinak (prevencija oštećenja staničnih makromolekula uključujući enzime i DNK), ali u slučaju bakterijskih infekcija i dijelom negativni učinak, jer superoksidi sudjeluju u uništavanju bakterija uspješnije nego peroksinitrat koji ima blaže antibakterijsko djelovanje, ali i manje toksično djelovanje unutar same stanice. Međutim ukoliko u stanici dođe do nakupljanja velikih količina dušičnog oksida odnosno peroksinitrata, moguća su oštećenja ekvivalentna oštećenjima izazvanim drugim slobodnim radikalima, iako se većina neutralizira vezanjem na glutathion. Izvor dušičnog oksida može biti transformacija aminokiseline L-arginin u L-citrulin katalizirana intracelularnim oksido-reduktivnim enzimima tzv. sintetazama dušičnog oksida ili je izvor redukcija nitrata iz hrane i lijekova, prvenstveno nitrita (NO_2) koji se u citoplazmi reducira u nitrat (NO_3), a nitrat potom u dušični oksid (NO), koji se opet može reverzibilno oksidacijom konvertirati u nitrat odnosno nitrit ili shematski: $\text{NO}_3 \leftrightarrow \text{NO}_2 \leftrightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_3$. Inaktivacija dušičnog oksida nastaje brzo, njegovim vezanjem za intracitoplazmatske molekule koje u svojoj strukturi imaju hem kao prostetičku skupinu ili za slobodne radikale u peroksinitrat. Glutathion koji intracelularno uklanja peroksinitrat (i time štiti stanicu), može se vezati i za slobodni dušični oksid, čime nastaje S-nitrozoglutation, koji predstavlja rezervar dušičnog oksida. Dušični oksid, kao hidrofobna molekula lako prolazi stanične membrane, pa prilikom vazodilatativnog učinka, slobodno iz endotelne stanice u kojoj je sintetiziran djelovanjem endotelijske sintetaze (NOS3, sin. eNOS) ili oslobođen iz nitratnih lijekova (nitroprusid, isosorbid di i trinitrat) difundira u okolinu i ulazi u glatke mišićne stanice, gdje se u citoplazmi veže za hem u prostetičkoj grupi gvanilat ciklaze (GC) koja ima ulogu drugog glasnika i koja aktivirana transformira gvanozin trifosfat (GTP) u ciklički gvanozin monofosfat (cGMP). U stijenci krvnih žila ciklički gvanozin monofosfat ima nekoliko učinaka koji rezultiraju relaksacijom glatkih mišićnih stanica: zatvara kalcijске kanale i otvara kalijeve kanale na staničnoj membrani onemogućujući ulazak kalcija u stanicu i povećavajući izlazak kalija iz stanice (hiperpolarizacija), a vezanjem za serin-treonin kinazu, engl. Protein Kinase G (PKG) izaziva defosforilaciju glavica miozina. Navedeni učinci cikličkog gvanozin monofosfata dovode do oslobađanja miozina od aktina i nastupa relaksacija. Prilikom pak

regeneracije postresekcijske jetre dušični oksid regulira hormonom proliferacije hepatocita engl. Hepatocyte Growth Factor (HGF) stimuliranu ekspresiju gena za ciklin D1 i D2, blokiranjem S-adenozil metionin sintetaze (SAME) koja je inhibitor ekspresije navedenih gena. Količinu raspoloživog dušičnog oksida u jetrenom ostatku određuje aktivnost citokinima inducirane sintetaze dušičnog oksida (NOS2, sin. iNOS), čija se količina povećava nakon resekcije ekspresijom odgovarajućeg gena, a ukoliko nedođe do ekspresije gena, pojavljuje se manjak dušičnog oksida što hepatocit vodi u apoptozu (porast kaspaze 3), a jetreni ostatak u eventualnu insuficijenciju.

Sintetaze dušičnog oksida

Sintetaze dušičnog oksida, engl. Nitric Oxide Synthase (NOS) su zapravo 3 izoproteina, sličnih citokromu p450 (posjeduju hem kao prostetičku skupinu), smješteni u citoplazmi (NOS1 i NOS2) odnosno na staničnoj membrani (NOS3), kodirani istoimenim genima, koji u aktiviranom obliku djeluju kao enzimi koji kataliziraju reakciju oslobađanja molekule dušičnog oksida (NO) i dvije molekule vode, transformacijom aminokiseline L-arginin (L-ARG, sin. LA) u aminokiselinu L-citrulin (L-Cit) uz potrošnju (oksidaciju) dvije molekule nikotin amid adenin dinukleotid fosfata (NADP) u reduciranoj formi ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) i dvije molekule kisika ili shematski: $\text{L-ARG} + \text{O}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{L-Cit} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}$. Sve forme sintetaza prisutne su u svim vrstama stanica (upalnim, endotelnim, srčanim, glatkomišićnim, epitelnim, živčanim, koštanim itd.), ali su u nekima naglašenije; NOS1 je najviše prisutna u završecima postsinaptičkih aksona, pa se još naziva i neuronalna (nNOS), NOS2 koji je najpotentnija sintetaza (oko 1000 x produktivnija od NOS1 i NOS3) najviše je prisutna u aktiviranim makrofazima i povezna je sa reakcijom na infekciju i upalnom reakcijom, pa se još naziva i infekcijska ili inducirana (iNOS), dok se NOS3 najviše nalazi u endotelnim stanicama i povezna je sa relaksacijom glatkih mišićnih stanica u stijenci krvnih žila, u prvom redu arteriola, manje vena, pa se naziva i endotelijska (eNOS). Sintetaze dušičnog oksida su strukturno polipeptidi, u čijem se lancu počevši od amino kraja prema karboksilnom kraju nalaze značajne regije tzv. domene. Prva domena (amino kraj) je oksigenaza koja posjeduje hem (porfirinski prsten sa Fe^{3+}) i služi za vezanje aminokiseline L-arginina i kisika na sintetazu. Domena na karboksilnom kraju je reduktaza, a između te dvije domene je domena za vezanje kalmodulina (slobodnog ili u kompleksu sa kalcijem ovisno o tipu sintetaze). Kalmodulin (CaM) je esencijalan pri aktivaciji sintetaza dušičnog oksida, za koje se veže ili slobodan u obliku apokalmodulina u slučaju kalcij nezavisne sintetaze (NOS2) ili pak u kompleksu sa kalcijem u slučaju kalcij ovisnih sintetaza (NOS1 i NOS3). Reduktazu čine dvije domene za vezanje flavin mononukleotida (FMN) između koju se nalazi domena u

obliku petlje za vezanje kalcija u kompleksu sa kalmodulinom (NOS1 i NOS3), odnosno ravni segment polinukleotidnog lanca (NOS2). Domene za vezanje flavin mononukleotida u aktivnom enzimu formiraju dimer na koji se veže molekula flavin mononukleotida (riboflavin fosfat) koji je derivat riboflavina (vitamin B2) i prostetička je grupa brojnih oksidoreduktaza. Zadnji dio reduktaze čini domena sa dijelom za vezanje flavin adenin dinukleotida (FAD), također derivata riboflavina i dijelom za vezanje reduciranog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH+H⁺). Reduktaza predstavlja lanac za prijenos elektrona sa NADPH+H⁺ preko flavin adenin dinukleotida i flavin mononukleotida na kisik vezan na oksigenazu ili shematski: $\text{NADPH+H}^+ \rightarrow \text{e}^- \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{HEM} \rightarrow \text{O}_2$. L-arginin je semiesencijalna odnosno uvjetno esencijalna aminokiselina, jer se u stanicama odraslih ljudi (za razliku od novorođenčadi i dojenčadi) može sintetizirati iz citrulina (dobijeng iz aminokiseline glutamina) djelovanjem sintetaze engl. Arginine Synthase (AS). L-arginin karakterizira alfa konformacija amino i karboksilne grupe (odatle i L u nazivu) i guanidino grupa (-N-C-(NH₂)) u pobočnom lancu, na kojoj se zbiva oksidacija L-arginina prilikom oslobađanja dušičnog oksida. Elektronom doniranim sa reduktaze iz NADPH+H⁺ atom kisika prvo oksidira atom dušika u guanidino grupi (-N-C-(NOHNH₂)) pri čemu nastaje hidroksi L-arginin, dok se drugi atom kisika reducira sa vodikom iz u molekulu vode uz oslobađanje oksidiranog NAD. Proces se nastavlja oksidacijom atoma dušika u guanidino grupi ((-N-C-(ONH₂))) hidroksi L-arginina na isti način kao i pri oksidaciji L-arginina, pa se od hidroksi L-arginina odvajaju dušik i kisik kao slobodni dušični oksid (NO), a kao rezidua preostaje L-citrulin, aminokiselina koja ne sudjeluje u sintezi proteina (ne postoji odgovarajuća tRNK) i nusprodukti (oksidirani NAD i molekula vode). Aktivnu sintetazu dušičnog oksida (enzim) čine zapravo dvije sintetaze (dva proteina) međusobno povezane u homodimer. Funkcionalno sintetaze su oksidoreduktaze, a ne sintetaze, a dimerizacija je nužna, jer se radi konformacijske strukture oksidaza i reduktaza istog enzima ne mogu funkcionalno povezati, pa je potrebno povezivanje oksigenaze iz jedne sa reduktazom iz druge sintetaze i obrnuto u homodimer, koji funkcionira kao dvije aktivne sintetaze. Aktivacija neuronalne (NOS1, sin. nNOS) i endotelijske (NOS3, sin. eNOS) sintetaze nastaje stimulacijom receptora na staničnoj membrani što pokreće intracelularnu enzimatsku kaskadu, koja u konačnici rezultira stvaranjem aktivacijskog kompleksa kalcija i kalmodulina, za razliku od aktivacije induksijske/infekcijske sintetaze (NOS2, sin. iNOS) koja nije potaknuta kalcijem, već nastaje transkripcijom odgovarajućeg gena (sinteza de novo) pod djelovanjem citokina i faktora rasta. Aktivacija endotelijske sintetaze (NOS3, sin. eNOS) nastaje stimulacijom acetil-kolinom, bradikininom ili histaminom putem odgovarajućeg receptora na staničnoj membrani

endotelnih stanica, koje nisu biološki inaktivno tkivo, već se mogu smatrati endokrinim (odnosno parakrinim) organom (izlučuju dušični oksid), što u konačnici rezultira relaksacijom glatke muskulature stijenki krvnih žila i vazodilatacijom, za razliku od direktne stimulacije npr. acetil kolinom istog receptora (muskarinski receptor) na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila kada dolazi do (vazo)konstrikcije. Navedeni membranski receptori pripadaju obitelji G proteina, od kojeg se aktivacijom odvaja alfa podjedinica koja aktivira membransku fosfolipazu C (PLC) koja hidrolizira fosfatidilinositol bisfosfat (PIP₂) u inositol trifosfat (IP₃) ključni faktor u aktivaciji endotelijske sintetaze dušičnog oksida, jer se veže za endoplazmatski retikulum i otvara kalcijske kanale, što dovodi do povećanja intracitoplazmatske koncentracije kalcija i njegovog vezanja u kompleks sa kalmodulinom. Kompleks kalcija sa kalmodulinom veže se na odgovarajuću domenu sintetaze dušičnog oksida i aktivira ju. Međutim za postizanje relaksacijskog učinka na glatkoj muskulaturi stijenki krvnih žila nije potrebna aktivacija endotelijske sintetaze dušičnog oksida, jer se isti rezultat postiže i davanjem donora dušičnog oksida (npr. lijekova nitroprusid, isosorbid di i trinitrat).

Produkcija dušičnog oksida iz L-arginina može se blokirati inhibicijom sintetaza dušičnog oksida bilo primjenom inhibitora sintetaza dušičnog oksida bilo preopterećenjem sintetaze visokim intracelularnim koncentracijama L-arginina. Inhibitori sintetaze dušičnog oksida tzv. NOS Inhibitors (NOSIs) mogu biti neselektivni kompetitivni analozi L-arginina ili selektivni kompetitivni inhibitori koji pripadaju strukturno različitim molekulama koje ne moraju imati strukturnu sličnost sa L-argininom. Neselektivni kompetitivni analozi L-arginina imaju na guanodino grupi L-arginina dodatak koji onemogućuje da se nakon vezanja na sintetazu dogodi oksidacija guanodino grupe i oslobađanje dušikovog oksida, pa neselektivno inhibiraju sve tipove sintetaza (NOS1, NOS2 i NOS3). U tu grupu spadaju N-monometil L-arginin (L-NMMA), L-nitro arginin (L-NOARG, sin. L-NA) i L-nitro arginin metil ester (L-NAME). Selektivni kompetitivni inhibitori mogu svoju selektivnost prikazivati samo in vivo, dok in vitro ne iskazuju selektivnost, što se dovodi u svezu sa afinitetom ciljane stanice za inhibitor, a ne afinitetom inhibitora za jednu vrstu sintetaze. Tako npr. derivat aromatskog ugljikovodika 7-nitroindazol (7-Ni) inhibira NOS1 (nNOS) sintetazu samo u neuronima, za razliku od ARL17477, pravog selektivnog inhibitora sintetaze NOS1 (nNOS) koji niti in vitro, niti in vivo ne inhibira sintetaze NOS2 i NOS3 (iNOS i eNOS). Također u prave selektivne inhibitore NOS2 sintetaze (iNOS) ubrajaju se N-iminoetil L-oritin (L-NIO), N-iminoetil L-lizin (L-NIL), aminoguanidin i S-metilisotioureja (SMITU).

Glutation

Glutation ne spada u signalne molekule, već je uključen u održavanje staničnog integriteta kao antioksidans. Po kemijskoj strukturi je tripeptid (L-glutamin, L-cistein i glicin) koji postoji u dva oblika tj. u aktivnom obliku odnosno reducirani glutathion (GSH) i iskorišteni odnosno oksidirani u obliku glutathion disulfida (GSSG). Glutation nije esencijalni nutrijent jer se sintetizira u svim stanicama, a najviše u jetri koja ga izlučuje u krv i žuč, međutim cistein koji doduše nije esencijalna aminokiselina, mora se unositi hranom jer endogena produkcija nije dovoljna. Sintezom glutathiona nastaje reducirani oblik (GSH), djelovanjem gama-glutamyl cistein sintetaze, engl. Glutamat Cistein Ligase (GCL), koja iz L-glutamina i cisteina uz potrošnju ATP sintetizira gama-glutamyl-cistein, na koji potom glutathion sintetaza dodaje glicin. Sve stanice, a pogotovo hepatociti su bogate glutathionom, a omjer intracelularnog GSH/GSSG je mjera staničnog oksidativnog stresa. U normalnoj stanici glutathion je 90% u reduciranom, a samo 10% u oksidiranom obliku, dok u oksidativnom stresu pada stanični GSH uz porast staničnog GSSG, iako pad staničnog GSH ali bez porasta staničnog GSSG može nastati ako se reducirani glutathion veže disulfidnom vezom za oksidirane proteine bogate aminokiselinama sa sumporom. Glutation, odnosno njegov reducirani oblik (GSH) ima funkciju antioksidansa, koji sprečava oštećenja staničnih komponenti koju mogu uzrokovati nestabilne molekule tj. reaktivni oksidansi (slobodni radikali, peroksidi, lipidni peroksidi, teški metali, peroksinitrat), a također reducira odnosno obnavlja potrošene (osidirane) vanjske antioksidanse (vitamin C i E), jer djeluje kao donor elektrona ($H^+ + e^-$) i služi kao rezervar dušičnog oksida (S-nitrozoglutation). Otpuštanjem elektrona reducirani glutathion (GSH) prelazi u oksidirani (otpustio H^+ i e^-), čime postaje reaktivan kao i ostale nestabilne molekule i najčešće reagira sa drugim oksidiranim glutathionom sa kojim se spaja disulfidnom vezom u glutathion disulfid (GSSG). Oksidirani glutathion tj. glutathion disulfid (GSSG) može se ponovo reducirati uz pomoć enzima glutathion reduktaze (GSR) i donora elektrona ($NADPH+H^+$).

Stanično - molekularna podloga oštećenja i regeneracije jetre

Apoptoza je proces umiranja stanice koji se može arbitrarno podijeliti u tri faze: inicijalizacija, razaranje stanice i fagocitoza. Sa celularno - molekularne perspektive ona predstavlja energetske ovisnu kaskadu molekularnih događaja (intracelularnim i ekstracelularnim signalima stimulirana kaskadna aktivacija kaspaza), strogo reguliranu djelovanjem brojnih stimulacijskih tzv. proapoptotičkih i supresorskih tzv. antiapoptotičkih molekula. Smatra se da

u jetri nakon ekstenzivnih resekcija prevladava djelovanje proapoptotičkih nad antiapoptotičkim faktorima (119). Apoptoza započinje aktivacijom inicijatorskih kaspaza, na što se nadovezuje propadanje stanice modulirano aktiviranim efektorskim kaspazama. Inicijalizacija apoptoze može nastati na nekoliko načina, od kojih su najznačajniji vanjski i nutanji put aktivacije inicijatorskih kaspaza, pri čemu vanjski put nastaje stimuliranjem procesa u ciljnoj stanici djelovanjem drugih stanica (npr. leukociti) koje iz nekog razloga (infekcija virusom, maligna alteracija) tu stanicu prepoznaju kao onu koja treba eliminirati, dok je nutarnji put aktiviran unutarstaničnim oštećenjima koja zahvaćaju nukleinske kiseline (DNK) i membranske strukture (endoplazmatski retikulum i mitohondriji), a koje stanica nije uspjela reparirati. Rjeđe je inicijalizacija apoptoze uzrokovana toksinima mikroorganizama (piroptoza) ili mehanizmom perforin/grazim. Vanjski put posljedica je stimulacije transmembranskih receptora sa vanjske strane stanične membrane citokinima, bilo cirkulirajućima (TNF α , TGF β), bilo vezanima za staničnu membranu limfocita (FAS ligand), čime se pokrene aktivacija intracelularnog adapterskog proteina (FADD adapter protein) i omogući formiranje induksijskog proteinskog signalnog kompleksa (Death Inducing Signaling Complex) koji dovodi do pokretanja apoptotičke kaskade počevši sa inicijatorskom kaspazom 8 ili 10. Nutarnji put uzrokovan je oštećenjem mitohondrija i posljedica je indukcije apoptoze izlaskom citokrom C oksidaze (CytC) iz mitohondrija, koja u citoplazmi formira sa adapterskim proteinom (Apoptotic Protease Activation Factor) multiproteinski kompleks (apoptosom) koji dovodi do pokretanja apoptotičke kaskade počevši sa inicijatorskom kaspazom 9. Mitohondrijsko oštećenje i povećana permeabilnost membrane mitohondrija nastaju djelovanjem regulatornih proteina iz obitelji Bcl-2 proteina (Bak, Bax, Bcl2, Bcl-XL, Puma, Noxa) i ulaskom citoplazmatskog Ca^{2+} u mitohondrije. Proapoptotički proteini iz familije Bcl-2 smješteni na vanjskoj strani membrane mitohondrija (Bak), odnosno u citoplazmi (Bax) formiraju pore (Bak-Bax kompleks) na vanjskoj mitohondrijalnoj membrani, što omogućuje izlazak citokrom C oksidaze u citoplazmu. Pod kontrolom transkripcijskog faktora NF- κ B (heterodimer p52 i RelB) dolazi do ekspresije gena antiapoptotičkih proteina Bcl2 i Bcl-XL koji suprimiraju formiranje Bak-Bax kompleksa, a time i apoptozu. Prilikom oštećenja staničnog DNK, koje nije uspješno reparirano, aktivira se transkripcijski faktor p53 koji djeluje kao promotor gena za sintezu proapoptotičkih proteina Puma i Noxa, koji blokiraju antiapoptotičke proteine Bcl2 i Bcl-XL i omogućuju formiranje Bak-Bax kompleksa (pora) na mitohondrijskoj membrani i inicijalizaciju apoptoze. U slučaju stresa endoplazmatskog retikuluma (ER-stres), oštećenja koja su prvo funkcionalna (defektna sinteza proteina) izazivaju pojačanu ekspresiju GADD153 gena i sintezu istoimenog

proapoptotičkog transkripcijskog faktora, koji inhibira ekspresiju gena za antiapoptotički protein Bcl2, dok kasnije nastaju i strukturne promjene (povećana permeabilnost i oštećenja membrane), što rezultira izlaskom Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma u citoplazmu i potom ulazak u mitohondrije. Osim indukcije apoptoze, stresom endoplazmatskog retikuluma izazvana pojačana ekspresija gena GADD153 (sinonimi CHOP, DDIT3) rezultira i blokadom proliferacije stanica (staničnog ciklusa i diobe), jer istoimeni transkripcijski faktor inhibira gene uključene u sintezu faktora uključenih u stanično preživljavanje. Piroptoza tj. apoptoza inducirana toksinima mikroorganizama, iako mikroorganizmi češće uzrokuju nekrozu, započinje aktivacijom kaspaze 1, a aktivacija kaspaza putem mehanizma perforin/grazim uključuje limfocite T i sekreciju perforina koji radi pore u staničnoj membrani. Jednom pokrenuta enzimska kaskada, koju karakterizira pozitivna povratna sprega, u konačnici dovodi do proteolitičkog oštećenja efektorskim kaspazama staničnog citoskeleta sa posljedičnim kolapsom (kondenzacijom) citoplazme i jezgre, razgradnje staničnih organela i proteina, te fragmentiranja DNK u mono ili oligonukleotide (aktiviranim nukleazama), pri čemu međutim stanična membrana dugo ostaje intaktna, a intracelularni detritus se kao tzv. apoptotična tjelešaca skuplja u fagosomima i razgrađuje. Na kraju procesa preostale ostatke apoptotične stanice (stanični detritus) uklanjaju tkivni fagociti (histiociti) i makrofazi pri čemu okolina stanice ostaje intaktna. Iako gubitak hepatocita u jetrenom ostatku može biti posljedica nekroze, apoptoze ili kombinacije oba procesa, smatra se da nekroza nije dominantan proces (100). Na štakorskim modelima dvotrećinske resekcije (70% parenhima), apoptoza je vjerojatnije pokrenuta aktivacijom kaspaza nutarnjim nego vanjskim putem (100). Naime uočeno je da kod štakora kojima je učinjena dvotrećinska resekcija jetre, stimulacija receptora za TNF α (TNF R1 receptori) i Fas ligande (Fas/Apo receptori), kojih ima u velikom broju na staničnoj membrani hepatocita, umjesto apoptoze, u principu potiče regeneraciju (iako je u najranijoj fazi prisutna apoptoza) (100). Također primjena TGF β kod štakora kojima je na cirotičnoj jetri učinjena dvotrećinska resekcija smanjuje pojavu jetrenog zatajenja, manje stimulacijom regeneracije, a više supresijom apoptoze stimulacijom ekspresije gena za antiapoptotički protein Bcl-XL (17). Dominantnost nutarnjeg aktivacijskog puta vjerojatno je povezana sa oksidativnim stresom uzrokovanim ishemijsko - reperfuzijskom reakcijom, koja oštećuje membranske strukture stanice, u prvom redu mitohondrije, staničnu membranu i endoplazmatski retikulum. Oštećenje mitohondrijske membrane rezultira već spomenutim izlaskom citokrom C oksidaze u citoplazmu, a oštećenje stanične membrane (koja postaje permeabilnija za ekstracelularne katione) i endoplazmatskog retikuluma (koji otpušta kalcij) dovodi do poremećaja citoplazmatske homeostaze kalcija i porasta njegove

intracelularne koncentracije (100). Iako utjecaj antiaoptotičkih faktora koji koče vanjski put apoptoze (17,100) nije zanemariv, smatra se da je oporavak jetrene funkcije u najvećem dijelu posljedica regeneracije (proliferacije) hepatocita, koja počinje rano nakon parcijalne hepatektomije (10,17,100,108,112), a ukoliko postoje faktori koji koče regeneraciju hepatocita doći će do razvoja jetrene insuficijencije (100,107,119). Hiperplazija odnosno proliferacija stanica je proces povećanja broja stanica umnažanjem tj. diobom postojećih stanica, kako bi se nadoknadile propale stanice i održao adekvatan, funkcionalno potreban broj stanica nekog tkiva (kontrolirana dioba) ili se radi o nekontroliranom i nesvrishodnom umažanju (tumorska dioba). Proces započinje aktiviranjem stanica koje su u mirovanju tj. u G0 fazi, najčešće nisko diferenciranih matičih tkivnih stanica, iako u nekim tkivima, to mogu biti i visoko diferencirane stanice. Aktivirana somatska stanica ulazi u stanični ciklus prvo u interfazu u kojoj se priprema za diobu (u G1 fazi raste i duplicira organele kako bi stanice kćeri dobile dovoljno citoplazme i organela, te sintetizira proteine, između ostalih i one potrebne za replikaciju DNK, u S fazi replicira DNK, a u G2 fazi između ostalog sintetizira i proteine mitotičkog aparata). Bilo koji poremećaj u interfazi, pogotovu u S fazi stanicu čini kandidatom za apoptozu, međutim ukoliko pak stanica uspješno završi interfazu, što je najčešći slučaj, ona se podijeli mitozom (M) u dvije stanice kćeri koje potom mogu ući u fazu mirovanja (G0), nastaviti se diferencirati do stupnja visoko diferencirane tkivne stanice ili ponovo ući u stanični ciklus i diobu. Hiperplazija je kompleksno zbivanje u čiju su regulaciju osim mehanizama stanične proliferacije istovremeno uključeni i procesi koji koče proliferaciju omogućujući adekvatnu nadoknadu stanica i spriječavajući razvoj nekontrolirane proliferacije i eventualne onkogeneze. Međutim za urednu regeneraciju tkiva i oporavak funkcije nije dovoljna samo kvantitativna nadoknada izgubljenih stanica, već i njihovo sazrijevanje u funkcionalno kompetentne stanice, kao i adekvatna prostorna organizacija, što uključuje potporne stanice, angiogenezu i formiranje međustaničnog matriksa. Signalni putevi stanične proliferacije uključuju između ostalih cikline, G proteine (RAS, EGF i EGFR), transkripcijske faktore Elk1, c-myc, c-FOS, c-Jun, regulatorne puteve NF- κ B, kinaze MAPK kaskade (RAF, MEK, ERK) itd., dok signalni putevi koji blokiraju stanični ciklus i staničnu proliferaciju uključuju između ostalih p53 (p21) i GADD 153. Glavni regulatori staničnog ciklusa su ciklini, molekule koje ne iniciraju diobu, ne sudjeluju u replikaciji DNK, niti u mitozu stanica, ali su esencijalne kako bi na diobu aktivirane stanice, mogle prelaziti iz jedne u drugu fazu staničnog ciklusa ($G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$) i konačno ući u mitozu. Ciklini (označeni slovima A, D, E, B) sa pripadajućim ciklin zavisnim kinazama, engl. Cyclin Dependent Kinase (CDK, Cdk) stvaraju komplekse koji fosforiliraju druge signalne molekule i / ili omogućuju

ekspresiju gena koji kontroliraju sintezu proteina neophodnih za diobu stanice. Aktivnost ciklin zavisnih kinaza regulirana je inhibitorima ciklin zavisnih kinaza, engl Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (CKI). Prema dominirajućem kompleksu (jer su svi prisutni u svim fazama), arbitrarno mogu podijeliti u podgrupe prema fazama staničnog ciklusa; na početku G1 faze kompleks ciklin ovisnih kinaza Cdk4 i Cdk6 sa ciklinom D fosforilira Rb protein i oslobađa ga od E2F proteina (transkripcijski faktor), dok na kraju faze kompleks ciklin ovisne kinaze Cdk2 i ciklina E omogućuje prijelaz stanice u S fazu. U S fazi dominira kompleks ciklin ovisnih kinaza Cdk1 i Cdk2 sa ciklinom A, omogućujući prijelaz u G2 fazu u kojoj kompleks ciklin ovisne kinaze Cdk1 i ciklina B omogućuje ulaz u mitozu (M faza), u kojoj MPF kompleks, engl. M phase maturation Promotion Factor, koji uključuje i ciklin ovisnu kinazu Cdk1 i cikline B1 i B2 omogućuje kaskadu mitoze. O količini raspoloživih kompleksa ciklina i ciklin zavisnih kinaza ovisi dioba; nedostatna količina onemogućuje diobu i aktiviranu stanicu vodi u smrt apoptozom, a prekomjerna može izazvati nekontrolirano dijeljenje stanice i pokrenuti onkogenezu. Regeneracija jetre uključuje proliferaciju svih staničnih komponenti i međustančnog matriksa, koja se odvija paralelno sa proliferacijom hepatocita, koji prvi pokazuju mitotičku aktivnost (100), za koju se smatra da je inducirana citokinima TNF α i IL6 (10,100), te faktorom rasta TGF β (17) koji stimuliraju DNK sintezu u hepatocitima koji se regeneriraju. Regeneracija zdrave humane jetre kod donora (transplantacija sa živog donora), započinje unutar dva tjedna po resekciji i završava unutar tri mjeseca (100). Markeri inicijalne faze regeneracije jetre su protoonkogeni koji kodiraju sintezu istoimenih transkripcijskih faktora c- fos, c-jun i c- myc (10,100), čija je ekspresija vidljiva je čak i nakon masivne hepatektomije štakora (100), zatim signalne molekule iz obitelji aktivatora transkripcije i provođenja (pretvaranja) signala (10,100), eng. Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT), koji stimuliraju gene za rast, prvenstveno gene za ciklin zavisne kinaze (100). Ekspresija navedenih gena najčešće je posljedica stimulacije hepatocita hepatotropnim faktorima, među kojima najvjerojatnije najznačajniju ulogu imaju citokini: tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNF α) i interleukin 6 (IL6), ali i drugi faktori rasta: faktor rasta hepatocita (HGF), epidermalni faktor rasta (EGF) i transformirajući faktor rasta (TGF). Svi hepatotropni faktori djeluju na stanice preko istoimenih receptora na staničnoj membrani, koji funkcionalno pripadaju receptorskim tirozin kinazama (RTK), koje su drugi glasnik brojnih intracelularnih signalnih puteva, između ostalih: PI3K-AKT-mTOR, RAS-RAF-MEK-ERK, PLC γ -PKC. Ti putevi reguliraju aktivnost transkripcijskih faktora, između ostalih Elk1, c- myc, c-fos, c-jun (100). Osim putem receptorskih tirozin kinaza, citokini reguliraju regeneraciju jetre i putem dušičnog oksida (NO), stimulirajući nakon resekcije ekspresiju

gena inducirane sintetaze dušičnog oksida (iNOS), te tako povećavaju količinu raspoloživog dušičnog oksida u jetrenom ostatku (17,100). Dušični oksid regulira hormonom proliferacije hepatocita (HGF) stimuliranu ekspresiju gena za ciklin D1 i D2, blokiranjem S-adenozil metionin sintetaze (SAdMet), koja je inhibitor ekspresije navedenih gena (17,100). Manjak dušičnog oksida hepatocit vodi u apoptozu (porast kaspaze 3), a jetreni ostatak u eventualnu insuficijenciju (17,100). Pojednostavljeno, u najranijoj fazi regeneracije, simultana ekspresija više vrsta gena koji kontroliraju rast stanica, utječe da se mirni i visokodiferencirani hepatociti aktiviraju i uđu u stanični ciklus, a nakon inicijalizacije, se proces nastavlja normalnim mehanizmima staničnog ciklusa, u prvom redu kompleksima ciklina i ciklin ovisnih kinaza, uz kontrolu (blokadu) regeneracije inhibitorima ciklin ovisnih kinaza (npr. protein p21 čija je sinteza vjerojatno inducirana sa TGF β), te inhibicijom sinteze NF- κ B (100).

Shodno navedenom, stanična se proliferacija može utvrđivati verifikacijom etabliranih medijatora jetrene regeneracije koji uključuju TNF α , IL6 i HGF, NF- κ B, STAT3, EGF, ERK, YAP, bilo direktno ili dokazivanjem pojačane sinteze odnosno ekspresije odgovarajućih gena, verifikacijom mRNK (10,17,101), potom ciklina i ciklin ovisnih kinaza, proteinskih regulatora staničnog ciklusa (10,17) ili dokazivanjem pojačane sinteze DNK verifikacijom Ki-67 i PCNA, proteina povezanih sa replikacijom DNK (10), verificiranjem ugradnje bromodeoksiuridina (BrdU) u novosintetiziranu DNK tijekom DNK sinteze (17,101).ili mjerenjem ukupne stanične DNK bojama za nukleinske kiseline (121).

Detaljniji pregled mehanizma stanične proliferacije i apoptoze, te dio signalnih puteva i molekula uključenih u navedene procese prikazan je u predhodnom odjeljku (poglavlje UVOD I SVRHA RADA: DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA: Signalne molekule uključene u mehanizme oštećenja i regeneracije jetre).

Metode verifikacije oštećenja i regeneracije jetre

Verifikaciju signalnih molekula uključenih u apoptotičke ili regeneracijske procese moguće je učiniti na direktan ili indirektan način, pri čemu se prilikom direktne verifikacije registrira sama molekula, mjerenjem njene koncentracije ili pomoću na signalnu molekulu sintetiziranih protutijela. Protutijela se koriste kod određivanja signalne molekule u plazmi imunoenzimskom metodom (ELISA) ili supernatantu dobijenim centrifugiranjem homogenata parenhima jetre, imunoenzimskom metodom ili Western blotting metodom. Indirektnom verifikacijom se ne registrira signalna molekula, već s njom povezani procesi, tj. ekspresija

(ili supresija) kodirajućeg gena ili njena posttranslacijska modifikacija. Ekspresija odnosno supresija kodirajućeg gena utvrđuje se određivanjem transkripcijskih faktora ili mRNK odgovorne za sintezu same signalne molekule. In situ hibridizacijom može se tražena mRNA dokazati u histološkom preparatu ili se sva postojeća mRNA izolira se iz uzorka tkiva jetrenog ostatka, a potom se postupkom polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (RT PCR), reverznom transkriptazom formiraju komplementarne DNK (cDNA), od kojih se korištenjem primera za traženu signalnu molekulu, umnaža samo ona cDNA koja je karakteristična za tu molekulu, te tako predstavlja mjeru ekspresije traženog gena.

Posttranslacijska modifikacija signalne molekule utvrđuje se verifikacijom njene aktivacije (supresije), mjerenjem koncentracije ili dokazivanjem pomoću protutijela, bilo proteina koji ju aktivira (suprimira), bilo dijela signalne molekule koji se oslobađa prilikom aktivacije odnosno supresije.

Oštećenja jetrenog parenhima kao i regeneracija jetre verificiraju se patohistološki, biokemijski, imunohistokemijski, imunocitokemijski, protočnom citometrijom i molekularnim metodama (10,12,16,17,101,107,113,119). Standardni biokemijski markeri jetrene funkcije određuju se iz uzoraka krvi, a uzorci jetrenog tkiva uzimaju se za standardnu patohistološku analizu svjetlosnim mikroskopom (10,17,100,101,107,113,119), a rjeđe se koriste za elektronsku mikroskopiju (100,107). Osim za patohistološke analize, tkivo ostatne jetre koristi se za molekularne metode (10,17,101,107), te imunohistokemiju, imunocitokemiju i protočnu citometriju (16,17,101,119).

Oporavak jetre može se verificirati i makroskopski, usporedbom mase ostatne jetre sa referentnim vrijednosti mase intaktne štakorske jetre, koje se mogu utvrditi žrtvovanjem zdravih životinja (17,107) ili se procijeniti prema masi resektata i poznatom udjelu reseciranih režnjeva u ukupnoj masi jetre (109). Tako se može odrediti indeks regeneracije jetre eng. Liver Regeneration Rate (LRR), koji predstavlja postotak regenerirane jetre (mase) i računa se kao omjer mase jetrenog ostatka i procijenjene mase intaktne jetre na osnovi izmjerene mase i udjela odstranjenih režnjeva (101).

Određivanje mase i volumena jetre

Za potrebe praćenja uspješnosti regeneracije jetre, u dijelu radova određivan je volumen ili češće masa prijeresekcijske i poslijeresekcijske jetre, odnosno prirast mase, bilo direktno ili izraženo kroz omjer mase jetre prema ukupnoj tjelesnoj masi. U nekim radovima korištene su 3 grupe laboratorijskih životinja; osim uobičajno istraživačke i kontrolne grupe, korištena je i dodatna grupa zdravih životinja koje su žrtvovane radi utvrđivanja referentnih vrijednosti,

između ostaloga i mase intaktne jetre koja je vađena cijela sa intrahepatalnom venom, a potom je mikrokirurški odstranjen svaki režanj, pa je stvarna vrijednost ukupne mase jetre dobijena oduzimanjem vrijednosti izmjerene mase tkiva preostale nakon odstranjenja svih režnjeva od vrijednosti mase ekstripirane jetre, a relativna masa svakog režnja kao kvocijent između mase režnja i stvarne ukupne mase jetre (107).

Promjene volumena ekstripirane jetre (intaktne ili ostatne) mogu se verificirati pomoću menzure, međutim za razliku od mjerenja mase jetre, mogu se određivati i bez žrtvovanja životinja, primjenom MR (10) ili MSCT (111), ali se životinje za svako mjerenje moraju predhodno anestezirati, a snimanje sinkronizirati sa respiratornim ciklusom.

Biokemijske metode

Krv za biokemijsku analizu uzima se punkcijom nakon anestezije životinje iz srca (119), hepatalne vene (107) ili donje šuplje vene (10,113), a kao standardni biokemijski markeri ozljede hepatocita mjere se koncentracije ukupnog i direktnog bilirubina, gama glutamil (GGT) transferaze, aspartat (AST) i alanin (ALT) aminotransferaze i alkalna fosfatza (ALP) (10,12,101,107,113,119). Osim standardnih biokemijskih markera jetrenog oštećenja, u istu svrhu mogu poslužiti i pokazatelji jetrene insuficijencije (amonijak i laktati u krvi) (108), te markeri oksidativnog stresa u krvi hepatalne vene tj. koncentracija i omjer reduciranog i oksidiranog glutaciona (GSH, GSSG i GSH / GSSG ratio) (107) i saturacija kisika (ShvO₂ - Hepatic venous oxygen saturation) (107). Markeri oksidativnog stresa (GSH, GSSG i GSH / GSSG ratio) mogu se određivati i iz tkiva (homogenata tj. supernatanta) ostatne jetre (101,107). U nekim radovima (101,118) dodatno su prećeni standardni parametri bubrežne funkcije (urea i kreatinin) i aktivnost dušičnog oksida, mjerenjem u serumu nitrozotiola kao endogenog izvora dušičnog oksida, odnosno aktivnosti NOS2 i NOS3 dušičnih sintetaza (imunohistokemijski). Biokemijski nalaz ovisi o opsegu resekcije i vremenu proteklom od zahvata do uzimanja uzorka za analizu. Pri 70-80% resekciji, u najranijoj fazi nakon resekcije (6 sati) signifikanto su povećane plazmatske koncentracije AST-a, ALT-a, dok je promjena koncentracije ukupnog bilirubina i GGT-a nesignifikantna. Također su signifikantno povećane koncentracije kisika i smanjene koncentracije reduciranog glutaciona (GSH) u krvi hepatalne vene, dok je promjena koncentracije jetrenog GSH-a i GSSG-a nesignifikantna (107). Nakon 24 sata kod 70% resekcije, signifikanto su povećane plazmatske koncentracije AST-a, ALT-a, i ALP-a, dok je koncentracija ukupnog i direktnog bilirubina povećana ali nesignifikantno, za razliku od 85% resekcije kod koje su signifikanto povećane plazmatske

koncentracije AST-a, ALT-a, i ALP-a, te ukupnog i direktnog bilirubina kako u odnosu na kontrolnu grupu tako i 70% resekciju (119).

Histopatološke metode

Patohistološka analiza jetrenog tkiva radi se rutinski svjetlosnim mikroskopom (10,100,101,107,113,119), a rijetko se koristi elektronska mikroskopija (100,107). Tkivo ostatne jetre se fiksira u puferiranom formalinu (10,101,107,119) i uklapa u parafin (parafinska kocka) iz koje se izrezuju preparati koji se potom boje hemalaun eozinomom (HE - standardni patohistološki preparat) i analiziraju svjetlosnim mikroskopom ili se tretiraju odgovarajućim protutijelima (direktna i indirektna imunohistokemija) i analiziraju svjetlosnim (enzimatska imunohistokemija) ili fluorescentnim mikroskopom (fluorescentna imunohistokemija). Patohistološkom analizom svjetlosnim mikroskopom na standardnim hemalaun - eozin (HE) preparatima, promatraju se znakovi oštećenja i regeneracije jetre, koja uključuju klasifikaciju parenhimnih oštećenja, broj hepatocita sa dvostrukim jezgrama, morfometriju veličine stanica i jezgri, blijedoću ili hiperkromaziju jezgri, nekrozu i apoptozu hepatocita, masnu metamorfozu (mikrovaskularna steatoza, vakuoalizacija citoplazme), leukocitnu infiltraciju, kongestiju sinusoida, perivaskularno krvarenje i mitotičke figure (10,100,101,107,113,117,119). Kako se smatra da je osnova jetrenog oštećenja vaskularne geneze, za patohistološku analizu postresekcijske jetre najčešće se koristi Rappaportov model jetrenog acinusa (107,119), iako on ne odgovara funkcionalno - strukturnoj jedinici štakorske jetre, kojoj vjerojatnije odgovara model portalnog režnjića (113) (poglavlje UVOD I SVRHA RADA: DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA: Štakorska jetra). Koncept jetrenog acinusa je temeljen je na vaskularizaciji parenhima i razlikuje tri zone hepatocita: zona 1 okružuje portalnu trijadu, prima najviše oksigenirane krvi, a prilikom resekcija najviše je izložena povećanom tlaku, zona 3 koja okružuje centralnu venu, prima najmanje kisika, a prilikom resekcija najmanje je izložena povećanom tlaku, te zona 2 između navedenih zona. U radovima koji su se primarno bavili istraživanjem mehanizmima postresekcijskog oštećenjem jetre (119) korištena je histološka klasifikacija hepatocelularne ozljede u 4 stupnja (*pvi put objavljena 2000 god. u časopisu Annals of Surgery u radu „Interaction of platelet activating factor reactive oxygen species generated by xanthine oxidase and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation“*): 0 označava uredan nalaz, 1 mrljastu, a 2 uniformnu pericentralnu nekrozu unutar 5 hepatocitnih cirkumferencija oko centralne vene, dok 3 označava pericentralnu nekrozu koja se proteže na više od 5 hepatocitnih cirkumferencija oko centralne vene. U pojedinim radovima (101) histopatološke promjene su

također klasificirane u 4 stupnja, ali na slijedeći način: 0 označava uredan nalaz, 1 blage promjene sa vakuolizacijom citoplazme i fokalno piknozom jezgri, 2 izražene promjene, gdje dominira piknoza jezgri, eozinofilija citoplazme i gubitak međustaničnih veza, dok 3 označava teške promjene sa ekstenzivnom nekrozom, krvarenjem, masivnom neutrofilnom infiltracijom i disrupcijom hepatocita. Neki autori (10) kvantificirali nekrozu kao % nekrotičnog tkiva u jetrenom parenhimu neovisno o funkcionalno - strukturnoj jedinici: 0 označava da je u vidnom polju parenhim bez nekroze, 1 manje od 25% nekroze, 2 između 25% i 50% nekroza, 3 između 50% i 75%, a 4 više od 75% nekrotičnog parenhima. Kao i biokemijski nalazi, tako i histopatološki ovisi o opsegu resekcije i vremenu proteklom od zahvata do izrade preparata. Pri 70-80% resekciji, u najranijoj fazi nakon resekcije (6 sati) vidljiva je vakuolizacija citoplazme hepatocita koja je naglašenija centrolobularno (zona 3) nego periportalno (zona 1) (107), odnosno difuzno (113) te hemoragična nekroza i početno nakupljanje leukocita periportalno (107). Nakon 24 sata udio nekrotičnih i apoptotičnih hepatocita je kod 70% i 85% resekcije signifikanto veći nego kod kontrolne grupe, pri čemu je udio apoptotičnih hepatocita nakon 85% resekcije signifikanto, a udio nekrotičnih nesignifikantno veći nego nakon 70% resekcije (119) kod koje dominira hepatocelularna ozljeda 1 i 2 stupnja, za razliku od 85% resekcije gdje se vidi i hepatocelularna ozljeda 3 stupnja. Patohistološkom analizom donorske jetre koja je činila manje od 30% težine zdrave jetre u štakora primatelja (100) u istraživanjima modela transplantacije nedostatne jetre (small for size liver), uočena je kongestija sinusoida, što upućuje na povećanje portalnog i arterijskog tlaka i protoka kroz jetrenu cirkulaciju, sa poremećajem mikrocirkulacije. Svjetlosnim mikroskopom u standardnom histološkom preparatu (HE) može se detektirati nekroza, dok je apoptične stanice (kondenzacija jezgre i eozinofilija citoplazme) teže uočiti, te se za detekciju apoptoze u histološkom preparatu (engl. in situ cell death detection), primijenjuju posebne tehnike tzv. intravitalnog bojenja ili imunohistokemijske metode koje detektiraju fragmentaciju DNK. Prilikom intravitalnog bojenja životinji se prije žrtvovanja intraperitonealno ili putem krvne žile daje vitalna boja (npr. tripansko plavilo) (107,119), a po usmrćivanju uzima tkivo koje se fiksira u puferiranom formalinu, uklapa u parafin i izrezuje u preparate koji se boje kontrastnom citoplazmatskom bojom (npr. eozin) (107,119), pri čemu se citoplazma apoptotičnih stanica boji modro (tripansko plavilo), a vitalnih stanica rozo (eozin).

Prilikom detektiranja fragmentacije DNK, histološki preparat izrezan iz parafinske kocke, se tretira terminalnom deoksinukleotidil transferazom (TUNEL test), koja dodaje fluorescentno označene nukleotide na kraj DNK lanca tj. na mjesto fragmentacije, a potom se fluorescentnim

mikroskopom među plavo obojenim jezgrama vitalnih stanica, apoptotičene stanice prepoznaju smeđe obojenom citoplazmom (16,17,100,101,119), dok se verifikacija DNK sinteze vrši detekcijom ugradnje nukleozidnih analoga (bromodeoksiuridin - BrdU) u novosintetiziranu DNK. Bromodeoksiuridin se nekoliko sati prije žrtvovanja injicira životinjama intraperitonealno i potom se u histološkom preparatu izrezanom iz parafinske kocke imunohistokemijski pomoću protutijela na BrdU određuje postotak pozitivno obojenih hepatocita (17,101).

Verificiranje nekih markera stanične proliferacije (npr. ciklina, STAT, Yap, Ki 67 i PCNA), te nekih markera apoptoze (npr. kaspaza 3) vrši se i imunohistokemijski; histološki preparat izrezan iz parafinske kocke. tretira se odgovarajućim protutijelima, a potom se nastali imunokompleksi (ako ih ima) registriraju u preparatu svjetlosnim ili fluorescentnim mikroskopom ovisno o primjenjenoj boji (10,16,17,101,119,121), dok se transkripcijska aktivnost gena koji kontroliraju sintezu markera može u histološkom preparatu dokazivati metodom in situ hibridizacije, npr. mRNK za HGF (17).

U vrlo malo radova (100,107) korištena je elektronska mikroskopija za analizu tkiva jetre, pri čemu kao i kod svjetlosne mikroskopije nalaz ovisi o opsegu resekcije i vremenu proteklom od zahvata do izrade preparata. Pri 70-80% resekciji, u najranijoj fazi nakon resekcije (6 sati) vidljive su degenerativne promjene u citoplazmi hepatocita (proteinske i lipidne vakuole), adhezija leukocita na endotelne stanice sinusoida, ali nisu registrirane morfološke promjene mitohondrija (107), koje su registrirane u radovima kada se analiza radila nakon 24 sata (107), što upućuje da morfološkim promjenama mitohondrija predhode funkcionalne promjene (107). U štakorskom modelu transplantacije nedostatne jetre (small for size liver) (100) prilikom koje je donorska jetra činila manje od 30% težine jetre recipijentnog štakora, elektronskom mikroskopijom je registrirano oticanje mitohondrija.

Molekularne metode

Za dokazivanje i mjerenje koncentracije različitih signalnih i regulatornih molekula, može se raditi imunohistokemija ili in situ hibridizacija na rezovima tkiva (histopatološke metode) ili izolacija mRNK i proteina iz supernatanta dobijenog centrifugiranjem homogenata (suspenzija stanica) formiranog iz jetrenog tkiva. Signalne molekule, koje su po svojoj kemijskoj strukturi proteini, nakon izolacije verificiraju se direktno, gel elektroforezom, imunoenzimskim metodama, engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western blotting metodom ili gel elektroforezom sa pomakom, engl. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), kojom se provjerava sposobnost nekog proteina da se veže za nukleinsku

kiselinu. Određivanjem iz supernatanta izolirane mRNK Northern blotting metodom ili metodom polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu, engl. Real Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR), indirektno se dokazuje određena signalna molekula, odnosno verificira njezina sinteza. ELISA se koristila u određivanju koncentracija IL6, TGF α , NF- κ B, STAT3, TNF α , HGF β , SOCS 3, ERK, c-met, Src, c-myc, c-jun, YAP (10,17), Western blotting za Yap, ciklin D1 i E, ciklin ovisne kinaze Cdk2 i Cdk4, STAT3 (10), te HGF, Bcl XL, Bax i Bcl2 (17), a EMSA za NF- κ B (10). RT PCR se koristio u određivanju mRNK za IL6, TNF α i HGF (10,17). Detaljniji prikaz metoda gel elektroforeze, Western i Northern blottinga, te EMSA-e nalazi se u nastavku teksta.

Gel elektroforeza, SDS PAGE i EMSA

Gel elektroforeza je razdvajanje električki nabijenih molekula pomoću istosmjernog električnog polja (elektroforeza), koje se zbiva u polisaharidnom gelu (agar), za razliku od prvotne tehnike, kada su molekule bile u vodenoj otopini. Metoda se koristi za detekciju određene makromolekule u smjesi istovrsnih makromolekula (DNK, RNK, proteini), a može se koristiti i kao prva faza separacije makromolekula u procesu detekcije (separirane molekule se iz gela izdvoje blottingom za daljnju analizu). DNK, RNK i proteini su električki (negativno) nabijene makromolekule koje se u istosmjernom električnom polju, međusobno razdvajaju prema veličini (masi) i naboju molekule - manje (masom i veličinom) i jače električki nabijene molekule u istom vremenskom intervalu putuju dalje od negativne elektrode, tj. dopijevaju bliže pozitivnoj. Kako bi se omogućila vizualizacija separiranih molekula, u ispitivanu smjesu dodaje se mala molekula, koja ne utječe na pokretljivost makromolekula u gelu, tzv. marker (radioizotop, biološka ili fluorescentna boja, npr. biotin ili etidium bromid) kojom se registrira mjesto tzv. elektroforetska linija (engl. band), do kojeg je dospjela, nakon određenog vremenskog intervala pojedina grupa molekula. Vremenski interval mora biti optimalan za uspješnu i točnu separaciju, npr. u ekstremnim situacijama se molekule uopće ne uspiju razdvojiti (prilikom preduge elektroforeze sve molekule su uz pozitivnu, a kod prekratke uz negativnu elektrodu). Fizikalne karakteristike (veličina, masa i naboj) razdvojenih makromolekula određuju se usporedbom sa elektroforetskim linijama standardne probe, tj. uzorka sa smjesom molekula poznate mase (standardizirana smjesa), tzv. reper (talon). Gel elektroforeza je gruba metoda kojom se detekcija vrši samo na osnovi fizikalnih karakteristika molekule, pa se za točniju detekciju, gel elektroforezom separirane molekule analiziraju preciznijim metodama (hibridizacija nukleinskih kiselina - PCR, Southern i Northern blotting, obilježavanje proteina protutijelima - ELISA, Western blotting).

SDS PAGE (engl. Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) je diskontinuirana gel elektroforeza proteina, pri čemu separacija nastaje samo prema molekularnoj masi proteina, jer se odvija u mediju (Na^+ dekodij sulfat i poliakrilamid gel) koji eliminira utjecaj strukture i naboja molekula na pokretljivost. Metoda jasnije prikazuje elektroforetske linije, nego gel elektroforeza, ali svi proteini nisu pogodni za separaciju ovom metodom, jer Na^+ dekodij sulfat denaturira neke vrste proteina. Točna detekcija se vrši pomoću protutijela (Western blotting), a ne na osnovu mase tj. farbanja elektroforetskih linija (SDS PAGE).

EMSA (engl. Electrophoretic Mobility Shift Assay, odnosno engl. mobility shift electrophoresis, gel shift assay, gel mobility shift assay, band shift assay, gel retardation) je gel elektroforeza proteina, kojom se provjerava sposobnost proteina na vezanje za nukleinsku kiselinu (engl. nucleic acid binding activity). Tom metodom dokazuju se proteini koji sudjeluju u mehanizmu popravka, replikacije i transkripcije DNK, te posttranskripcijske modifikacije mRNK, tj. sudjeluju u kontroli onkogeneze, proliferacije stanica, ekspresije gena i maturacije mRNK. Elektroforetska linija u kojoj je kompleks nukleinske kiseline i vezanog proteina je pomaknuta odnosno kasni (shift) u odnosu na liniju u kojoj je samo nukleinska kiselina (reper, talon). Proteini koji se ne vežu na nukleinsku kiselinu se ne detektiraju, jer je marker vezan odnosno registrira samo nukleinsku kiselinu, bilo slobodnu, bilo vezanu na protein.

Southern, Northern i Western blotting

Blotting (engl.) je proces transfera gel elektroforezom separiranih makromolekula (DNK, RNK ili proteina) iz gela u membranu od nitroceluloze ili najlona (engl. blot) u kojoj se molekule fiksiraju i potom detektiraju. Detekcija nukleinskih kiselina (DNK - Southern blotting, RNK - Northern blotting) vrši se hibridizacijom pomoću odgovarajuće probe (primer), a proteina monoklinalnim protutijelom (Western blotting = immuno blotting). Za izdvajanje/detekciju fragmenta nukleinskih kiselina, mora biti poznata struktura tj. slijed nukleotida, kako bi se mogao primjeniti adekvatan komplementarni polinukleotidni lanac (proba, primer), dok je za polipeptidne lance (proteini) potrebno znati o kojim se proteinima radi kako bi se primjenilo odgovarajuće monoklinalno protutijelo. Drugim riječima blotting metodama ne može se verificirati postojanje nepoznate molekule, već samo pokazati da li u smjesi ispitivanih makromolekula postoji ili ne neka točno određena molekula. Southern i Northern blotting se nakon pojave PCR-a rijetko primjenjuju, dok je Western blotting i dalje široko primjenjivana metoda u verifikaciji proteina.

Metode detekcije apoptoze

Detekcija apoptoze bazira se na dokazivanju promjena koje su posljedica samog procesa tj. oštećenja citoplazmatskih struktura, stanične i mitohondrijske membrane, fragmentacije i raspadanja DNK, te aktiviranja kaspaza (17,101,121). Morfološke promjene mogu se verificirati svjetlosnim i elektronskim mikroskopom u preparatima tkiva. Standardni histološki preparat (HE) koji kvalitetno detektira nekrozu, nije pogodan za detekciju apoptičnih stanica, iako se (doduše teško) mogu uočiti znakovi oštećenja u smislu skvrčavanja stanice, kondenzacije citoplazme i jezgre, pupanja stanične membrane, naglašene eozinofilije citoplazme, zgušnjavanja kromatina, raspada jezgrine ovojnice i fragmentacije jezgre, te formiranja apoptotičnih tjelešaca. Morfološke promjene uočljive su i elektronskim mikroskopom u vidu strukturnih promjena mitohondrija, trganja kromatina i pupanja stanične membrane, ali se u rutinskoj praksi elektronska mikroskopija rijetko primjenjuje. Isključne vitalne boje koje su kemijski građene od makromolekula (propidij jodid, tripansko plavilo), ne mogu prolaziti kroz intaktnu staničnu membranu, pa ne mogu obojiti citoplazmu zdravih stanica, međutim patološka permeabilnost oštećene stanične membrane, čini ih idealnim za detekciju apoptotičnih stanica i njihovo razlikovanje od zdravih stanica, svjetlosnim mikroskopom u histološkom preparatu, uz napomenu da se boja mora primjeniti prije žrtvovanja životinja (tzv. supravitalno bojenje). Pojava fosfolipida nutarnje strane stanične membrane (npr. fosfatidil serin), na njenoj vanjskoj strani, također je posljedica oštećenja stanične membrane, a dokazuje se fluorokromom obilježenim AnnexinV (protein koji veže fosfatidil serin), doduše ne u histološkom preparatu već protočnom citometrijom (121). Oštećenja mitohondrijske membrane, povećanje aktivnost proteina iz Bcl-2 familije, porast slobodnog intracelularnog i intramitohondrijskog Ca^{2+} , te porast citoplazmatske citokrom C oksidaze, iako esencijalni u procesu apoptoze, tehnološki su zahtjevni za verifikaciju, pa se rjeđe koriste u rutinskoj praksi (121). Defragmentacija polinukleotidnih lanca stanične DNK, rezultira oslobađanjem mono i dinukleotida, koji su male molekule, pa lako prolaze kroz oštećenu staničnu membranu u intersticiji, što dovodi do smanjenja ukupne količine DNK u stanici, a mjesta pucanja polinukleotidnih lanaca ostaju otvorena za djelovanje DNK polimeraza (koje bi u normalnoj stanici reparirale DNK i spojile fragmente u kontinuitet, dok u apoptotičnoj stanici ostaju slobodni polinukleotidni fragmenti). Smanjenje ukupne količine DNK u stanici se dokazuje fluorescentnim bojama za nukleinske kiseline protočnom citometrijom npr. Nicoletti testom (121), a prekid kontinuiteta polinukleotidnih lanaca polimerizacijom fluorescentno označenim nukleotidima (TUNEL assay) (16,17,100,101,119,121) fluorescentnom mikroskopijom histoloških preparata ili protočnom

citometrijom. Metode detekcije fragmentacije DNK verificiraju apoptozu puno prije nego što ona postane histološki vidljiva, pa imaju prednost nad morfološkim metodama. Aktivnost kaspaza može se verificirati direktno, dokazivanjem određene kaspaze ili indirektno dokazivanjem blokiranja reparacije DNK. Odabir metode koja se koristi za direktno dokazivanje aktivnosti kaspaza ovisi o vrsti materijala u kojem se aktivnost dokazuje. U kulturi stanica, što je najčešća metoda dokazivanja apoptoze, dodaje se detektibilno sredstvo koje predstavlja supstrat za kaspazu i koje postaje detektibilno kad ga odgovarajuća kaspaza (kaspaze su proteolitički enzimi) razgradi (121). Supstrat za kaspazu može biti luminescentan (emitira svjetlo određene valne duljine) ili fluorescentan (emitira kad je obasjan određenom valnom duljinom) ili obojen (apsorbira određenu valnu duljinu vidljivog spektra), pa se detekcija vrši fluorescentnim mikroskopom odnosno protočnom citometrijom (fluorescentan) ili spektrometrom (luminescentan ili obojen supstrat). U tkivu se aktivnost pojedine kaspaze dokazuje imunohistokemijski odgovarajućim protutijelom koje sa ciljanom kaspazom, bilo cijelom (inaktivnom) ili njenim aktivnim fragmentom formira imunokompleks (17,121). Indirektno dokazivanje kaspaza bazira se na verifikaciji blokiranja reparacije DNK proteolitičkom razgradnjom poli adenozin difosfat riboza polimeraze (PARP), DNK polimeraze zadužene za reparaciju jednolančane DNK. Naime, tijekom apoptoze, dolazi do fragmentacije DNK, što aktivira navedenu DNK polimerazu, koju razgrađuje aktivirana kaspaza 3, onemogućujući tako reparaciju DNK, a fragmenti PARP se, verificiraju Western blotting metodom primjenom odgovarajućih protutijela na polimerazu (121). Detaljniji prikaz kaspaza nalazi se u odjeljku Signalne molekule uključene u mehanizme oštećenja i regeneracije jetre (poglavlje UVOD I SVRHA RADA: DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA), a fluorescentnih boja za nukleinske kiseline i TUNEL assay metode u nastavku teksta.

TUNEL test

TUNEL assay (engl. TdT dUTP Nick End Labeling, sin. terminal UTP nick & labeling) je metoda dokazivanja fragmentacije molekule DNK, uvedena u upotrebu 1992. godine. Pomoću posebne vrste DNK polimeraze, tzv. terminalna deoksinukleotidil transferaza (TdT) na mjesto prekida kontinuiteta polinukleotidnog lanca, dodaje se fluorescentno ili bojom označeni nukleotid, u ovom slučaju uridin tri fosfat (UTP). Terminalna deoksinukleotidil transferaza, terminalna jer djeluje na kraj polinukleotidnog lanca DNK (engl. nick end), dodaje veliki broj označenih nukleotida na krajeve fragmenata DNK koji tako postaju vidljivi fluorescentnom mikroskopijom u histološkim preparatima ili se detektiraju protočnom citometrijom u suspenziji stanica.

Fluorescentne boje za nukleinsike kiseline

Svjetlosnim mikroskopiranjem standardno obojenih stanica (HE), gotovo je nemoguće razlikovati stanice u mirovanju (funkcionalne stanice u G0 fazi) od stanica koje se nalaze u interfazi (G1, S i G2 faza). Primjena fluorescentnih boja za nukleinsike kiseline, omogućuje detekciju stanica u fazi proliferacije (cell cycle assay), dok još nisu vidljive morfološke promjene karakteristične za mitozu. Fluorescentne boje za nukleinsike kiseline, npr. propidium iodid (PI), 7 - amino actinomycin D (7-AAD), Hoechst 33342, Hoechst 33258, 4' 6' - amidino -2- fenilindol (DAPI) se vežu za RNK i DNK i fluoresciraju kad se osvijetle (svjetlom ili laserom) odgovarajuće valne duljine (boje), pa se prema količini odaslane svjetlosti (količini boje u stanici) može odrediti količina stanične DNK i tako procijeniti u kojoj je stanica fazi; G1 stanice imaju haploidnu tj. najmanju količinu DNK, u S fazi replicira se DNK, pa količina DNK raste, a u G2 fazi stanice imaju u cijelosti repliciranu DNK i time najveću (diploidnu) količinu. Tijekom M faze stanice se podijele tako da svaka stanica kćer dobije polovicu majčine DNK (haploidnu količinu) pa se ukupnostanična količina DNK smanjuje. Po kemijskoj građi te boje su makromolekule, pa ne prolaze kroz intaktnu staničnu membranu, što im omogućuje da se osim za dokazivanju stanične proliferacije, koriste i za utvrđivanje vitaliteta stanica i apoptoze (tzv. isključno vitalno bojenje). Da bi boja mogla ući u stanicu, stanična membrana se mora predhodno učiniti permeabilnom korištenjem odgovarajućih otopina (0,1% triton X100 ili 0,1% NP 40) i onemogućiti vezanje boje na staničnu RNK njezinom enzimatskom razgradnjom RNazama. Fluorescentnim bojama za nukleinske kiseline teško se razlikuju granične faze staničnog ciklusa, npr. kasna G1 od rane S, kasna S od rane G2, kasna G2 od rane M, pa se ako je potrebna točnija analiza, kombiniraju sa drugim markerima proliferacije, najčešće istovremenim dokazivanje replikacije DNK obilježenim mononukleozidom (npr. ugradnja nukleozida je prisutna u kasnoj S fazi, za razliku od rane G2 faze). Iako se detekcija stanica može raditi u histološkom preparatu najčešće se koriste u protočnoj citometriji i FACS-u.

Metode dokazivanja stanične proliferacije

Pokazatelji jetrene regeneracije određuju se u tkivu uzetom iz jetrenog ostatka i /ili u plazmi. Stanična se proliferacija može analizirati testovima procjene staničnog vitaliteta, engl. cell viability assays, ali se najčešće se koriste specijalizirane metode namijenjene verifikaciji stanične proliferacije, engl. cell proliferation assay (npr. verifikacija mitoze, ugradnje nukleozidnih analoga u novosintetiziranu DNK ili proteina povezanih sa replikacijom DNK), odnosno registraciji staničnog ciklusa, engl. cell cycle assay (npr. mjerenje ciklina, ciklin

zavisnih kinaza i njihovih kompleksa, kao proteinskih regulatora staničnog ciklusa ili količine DNK bojama za nukleinske kiseline) (10,121). Navedenim specijaliziranim metodama (cell proliferation assay, cell cycle assay) prati se stopa rasta (umnažanja) stanica u populaciji, detekiraju stanice kćeri u staničnoj populaciji ili analizira udio stanica u različitim fazama staničnog ciklusa. Temeljni cilj dokazivanja stanične proliferacije je utvrđivanje broja stanica u diobi, bilo u histološkom preparatu ili u staničnoj kulturi, a metode verifikacije se baziraju na morfološkoj verifikaciji mitoze, određivanju faze staničnog ciklusa, dokazivanju replikacije DNK ili mjerenju proteina povezanih sa staničnom proliferacijom. Dokazivanje stanične proliferacije u histološkom preparatu moguće je svjetlosnim mikroskopom (standardni HE preparat) ili fluorescentnim mikroskopom (histološki preparat obojen fluorescentnom bojom za nukleinske kiseline). Standardni HE preparat nije precizan način verifikacije, jer registrira samo dio stanica u proliferaciji, tj. samo one koje su u nekoj od faza mitoze, za razliku od preparata obojenog fluorescentnom bojom za nukleinske kiseline koji registrira sve stanice u proliferaciji, kako one u mitozu, tako i one interfazi (G1, S ili G2). Morfološka verifikacija mitoze obično se provodi na standardnom histološkom preparatu svjetlosnim mikroskopom, brojenjem stanica sa karakterističnim mitotičkim figurama, iako se stanice mogu brojati i protočnom citometrijom. Međutim svjetlosnim mikroskopiranjem standardno obojenih stanica (HE), gotovo je nemoguće razlikovati stanice u mirovanju (funkcionalne stanice u G0 fazi) od stanica koje se nalaze u interfazi (G1, S i G2 faza), pa primjena fluorescentnih boja za nukleinske kiseline, omogućuje detekciju stanica u fazi proliferacije, dok još nisu vidljive morfološke promjene karakteristične za mitozu (121). Obje metode su vremenski zahtijevne ako se brojanje stanica vrši ručno, pa se preferira protočna citometrija suspenzije stanica dobijene iz tkiva. Dokazivanje replikacije DNK može se vršiti direktno registracijom nukleozida ugrađenih u nosivnik DNK (17,121) ili indirektno proteinima stanične jezgre koji sudjeluju u replikaciji DNK kao npr. Ki 67 i PCNA. koji nisu prisutni u jezgrama stanica koje nisu u diobi (10,16,121). Osim proteina stanične jezgre koji sudjeluju u replikaciji DNK, moguće je registrirati i druge grupe proteina povezanih sa staničnom proliferacijom kao npr. cikline, ciklin ovisne kinaze (CDK) i inhibitore ciklin ovisnih kinaza (CKI), koji detektiraju faze staničnog ciklusa, te transkripcijske aktivatore (10,121). Najčešće se istovremeno koristi kombinacija nekoliko metoda npr. određivanje faze staničnog ciklusa sa dokazivanjem replikacije DNK (10,121), (121), jer morfološka verifikacija kao i direktna verifikacija replikacije DNK registriraju samo dio proliferirajućih stanica (one koje su u M odnosno S fazi), za razliku od metoda indirektna verifikacije replikacije DNK i metoda koje određuju faze staničnog ciklusa koje detektiraju sve stanice u

proliferaciji. U nastavku teksta dan je detaljniji opis detekcije replikacije DNK metodom označenih mononukleozida, te putem jezgrenih proteina.

Detekcija replikacije DNK metodom označenih mononukleozida

Verifikacija ugradnje nukleozida (nukleotid bez fosfata), tj. spoja dušične baze i šećera u molekulu DNK je direktni indikator DNK sinteze. Najčešće se u tu svrhu koristi 5-bromo 2-dezoksiuridin (BrdU) koji je pirimidinski analog timidina, u kojem je jedna CH₃ grupa zamijenjena atomom broma. BrdU se daje živim stanicama, koje ga, ako su aktivirane na diobu, tijekom S faze staničnog ciklusa (replikacija DNK), ugrađuju kao supstituciju za timidin u novonastalu molekulu DNK. Testiranje se može provoditi in vitro na kulturama stanica apliciranjem BrdU u stanični medij ili in vivo na laboratorijskim životinjama kojima se BrdU injicira intraperitonealno ili daje peroralno kraće vrijeme prije žrtvovanja. Aplikacija BrdU traje kratko jer je replikacija DNK brz proces (S faza stanice traje par minuta), a dokazivanje inkorporiranog BrdU vrši na predhodno denaturiranoj DNK pomoću protutijela na BrdU, bilo direktnom imunohistokemijom (fluorescentno označena protutijela na BrdU), bilo indirektnom imunohistokemijom (fluorescentno označena protutijela na protutijela na BrdU). Denaturiracija DNK (razdvajanje polinukleotidnih lanaca) je potrebna jer protutijela ne mogu reagirati sa dvolančanom DNK. Ukoliko se umjesto bromodeoksiuridina (BrdU) kao supstitut koristi etinildeoksiuridin (EdU), prilikom detekcije nije potrebno koristiti protutijela, jer se EdU jednostavno obilježava bilo fluorescentnom bojom bilo biotinom i detektira kolorimetrijski ili fluorometrijski sa streptavidin-HRP.

Dokazivanje replikacije DNK jezgrenim proteinima

Verifikacija replikacije DNK proteinima stanične jezgre uključenima u polimerizaciju polinukleotidnih lanaca je indirektni indikator DNK sinteze. Ki67, PCNA i MCM-2 su proteini koji nisu prisutni u jezgrama stanica koje nisu u diobi (stanice u G₀ fazi), već se pojavljuju paralelno sa replikacijom DNK, pa iako su prisutni i u stanicama koje su u ranoj G₁ fazi, vrhunac dostižu u kasnoj G₁ i S fazi, da bi ima tijekom G₂ i M faze staničnog ciklusa prisutnost padala. Verificiraju se odgovarajućim protutijelima imunohistokemijski u histološkim preparatima, rjeđe imunocitokemijski u kulturi stanica.

Analgezija i anestezija laboratorijskih životinja

U svrhu smanjenja patnje laboratorijskih životinja, prilikom izvođenja kirurških zahvata, primjenjuju se u perioperacijskom i poslijeoperacijskom periodu različiti protokoli (122–130),

ovisno o vrsti korištene laboratorijske životinje, te tipu i svrsi istraživanja. Pri tome se koriste različite grupe lijekova: lokalni anestetici, opći inhalacioni anestetici, opći neinhalacioni anestetici odnosno sedativi (antagonist NMDA receptora, agonisti alfa 2 adrenergičkih receptora, benzodijazepini, barbiturati, opioidni analgetici, nesteroidni analgetici - antireumatici. Nesteroidni analgetici - antireumatici (karprofen, ketoprofen, meloksikam) apliciraju se parenteralno i koriste uglavnom za analgeziju u poslijeoperacijskom periodu (djeluju do 24 sata od primjene) bilo samostalno ili u kombinaciji sa opioidnim analgeticima. Opioidni analgetici (fentanil, oksimorfin, buprenorfin) koriste se za poslijeoperacijsku analgeziju (uglavnom parenteralno, jer per os zahtijevaju veće doze) ili u anesteziji u kombinaciji sa drugim anestheticima (parenteralnim ili inhalacionim), jer smanjuju potrebnu dozu anestetika. Benzodijazepini (diazepam, midazolam) se primjenjuju prilikom anestezije u kombinaciji sa drugim anestheticima i apliciraju parenteralno. Barbiturati (fentobarbiton, tiopental) ovisno o dozi djeluju kao sedativi, anestetici ili se koriste za eutanaziju životinja. Agonisti alfa 2 adrenergičkih receptora (ksilazin, deksmedetomidin) koriste za sedaciju, analgeziju, mišićnu relaksaciju ili anesteziju (u kombinaciji sa ketaminom), a kod nekih životinja i kao antiemetik. Antagonisti NMDA (N metil D aspartat) receptora (ketamin, tiletamin) spadaju u grupu disocijativnih anestetika, koji za razliku od općih anestetika ne moraju izazvati potpuni gubitak svijesti) i primjenjuju se parenteralno samostalno ili u kombinaciji sa ksilazinom ili dijazepamom. Operativni zahvati se uglavnom izvode kod životinja u općoj anesteziji (rjeđe u lokalnoj anesteziji), a po zahvatu se do trenutka žrtvovanja primjenjuje poslijeoperacijska analgezija. Opća anestezija se postiže općim inhalacionim (Izofluran) ili neinhalacionim anestheticima odnosno sedativima (ketamin, agonisti alfa 2 adrenergičkih receptora, benzodijazepini, barbiturati). Lijekovi koji se primjenjuju parenteralno (lokalni anestetici, ketamin, agonisti alfa 2 adrenergičkih receptora, benzodijazepini, barbiturati, opioidni analgetici, nesteroidni analgetici - antireumatici) apliciraju se intraperitonealnom ili supkutanom injekcijom, a rjeđe intramuskularno, jer intramuskularni način aplikacije izaziva veću bol. Prilikom primjene lijekova peroralnim putem, isti se daju u vodi za piće koju životinje uzimaju slobodno, uz napomenu da životinje u prvih 24 sata od zahvata piju manje vode (do 50% uobičajene količine) (129). Resekcijski zahvati se izvode na anesteziranim životinjama, a u većini dosadašnjih radova (105,109,111) korištena je opća inhalaciona anestezija Izofluranom (idealna jer ne remeti jetreni protok (12), ima kratku indukciju i brz oporavak nakon anestezije), najčešće u smjesi sa kisikom putem vaporizatora, što međutim zahtijeva adekvatnu opremu i provjetravanu prostoriju, jer je udisanje Izoflurana potencijalno štetno za osoblje. U nekim radovima umjesto inhalacione

rabljena je anestezija intraperitonealnom ili supkutanom injekcijom ili antagonista NMDA receptora (tiletamina (107) odnosno ketamina (119)) ili barbiturata (tiofental (110) odnosno fenobarbiton (115)), dok se lokalni anestetici (lidokain, bupivakain) koji su pogodni za manje kirurške zahvate ili incizije, ne koriste (129). Poslijeoperacijska analgezija provodi se subkutanim injekcijama opioidnog analgetika Buprenorphine (109), odnosno njegovom peroralnom primjenom (128), ili peroralnom primjenom aspirina (128), odnosno benzodiazepina (zolazepam) (107).

2. HIPOTEZA

Pentadekapeptid BPC 157 pospješuje restituciju funkcije i regeneraciju parenhima u ostatnoj jetri štakora (FLR) nakon 70% resekcije.

3. CILJEVI RADA

Opći cilj

- realizacija hipoteze
- zaustaviti daljnje oštećenje jetrenog parenhima
- regeneracija jetrenog parenhima

Specifični ciljevi

- histološka potvrda regeneracije jetrenog parenhima
- biokemijska potvrda očuvanosti funkcije jetre
- ovisnost učinka pentadekapeptida BPC 157:
 - o dozi primjene
 - o načinu primjene
 - o trajanju primjene

4. MATERIJALI I METODE

PROTOKOL ISTRAŽIVANJA

Kako je cilj istraživanja djelovanje BPC 157 na regeneraciju ostatne jetre, kao animalni model odabrana je dvotrećinska standardna parcijalna (70%) resekcija što je prihvaćeni model za istraživanje postresekcijske regeneracije jetre (108,112). Istraživanje je učinjeno u skladu sa već objavljenim radovima (10,14,24,25,43,46,100,101,105–108,15,109–118,16,119,120,126–132,17–19,21–23); nakon anesteziranja učinjana je resekcija, potom su životinje praćene do trenutka žrtvovanja, kada su uzeti uzorci krvi za laboratorijsku analizu i ekstripirana ostatna jetra za makroskopska mjerenja i analizu tkiva. Resekcija jetre izvedena je na 120 muških Wistar štakora mase 200 gr., nakon ligiranja vaskularno - bilijarne peteljke za srednji režanj i lijevi lateralni režanj, čime je postignuta dvotrećinska (70%) resekcija jetre (108,112,113), što je model za istraživanje postresekcijske regeneracije jetre (107,108,112,113,118). Ligiranje vaskularne peteljke omogućilo je da su sve resekcije izvedene bez intraoperativnog krvarenja. Postupak je izveden u općoj inhalacijskoj anesteziji izofluranom, nakon standardne kirurške pripreme operacionog polja. Sve životinje su preživjele resekciju (after surgery survival rate = 100%), a po zahvatu su grijane, promatrane i prevrtane sa strane na stranu dok nisu uspostavile stabilnu sternalnu rekumbenciju. Poslijeoperacijska analgezija je provođena svakih 12 sati peroralnim davanjem opioidnog analgetika buprenorfina u dozi od 0,1 mg (0,5 mg/kg) kao i u drugim radovima (126,128). Tertirane životinje dobivale su svakodnevno do trenutka žrtvovanja BPC 157 (Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija), intraperitonealno ili peroralno u dozama od 10 µg/kg odnosno 10 ng/kg tjelesne težine. Za intraperitonealnu aplikaciju, BPC 157 je administriran u 1 ml fiziološke otopine, dok je za peroralnu aplikaciju administriran u 12 ml vode za piće. Time su formirane četiri BPC 157 grupe: BPC 157 davan intraperitonealno u dozi od 10 µg/kg (BPC i.p. mcg.), BPC 157 davan intraperitonealno u dozi od 10 ng/kg (BPC i.p. ng.), BPC 157 davan peroralno u dozi od 10 µg/kg (BPC p.o. mcg.) i BPC 157 davan peroralno u dozi od 10 ng/kg (BPC p.o. ng.). Životinje kontrolne grupe dobivale su svakodnevno do trenutka žrtvovanja 1ml fiziološke otopine intraperitonealno, odnosno slobodno su peroralno uzimale vodu za piće. Time su formirane dvije kontrolne grupe: one koje su dobijale 1ml fiziološke otopine intraperitonealno (kontrola i.p.) i one koje su slobodno pile vodu (kontrola p.o.). Tako je formirano ukupno 6 grupa (4 BPC 157 grupe i

2 kontrolne grupe). Životinje su svakodnevno promatrane, hranu i vodu su dobivale ad libitum i sve su životinje preživjele do trenutka žrtvovanja. Žrtvovanje životinja učinjeno je u četiri intervala unutar četiri tjedna trajanja pokusa. Iz svake grupe se po protoku odgovarajućeg vremenskog perioda (4, 14, 21, 28 dana) metodom slučajnog uzorka odabralo pet životinja, koje su žrtvovane giljotinom uz predhodnu anesteziju. Kod usmrćivanja uzeti su uzorci krvi za biokemijsku analizu, koja je uključivala određivanje koncentracije ukupnog bilirubina, transaminaza (AST i ALT), i albumina, te je izmjerena ukupna tjelesna masa štakora. Po žrtvovanju je odstranjena jetra, izmjerena njena masa i uzet uzorak tkiva za patohistološku analizu. Nije provedeno žrtvovanje zdravih životinja, kako bi se dobile referentne vrijednosti mase intaktne jetre (107), albumina, transaminaza i bilirubina. Također nisu niti eksperimentalnim životinjama izmjerene vrijednosti albumina, transaminaza i bilirubina prije resekcije, niti mase odstranjenih (reseciranih) režnjeva. Tablica 1 pokazuje protokol pokusa sa brojem životinja u svakoj grupi, a tablica 2 promatrane grupe životinja (grupe uzoraka).

Tablica 1. Protokol pokusa sa brojem životinja u svakoj grupi

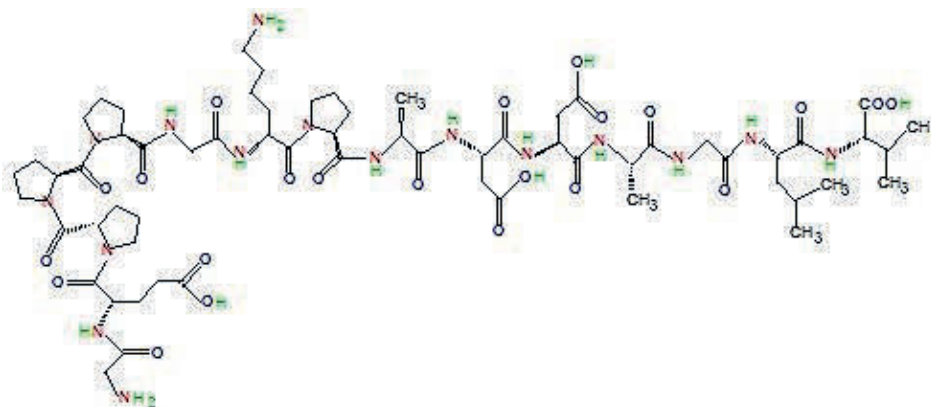
APLICIRANO SREDSTVO	DANI ŽRTVOVANJA			
	4.	14.	21.	28.
BPC 157 (10 μ g/kg) i.p.	5	5	5	5
BPC 157 (10ng/kg) i.p.	5	5	5	5
BPC 157 (10 μ g/kg) p.o.	5	5	5	5
BPC 157 (10ng/kg) p.o.	5	5	5	5
0,9%NaCl (1ml) i.p.	5	5	5	5
voda za piće p.o.	5	5	5	5

Tablica 2. Grupe životinja

24 GRUPE			
4. dan BPC i.p. mcg	14. dan BPC i.p. mcg	21. dan BPC i.p. mcg	28. dan BPC i.p. mcg
4. dan BPC i.p. ng	14. dan BPC i.p. ng	21. dan BPC i.p. ng	28. dan BPC i.p. ng
4. dan BPC p.o. mcg	14. dan BPC p.o. mcg	21. dan BPC p.o. mcg	28. dan BPC p.o. mcg
4. dan BPC p.o. ng	14. dan BPC p.o. ng	21. dan BPC p.o. ng	28. dan BPC p.o. ng
4. dan kontrola i.p.	14. dan kontrola i.p.	21. dan kontrola i.p.	28. dan kontrola i.p.
4. dan kontrola p.o.	14. dan kontrola p.o.	21. dan kontrola p.o.	28. dan kontrola p.o.

PENTADEKAPEPTID BPC 157

U istraživanju je korištena stabilna forma (postojana na sobnoj temperaturi) BPC 157, proizvođača Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija, koja dolazi pakirana kao bijeli amorfni prašak. BPC 157 ($C_{62}H_{98}N_{16}O_{22}$) je polipeptidni lanac od 15 aminokiselina molekulske mase 1418,5 (35,133), primarne strukture: Glycyl-L- α -glutamyl-L-prolyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-alanyl-L- α -aspartyl-L- α -aspartyl-L-alanyl-glycyl-L-leucyl-L-valine (133). Slika 7 prikazuje sekundarnu strukturu BPC 157 (133). Navedena sekvenca se smatra odgovorna za učinke BPC-a (Body Protecting Compound) polipeptida molekulske mase 40 000 (35,51,52) ekstrahiranog iz želučanog soka.



Slika 7. sekundarna struktura BPC 157 iz <http://www.bpc157.si/description-of-bpc-157/>

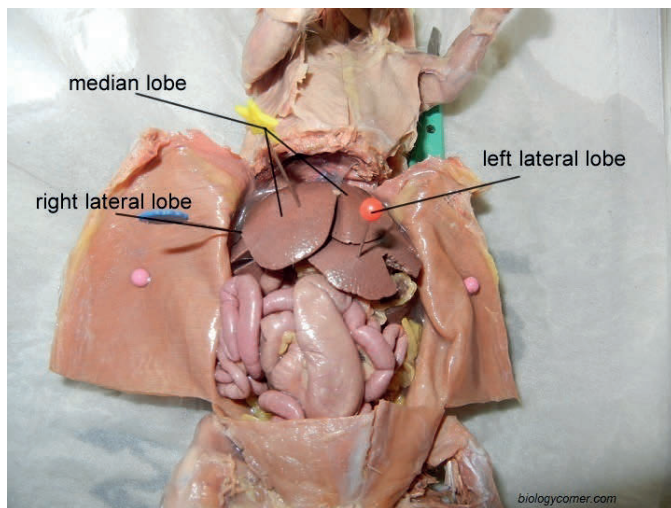
PROTOKOL 70% RESEKCIJE JETRE

Reskcija jetre je izvedena je u prema standardnom protokolu (108,112,119) za dvotrećinsku parcijalnu resekciju (70%) u općoj inhalacionoj anesteziji Izofluranom (105,109,111). Incizijom prednje trbušne stijenke u dužini 3-4 cm, po predhodno učinjenoj standardnoj pripremi operacionog polja, pristupilo se u trbušnu šupljinu i prikazali su se jetreni režnjevi. Slika 9 prikazuje položaj jetrenih režnjeva unutar trbušne šupljine štakora. Resorptivnim polifilamentnim koncem 3-0 (Vycril) zaomčile su se i podvezale vaskularno - bilijarne peteljke za srednji (ML) i lijevi lateralni režanj (LLL) i isti resecirali (vessel oriented approach i en bloc resekcija) (108–112). Liganje i resekcija nisu izvedeni preporučenom mikrokirurškom tehnikom (108–112), već klasičnim načinom uz korištenje stolne lupe sa

osvijetljenjem 22 W fluo cijevi i povećanje 3x. (slika 8). Trbušna stijenka se rekonstruirala u dva sloja resorptivnim polifilamentnim koncem 3-0 (Vycril). Tablica 3 prikazuje podjelu štakorske jetre na režnjeve, prema granjanju porto-bilijarnog stabla, sa približnim udjelom svakog režnja u volumenu (masi) jetre i podjelom na režnjiće, dok su u zagradi navedene oznake u anglosaksonskoj literaturi (10,105,106,108–114). Slika 9 grafički prikazuje u predhodno spomenutoj tablici navedenu podjelu štakorske jetre sa režnjevima i režnjićima označenima prema anglosaksonskoj literaturi, a slika 11 tehniku resekcije jetre zaomčavanjem biliovaskularne peteljke (113). Slika 12 je fotografija resekcije izvedene u eksperimentu (intaktna jetra, jetreni ostatak i resecirani režnjevi).

Tablica 3. Režnjevi štakorske jetre (u zagradama oznake iz anglosaksonske literature)

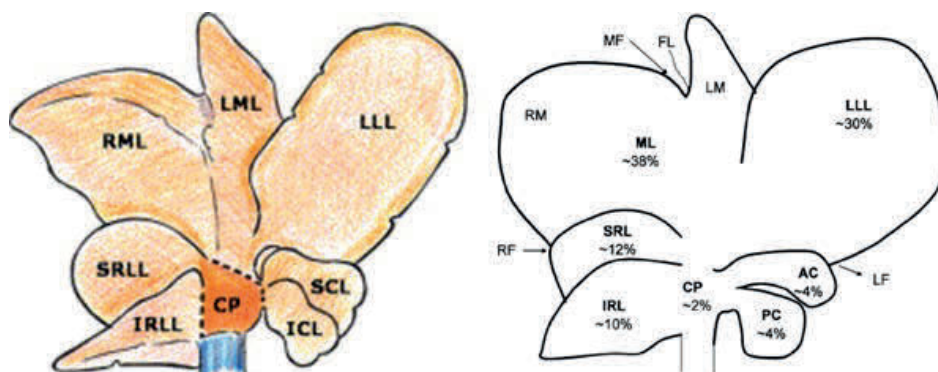
REŽANJ	REŽNJIĆI	% JETRENOG VOLUMENA
DESNILATERALNI (RLL) (RF)	desni lateralni gornji (SRL) (SRL)	~ 22 %
	desni lateralni donji (IRLL) (IRL)	
SREDNJI (ML)	srednji desni (RML) (RM)	~ 38 %
	srednji lijevi (LML) (LM)	
KAUDALNI (CL)	gornji dio (SCL) (AC)	~ 10 %
	donji dio (ICL) (PC)	
	procesus kaudatus (CP)	
LIJEVILATERALNI (LLL)	—	~ 30 %



Slika 8. lupa sa svjetlom

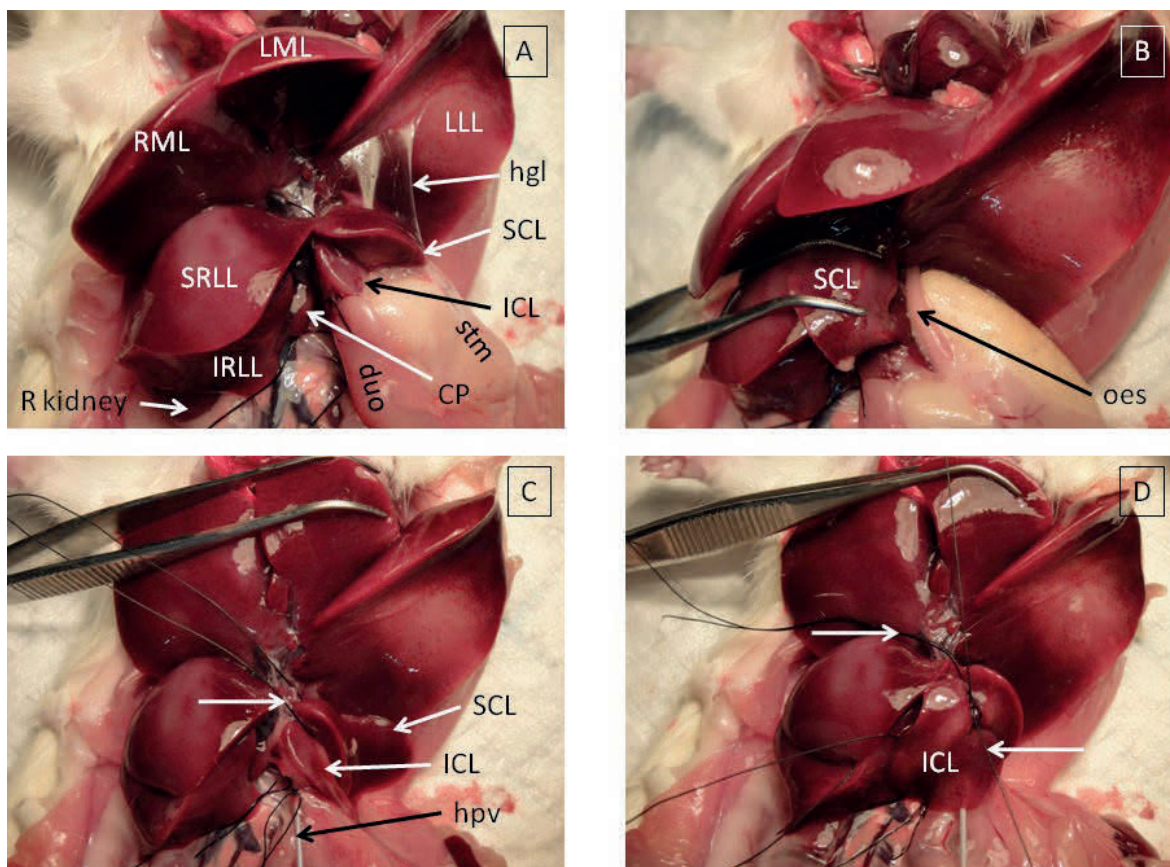
Slika 9. Položaj jetrenih režnjeva unutar abdomena štakora iz: Rat dissection step 6.

https://www.biologycorner.com/worksheets/rat_dissection06.html



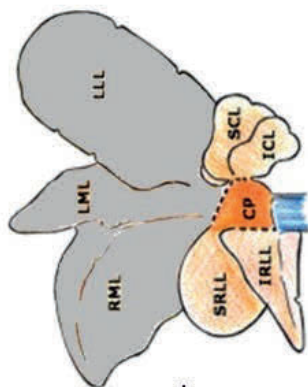
Slika 10. režnjevi štakorske jetre (visceralna strana) sa prosječnim udjelom mase iz: Martins PNA, Neuhaus P: Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. Liver Int. 2007; 27:384-392.

PC, sin. ICL stražnji kaudalni režnjić, AC, sin. SCL prednji kaudalni režnjić, LLL lijevi lateralni režanj, LM, sin. LML lijevi srednji režnjić, ML srednji režanj, RM, sin. RML desni srednji režnjić, SRL, sin. SRSLL gornji desni režnjić, IRL, sin. IRL doljni desni režnjić, CP kaudalni procesus



Slika 11. resekcija režnjeva štakorske jetre podvezivanjem biliovaskularne peteljke
 iz: Rowe A, Zhang L, Hussain A, Braet F, Ramzan I: Assessment and histological
 analysis of the IPRL technique for sequential in situ liver biopsy. *Comp Hepatol.* 2011;
 10:7.

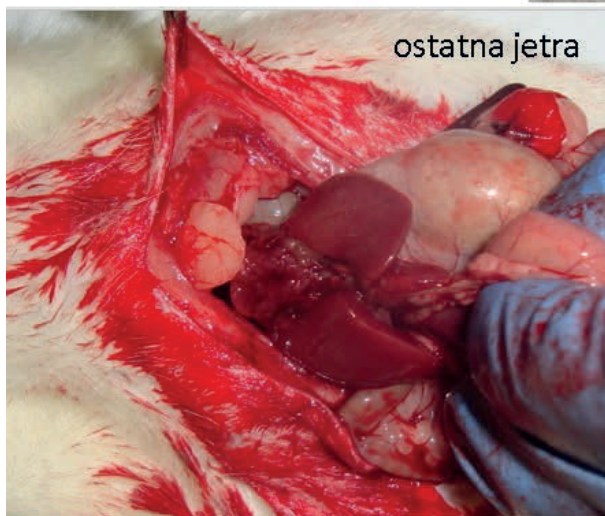
ICL stražnji kaudalni režnjić, SCL prednji kaudalni režnjić, LLL lijevi lateralni režanj,
 LML lijevi srednji režanjić, RML desni srednji režnjić, , SRLL gornji desni režnjić, IRIL
 donji desni režnjić, CP kaudalni procesus, duo duodenum, stm želudac, hgl
 hepatogastrični ligament, oes jednjak, hpv hepatalna vena



skica



prijeresekcijska jetra



ostatna jetra



resektat

Slika 12. resekcija jetre izvedena na eksperimentalnim štakorima (na skici resecirani režnjevi prikazani sivom bojom)

PROTOKOL ANALIZE MATERIJALA

Iz svake grupe se po protoku odgovarajućeg vremenskog perioda (4, 14, 21, 28 dana) metodom slučajnog uzorka odabralo pet životinja, koje su žrtvovane giljotinom uz predhodnu opću inhalacionu anesteziju Izofluranom. Prije usmrćivanja uzeti su iz donje šuplje vene uzorci krvi za biokemijsku analizu, te je izmjerena je ukupna tjelesna masa štakora. Po žrtvovanju je ekstripirana jetra, izmjerena njena masa i uzeti uzorak tkiva za patohistološku analizu.

Biokemijska analiza

Biokemijska analiza učinjena je na uzorcima krvi uzetih iz donje šuplje vene (10,107) neposredno prije usmrćivanja predhodno anesteziranih životinja. Analiza je obavljena u ovlaštenom biokemijskom laboratoriju primjenom standardnih analizatora i analitičkih kitova (Olympus AU2700, Olympus Diagnostica). Kao pokazatelji jetrenog oštećenja određivani su ukupni bilirubin i transaminaze (AST i ALT), a kao pokazatelj sintetske funkcije jetre albumin. Koncentracija ukupnog bilirubina mjerena je sa preciznošću na jednu decimalu u $\mu\text{mol/lit}$. Koncentracije aspartat aminotransferaze (AST) i koncentracije alanin aminotransferaze (ALT) mjerene su sa preciznošću cijelog broja u IU/lit. Koncentracija albumina mjerena je sa preciznošću na jednu decimalu u g/lit.

Makroskopska analiza

Prije usmrćivanja anesteziranih životinja izmjerena je ukupna tjelesna masa štakora, a po žrtvovanju je ekstripirana ostatna jetra, te izmjerena njena masa. Masa životinja mjerena na običnoj vazi sa preiznošću 1g, a masa ostatne jetre na preciznoj vazi Kern 440-21A sa preciznošću 0,001g (maksimalna dopuštena masa 60 g). Prilikom ekstripacije, nije niti kod jedne životinje nađena slobodna intraperitonealna tekućina, a ostatna jetra je odstranjivana u bloku zajedno sa parakavalnim dijelom (uključena donja šuplja vena) koji predstavlja neparenhimski dio jetre.

Patohistološka analiza

Uzorci tkiva ostatne jetre, ekstripirane nakon usmrćivanja anesteziranih životinja, korišteni su za patohistološku analizu, dok imunohistokemijska i biokemijska analiza tkiva (10,107,119) nije rađena. Uzorci su po uzimanju fiksirani 24 sata u puferiranom formalinu (pH 7.4) i poslani u ovlašteni patohistološki laboratorij, gdje su dehidrirani i zaliveni parafinskim voskom u blokove, te nakon rezanja, bojani hemalaun eozinom i promatrani svjetlosnim mikroskopom od strane iskusnih promatrača koji nisu upoznati s podrijetlom materijala. Za analizu pod povećanjem 200 puta, randomizacijom je odabrano pet polja, a analiza je uključivala morfometriju hepatocita i jezgri, dok ostali znakovi oštećenja i regeneracije jetre

nisu registrirani (zastojne promjene jetre, steatoza, mikrovezikularna steatoza hepatocita, parenhimalna nekroza, infiltracija upalnih stanica, eozinofilna citoplazma i piknotične jezgrice (19–21), hiperkromazija jezgri, proliferacija hepatocita, multinuklearni hepatociti). Morfometrija tj. mjerenje i izračunavanje broja i dimenzija struktura na slici (histološki preparat), učinjena je na sustavu za analizu slike, koji se sastoji se od mikroskopa, kamere visoke rezolucije, monitora i računala, pomoću programa za analizu (SFORM) i pohranu (ISSA) slika proizvođača VAMSTEC, Zagreb, Croatia. Površina hepatocita mjerena je sa preciznošću cijelog broja u μm^2 , a promjer jezgre hepatocita sa preciznošću na jednu decimalu u μm .

PROTOKOL ANALIZE PRIKUPLJENIH PODATAKA

Makroskopska mjerenja i laboratorijski rezultati pohranjivani su u MS Access bazu podataka putem odgovarajućeg formulara. Slika 13 prikazuje formular za unos podataka.

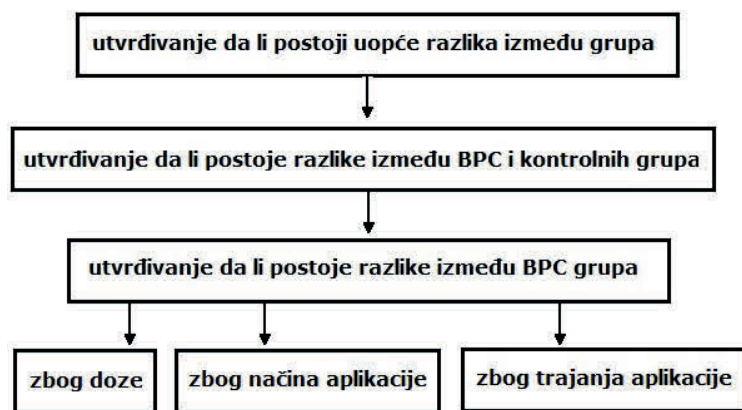
Histopatološki podaci spremeni su u MS Excel datoteku. Svi podaci su prije obrade preformatirani prema zahtjevu statističara.

ID	Grupa	Aplikacija	Dan	Masa jetre	Masa životinje	AST	ALT	Bilirubin	Albumini
1	(New)	i.p.	1						
	mcgBPC	p.o.	4						
	ngBPC		7						
	kont		14						
			21						
			28						

Slika 13. formular za unos podataka u MS Acces bazi podataka

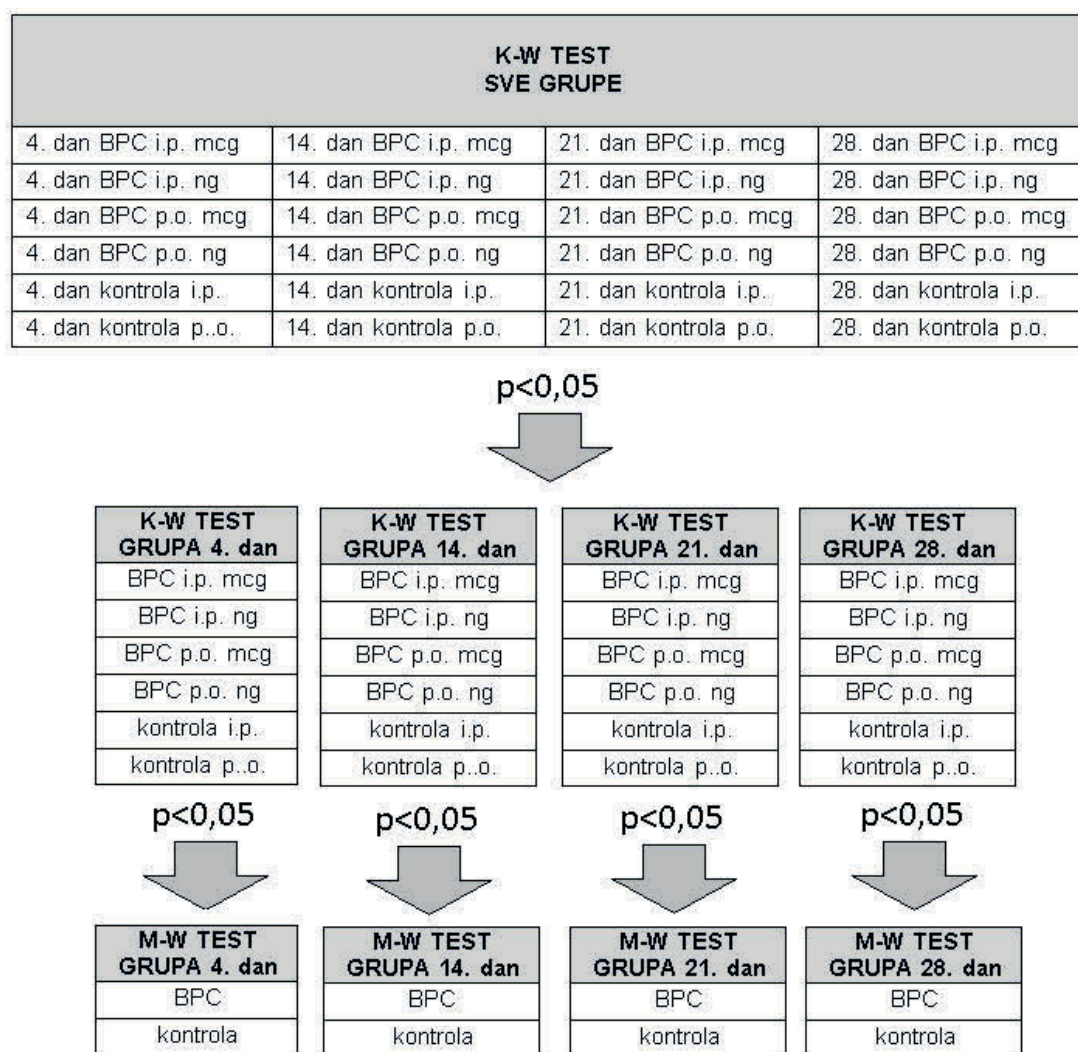
Originalno izmjerene vrijednosti su cijeli brojevi, osim vrijednosti bilirubina, promjera jezgre hepatocita i albumina (jedna decimala), te mase ostatne jetre i odnosa mase ostatne jetre prema ukupnoj masi štakora (tri decimale). Rezultati statističke obrade prikazani su jednakom preciznošću kao i izmjerene vrijednosti, osim kvartila koje su zaokruživane na dvije odnosno tri decimale (masa ostatne jetre i odnos mase jetre prema ukupnoj masi štakora). Za prikaz rezultata promatranih varijabli: AST, ALT, bilirubin, masa jetre i masa štakora, promjer jezgre hepatocita (PJH), omjer mase jetre prema masi tijela (OJT) korištene su tablice i grafikoni. Prikazani su rezultati za 24 grupe, formirane prema danu žrtvovanja: 4., 14., 21.,

28., vrsti i količini apliciranog sredstva: 0,9% NaCl (kontrola), µg BPC (BPC mcg), ng BPC (BPC ng) i načinu aplikacije: intraperitonealno (i.p.) i per os (p.o) kao što je već prikazano u tablici 2. U statističkim talicama su prikazane mjere centralne tendencije i raspršenja, te broj uzoraka prema ispitivanim grupama. Kao mjera centralne tendencije korišten je medijan (C), a kao mjera raspršenja raspon sa navođenjem najmanje i najveće vrijednosti, te prva (Q1) i treća (Q3) kvartila. Isti pokazatelji prikazani su i grafički pomoću box-plot dijagrama. Sakupljeni podaci su statistički obrađeni primjenom jednofaktorske analize uz navođenje null hipoteze (H0) i alternativne hipoteze (H1). Radi veličine uzoraka (24 grupe svaka sa po 5 štakora) podaci su analizirani neparametrijskim testovima za nezavisne uzorke. S obzirom na ciljeve istraživanja, za svaku izmjerenu varijablu, prvo se analiziralo da li ima razlike između štakora kontrolnih i BPC grupa. To je učinjeno tako da je prvo je provjereno da li uopće postoji razlika između svih grupa, a potom između svih grupa žrtvovanih isti dan. Ukoliko je postojala statistički značajna razlika između svih grupa žrtvovanih isti dan provjerilo se da li postoji razlika između kontrolnih i BPC grupa štakora žrtvovanih isti dan. Potom je za svaku izmjerenu varijablu analizirano da li postoji razlika između BPC grupa s obzirom na trajanje, dozu i način aplikacije. Prvo je provjereno da li postoji razlika između svih BPC grupa, a zatim između BPC grupa s obzirom na dan žrtvovanja. Ukoliko prilikom testiranja nije utvrđena statistički značajna razlika između različitih BPC grupa nije provedena daljnja analiza, dok je u suprotnom slučaju provjereno da li postoji razlika između BPC grupa s obzirom na trajanje aplikacije, a zatim je još provjerno da li postoji statistički značajna razlika između BPC grupa žrtvovanih isti dan. Ako je postojala razlika između BPC grupa štakora žrtvovanih isti dan, provjerilo se da li postoji razlika s obzirom na dozu i način aplikacije BPC. Slika 14 prikazuje opisani algoritam analize.



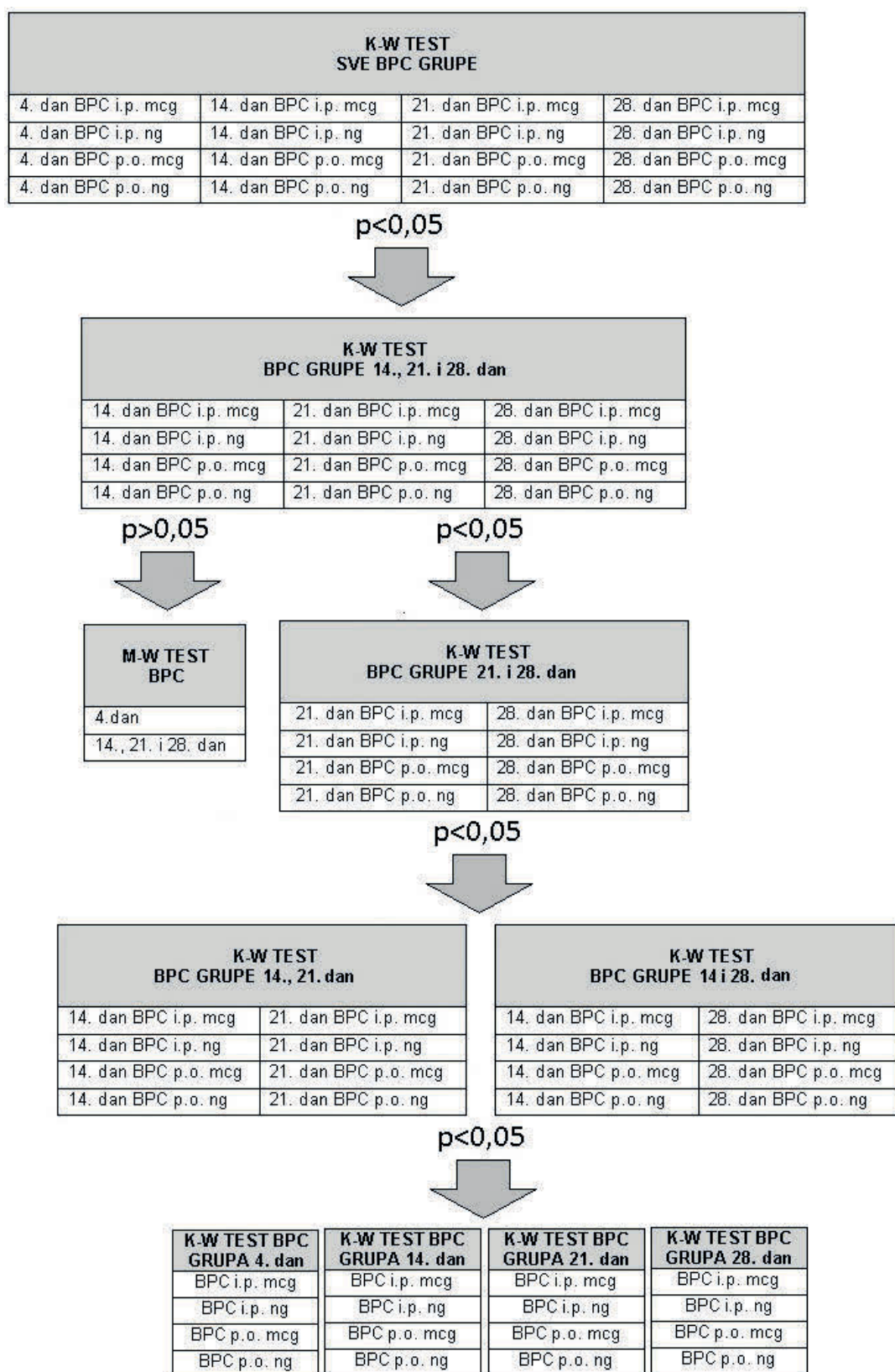
Slika 14. Algoritam ispitivanja dobijenih rezultata istraživanja

Statistička provjera da li postoji razlika između kontrolnih i BPC grupa prvo je provedena na svim uzorcima podjeljenima u 24 grupe Kruskal - Wallis H testom. Primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Ukoliko je testiranjem odbačena null hipoteza, statistički se provjeravalo postoji li razlika između grupa žrtvovanih isti dan; isti uzorci podijeljni su prema trenutku žrtvovanja u četiri grupe uzoraka: 4., 14., 21. i 28. dan. Unutar svake od četiri takve grupe, uzorci su podijeljni u šest grupa svaka sa po 5 štakora, na osnovi primjenjenog sredstva (BPC ili kontrola) i načina aplikacije (i.p. ili p.o.), te je provedena analiza Kruskal - Wallis H testom. Primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Ukoliko je testiranjem odbačena null hipoteza, provedena je dalje unutar iste grupe uzoraka post hoc analiza. Uzorci su podijeljni u dvije grupe prema vrsti primjenjenog sredstva (BPC ili kontrola) bez obzira na dozu BPC i način aplikacije (i.p. ili p.o.) i analiza je obavljena Mann - Whitney U testom. Primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Slika 15 prikazuje algoritam statističke analize prikupljenih podataka.



Slika 15. shema algoritma statističke analize (BPC i kontrolne grupe)

Statistička provjera postoji li razlika između BPC grupa prvo je provedena na svim BPC uzorcima Kruskal - Wallis H testom. Primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Ukoliko je testiranjem odbačena null hipoteza testiranje se nastavljalo dalje Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 14., 21. i 28. dan (izostavljeni štakori BPC grupe žrtvovani 4. dan). Primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Ukoliko je prihvaćena null hipoteza analiza se završavala Mann - Whitney U testom sa primijenjenom razinom značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno između štakora BPC grupa koji su žrtvovani 14., 21., 28. dan s jedne strane i štakora BPC grupa žrtvovanih 4. dan sa druge strane. Ukoliko je pak Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 14., 21. i 28. dan odbačena null hipoteza analiza se nastavljala dalje Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 21. i 28. dan (izostavljeni štakori BPC grupe žrtvovani 4. i 14. dan). Primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Ukoliko je Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 21. i 28. dan prihvaćena null hipoteza analiza se nastavljala dalje Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 14. i 21. dan (izostavljeni štakori BPC grupe žrtvovani 4. i 28. dan), a je ako je odbačena null hipoteza nastavljalo se dalje Kruskal - Wallis H testom još i na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 14. i 28. dan (izostavljeni štakori BPC grupe žrtvovani 4. i 21. dan), te ukoliko je prvotnim testiranjem dokazana statistički značajna razlika između kontrolnih i BPC grupa žrtvovanih 4. dan i Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani 4. i 21. dan (izostavljeni štakori BPC grupe žrtvovani 14. i 28. dan). U tim testiranjima primijenjena je razina značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Ukoliko je navedenim testiranjima odbačena null hipoteza analiza se nastavljala dalje Kruskal - Wallis H testom na BPC grupama štakora koji su žrtvovani isti dan (4., 14., 21. i 28. dan) bez obzira na način aplikacije (i.p. ili p.o.) i dozu BPC-a sa primijenjenom razinom značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno, s tim da je testiranje BPC grupa žrtvovanih 4. dana provedeno samo ako je prvotnim testiranjem dokazana statistički značajna razlika između kontrolnih i BPC grupa štakora žrtvovanih taj dan. Testiranje razlike u vrijednostima između BPC grupa štakora prema načinu aplikacije BPC-a, prema dozi BPC-a, te štakora koji su primali BPC u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$ intraperitonealno prema ostalim grupama štakora (10 mcg/kg peroralno, 10 ng/kg peroralno i 10 ng/kg intraperitonealno) provedeno je samo kod ukupne tjelesne mase i to samo za životinje žrtvovane 4. dan Mann - Whitney testom sa primijenjenom razinom značajnosti $p < 0,05$ dvosmjerno. Slika 16 prikazuje algoritam statističke analize za BPC grupe.



Slika 16. shema algoritma statističke analize za BPC grupe

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Tablica 4 prikazuje sve prikupljene podatke (raw data). Rezultati mjerenja predstavljani su u cijelim brojevima, osim vrijednosti bilirubina, promjera jezgre hepatocita i albumina (jedna decimala), te mase ostatne jetre i odnosa mase ostatne jetre prema ukupnoj masi štakora (tri decimala).

Obradeni rezultati istraživanja prikazani su i tabularno i grafički shodno preporukama NIST-a (National Institute of Standards and Technology) i IASE (The International Association for Statistical Education) za prikaz statističkih podataka. Grafički kao bi se prikazali trendovi u promjenama vrijednosti, koje je teško uočiti iz tablica, a tabularno kako bi se prikazale točne vrijednosti koje je teško pročitati sa grafikona. Podaci u tablicama prikazuju za svaku varijablu mjeru centralne tendencije i raspršenja, te broj uzoraka u ispitivanim grupama, kojih je ukupno bilo 24. Kao mjera centralne tendencije korišten je medijan (C), a kao mjera raspršenja raspon (sa navođenjem najmanje i najveće vrijednosti), te prva (Q1) i treća (Q3) kvartila. Isti pokazatelji prikazani su i grafički pomoću box-plot dijagrama.

Vrijednosti medijana i raspona izražene su cijelim brojevima, osim za vrijednosti bilirubina, promjera jezgre hepatocita i albumina (jedna decimala), te mase ostatne jetre i odnosa mase jetre prema ukupnoj masi štakora (tri decimala). Vrijednosti prve i treće kvartile su izražene na dvije decimala, a za masu ostatne jetre i odnosa mase jetre prema ukupnoj masi štakora na tri decimala, sa zaokruživanjem.

Statistička obrada je provedena jednofaktorskom analizom. Podaci su obrađeni neparametrijskim testovima za nezavisne uzorke (Kruskal – Wallis H test i Mann – Whitney U test), sa navođenjem vrijednosti statistike (H odnosno U), stupnjeva slobode (df) i značajnosti (p), kako je objašnjeno u poglavlju MATERIJALI I METODE: obrada prikupljenih podataka.

Tablica 4. prikaz svih rezultata (raw data)

Nr	GRUPA	ukup. masa (gr.)	masa jetre (gr.)	omjer masa	bilirubin (μ mol /lit)	AST (IU /lit)	ALT (IU/lit)	promjer jezgre (μ m)	albumin (g/lit)	povšina hepatocita (μ m ²)
1	4.dan BPC i.p.mcɡ	226	5,031	0,022	8,6	118	83	5,5	25,2	284
2	4.dan BPC i.p.mcɡ	227	3,654	0,016	6,8	115	86	8,8	24,4	300
3	4.dan BPC i.p.mcɡ	212	5,046	0,024	9,4	114	88	7,8	25,0	268
4	4.dan BPC i.p.mcɡ	233	3,500	0,015	5,7	111	87	7,3	25,0	278
5	4.dan BPC i.p.mcɡ	223	5,629	0,025	10,2	121	85	8,3	24,5	276
6	4.dan BPC i.p.ng	189	3,597	0,019	7,7	118	79	7,3	23,4	294
7	4.dan BPC i.p.ng	216	4,991	0,023	9,1	110	81	7,9	24,7	298
8	4.dan BPC i.p.ng	184	3,698	0,020	7,1	121	76	7,0	25,0	307
9	4.dan BPC i.p.ng	189	4,505	0,024	7,7	115	84	6,9	23,7	290
10	4.dan BPC i.p.ng	206	4,119	0,020	6,4	129	89	7,2	23,3	286
11	4.dan BPC p.o.mcɡ	196	4,215	0,022	5,3	112	90	8,0	23,5	301
12	4.dan BPC p.o.mcɡ	199	3,417	0,017	2,4	126	83	8,5	23,2	293
13	4.dan BPC p.o.mcɡ	201	3,596	0,018	5,3	106	71	7,4	23,0	291
14	4.dan BPC p.o.mcɡ	202	3,412	0,017	5,3	122	69	7,9	22,9	295
15	4.dan BPC p.o.mcɡ	174	4,068	0,023	7,9	104	87	7,4	22,3	297
16	4.dan BPC p.o.ng	197	2,679	0,014	5,8	116	75	8,8	23,6	284
17	4.dan BPC p.o.ng	225	6,179	0,027	4,7	127	85	7,7	24,8	300
18	4.dan BPC p.o.ng	197	4,030	0,020	9,1	124	75	8,1	24,2	309
19	4.dan BPC p.o.ng	206	3,426	0,017	7,4	128	73	6,7	23,9	269
20	4.dan BPC p.o.ng	188	5,073	0,027	7,3	133	77	8,9	24,7	299
21	4.dan kontrola i.p.	204	3,895	0,019	11,0	152	70	8,5	19,9	249
22	4.dan kontrola i.p.	191	2,698	0,014	6,3	142	104	8,2	20,0	242
23	4.dan kontrola i.p.	167	3,138	0,019	7,0	136	76	7,2	19,6	249
24	4.dan kontrola i.p.	189	5,118	0,027	4,9	141	102	8,3	18,6	235
25	4.dan kontrola i.p.	196	5,532	0,028	10,3	157	92	7,5	19,3	231
26	4.dan kontrola p.o.	175	3,820	0,022	8,7	152	78	7,3	19,2	237
27	4.dan kontrola p.o.	193	2,526	0,013	6,9	153	92	6,8	19,2	234
28	4.dan kontrola p.o.	192	4,248	0,022	7,9	136	94	8,2	18,9	215
29	4.dan kontrola p.o.	181	3,557	0,020	12,9	131	90	8,9	20,2	228
30	4.dan kontrola p.o.	198	4,289	0,022	9,1	122	92	8,8	18,6	243
31	14.dan BPC i.p.mcɡ	232	8,892	0,038	2,6	30	35	6,7	30,2	244
32	14.dan BPC i.p.mcɡ	236	9,676	0,041	2,7	48	29	5,5	30,4	222
33	14.dan BPC i.p.mcɡ	242	8,113	0,034	1,9	32	28	7,3	30,1	204
34	14.dan BPC i.p.mcɡ	239	8,607	0,036	3,1	31	34	6,8	29,7	219
35	14.dan BPC i.p.mcɡ	236	6,544	0,028	3,3	50	32	6,3	30,2	210
36	14.dan BPC i.p.ng	234	6,861	0,029	1,9	42	33	7,2	30,8	224
37	14.dan BPC i.p.ng	238	7,425	0,031	3,9	56	35	6,9	30,5	204
38	14.dan BPC i.p.ng	251	9,108	0,036	2,9	49	34	6,3	30,1	229
39	14.dan BPC i.p.ng	226	6,515	0,029	1,5	36	36	5,8	30,5	210
40	14.dan BPC i.p.ng	236	8,410	0,036	2,5	49	31	6,0	30,5	210

Tablica 4. prikaz svih rezultata (raw data) – nastavak 1

Nr	GRUPA	ukup. masa (gr.)	masa jetre (gr.)	omjer masa	bilirubin (μ mol /lit)	AST (IU /lit)	ALT (IU/lit)	promjer jezgre (μ m)	albumin (g/lit)	površina hepatocita (μ m ²)
41	14.dan BPC p.o.mcgr	232	8,073	0,035	3,6	46	34	7,0	28,8	226
42	14.dan BPC p.o.mcgr	259	9,033	0,035	3,0	36	26	7,6	28,5	192
43	14.dan BPC p.o.mcgr	259	9,049	0,035	2,8	39	32	6,9	27,9	228
44	14.dan BPC p.o.mcgr	260	10,410	0,040	1,3	49	37	6,3	29,5	220
45	14.dan BPC p.o.mcgr	224	7,001	0,031	1,4	32	40	6,8	30,1	217
46	14.dan BPC p.o.ng	234	9,636	0,041	4,0	26	31	6,7	31,3	224
47	14.dan BPC p.o.ng	245	9,016	0,037	2,4	36	35	7,1	31,6	218
48	14.dan BPC p.o.ng	240	10,059	0,042	1,8	48	33	8,3	30,6	220
49	14.dan BPC p.o.ng	243	10,075	0,041	2,8	42	32	5,9	30,7	227
50	14.dan BPC p.o.ng	234	8,365	0,036	3,7	40	28	4,9	30,6	220
51	14.dan kontrola i.p.	192	4,216	0,022	17,9	152	44	7,9	22,8	187
52	14.dan kontrola i.p.	216	3,208	0,015	19,3	128	47	6,7	23,3	189
53	14.dan kontrola i.p.	215	5,872	0,027	18,1	147	44	6,8	22,9	183
54	14.dan kontrola i.p.	187	2,970	0,016	17,9	132	60	5,2	23,2	179
55	14.dan kontrola i.p.	212	5,001	0,024	18,0	125	56	7,3	23,6	174
56	14.dan kontrola p.o.	199	5,098	0,026	16,5	144	59	6,9	23,5	189
57	14.dan kontrola p.o.	203	2,702	0,013	17,5	159	59	7,6	23,0	183
58	14.dan kontrola p.o.	179	2,656	0,015	17,3	158	53	6,8	22,6	189
59	14.dan kontrola p.o.	230	5,417	0,024	18,9	157	64	7,2	23,2	182
60	14.dan kontrola p.o.	185	3,628	0,020	19,3	145	62	6,1	23,0	184
61	21.dan BPC i.p.mcgr	262	11,779	0,045	3,5	42	31	8,8	30,9	266
62	21.dan BPC i.p.mcgr	242	11,028	0,046	1,5	41	30	7,2	31,3	250
63	21.dan BPC i.p.mcgr	267	12,796	0,048	2,2	58	39	7,8	33,0	256
64	21.dan BPC i.p.mcgr	274	12,799	0,047	1,9	28	28	8,2	31,6	265
65	21.dan BPC i.p.mcgr	252	12,307	0,049	2,3	35	34	6,6	33,0	250
66	21.dan BPC i.p.ng	228	9,890	0,043	1,8	61	28	7,7	33,0	206
67	21.dan BPC i.p.ng	261	8,295	0,032	1,7	52	30	6,5	33,0	231
68	21.dan BPC i.p.ng	240	11,142	0,047	3,1	46	36	7,7	32,6	254
69	21.dan BPC i.p.ng	273	10,116	0,037	2,6	57	25	7,3	33,1	244
70	21.dan BPC i.p.ng	265	11,611	0,044	2,7	44	30	6,7	32,9	246
71	21.dan BPC p.o.mcgr	274	11,368	0,042	1,3	39	28	8,2	30,5	250
72	21.dan BPC p.o.mcgr	260	11,797	0,045	2,6	35	24	7,0	31,0	242
73	21.dan BPC p.o.mcgr	255	10,988	0,043	3,1	31	36	5,5	31,1	258
74	21.dan BPC p.o.mcgr	257	13,185	0,051	2,7	38	34	8,3	30,8	262
75	21.dan BPC p.o.mcgr	247	10,537	0,043	1,9	48	49	7,4	30,7	256
76	21.dan BPC p.o.ng	272	12,089	0,044	3,4	59	33	8,1	32,1	273
77	21.dan BPC p.o.ng	270	11,763	0,044	1,7	56	29	6,6	33,3	254
78	21.dan BPC p.o.ng	271	11,423	0,042	1,9	35	36	7,6	33,2	236
79	21.dan BPC p.o.ng	287	13,029	0,045	1,5	45	31	8,4	34,4	256
80	21.dan BPC p.o.ng	255	10,551	0,041	2,7	62	25	7,0	33,0	268

Tablica 4. prikaz svih rezultata (raw data) – nastavak 2

Nr	GRUPA	ukup. masa (gr.)	masa jetre (gr.)	omjer masa	bilirubin (μ mol /lit)	AST (IU /lit)	ALT (IU/lit)	promjer jezgre (μ m)	albumin (g/lit)	površina hepatocita (μ m ²)
81	21.dan kontrola i.p.	231	4,916	0,021	24,5	166	71	7,1	22,7	221
82	21.dan kontrola i.p.	211	6,266	0,030	25,5	142	51	8,0	22,4	244
83	21.dan kontrola i.p.	211	5,463	0,026	23,6	138	66	6,4	22,1	223
84	21.dan kontrola i.p.	214	5,433	0,025	21,8	139	52	7,3	23,3	248
85	21.dan kontrola i.p.	209	5,412	0,026	25,1	148	59	7,3	22,9	243
86	21.dan kontrola p.o.	211	5,064	0,024	25,4	166	64	8,1	23,5	229
87	21.dan kontrola p.o.	219	5,227	0,024	24,0	174	47	6,7	23,6	235
88	21.dan kontrola p.o.	213	4,663	0,022	30,6	145	47	8,1	22,1	225
89	21.dan kontrola p.o.	233	5,570	0,024	30,5	148	54	8,0	22,8	264
90	21.dan kontrola p.o.	221	5,858	0,027	26,8	163	66	8,6	21,2	236
91	28.dan BPC i.p.mcrg	261	13,836	0,053	1,4	24	31	6,5	35,0	216
92	28.dan BPC i.p.mcrg	277	13,688	0,049	1,9	48	31	4,7	35,3	219
93	28.dan BPC i.p.mcrg	272	15,396	0,057	3,4	56	44	6,8	33,7	229
94	28.dan BPC i.p.mcrg	278	15,560	0,056	2,1	26	22	6,8	35,2	220
95	28.dan BPC i.p.mcrg	279	13,611	0,049	2,5	53	44	8,1	35,3	220
96	28.dan BPC i.p.ng	259	13,421	0,052	3,4	37	20	7,0	34,2	236
97	28.dan BPC i.p.ng	265	14,355	0,054	2,7	45	34	7,0	34,3	202
98	28.dan BPC i.p.ng	249	13,579	0,055	1,0	47	37	6,8	33,8	247
99	28.dan BPC i.p.ng	271	14,352	0,053	2,6	50	28	6,2	34,1	247
100	28.dan BPC i.p.ng	281	14,585	0,052	2,3	51	39	7,1	34,0	209
101	28.dan BPC p.o.mcrg	248	13,236	0,053	2,2	49	29	9,3	36,6	212
102	28.dan BPC p.o.mcrg	271	13,452	0,050	3,5	35	33	7,0	36,5	214
103	28.dan BPC p.o.mcrg	265	15,017	0,057	3,2	66	42	6,8	37,8	227
104	28.dan BPC p.o.mcrg	251	13,497	0,054	2,4	36	47	4,7	36,6	227
105	28.dan BPC p.o.mcrg	264	12,062	0,046	2,5	40	42	6,8	35,9	213
106	28.dan BPC p.o.ng	250	14,262	0,057	2,3	54	45	5,6	34,2	216
107	28.dan BPC p.o.ng	253	14,386	0,057	2,7	41	41	8,0	36,0	226
108	28.dan BPC p.o.ng	245	14,524	0,059	1,5	32	33	5,8	36,7	222
109	28.dan BPC p.o.ng	256	13,244	0,052	2,0	37	27	6,7	35,1	220
110	28.dan BPC p.o.ng	265	13,844	0,052	1,8	41	42	6,3	35,2	218
111	28.dan kontrola i.p.	203	4,760	0,023	34,8	153	49	7,2	27,2	202
112	28.dan kontrola i.p.	216	9,257	0,043	31,6	164	52	7,2	28,4	207
113	28.dan kontrola i.p.	204	7,087	0,035	32,3	147	64	7,8	28,0	211
114	28.dan kontrola i.p.	226	5,079	0,022	31,4	170	36	6,8	27,7	189
115	28.dan kontrola i.p.	211	7,040	0,033	32,3	171	57	7,0	28,3	211
116	28.dan kontrola p.o.	209	7,140	0,034	34,8	170	61	7,4	28,3	211
117	28.dan kontrola p.o.	208	5,073	0,024	30,5	150	56	7,1	28,3	218
118	28.dan kontrola p.o.	204	6,432	0,031	32,8	160	56	6,6	28,1	213
119	28.dan kontrola p.o.	215	8,406	0,039	31,3	146	65	7,3	28,2	216
120	28.dan kontrola p.o.	201	6,416	0,032	31,6	146	48	7,4	28,2	224

ALBUMIN ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti koncentracije albumina (g/lit) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

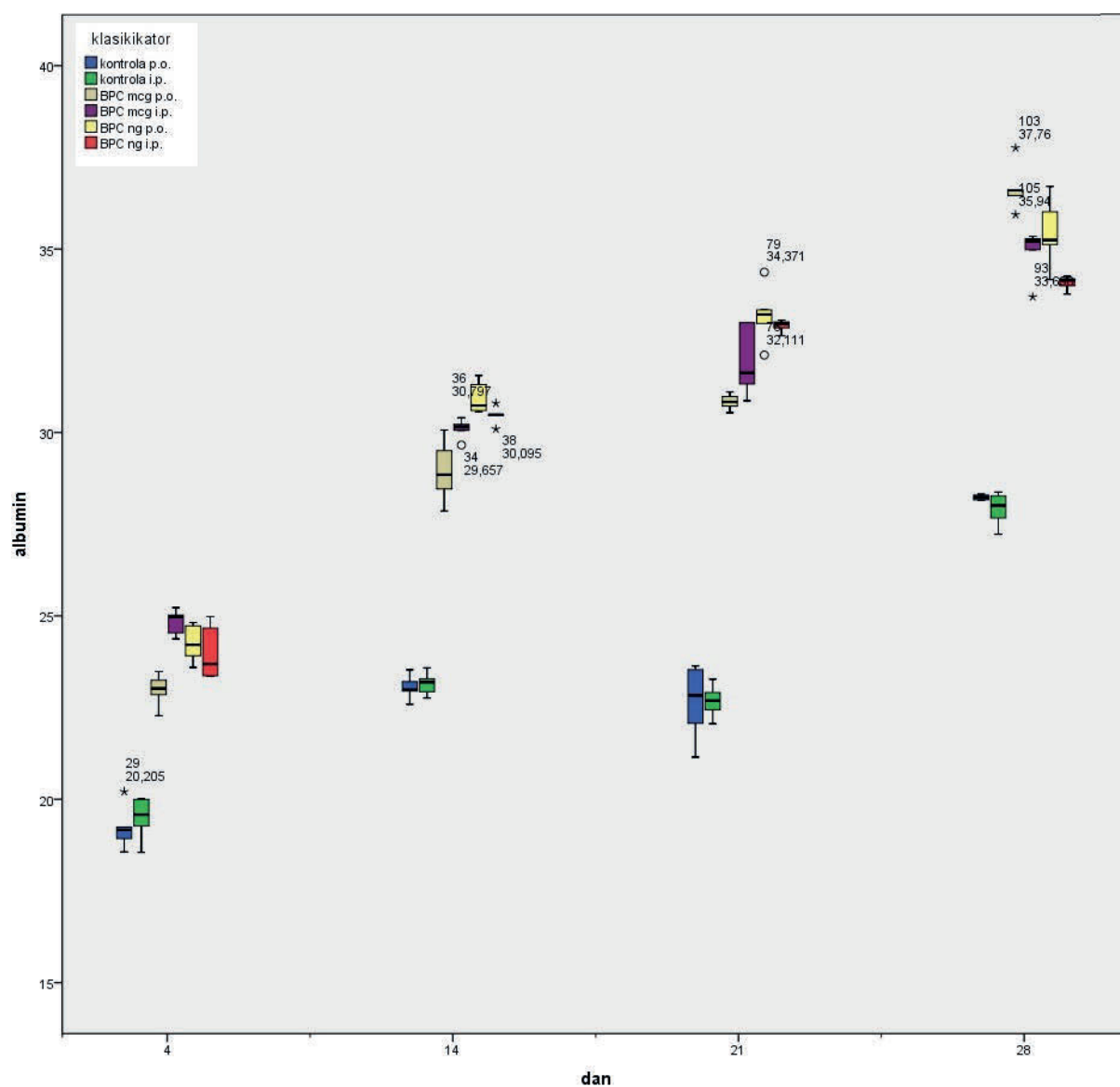
- štakori žrtvovani 14. dana imaju u prosjeku veće vrijednosti albumina u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana imaju u prosjeku veće vrijednosti albumina u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan, s tim da štakori svih BPC grupa imaju u prosjeku veću vrijednost albumina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, dok kod štakora kontrolnih grupa dolazi do pada vrijednost albumina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan
- štakori žrtvovani 28. dan imaju u prosjeku veće vrijednosti albumina u odnosu na štakore žrtvovane 4., 14. i 21. dan

Štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku više vrijednosti albumina nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 5 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) za vrijednosti koncentracija albumina (g/lit). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 17 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 5. statistika koncentracije albumina (g/lit) prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (g/lit)	Q1 (g/lit)	Q3 (g/lit)	raspon (min-max) (g/lit)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	25,0	24,45	25,10	24,4	25,2
4. dan BPC i.p. ng	5	23,7	23,35	24,85	23,3	25,0
4. dan BPC p.o. mcg	5	23,0	22,60	23,35	22,3	23,5
4. dan BPC p.o. ng	5	24,2	23,75	24,75	23,6	24,8
4. dan kontrola i.p.	5	19,6	18,95	20,00	18,6	20,0
4. dan kontrola p.o.	5	19,2	18,75	19,70	18,6	20,2
14. dan BPC i.p. mcg	5	30,2	29,90	30,30	29,7	30,4
14. dan BPC i.p. ng	5	30,5	30,30	30,65	30,1	30,8
14. dan BPC p.o. mcg	5	28,8	28,20	29,80	27,9	30,1
14. dan BPC p.o. ng	5	30,7	30,60	31,45	30,6	31,6
14. dan kontrola i.p.	5	23,2	22,85	23,45	22,8	23,6
14. dan kontrola p.o.	5	23,0	22,75	23,35	22,6	23,5
21. dan BPC i.p. mcg	5	31,6	31,10	33,00	30,9	33,0
21. dan BPC i.p. ng	5	33,0	32,75	33,05	32,6	33,1
21. dan BPC p.o. mcg	5	30,8	30,60	31,05	30,5	31,1
21. dan BPC p.o. ng	5	33,2	32,55	33,85	32,1	34,4
21. dan kontrola i.p.	5	22,7	22,25	23,10	22,1	23,3
21. dan kontrola p.o.	5	22,8	21,60	23,55	21,1	23,6
28. dan BPC i.p. mcg	5	35,2	34,35	35,30	33,7	35,3
28. dan BPC i.p. ng	5	34,1	33,90	34,25	33,8	34,3
28. dan BPC p.o. mcg	5	35,6	36,20	37,20	35,9	37,8
28. dan BPC p.o. ng	5	35,2	34,65	36,35	34,2	36,7
28. dan kontrola i.p.	5	28,0	27,45	28,35	27,2	28,4
28. dan kontrola p.o.	5	28,2	28,15	28,30	28,1	28,3



Slika 17. box plot grafikon koncentracija albumina (g/lit) prema ispitivanim grupama

Vrijednosti albumina izmjerene u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Albumin - **provjera svih ispitivanih grupa (24 grupe):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=116,62$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Albumin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=24,96$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

3. Albumin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=26,41$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. Albumin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=25,23$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. Albumin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=24,95$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 6 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija albumina svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 6. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u koncentraciji albumina (g/lit) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	116,62	23	0,000	H1
4.	30	24,96	5	0,000	H1
14.	30	26,41	5	0,000	H1
21.	30	25,23	5	0,000	H1
28.	30	24,95	5	0,000	H1

6. Albumin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 4. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. Albumin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. Albumin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

9. Albumin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=10,00$, $n_{\text{kont}}=10$, $n_{\text{BPC}}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 7 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija albumina između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 7. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji albumina (g/lit) između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	n_{kont}	n_{BPC}	p	Hipot.
4.	30	0,00	10	20	0,000	H1
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	0,00	10	20	0,000	H1
28.	30	0,00	10	20	0,000	H1

10. Albumin - provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=49,83$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

11. Albumin - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H testom ($H=8,84$ i $df = 11$) pokazao je značajnost $P = 0,636$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze.

Tablica 8 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija albumina BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 8. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u koncentraciji albumina (g/lit) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	76,89	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	8,84	11	0,636	H0

12. Albumin - provjera rezultata BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan prema grupama štakora žrtvovanih 14., 21., 28. dan (2 grupe)

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina pripadaju istoj populaciji kao i štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti albumina statistički se značajno razlikuju od štakora iz BPC tretiranih grupa žrtvovanih 14., 21. i 28. dan

Test značajnosti: Mann - Whitney U testom ($U=0,00$ $n_{BPC4}=20$, $n_{BPC14.21.28}=60$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 9 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija albumina između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan).

Tablica 9. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji albumina (g/lit) između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan)

BPC GRUPA (dani)	n	U	nBPC4.	nBPC14.21.28.	p	Hipot.
4. : 14., 21. i 28.	80	0,00	20	60	0,000	H1

ALT ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti koncentracija aspartat aminotransferaze – ALT (IU/lit) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

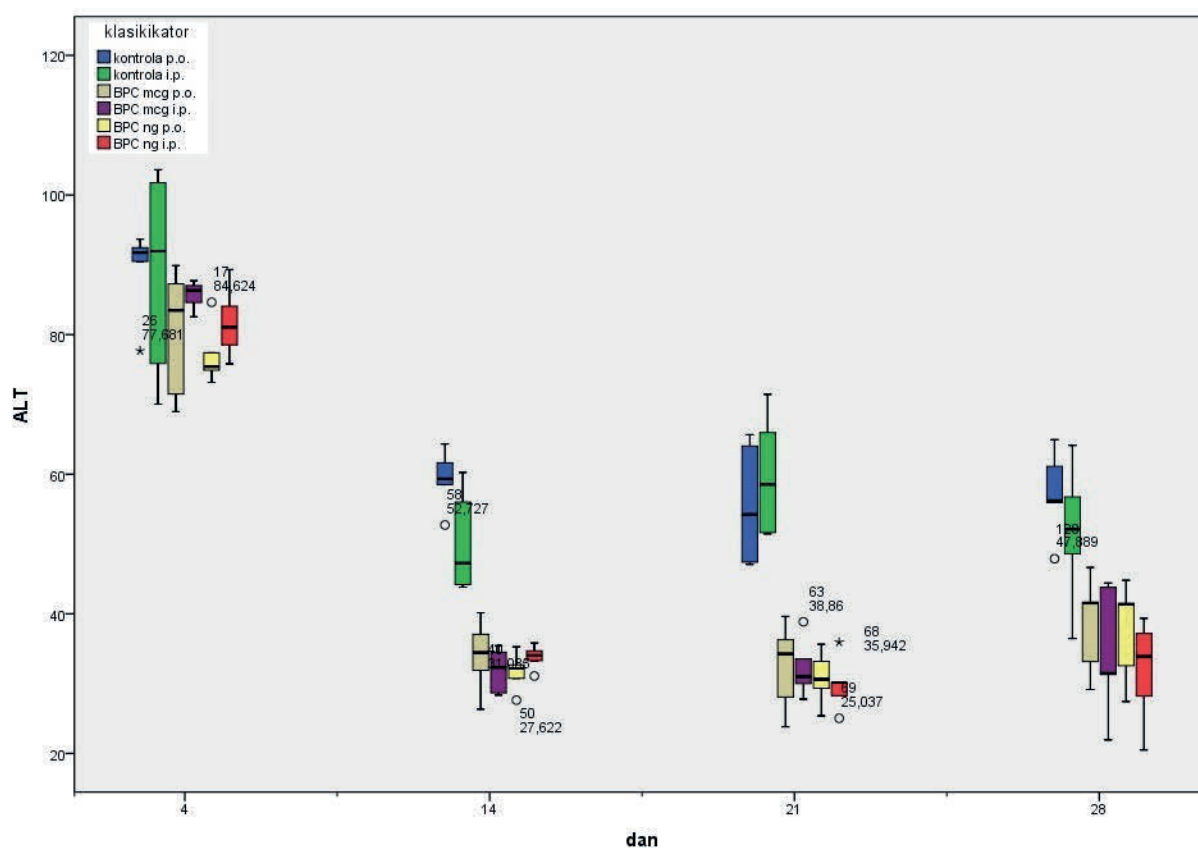
- štakori žrtvovani 14. dana imaju u prosjeku manju vrijednost ALT-a u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana imaju u prosjeku manju vrijednost ALT-a u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan, a oni koji su primali BPC, te štakori kontrolne grupe koji su pili vodu za piće, imaju u prosjeku manju vrijednost ALT-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, (ali je pad značajno manji nego sa 4. na 14. dan), dok štakori kontrolne grupe koji su dobivali F.O. intraperitonealno, imaju u prosjeku veće vrijednosti ALT-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan
- štakori žrtvovani 28. dana imaju u prosjeku manju vrijednost ALT-a u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan, ali s izuzetkom štakora kontrolne grupe koji su dobivali F.O. intraperitonealno, veću nego štakori žrtvovani 21. dan, s tim da oni koji su primali BPC peroralno neovisno o dozi ili intraperitonealno u nanogramskim dozama imaju u prosjeku veću vrijednost ALT-a i u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan

Štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku niže vrijednosti ALT-a nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 10 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) za vrijednosti koncentracija aspartat aminotransferaze - ALT (IU/lit). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 18 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 10. statistika koncentracije ALT (IU/lit) prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (IU/lit)	Q1 (IU/lit)	Q3 (IU/lit)	raspon (min-max) (IU/lit)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	86	84,00	87,50	83	88
4. dan BPC i.p. ng	5	81	77,50	86,50	76	89
4. dan BPC p.o. mcg	5	83	70,00	88,50	69	90
4. dan BPC p.o. ng	5	75	74,00	81,00	73	85
4. dan kontrola i.p.	5	92	73,00	103,00	70	104
4. dan kontrola p.o.	5	92	84,00	93,00	78	94
14. dan BPC i.p. mcg	5	32	28,50	34,50	28	35
14. dan BPC i.p. ng	5	34	32,00	35,50	31	36
14. dan BPC p.o. mcg	5	34	29,00	38,50	26	40
14. dan BPC p.o. ng	5	32	29,50	34,00	28	35
14. dan kontrola i.p.	5	47	44,00	58,00	44	60
14. dan kontrola p.o.	5	59	56,00	63,00	53	64
21. dan BPC i.p. mcg	5	31	29,00	36,50	28	39
21. dan BPC i.p. ng	5	30	26,50	33,00	25	36
21. dan BPC p.o. mcg	5	34	26,00	38,00	24	40
21. dan BPC p.o. ng	5	31	27,00	34,50	25	36
21. dan kontrola i.p.	5	59	51,50	68,50	51	71
21. dan kontrola p.o.	5	54	47,00	65,00	47	66
28. dan BPC i.p. mcg	5	31	26,50	44,00	22	44
28. dan BPC i.p. ng	5	34	24,00	38,00	20	39
28. dan BPC p.o. mcg	5	42	31,00	44,50	29	47
28. dan BPC p.o. ng	5	41	30,00	43,00	27	45
28. dan kontrola i.p.	5	52	42,50	60,50	36	64
28. dan kontrola p.o.	5	56	52,00	63,00	48	65



Slika 18. box plot grafikon koncentracija ALT (IU/lit) prema ispitivanim grupama

Vrijednosti ALT izmjerene u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. ALT - provjera svih ispitivanih grupa (24 grupe):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=102,22$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. ALT - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=8,96$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,111$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze.

3. ALT - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT -a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT -a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=20,74$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. ALT - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,95$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. ALT - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=17,16$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,004$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 11 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija ALT-a svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 11. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u koncentraciji ALT-a (IU/lit) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	102,22	23	0,000	H1
4.	30	8,96	5	0,111	H0
14.	30	20,74	5	0,001	H1
21.	30	19,95	5	0,001	H1
28.	30	17,16	5	0,004	H1

6. ALT - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. ALT - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. ALT - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=10,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 12 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija ALT-a između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 12. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji ALT-a (IU/lit) između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	n _{kont}	n _{BPC}	p	Hipot.
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	0,00	10	20	0,000	H1
28.	30	10,00	10	20	0,000	H1

9. ALT - provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=49,83$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvaćanje alternativne.

10. ALT - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H testom ($H=8,84$ i $df = 11$) pokazao je značajnost $P = 0,636$ što zahtijeva prihvaćanje nul hipoteze.

Tablica 13 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija ALT-a BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 13. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u koncentraciji ALT-a (IU/lit) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	49,83	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	8,84	11	0,636	H0

11. ALT - provjera rezultata BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan prema grupama štakora žrtvovanih 14., 21., 28. dan (2 grupe)

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a pripadaju istoj populaciji kao i štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti ALT-a statistički se značajno razlikuju od štakora iz BPC tretiranih grupa žrtvovanih 14., 21. i 28. dan

Test značajnosti: Mann - Whitney U testom ($U=0,00$, $n_{BPC4}=20$, $n_{BPC14.21.28}=60$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 14 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann – Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija ALT-a između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan).

Tablica 14. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji ALT-a (IU/lit) između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan)

BPC GRUPA (dani)	n	U	n_{BPC4}	$n_{BPC14.21.28}$	p	Hipot.
4. : 14., 21. i 28.	80	0,00	20	60	0,000	H1

AST ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti koncentracija aspartat aminotransferaze – AST (IU/lit) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

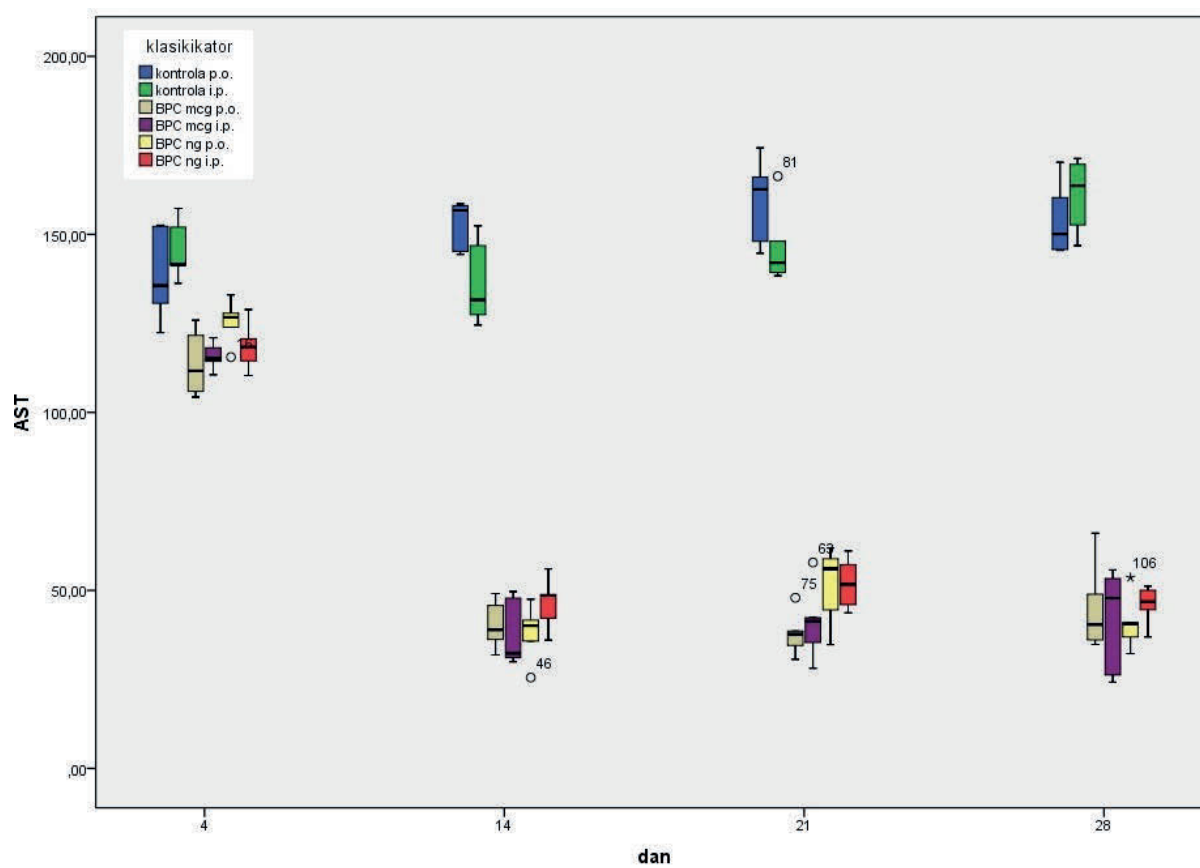
- štakori žrtvovani 14. dana svih BPC grupa i štakori kontrolne grupe koji su dobivali F.O. intraperitonealno, imaju u prosjeku manju vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, za razliku od štakora kontrolne grupe koji su pili vodu za piće, koji imaju u prosjeku veću vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana svih BPC grupa imaju u prosjeku manju vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, ali s izuzetkom štakora koji su BPC dobivali peroralno u mikrogramskim dozama imaju veću vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, dok štakori kontrolnih grupa žrtvovani 21. dana imaju u prosjeku veću vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. i 14. dan
- štakori žrtvovani 28. dana svih BPC grupa imaju u prosjeku manju vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, ali s izuzetkom štakora koji su BPC dobivali intraperitonealno u nanogramskim dozama imaju u prosjeku veću (intraperitonealno u mikrogramskim dozama) ili jednaku (peroralno bez obzira na dozu) vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan. U odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 21. dan štakori žrtvovani 28. dan koji su BPC dobivali u nanogramskim dozama imaju u prosjeku manju, a oni koji su BPC dobivali u mikrogramskim dozama veću vrijednost AST-a.
- štakori kontrolnih grupa žrtvovani 28. dana imaju u prosjeku veću vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, s tim da štakori kontrolne grupe koji su pili vodu za piće, imaju u prosjeku manju vrijednost AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. i 21. dan, za razliku od štakora kontrolne grupe koji su dobivali F.O. intraperitonealno, koji imaju u prosjeku veće vrijednosti AST-a u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. i 21. dan

Štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku niže vrijednosti AST-a nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 15 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) za vrijednosti koncentracija aspartat aminotransferaze - AST (IU/lit). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 19 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 15. statistika koncentracije AST (IU/lit) prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (IU/lit)	Q1 (IU/lit)	Q3 (IU/lit)	raspon (min-max) (IU/lit)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	115	112,50	119,50	111	121
4. dan BPC i.p. ng	5	118	112,50	125,00	110	129
4. dan BPC p.o. mcg	5	112	105,00	124,00	104	126
4. dan BPC p.o. ng	5	127	120,00	130,50	116	133
4. dan kontrola i.p.	5	142	138,50	154,50	136	157
4. dan kontrola p.o.	5	136	126,50	152,50	122	153
14. dan BPC i.p. mcg	5	32	30,50	49,00	20	50
14. dan BPC i.p. ng	5	49	39,00	52,50	36	56
14. dan BPC p.o. mcg	5	39	34,00	47,50	32	49
14. dan BPC p.o. ng	5	40	31,00	45,00	26	48
14. dan kontrola i.p.	5	132	126,50	149,50	125	152
14. dan kontrola p.o.	5	157	144,50	158,50	144	159
21. dan BPC i.p. mcg	5	41	31,50	50,00	28	58
21. dan BPC i.p. ng	5	52	45,00	59,00	44	61
21. dan BPC p.o. mcg	5	38	33,00	43,50	31	48
21. dan BPC p.o. ng	5	56	40,00	60,50	35	62
21. dan kontrola i.p.	5	142	138,50	157,00	138	166
21. dan kontrola p.o.	5	163	146,50	170,00	145	174
28. dan BPC i.p. mcg	5	48	25,00	54,50	24	56
28. dan BPC i.p. ng	5	47	41,00	50,50	37	51
28. dan BPC p.o. mcg	5	40	35,50	57,50	35	66
28. dan BPC p.o. ng	5	41	34,50	47,50	32	54
28. dan kontrola i.p.	5	164	150,00	170,50	147	171
28. dan kontrola p.o.	5	150	146,00	165,00	146	170



Slika 19. box plot grafikon koncentracija AST (IU/lit) prema ispitivanim grupama

Vrijednosti AST izmjerene u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. AST - provjera svih ispitivanih grupa (24 grupe):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=103,90$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. AST - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti : Kruskal - Wallis H test ($H=20,27$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

3. AST - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=21,24$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. AST - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=22,73$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. AST - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,82$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 16 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija AST-a svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 16. Rezultati Kruskal – Wallis testiranja razlike u koncentraciji AST-a (IU/lit) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	103,90	23	0,000	H1
4.	30	20,27	5	0,001	H1
14.	30	21,24	5	0,001	H1
21.	30	22,73	5	0,000	H1
28.	30	19,82	5	0,001	H1

6. AST - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 4. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=7,50$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. AST - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. AST - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

9. AST - provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan
(2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 17 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija AST-a između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 17. Rezultati Mann – Whitney testiranja razlike u koncentraciji AST-a (IU/lit) između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	n_{kont}	n_{BPC}	p	Hipot.
4.	30	7,50	10	20	0,000	H1
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	0,00	10	20	0,000	H1
28.	30	0,00	10	20	0,000	H1

10. AST - provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=52,23$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

11. AST - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H testom ($H = 13,04$ i $df = 11$) pokazao je značajnost $P = 0,291$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze.

Tablica 18 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija AST-a BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 18. Rezultati Kruskal – Wallis testiranja razlike u koncentraciji AST-a (IU/lit) BPC ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	52,23	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	13,04	11	0,291	H0

12. AST - provjera rezultata BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan prema grupama štakora žrtvovanih 14., 21., 28. dan (2 grupe)

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a pripadaju istoj populaciji kao i štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti AST-a statistički se značajno razlikuju od štakora iz BPC tretiranih grupa žrtvovanih 14., 21. i 28. dan

Test značajnosti: Mann - Whitney U testom ($U=0,00$ $n_{BPC4}=20$, $n_{BPC14.21.28}=60$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 19 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann – Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija AST-a između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan).

Tablica 19. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji AST-a (IU/lit) između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan)

BPC GRUPA (dani)	n	U	nBPC4.	nBPC14.21.28.	p	Hipot.
4. : 14., 21. i 28.	80	0,00	20	60	0,000	H1

BILIRUBIN ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti koncentracija bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

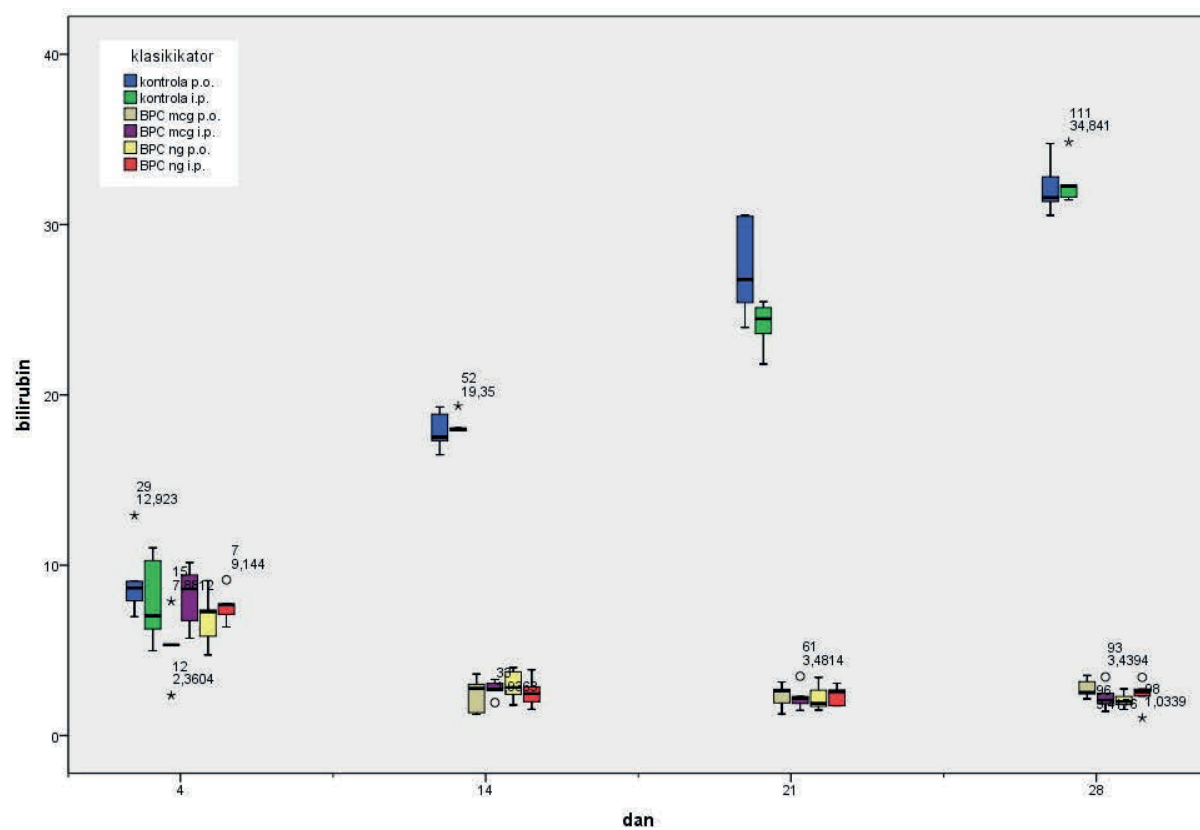
- štakori žrtvovani 14. dana svih BPC grupa, imaju u prosjeku manju vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, za razliku od štakora kontrolnih grupa koji imaju u prosjeku veću vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana svih BPC grupa imaju u prosjeku manju vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, te približno jednaku vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, za razliku od štakora kontrolnih grupa koji imaju u prosjeku veću vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. i 14. dan
- štakori žrtvovani 28. dana svih BPC grupa imaju u prosjeku manju vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, te približno jednaku vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. i 21. dan, za razliku od štakora kontrolnih grupa koji imaju u prosjeku veću vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4., 14. i 21. dan

Štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku niže vrijednosti bilirubina nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 20 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) za vrijednosti koncentracija ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 20 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 20. statistika koncentracije bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C ($\mu\text{mol/lit}$)	Q1 ($\mu\text{mol/lit}$)	Q3 ($\mu\text{mol/lit}$)	raspon (min-max) ($\mu\text{mol/lit}$)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	8,6	6,25	9,80	5,7	10,2
4. dan BPC i.p. ng	5	7,7	6,75	8,40	6,4	9,1
4. dan BPC p.o. mcg	5	5,3	3,85	6,60	2,4	7,9
4. dan BPC p.o. ng	5	7,3	5,25	8,25	4,7	9,1
4. dan kontrola i.p.	5	7,0	5,65	10,65	5,0	11
4. dan kontrola p.o.	5	8,7	7,45	11,00	7,0	12,9
14. dan BPC i.p. mcg	5	2,7	2,25	3,20	1,9	3,3
14. dan BPC i.p. ng	5	2,5	1,75	3,40	1,5	3,9
14. dan BPC p.o. mcg	5	2,8	1,30	3,30	1,3	3,6
14. dan BPC p.o. ng	5	2,8	2,10	3,85	1,8	4,0
14. dan kontrola i.p.	5	18,0	17,90	18,70	17,9	19,3
14. dan kontrola p.o.	5	17,5	16,90	19,10	16,5	19,3
21. dan BPC i.p. mcg	5	2,2	1,70	2,90	1,5	3,5
21. dan BPC i.p. ng	5	2,6	1,75	2,88	1,7	3,1
21. dan BPC p.o. mcg	5	2,6	1,60	2,90	1,3	3,1
21. dan BPC p.o. ng	5	1,9	1,60	3,05	1,5	3,4
21. dan kontrola i.p.	5	24,5	22,70	25,30	21,8	25,5
21. dan kontrola p.o.	5	26,8	24,70	30,55	24,0	30,6
28. dan BPC i.p. mcg	5	2,1	1,65	2,95	1,4	3,4
28. dan BPC i.p. ng	5	2,6	1,65	3,05	1,0	3,4
28. dan BPC p.o. mcg	5	2,5	2,30	3,35	2,2	3,5
28. dan BPC p.o. ng	5	2,0	1,65	2,50	1,5	2,7
28. dan kontrola i.p.	5	32,3	31,50	33,55	31,4	34,8
28. dan kontrola p.o.	5	31,6	30,90	33,80	30,5	34,8



Slika 20. box plot grafikon koncentracije bilirubina (mmol/lit) prema ispitivanim grupama

Vrijednosti ukupnog bilirubina izmjerene u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Bilirubin - **provjera svih ispitivanih grupa (24 grupe):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=102,53$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Bilirubin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=8,04$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,154$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze.

3. Bilirubin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,79$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. Bilirubin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,84$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. Bilirubin - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=20,86$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 21 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal – Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija ukupnog bilirubina svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 21. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u koncentraciji bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	102,53	23	0,000	H1
4.	30	8,04	5	0,154	H0
14.	30	19,79	5	0,001	H1
21.	30	19,84	5	0,001	H1
28.	30	20,86	5	0,001	H1

6. Bilirubin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. Bilirubin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. Bilirubin - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 22 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann – Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija ukupnog bilirubina između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 22. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	n _{kont}	n _{BPC}	p	Hipot.
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	0,00	10	20	0,000	H1
28.	30	0,00	10	20	0,000	H1

9. Bilirubin - **provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora** (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=44,81$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

10. Bilirubin - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan** (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H testom ($H=6,18$ i $df=11$) pokazao je značajnost $P=0,861$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze.

Tablica 23 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti koncentracija ukupnog bilirubina BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 23. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u koncentraciji bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	44,81	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	6,18	11	0,861	H0

11. Bilirubin - provjera rezultata BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan prema grupama štakora žrtvovanih 14., 21., 28. dan (2 grupe)

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina pripadaju istoj populaciji kao i štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 14., 21. I 28. dan, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC tretiranih grupa žrtvovani 4. dan s obzirom na izmjerene vrijednosti bilirubina statistički se značajno razlikuju od štakora iz BPC tretiranih grupa žrtvovanih 14., 21. i 28. dan

Test značajnosti: Mann - Whitney U testom ($U=32,00$ $n_{\text{BPC4}}=20$, $n_{\text{BPC14.21.28}}=60$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 24 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann – Whitney testiranja za vrijednosti koncentracija ukupnog bilirubina između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan).

Tablica 24. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u koncentraciji bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) između BPC ispitivanih grupa štakora podijeljenih prema danu žrtvovanja u 2 grupe (4. dan prema 14., 21., 28. dan)

BPC GRUPA (dani)	n	U	n_{BPC4}	$n_{\text{BPC14.21.28}}$	p	Hipot.
4. : 14., 21. i 28.	80	32,00	20	60	0,000	H1

MASA OSTATNE JETRE ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre štakora (g) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

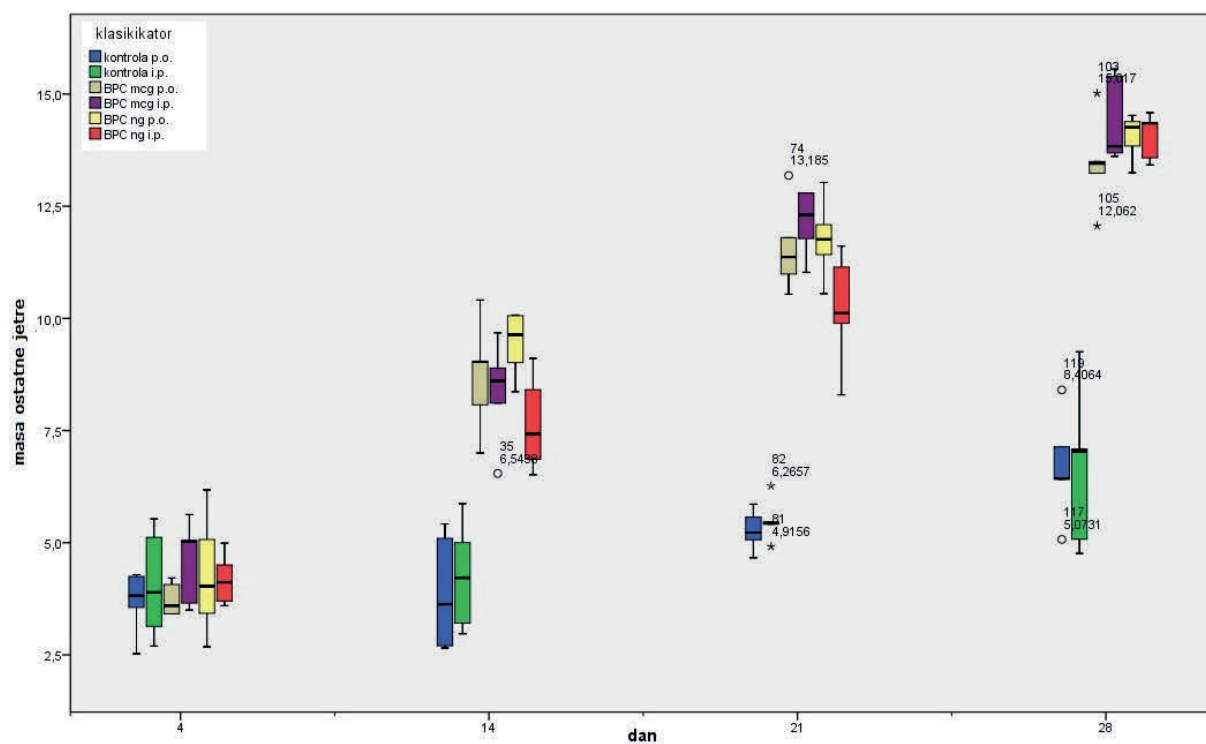
- štakori žrtvovani 4. dan imaju u prosjeku približno istu masu ostatne jetre
- štakori koji su žrtvovani 14., 21. i 28. dana imaju u prosjeku veću ostatnu masu jetre nego štakori žrtvovani 4. dan i porast mase je u prosjeku to veći što su životinje kasnije žrtvovane

Navedena dinamika prisutna je kod svih štakora (kontrola i BPC), s tim da štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku više vrijednosti nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 25 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) za vrijednosti mase ostatne jetre štakora (u gramima). Prikazani su rezultati za sve 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 21 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 25. statistika mase ostatne jetre štakora (g) prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (g)	Q1 (g)	Q3 (g)	raspon (min-max) (g)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	5,031	3,577	5,337	3,500	5,629
4. dan BPC i.p. ng	5	4,119	3,647	4,748	3,597	4,991
4. dan BPC p.o. mcg	5	3,596	3,415	4,141	3,412	4,215
4. dan BPC p.o. ng	5	4,030	3,053	6,626	2,679	6,179
4. dan kontrola i.p.	5	3,895	2,918	5,325	2,698	5,532
4. dan kontrola p.o.	5	3,820	3,041	4,268	2,526	4,289
14. dan BPC i.p. mcg	5	8,607	7,328	9,284	6,544	9,676
14. dan BPC i.p. ng	5	7,425	6,688	8,759	6,515	9,108
14. dan BPC p.o. mcg	5	9,033	7,537	9,730	7,001	10,410
14. dan BPC p.o. ng	5	9,636	8,690	10,077	8,365	10,075
14. dan kontrola i.p.	5	4,216	3,089	5,437	2,970	5,872
14. dan kontrola p.o.	5	3,628	2,679	5,258	2,656	5,417
21. dan BPC i.p. mcg	5	12,307	11,404	12,798	11,028	12,799
21. dan BPC i.p. ng	5	10,116	9,093	11,376	8,295	11,611
21. dan BPC p.o. mcg	5	11,368	10,763	12,491	10,537	13,185
21. dan BPC p.o. ng	5	11,763	10,987	12,559	10,551	13,029
21. dan kontrola i.p.	5	5,433	5,164	5,864	4,916	6,266
21. dan kontrola p.o.	5	5,227	4,864	5,714	4,663	5,858
28. dan BPC i.p. mcg	5	13,836	13,650	15,478	13,611	15,560
28. dan BPC i.p. ng	5	14,352	13,500	14,470	13,421	14,585
28. dan BPC p.o. mcg	5	13,452	12,649	14,257	12,062	15,017
28. dan BPC p.o. ng	5	14,262	13,544	14,455	13,244	14,524
28. dan kontrola i.p.	5	7,040	4,919	8,172	4,760	9,257
28. dan kontrola p.o.	5	6,432	5,754	7,773	5,073	8,406



Slika 21. box plot grafikon mase ostatne jetre štakora (g) prema ispitivanim grupama

Vrijednosti mase ostatne jetre štakora u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Masa ostatne jetre - **provjera svih ispitivanih grupa** (24 grupe):

H₀: štakori iz različitih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H₁: štakori iz različitih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=108,55$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Masa ostatne jetre - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan** (6 grupa):

H₀: štakori iz različitih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H₁: štakori iz različitih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=2,84$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,725$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

3. Masa ostatne jetre - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan** (6 grupa):

H₀: štakori iz različitih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H₁: štakori iz različitih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=21,58$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. Masa ostatne jetre - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz različitih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=22,41$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. Masa ostatne jetre - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz različitih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=20,98$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 26 na slijedećoj strani sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti mase ostatne jetre štakora svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 26. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u masi ostatne jetre svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	108,55	23	0,000	H1
4.	30	2,84	5	0,725	H0
14.	30	21,58	5	0,001	H1
21.	30	22,41	5	0,000	H1
28.	30	20,98	5	0,001	H1

6. Masa ostatne jetre - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. Masa ostatne jetre - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. Masa ostatne jetre - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=10,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 27 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za vrijednosti mase ostatne jetre između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 27. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u masama ostatne jetre između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	n_{kont}	n_{BPC}	p	Hipot.
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	0,00	10	20	0,000	H1
28.	30	0,00	10	20	0,000	H1

9. Masa ostatne jetre - provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=74,26$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

10. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i**

28. dan (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=52,48$ i $df=11$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

11. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. i 28.**

dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=30,79$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

12. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. i 21.**

dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=29,49$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

13. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. i 28.**

dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=31,43$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

14. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan** (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=4,86$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,182$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

15. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan** (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=6,69$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,082$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

16. Masa ostatne jetre - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan** (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti mase ostatne jetre, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=3,59$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,309$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

Tablica 28 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal – Wallis testiranja razlike u masi ostatne jetre BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 28. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u vrijednostima mase ostatne jetre BPC ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	74,26	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	52,48	11	0,000	H1
21. i 28.	40	30,79	7	0,000	H1
14. i 21.	40	29,49	7	0,000	H1
14. i 28.	40	31,43	7	0,000	H1
14.	20	4,86	3	0,182	H0
21.	20	6,69	3	0,082	H0
28.	20	3,59	3	0,309	H0

POVRŠINA HEPATOCITA ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti površine hepatocita štakora (μm^2) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

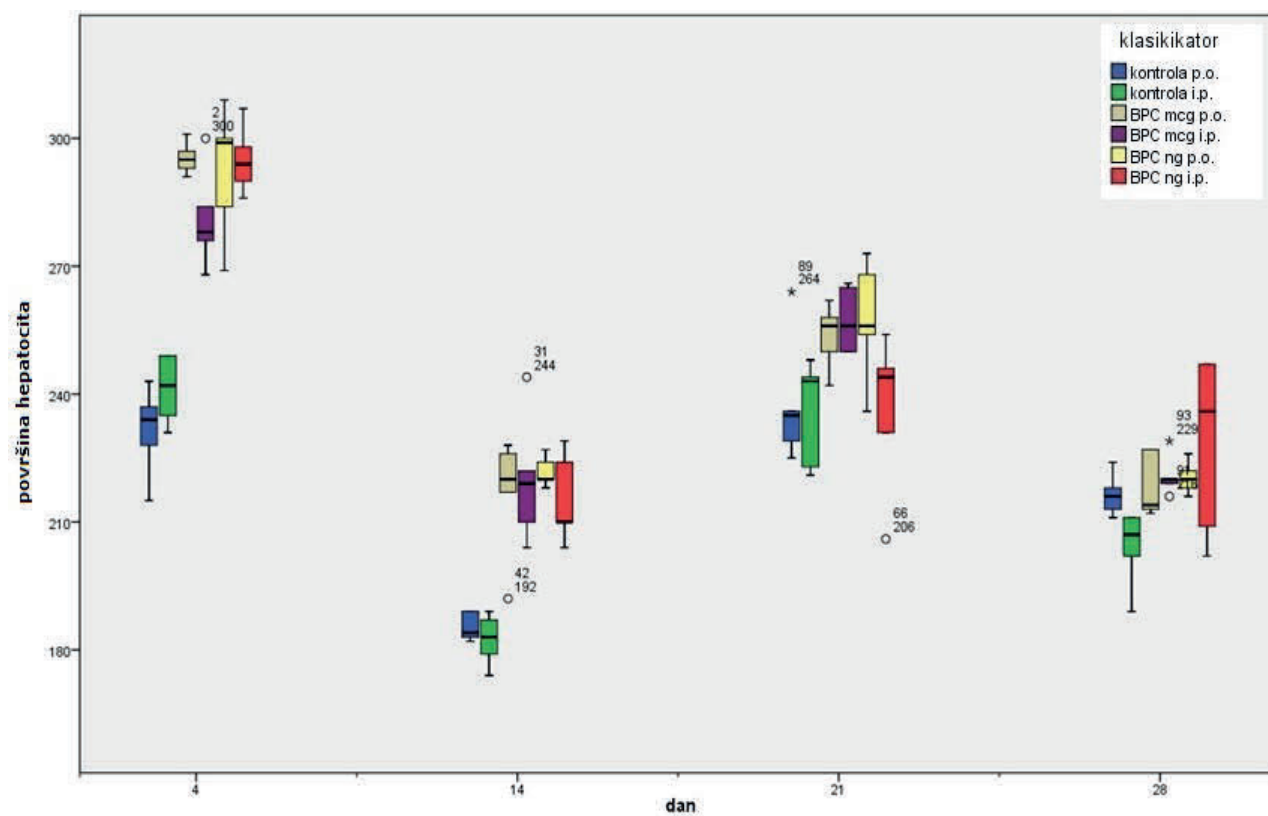
- štakori žrtvovani 14. dana imaju u prosjeku manju površinu hepatocita u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana imaju u prosjeku veću površinu hepatocita u odnosu na štakore žrtvovane 14. dan, ali manju u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 28. dan imaju u prosjeku manju površinu hepatocita u odnosu na štakore žrtvovane 4 i 21. dan, ali veću u odnosu na štakore žrtvovane 14. dan

Navedena dinamika prisutna je kod svih štakora (kontrola i BPC), s tim da štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku više vrijednosti nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 29 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) vrijednosti površine hepatocita (μm^2). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 22 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 29. statistika površine hepatocita štakora prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (μm^2)	Q1 (μm^2)	Q3 (μm^2)	raspon (min-max) (μm^2)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	278	272,00	292,00	268	300
4. dan BPC i.p. ng	5	294	288,00	302,50	286	307
4. dan BPC p.o. mcg	5	295	292,00	299,00	291	301
4. dan BPC p.o. ng	5	299	276,50	304,50	269	309
4. dan kontrola i.p.	5	242	233,00	249,00	231	249
4. dan kontrola p.o.	5	234	221,50	240,00	215	243
14. dan BPC i.p. mcg	5	219	207,00	233,00	204	244
14. dan BPC i.p. ng	5	210	207,00	226,50	204	229
14. dan BPC p.o. mcg	5	220	204,50	227,00	192	228
14. dan BPC p.o. ng	5	220	219,00	225,50	218	227
14. dan kontrola i.p.	5	183	176,50	188,00	174	189
14. dan kontrola p.o.	5	184	182,50	189,00	182	189
21. dan BPC i.p. mcg	5	256	250,00	265,50	250	266
21. dan BPC i.p. ng	5	244	218,50	250,00	206	254
21. dan BPC p.o. mcg	5	256	246,00	260,00	242	262
21. dan BPC p.o. ng	5	256	245,00	270,50	236	273
21. dan kontrola i.p.	5	243	222,00	246,00	221	248
21. dan kontrola p.o.	5	235	227,50	250,00	225	264
28. dan BPC i.p. mcg	5	220	217,50	224,50	216	229
28. dan BPC i.p. ng	5	236	205,50	247,00	202	247
28. dan BPC p.o. mcg	5	214	212,50	227,00	212	227
28. dan BPC p.o. ng	5	220	217,00	224,00	216	226
28. dan kontrola i.p.	5	207	195,50	211,00	189	211
28. dan kontrola p.o.	5	216	212,00	221,00	211	224



Slika 22. box plot grafikon površine hepatocita štakora prema ispitivanim grupama

Vrijednosti izmjerene površine hepatocita u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Površina hepatocita štakora - **provjera svih ispitivanih grupa (24 grupe):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=100,87$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Površina hepatocita štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=21,34$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

3. Površina hepatocita štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,84$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. Površina hepatocita štakora - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih

21. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=12,98$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,024$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. Površina hepatocita štakora - provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih

28. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=11,17$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,048$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 30 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal – Wallis testiranja za izmjerene vrijednosti površine hepatocita svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 30. Rezultati Kruskal – Wallis testiranja razlike u površini hepatocita svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	100,87	23	0,000	H1
4.	30	21,34	5	0,001	H1
14.	30	19,84	5	0,001	H1
21.	30	12,98	5	0,024	H1
28.	30	11,17	5	0,048	H1

6. Površina hepatocita štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 4. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. Površina hepatocita štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. Površina hepatocita štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=39,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,006$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

9. Površina hepatocita štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=37,50$ $n_{\text{kont}}=10$, $n_{\text{BPC}}=20$) pokazao je značajnost $P=0,005$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 31 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za izmjerene vrijednosti površine hepatocita između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 31. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u površini hepatocita između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	nkont	nBPC	p	Hipot.
4.	30	0,00	10	20	0,000	H1
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	39,00	10	20	0,006	H1
28.	30	37,50	10	20	0,005	H1

10. Površina hepatocita štakora - provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=64,01$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

11. Površina hepatocita štakora - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=34,43$ i $df=11$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

12. Površina hepatocita štakora - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih

21. i 28. dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=25,92$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

13. Površina hepatocita štakora - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih

14. i 21. dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal Wallis H test ($H=27,25$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

14. Površina hepatocita štakora - provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih

14. i 28. dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=31,86$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

15. Površina hepatocita štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

4. i 21. dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=31,36$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

16. Površina hepatocita štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

4. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=3,89$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,273$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

17. Površina hepatocita štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

14. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal Wallis H test ($H=0,76$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,858$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

18. Površina hepatocita štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

21. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=6,31$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,097$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

19. Površina hepatocita štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

28. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti površine hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=0,865$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,834$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

Tablica 32 na slijedećoj strani sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja razlike u izmjerenim površinama hepatocita BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 32. Rezultati Kruskal – Wallis testiranja razlike u površini hepatocita BPC ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	64,01	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	34,43	11	0,000	H1
21. i 28.	40	25,92	7	0,001	H1
14. i 21.	40	27,25	7	0,000	H1
14. i 28.	40	31,86	7	0,000	H1
4. i 21.	40	31,36	7	0,000	H1
4.	20	3,89	3	0,273	H0
14.	20	0,76	3	0,858	H0
21.	20	6,31	3	0,097	H0
28.	20	0,865	3	0,834	H0

PROMJER JEZGRE HEPATOCITA ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita štakora (μm) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

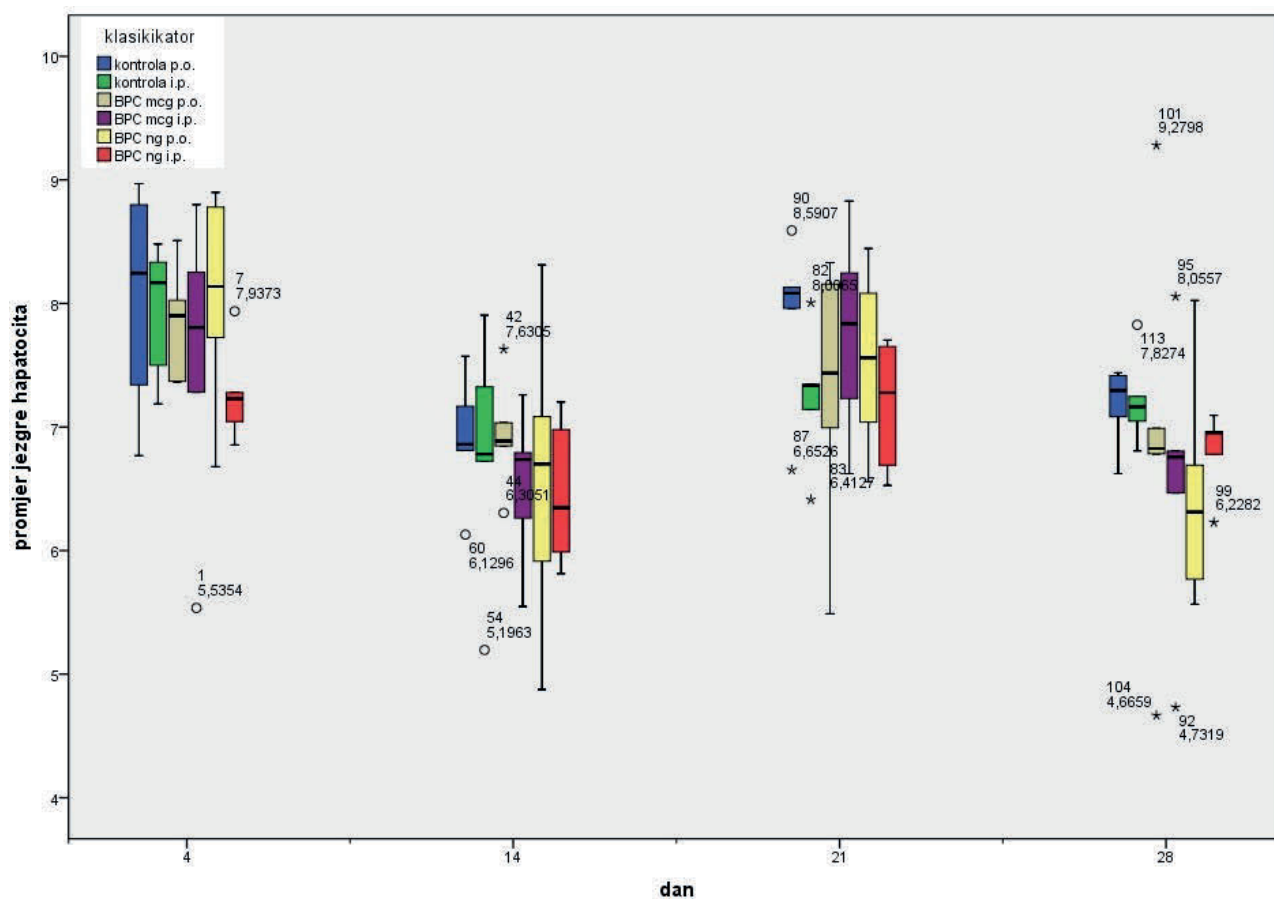
- štakori žrtvovani 14. dana imaju u prosjeku manji promjer jezgre hepatocita u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana imaju u prosjeku veći promjer jezgre hepatocita u odnosu na štakore žrtvovane 14. dan, ali manji u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan, osim štakora koji su BPC dobivali intraperitonealno u nanogramskim dozama
- štakori žrtvovani 28. dan imaju u prosjeku manji promjer jezgre hepatocita u odnosu na štakore žrtvovane 4. i 21. dan, ali veći u odnosu na štakore žrtvovane 14. dan, osim štakora koji su BPC dobivali peroralno

Navedena dinamika prisutna je kod svih štakora (kontrola i BPC), s tim da štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku niže vrijednosti nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 33 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) vrijednosti promjera jezgre hepatocita (μm). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 23 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 33. statistika promjera jezgre hepatocita prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (μm)	Q1 (μm)	Q3 (μm)	raspon (min-max) (μm)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	7,8	6,41	8,53	5,5	8,8
4. dan BPC i.p. ng	5	7,2	6,95	7,61	6,9	7,9
4. dan BPC p.o. mcg	5	7,9	7,37	8,27	7,4	8,5
4. dan BPC p.o. ng	5	8,1	7,20	8,84	6,7	8,9
4. dan kontrola i.p.	5	8,2	7,34	8,41	7,2	8,5
4. dan kontrola p.o.	5	8,2	7,06	8,88	6,8	9,0
14. dan BPC i.p. mcg	5	6,7	5,91	7,03	5,5	7,3
14. dan BPC i.p. ng	5	6,3	5,90	7,09	5,8	7,2
14. dan BPC p.o. mcg	5	6,9	6,58	7,33	6,3	7,6
14. dan BPC p.o. ng	5	6,7	5,40	7,70	4,9	8,3
14. dan kontrola i.p.	5	6,8	5,96	7,62	5,2	7,9
14. dan kontrola p.o.	5	6,9	6,47	7,37	6,1	7,6
21. dan BPC i.p. mcg	5	7,8	6,93	8,54	6,6	8,8
21. dan BPC i.p. ng	5	7,3	6,61	7,68	6,5	7,7
21. dan BPC p.o. mcg	5	7,4	6,24	8,24	5,5	8,3
21. dan BPC p.o. ng	5	7,6	6,80	8,23	6,6	8,4
21. dan kontrola i.p.	5	7,3	6,78	7,68	6,4	8,0
21. dan kontrola p.o.	5	8,1	7,31	8,32	6,7	8,6
28. dan BPC i.p. mcg	5	6,8	5,60	7,43	4,7	8,1
28. dan BPC i.p. ng	5	7,0	6,50	7,03	6,2	7,0
28. dan BPC p.o. mcg	5	6,8	5,73	8,13	4,7	9,3
28. dan BPC p.o. ng	5	6,3	5,67	7,36	5,6	8,0
28. dan kontrola i.p.	5	7,2	6,93	7,54	6,8	7,8
28. dan kontrola p.o.	5	7,3	6,85	7,43	6,6	7,4



Slika 23. box plot grafikon promjera jezgre hepatocita prema ispitivanim grupama

Vrijednosti izmjerenih promjera jezgri hepatocita u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Promjer jezgre hepatocita - **provjera svih ispitivanih grupa (24 grupe):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=39,99$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,015$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Promjer jezgre hepatocita - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=4,59$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,471$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

3. Promjer jezgre hepatocita - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan (6 grupa):**

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=2,37$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,795$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

4. Promjer jezgre hepatocita - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21.**

dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=3,90$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,563$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

5. Promjer jezgre hepatocita - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28.**

dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=6,43$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,266$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

Tablica 34 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal – Wallis testiranja za izmjerene vrijednosti promjera jezgre hepatocita svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 34. Rezultati Kruskal – Wallis testiranja razlike u promjerima jezgre hepatocita svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4., 14., 21. i 28.	120	39,99	23	0,015	H1
4.	30	4,56	5	0,471	H0
14.	30	2,37	5	0,795	H0
21.	30	3,90	5	0,563	H0
28.	30	6,43	5	0,266	H0

UKUPNA TJELESNA MASA ŠTAKORA

Izmjerene vrijednosti tjelesne mase štakora (g) kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

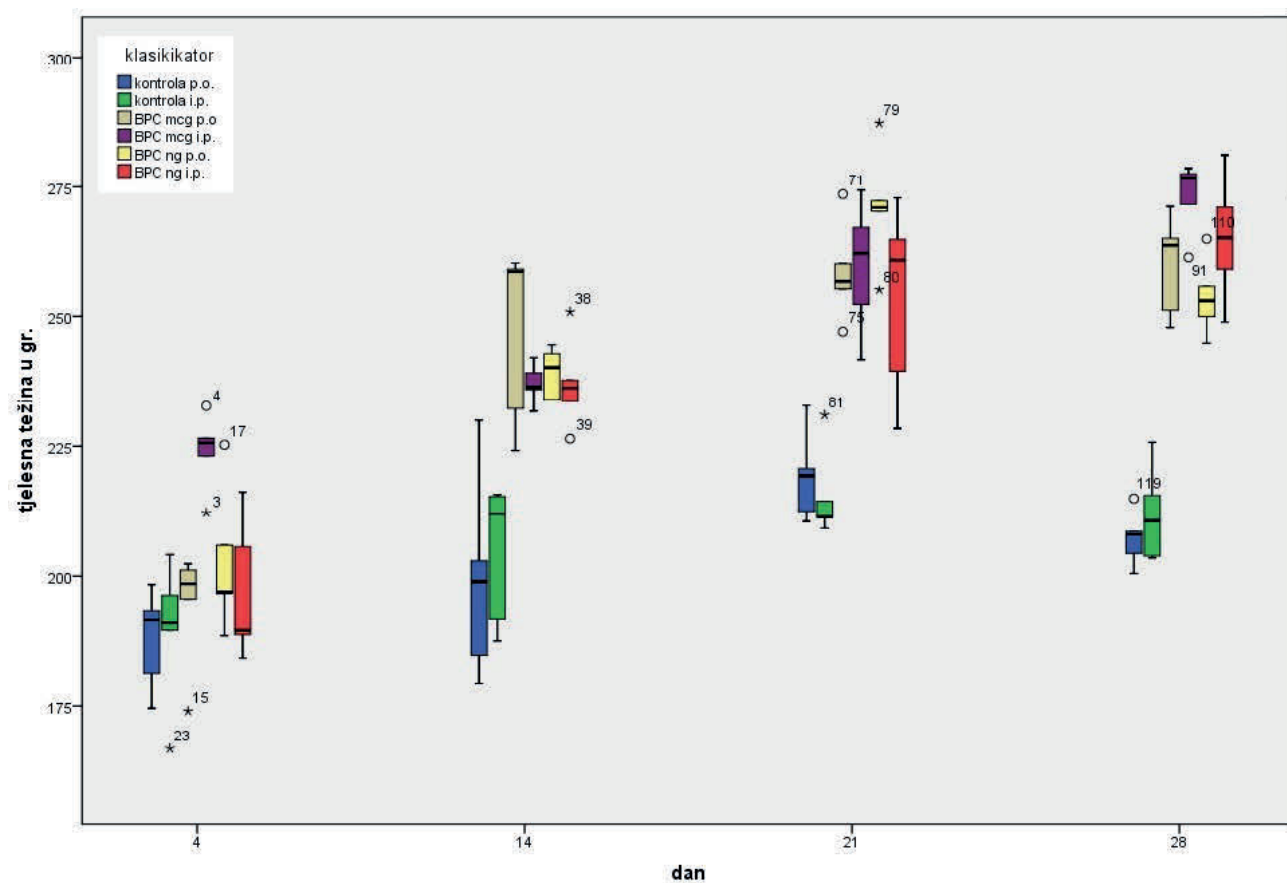
- štakori žrtvovani 14. dana imaju u prosjeku veću tjelesnu masu u odnosu na štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana koji su primali BPC intraperitonealno neovisno o dozi ili peroralno u nanogramskim dozama, te štakori kontrolne grupe koji su pili vodu za piće, imaju u prosjeku veću tjelesnu masu u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, dok štakori koji su primali peroralno BPC u mikrogramskim dozama, te štakori kontrolne grupe koji su dobivali F.O. intraperitonealno, imaju u prosjeku manju tjelesnu masu u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, ali veću u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 28. dan koji su primali BPC intraperitonealno neovisno o dozi ili peroralno u mikrogramskim dozama imaju u prosjeku veću tjelesnu masu u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. ili 14. dan, dok štakori koji su primali peroralno BPC u nanogramskim dozama, te štakori kontrolne grupe, imaju u prosjeku manju tjelesnu masu u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 21. dan, ali veću u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. ili 14. dan, osim štakora kontrolne grupe koji su dobivali F.O. intraperitonealno, koji imaju u prosjeku manju tjelesnu masu u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, ali veću u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan

Štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku više vrijednosti tjelesne mase nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 35 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) za vrijednosti tjelesne mase štakora (g). Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 24 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 35. statistika tjelesne mase štakora (g) prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C (g)	Q1 (g)	Q3 (g)	raspon (min-max) (g)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	225	217,67	229,64	212	233
4. dan BPC i.p. ng	5	189	186,36	210,92	184	216
4. dan BPC p.o. mcg	5	198	184,80	201,74	174	202
4. dan BPC p.o. ng	5	196	192,56	215,61	188	225
4. dan kontrola i.p.	5	191	178,10	200,20	167	204
4. dan kontrola p.o.	5	191	177,88	195,88	175	198
14. dan BPC i.p. mcg	5	236	233,86	240,64	232	242
14. dan BPC i.p. ng	5	236	230,07	244,30	226	251
14. dan BPC p.o. mcg	5	258	228,20	259,82	224	260
14. dan BPC p.o. ng	5	240	233,98	243,71	234	245
14. dan kontrola i.p.	5	212	189,60	215,56	187	216
14. dan kontrola p.o.	5	198	181,99	216,46	179	230
21. dan BPC i.p. mcg	5	262	247,01	270,79	242	274
21. dan BPC i.p. ng	5	260	233,96	268,90	228	273
21. dan BPC p.o. mcg	5	256	251,16	266,94	247	274
21. dan BPC p.o. ng	5	271	262,72	279,80	255	287
21. dan kontrola i.p.	5	211	210,22	222,74	209	231
21. dan kontrola p.o.	5	219	211,51	226,78	211	233
28. dan BPC i.p. mcg	5	276	266,55	278,11	261	279
28. dan BPC i.p. ng	5	265	254,07	276,14	249	281
28. dan BPC p.o. mcg	5	263	249,50	268,17	248	271
28. dan BPC p.o. ng	5	252	247,44	260,50	245	265
28. dan kontrola i.p.	5	210	203,68	220,66	203	226
28. dan kontrola p.o.	5	207	202,43	211,77	201	215



Slika 24. box plot grafikon ukupne tjelesne mase štakora (g) prema ispitivanim grupama

Vrijednosti ukupne tjelesne mase štakora u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera svih ispitivanih grupa** (24 grupe):

H₀: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H₁: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=104,79$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan** (6 grupa):

H₀: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H₁: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=13,44$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,020$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

3. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan** (6 grupa):

H₀: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H₁: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,17$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,002$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

21. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=20,09$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

28. dan (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=22,92$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 36 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 36. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u tjelesnoj masi svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	104,79	23	0,000	H1
4.	30	13,44	5	0,020	H1
14.	30	19,17	5	0,002	H1
21.	30	20,09	5	0,001	H1
28.	30	22,92	5	0,000	H1

6. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 4. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=47,00$ $n_{\text{kont}}=10$, $n_{\text{BPC}}=20$) pokazao je značajnost $P=0,019$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=2,00$ $n_{\text{kont}}=10$, $n_{\text{BPC}}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=2,00$ $n_{\text{kont}}=10$, $n_{\text{BPC}}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

9. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 37 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann – Whitney testiranja izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase štakora između kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 37. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u tjelesnoj masi između štakora kontrolne i BPC grupa prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	nkont	nBPC	p	Hipot.
4.	30	47,00	10	20	0,019	H1
14.	30	2,00	10	20	0,000	H1
21.	30	2,00	10	20	0,000	H1
28.	30	0,00	10	20	0,000	H1

10. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora** (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=63,85$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

11. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 4. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=47,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,019$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

12. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

14., 21. i 28. dan (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=34,55$ i $df=11$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

13. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

21. i 28. dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=11,73$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,110$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

14. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

14. i 21. dan (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=19,74$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,006$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

15. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

4. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=9,49$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,023$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

16. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih**

14. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti ukupne tjelesne mase, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=1,21$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,749$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

Tablica 38 na slijedećoj strani sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja razlike u ukupnoj tjelesnoj masi štakora BPC ispitivanih grupa, prema danu žrtvovanja.

Tablica 38. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u tjelesnoj masi štakora BPC ispitivanih grupa prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	80	63,85	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	34,55	11	0,000	H1
21. i 28.	40	11,73	7	0,110	H0
14. i 21.	40	19,74	7	0,006	H1
4.	20	9,49	3	0,023	H1
14.	20	1,21	3	0,749	H0

17. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između BPC grupe žrtvovanih 4.**

dan (2 grupe) prema načinu aplikacije BPC (intraperitonealno ili peroralno):

H0: štakori iz BPC grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji bez obzira na način primjene BPC, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, s obzirom na način aplikacije.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test (($U=30,00$ $n_{mcg}=10$, $n_{ng}=20$) pokazao je značajnost $P=0,143$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

18. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između BPC grupe žrtvovanih 4.**

dan (2 grupe) prema primjenjenoj dozi BPC:

H0: štakori iz BPC grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji bez obzira na primjenjenu dozu BPC, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, s obzirom na primjenjenu dozu BPC.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=31,00$ $n_{mcg}=10$, $n_{ng}=20$) pokazao je značajnost $P=0,165$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

19. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između BPC grupe žrtvovanih 4.**

dan (2 grupe) koji su primali BPC u dozi 10 µg/kg intraperitonealno i preoralno:

H0: štakori iz BPC grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji bez obzira na način aplikacije BPC, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, s obzirom na način aplikacije BPC.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{mcg.ip}=5$, $n_{mcg.po}=5$) pokazao je značajnost $P=0,008$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

20. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između BPC grupe žrtvovanih 4.**

dan (2 grupe) koji su primali BPC u dozi 10 µg/kg intraperitonealno i onih koji su primali BPC u dozi 10 ng/kg peroralno:

H0: štakori iz BPC grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji bez obzira na način aplikacije i primjenjenu dozu BPC, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, s obzirom na način aplikacije i primjenjenu dozu BPC.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=2,00$ $n_{mcg.ip}=5$, $n_{ng.po}=5$) pokazao je značajnost $P=0,032$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne

21. Ukupna tjelesna masa štakora - **provjera razlike između BPC grupe žrtvovanih 4.**

dan (2 grupe) koji su primali BPC u dozi 10 µg/kg intraperitonealno i onih koji su primali BPC u dozi 10 ng/kg intraperitonealno:

H0: štakori iz BPC grupa s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase pripadaju istoj populaciji bez obzira na način aplikacije i primjenjenu dozu BPC, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na izmjerene vrijednosti ukupne tjelesne mase, s obzirom na način aplikacije i primjenjenu dozu BPC.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=1,00$ $n_{mcg.ip}=5$, $n_{ng.ip}=5$) pokazao je značajnost $P=0,016$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne

Tablica 39 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja razlike u vrijednosti ukupne tjelesne mase između BPC grupa štakora žrtvovanih 4. dan prema načinu aplikacije BPC-a, potom prema dozi BPC-a, te napokon štakora koji su

primali BPC u dozi 10 µg/kg intraperitonealno prema ostalim grupama štakora (10 mcg/kg peroralno, 10 ng/kg peroralno i 10 ng/kg intraperitonealno).

Tablica 39. Rezultati Mann – Whitney testiranja razlike u tjelesnoj masi između štakora BPC grupa žrtvovanih 4. dan

BPC GRUPA 4. dan	n_{uk}	U	n	n	p	Hipot.
i.p. : p.o.	20	30,00	10	10	0,143	H0
mcg : ng	20	31,00	10	10	0,165	H0
mcg. i.p. : mcg p.o	10	0,00	5	5	0,008	H1
mcg. i.p. : ng. p.o.	10	2,00	5	5	0,032	H1
mcg. i.p. : ng. i.p.	10	1,00	5	5	0,016	H1

OMJER MASE JETRE PREMA UKUPNOJ MASI ŠTAKORA

Izračunati omjeri mase jetre prema ukupnoj masi štakora kod eksperimentalnih životinja imaju slijedeću dinamiku:

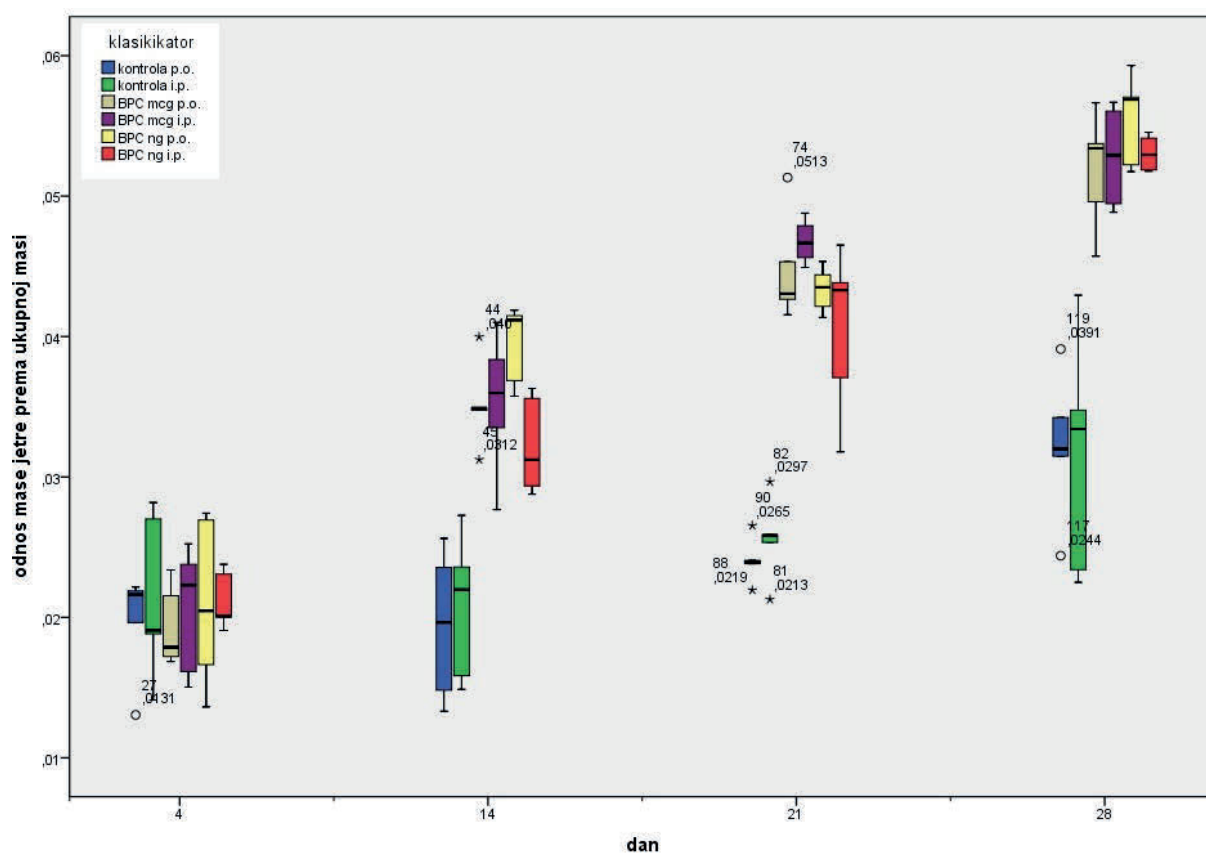
- štakori žrtvovani 14. dana, osim štakora kontrolne grupe koji su pili vodu za piće, imaju u prosjeku više vrijednost omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, za razliku od štakora kontrolnih grupa koji imaju u prosjeku veću vrijednost bilirubina u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan
- štakori žrtvovani 21. dana imaju u prosjeku više vrijednost omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. i 14. dan
- štakori žrtvovani 28. dana imaju u prosjeku više vrijednost omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. , 14. i 21. dan

Navedena dinamika prisutna je kod svih štakora (kontrola i BPC), s tim da štakori tretirani BPC-om postižu u prosjeku više vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora nego štakori kontrolnih grupa žrtvovani isti dan. Statistički je provjereno da li je razlika postignutih vrijednosti slučajna.

Tablica 40 prikazuje statistiku (C, n, Q1, Q3, raspon) vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora. Prikazani su rezultati za svih 24 grupe, prema danu žrtvovanja, vrsti apliciranog sredstva (0,9% NaCl = kontrola, BPC mcg = mikrogrami BPC, BPC ng = nanogrami BPC) i načinu aplikacije (i.p. = intra peritonealno, p.o. = per os). Slika 25 prikazuje iste podatke grafički box plot dijagramom.

Tablica 40. statistika omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora prema ispitivanim grupama

GRUPA	n	C	Q1	Q3	raspon (min-max)	
4. dan BPC i.p. mcg	5	0,022	0,016	0,025	0,015	0,025
4. dan BPC i.p. ng	5	0,020	0,020	0,023	0,019	0,024
4. dan BPC p.o. mcg	5	0,018	0,017	0,022	0,017	0,023
4. dan BPC p.o. ng	5	0,020	0,015	0,027	0,014	0,027
4. dan kontrola i.p.	5	0,019	0,016	0,028	0,014	0,028
4. dan kontrola p.o.	5	0,022	0,016	0,022	0,013	0,022
14. dan BPC i.p. mcg	5	0,036	0,031	0,040	0,028	0,041
14. dan BPC i.p. ng	5	0,031	0,029	0,036	0,029	0,036
14. dan BPC p.o. mcg	5	0,035	0,033	0,037	0,031	0,040
14. dan BPC p.o. ng	5	0,041	0,036	0,042	0,036	0,042
14. dan kontrola i.p.	5	0,022	0,015	0,025	0,015	0,027
14. dan kontrola p.o.	5	0,020	0,014	0,025	0,013	0,026
21. dan BPC i.p. mcg	5	0,047	0,045	0,048	0,045	0,049
21. dan BPC i.p. ng	5	0,043	0,034	0,045	0,032	0,047
21. dan BPC p.o. mcg	5	0,043	0,042	0,048	0,042	0,051
21. dan BPC p.o. ng	5	0,044	0,042	0,045	0,041	0,045
21. dan kontrola i.p.	5	0,026	0,023	0,028	0,021	0,030
21. dan kontrola p.o.	5	0,024	0,023	0,025	0,022	0,027
28. dan BPC i.p. mcg	5	0,053	0,049	0,056	0,049	0,057
28. dan BPC i.p. ng	5	0,053	0,052	0,054	0,052	0,055
28. dan BPC p.o. mcg	5	0,053	0,048	0,055	0,046	0,057
28. dan BPC p.o. ng	5	0,057	0,052	0,058	0,052	0,059
28. dan kontrola i.p.	5	0,033	0,023	0,039	0,022	0,043
28. dan kontrola p.o.	5	0,032	0,028	0,037	0,024	0,039



Slika 25. box plot grafikon omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora prema ispitivanim grupama

Vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora u ispitivanim grupama (24 grupe) su različite, a statistički se provjerilo da li je razlika slučajna.

1. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera svih ispitivanih grupa** (24 grupe):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=106,16$ i $df=23$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

2. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 4. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=0,92$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,969$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

3. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=22,89$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

4. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=22,47$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

5. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera svih ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 28. dan** (6 grupa):

H0: štakori iz tretiranih i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih grupa (tretiranih i kontrolnih) statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=20,45$ i $df=5$) pokazao je značajnost $P=0,001$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 41 na slijedećoj stranici sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja za vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora svih ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 41. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u omjerima mase jetre prema ukupnoj masi štakora svih ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4. , 14., 21. i 28.	120	106,16	23	0,000	H1
4.	30	0,92	5	0,969	H0
14.	30	22,89	5	0,000	H1
21.	30	22,47	5	0,000	H1
28.	30	20,45	5	0,001	H1

6. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 14. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

7. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 21. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=0,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

8. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera razlike između štakora kontrolne i BPC grupe žrtvovanih 28. dan** (2 grupe):

H0: štakori iz BPC i kontrolnih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz BPC i kontrolnih grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora.

Test značajnosti: Mann - Whitney U test ($U=10,00$ $n_{kont}=10$, $n_{BPC}=20$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

Tablica 42 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Mann - Whitney testiranja za vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora između štakora kontrolne i BPC grupe prema danu žrtvovanja.

Tablica 42. Rezultati Mann - Whitney testiranja razlike u omjerima mase jetre prema ukupnoj masi štakora između štakora kontrolne i BPC grupa štakora prema danu žrtvovanja

GRUPA (dani)	n	U	nkont	nBPC	p	Hipot.
14.	30	0,00	10	20	0,000	H1
21.	30	0,00	10	20	0,000	H1
28.	30	0,00	10	20	0,000	H1

9. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera svih BPC ispitivanih grupa štakora** (16 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=73,59$ i $df=15$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

10. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan** (12 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=51,55$ i $df=11$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

11. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 21. i 28. dan** (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=29,72$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

12. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa štakora žrtvovanih 14. i 21. dan** (8 grupa):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=28,56$ i $df=7$) pokazao je značajnost $P=0,000$ što zahtijeva odbacivanje nul hipoteze i prihvatanje alternativne.

13. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa**

štakora žrtvovanih 14. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=7,70$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,052$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

14. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa**

štakora žrtvovanih 21. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=6,68$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,08$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

15. Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora - **provjera BPC ispitivanih grupa**

štakora žrtvovanih 28. dan (4 grupe):

H0: štakori iz BPC tretiranih grupa s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pripadaju istoj populaciji, tj. utvrđena razlika je slučajna.

H1: štakori iz različitih BPC grupa statistički se značajno razlikuju s obzirom na vrijednosti omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora, odnosno barem jedna promatrana grupa ne pripada istoj populaciji sa ostalim grupama.

Test značajnosti: Kruskal - Wallis H test ($H=2,44$ i $df=3$) pokazao je značajnost $P=0,486$ što zahtijeva prihvatanje nul hipoteze i odbacivanje alternativne.

Tablica 43 sumarno prikazuje rezultate provedene statističke analize Kruskal - Wallis testiranja razlike u omjerima mase jetre prema ukupnoj masi štakora BPC ispitivanih grupa štakora, prema danu žrtvovanja.

Tablica 43. Rezultati Kruskal - Wallis testiranja razlike u omjerima mase jetre prema ukupnoj masi BPC ispitivanih grupa štakora prema danu žrtvovanja

BPC GRUPA (dani)	n	H	df	p	Hipot.
4., 14., 21. i 28.	80	73,59	15	0,000	H1
14., 21. i 28.	60	51,55	11	0,000	H1
21. i 28.	40	29,72	7	0,000	H1
14. i 21.	40	28,56	7	0,000	H1
14.	20	7,70	3	0,052	H0
21.	20	6,68	3	0,083	H0
28.	20	2,44	3	0,486	H0

6. RASPRAVA

Za istraživanje je kao regenerativni faktor odabran pentadekapeptid BPC 157, opsežno proučavan polipeptid, uglavnom istraživanjima na eksperimentalnim životinjama, najčešće na štakoru, što ima nekoliko nedostataka kada se rezultati žele translirati u humanu medicinu. Iz razumljivih etičkih razloga, koriste se uzorci sa ograničenim (malim) brojem životinja, što generira određeni stupanj nepouzdanosti statističkog zaključivanja, ali i vjerojatnost da se rijetki događaji (ekstremi) uopće ne pojave, a time i ne registriraju ili ako se i pojave (i registriraju), obično se odbacuju kao greške mjerenja, iako oni mogu predstavljati vrlo značajna otkrića, pa se moderna teorija i praksa analize podataka udaljava od statistike u smjeru rudarenja podataka (data mining), što naravno zahtijava potpuno drugačije modelirana istraživanja. Drugi problem predstavlja činjenica da metabolizam i biologija štakora i čovjeka nisu identični, a u nekim slučajevima primjenjene nokse su često izrazito ekstenzivnog intenziteta, kakav se često ne događa u prirodi. U istraživanjima se najčešće izolirano prati nekoliko parametara, iako su biološki modeli sve samo ne mono, bi, tri ili oligovarijantni, već multivarijantni, pa promjene nekog parametra često izazivaju kompenzacijske mehanizme i promjene u brojnim mehanizmima koji nekim oblikom (pozitivne ili negativne sprege) djeluju na praćeni parametar ili izazivaju promjene koje se uopće ne prate (i ne registriraju) istraživanjem. Navedena problematika nije specifična za proučavanje BPC 157, već je to univerzalni problem svih eksperimentalnih istraživanja.

U provedenom istraživanju cilj je bio utvrditi, da li je nakon resekcije jetre, njezin oporavak potpomognut sa BPC 157 učinkovitiji u odnosu na spontani, te ako je, da li je učinkovitost BPC 157 ovisna o dozi, načinu aplikacije i trajanju primjene. Spontani oporavak ostane jetre nije bio predmet istraživanja. Za istraživanje je odabran animalni model i to standardna dvotrećinska parcijalna (70%) resekcija jetre štakora, jer je ona prihvaćeni model za istraživanje postresekcijske regeneracije jetre (101,107,112,119) i jer se izvodi jednostavno (108,112), za razliku od suptotalne (90 -97%) resekcije koja je model za insuficijenciju jetrenog ostatka (111). Shodno navedenom i izvorni prijedlog naziva dizertacije bio je „Učinak pentadekapeptida BPC 157 na 70 postotnu resekciju jetre u štakora“ ali je na sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj 15. prosinca 2014. godine, promijenjen naslov disertacije u „Učinak pentadekapeptida BPC 157 na regeneraciju jetre štakora nakon subtotalne resekcije“, što formalno ne odgovara učinjenoj resekciji.

Za procjenu oporavka jetre korištene su varijable temeljene na vrijednostima iz seruma (albumin, ALT, AST i bilirubin), makroskopskim parametrima (ukupna tjelesna masa, masa ostatne jetre i njihov omjer) i morfometrijskim histopatološkim parametrima (površina hepatocita i promjer jezgre hepatocita) kako je navedeno u poglavlju MATERIJALI I METODE. Pri tome se kao znak oporavka jetre uzimao pad vrijednosti ALT-a, AST-a i bilirubina, porast vrijednosti albumina, mase ostatne jetre, ukupne tjelesne mase i omjera mase jetre prema ukupnoj tjelesnoj masi, dok su morfometrijski parametri trebali poslužiti u procjeni intrinzičkih zbivanja (porast površine hepatocita kao mjera hipertrofije, a porast promjera jezgre hepatocita kao mjera hiperplazije). Pretraživanjem literature nisu nađene referentne vrijednosti za Wistar štakore, osim krivulje rasta ukupne tjelesne mase, a također je utvrđeno da drugi autori nisu koristili albumine i koagulaciju za provjeru sintetske funkcije jetre.

Reskcija jetre izvedena je preporučenim načinom (vessel oriented approach, en bloc resekcija) (107–109,112), ligiranjem vaskularno - bilijarne peteljke za srednji režanj i lijevi lateralni režanj, čime je postignuta dvotrećinska (70%) resekcija jetre, ali klasičnom, a ne mikrokirurškom tehnikom (107–109,112) jer je za potonju potrebna adekvatna oprema i izobrazba operatera što u trenutku izvođenja istraživanja nije bilo dostupno. Sve su životinje preživjele resekciju (after surgery survival rate = 100%) i ušle u postupak istraživanja. Niti kod jedne životinje nije tijekom resekcijskog zahvata bilo intraoperacijskog krvarenja, niti je kasnije tijekom žrtvovanja nađen ascites.

Dosadašnjim istraživanjima (10,101,108,112) na ostatnoj jetri štakora nakon 70% resekcije, praćena je regeneracija unutar prvih 6 i 48 sati (101), odnosno prva tri tjedna (10,108,112), te je utvrđeno je da 24 sata od zahvata, masa ostatne jetre dostiže 45%, a za 72 sata 70% mase intaktne jetre. Između 7. i 14. dana ostatna jetra ima 93% mase prijeresekcijske jetre, a nakon 3 tjedna (20 dana) masa je u cijelosti vraćena na vrijednost prije resekcije, odnosno da se jetra najbrže obnavlja između 2. i 7. dana. Iz tog razloga, prvotno dizajnirano istraživanje formirano je u skladu sa dosad objavljenim rezultatima obnove mase jetre i pretpostavljalo je žrtvovanje životinja 0. (24 sata), 4., 7., 14., 21. i 28. dan. Kako za korišteni soj štakora (muških Wistar štakori mase 200 gr.) nije u dostupnoj literaturi nađena ekvivalentna dinamika za jetrene metabolite (albumin, transaminaze, bilirubin), niti referentne vrijednosti praćenih varijabli za zdrave životinje (postoji istraživanje (119) na muškim Wistar štakorima kojima je učinjena 70% i 85% resekcije jetre, ali mase 200 – 250 gr. i koji su žrtvovani 24 sata po resekciji), neovisno o ovom istraživanju bilo je predviđeno žrtvovanje 20 jedinki (muški Wistar štakori mase 200 gr.) kako bi se formirale referentne vrijednosti za masu intaktne jetre

(107) i ostale promatrane varijable. Međutim prilikom javne rasprave o prijedlogu doktorskog rada održane 22. travnja 2013. godine, na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, odlukom nadležnog povjerenstva određeno je da se radi smanjenja broja usmrćenih životinja, ukinu žrtvovanja 0. i 7. dan, pa nije niti zatražena dozvola za žrtvovanje zdravih životinja. Isključenjem grupe 0. i 7. dan onemogućeno je praćenje dinamike promjena u periodu kada su one u ostatnoj jetri najintenzivnije. Kako je odlukom povjerenstva promijenjena prvotna koncepcija istraživanja, u dizajnu i izvođenju istraživanja potkrala su se dva propusta - životinjama prije resekcije nisu izmjerene vrijednosti albumina, transaminaza i bilirubina čime bi se praktički dobile referentne vrijednosti zdravih životinja. Također prilikom resekcije nisu mjerene mase odstranjenih (reseciranih) režnjeva jetre, čime se doduše ne bi dobile referentne vrijednosti za masu jetre, (eventualno se može procjenti masa jetre prema masi resektata i poznatom udjelu reseciranih režnjeva u ukupnoj masi jetre (101,109), ali bi se moglo usporediti porast mase ostatne jetre sa masom odstranjenih režnjeva intaktne jetre. Shodno navedenom, uspješnost oporavka jetre, mogla se uspoređivati samo između eksperimentalnih grupa međusobno, ali ne i u odnosu na zdrave životinje. Kriterij za odabir životinja koje su korištene u istraživanju bila je ukupna tjelesna masa (200 g), pa su u istraživanje su uključene životinje različite starosti (6-7 tjedana), međutim dob životinja nije korištena kao parametar u istraživanju, iako je kod starijih štakora utvrđeno da nakon resekcije jetre imaju smanjenu sekreciju žuči, smanjenu sintezu žučnih kiselina i proteina akutne faze u odnosu na mlađe štakore (100,101).

Sve eksperimentalne grupe (ukupno 24), formirane su kao nezavisni uzorci sa po 5 štakora, što sa stanovišta statističke analize predstavlja male uzorke, a taj je problem prisutan i kod drugih istraživača (107). Negativan utjecaj malih uzoraka na donošenje zaključaka dolazi do izražaja pogotovo u situacijama kada je istovremeno prisutno i raspršenje rezultata, što za posljedicu ima, da unatoč vidljivim razlikama u izmjerenim vrijednostima različitih grupa, ta razlika nije statistički značajna iako možda (ili vjerojatno) postoje stvarne razlike između grupa. U provedenom istraživanju takav utjecaj vidljiv je pri analizi albumina (neovisnost učinka BPC-a o trajanju primjene nakon 4. dana), ALT-a (izostanak pojave učinka primjene BPC-a prije 14. dana), te ukupne tjelesne mase (ovisnost učinka BPC-a o dozi i načinu aplikacije prvih 4 dana) - detaljna rasprava za svaku mjerenu varijablu prikazana je kasnije u odgovarajućem potpoglavlju.

Uzimanje uzoraka za analizu vršilo se neposredno prije (krv za laboratorijsku analizu, mjerenje ukupne tjelesne mase), odnosno neposredno po žrtvovanju životinja (uzimanje tkiva za patohistološku analizu, mjerenje mase ostatne jetre). Shodno tome su se i promjene

vrijednosti praćenih varijabli naglašeno diskretne, odnosno mogle su se registrirati tek u trenutku žrtvovanja, koji se i navodi kao dan utvrđivanja promjene, iako su stvarne promjene mogle nastupiti i ranije u bilo kojem trenutku ili kontinuirano tijekom intervala između dva žrtvovanja. U provedenom istraživanju takav utjecaj vidljiv je pri analizi albumina, ALT-a, AST-a i bilirubina (manifestan skok u učinkovitosti BPC-a 14. dan), te ukupne tjelesne mase (ovisnost učinka BPC-a o dozi i načinu aplikacije prvih 4 dana) - detaljna rasprava za svaku mjerenu varijablu prikazana je kasnije u odgovarajućem potpoglavlju.

Histološka analiza bazirala se na morfometrijskoj analizi površine hepatocita i promjera njihove jezgre standardno bojenih preparata (hemalaun eozin), u svrhu detekcije mehanizma jetrene regeneracije, za razliku od drugih radova gdje su analizirane patološke promjene. Pri tome je uočeno da se obje varijable ponašaju na vrlo sličan intermitentan način, tj. da kod svih štakora izmjerene vrijednosti padaju između 4. i 14. dana žrtvovanja, potom rastu između 14. i 21. dana, a zatim opet padaju između 21. i 28. dana, uz napomenu da za razliku od površine hepatocita, analiza promjera jezgri hepatocita nije utvrdila statistički značajne razlike između BPC tretiranih i netretiranih životinja. Kako je već vizualnom usporedbom dinamike promjena (slika 17, slika 18, slika 19, slika 20, slika 21, slika 22, slika 23) u vrijednostima površine hepatocita i promjera njihove jezgre s jedne strane, te biokemijskih markera i mase jetre s druge strane jasno vidljivo da nema sličnosti u trendu promjena, nije niti rađena korelacijska analiza između navedenih varijabli. Istraživanjem nije razriješen mehanizam oporavka jetre (hipertrofija ili hiperplazija), jer histološko-morfometrijska metoda očigledno nije adekvatan izbor. Detaljna rasprava o površini hepatocita i promjeru njihove jezgre prikazana je kasnije u odgovarajućim potpoglavljima.

Statističkom obradom praćenih varijabli utvrđeno je pozitivno djelovanje BPC-a na oporavak ostatne jetre, te također i neovisnost učinka BPC-a o dozi (mikrogrami ili nanogrami) i načinu aplikacije (peroralno ili intraperitonealno), dok je utjecaj duljine primjene BPC-a na postignute učinke različito izražen kod različitih varijabli.

Parametrima (varijablama) mjerenim u istraživanju nije bilo moguće utvrditi kojim mehanizmom BPC djeluje. Većina autora se slaže da je temeljni patofiziološki mehanizam oštećenja u jetrenom ostatku (FLR) nakon resekcije uzrokovan infuzijsko - perfuzijskom ozljedom sa razvojem staničnog oksidativnog stresa (101,107,108,112,114) Biokemijske markere tog stresa (101,107) kao npr. omjer intracelularnog glutationa (GSH / GSSG), saturaciju kisika u hepatalnoj veni (ShvO₂), nismo određivali, jer nismo imali na raspolaganju adekvatnu opremu (kromatograf (HPLC High Performance Liquid Chromatography) za mjerenje GSH i GSSG, odnosno plinski analizator za mjerenje ShvO₂). Temeljem navedenog

ne znamo da li hepatoprotektivni učinak BPC-a djeluje putem smanjenja oksidativnog stresa. Međutim navedeni biokemijski parametri kao npr. smanjena ekskrecija reduciranog glutatona (GSH) iz jetre ili porast saturacije kisika u hepatalnoj veni ($ShvO_2$) mogu biti i direktna posljedica smanjenja jetrene mase tj. broja hepatocita, a ne nužno mjera njihovog oksidativnog stresa.

POZITIVAN UČINAK BPC-a NA OPORAVAK OSTATNE JETRE

Analizirajući vrijednosti albumina, ALT-a, mase ostane jetre, ukupne tjelesne mase i omjera mase jetre prema ukupnoj masi, te površine hepatocita, vidljivo je da kod svih životinja dolazi do oporavka jetre, međutim da primjena BPC-a ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate, nego spontani oporavak (postoje statistički značajne razlike). Pri tome je djelovanje BPC-a vidljivo (ovisno o praćenom parametru) već u grupama životinja žrtvovanih 4. dan (albumin, ukupna tjelesna masa štakora, površina hepatocita), odnosno u grupama životinja žrtvovanih 14. dan (ALT, masa ostatne jetre, omjer mase jetre prema ukupnoj masi). Kako nema referentnih vrijednosti mase jetre za muške Wistar štakore mase 200 g, a prilikom resekcije nisu mjerene mase odstranjenih (reseciranih) režnjeva jetre, nije bilo moguće usporediti rezultate sa dinamikom oporavka mase ostatne jetre opisne u dosadašnjim istraživanjima (10,108,112). Kada se pak uspoređuje dostignuta ukupna tjelesna masa životinja (uz napomenu da kod nijedne životinje nije utvrđen ascites), sa prije resekcijskim vrijednostima (sve korištene životinje su imale 200 gr), gotovo sve životinje žrtvovane 14. dan dostižu prijeresekcijske vrijednosti. Kako su u istraživanje ušle životinje različite dobi (između 6 i 7 tjedana), a dob životinja nije korištena kao parametar u istraživanju, prirast (oporavak) tjelesne mase ne može se točno uspoređivati sa krivuljom prirasta tjelesne mase zdravih životinja (Slika 36, poglavlje RASPRAVA: ukupna tjelesna masa štakora), međutim u grubo je vidljivo da BPC tretirane životinje u trenutku žrtvovanja ne dostižu ukupnu tjelesnu masu zdravih životinja slične dobi.

Analizirajući pak vrijednosti AST-a i bilirubina utvrđeno je da jedino kod životinja tretiranih sa BPC-om dolazi do oporavka jetre za razliku od ne tretiranih životinja kod kojih ne dolazi do spontanog oporavka. Pri tome je djelovanje BPC-a vidljivo (ovisno o praćenom parametru) u grupama životinja žrtvovanih 4. dan (AST), odnosno u grupama životinja žrtvovanih 14. dan (bilirubin). Međutim u istraživanju provedenom na muškim Wistar štakorima mase 200 – 250 gr. nakon 70% resekcije, koji su žrtvovani 24 sata po resekciji, serumske vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina bile su nesignifikantno povišene, dok su vrijednosti ALT, AST i ALP signifikantno povišene (razina značajnosti 95%) u resekcijskoj grupi u odnosu na kontrolnu (placebo kirurški zahvat) (119). Kako u našem radu nema grupe 24 sata ne možemo usporediti rezultate, ali je vrijednost bilirubina u kontrolnoj grupi (ekvivalent eksperimentalnoj grupi u navedenom istraživanju) bila trajno povišena i nije dolazilo do sniženja vrijednosti.

Analizirajući vrijednosti veličine jezgri hepatocita ne mogu se utvrditi statistički značajne razlike između BPC tretiranih i ne tretiranih životinja.

NEOVISNOST UČINKA BPC-a O DOZI I NAČINU APLIKACIJE

Analizirajući vrijednosti albumina, AST-a, ALT-a, bilirubina, površine hepatocita, mase ostane jetre, te omjera mase jetre prema ukupnoj masi, učinci primjene BPC-a su jednako izraženi (ne postoje statistički značajne razlike) neovisno o načinu aplikacije ili primjenjenoj dozi, dok se u slučaju analize vrijednosti veličine jezgri hepatocita ne mogu utvrditi statistički značajne razlike između BPC tretiranih i ne tretiranih životinja, pa samim tim niti ovisnost učinaka BPC-a o dozi, načinu ili trajanju aplikacije. Analizirajući ukupnu tjelesnu masu u grupama BPC tretiranih životinja žrtvovanih 4. dan, one koje su BPC primale intraperitonealno u mikrogramskim dozama imaju veću ukupnu tjelesnu masu (postoje statistički značajne razlike), nego one koje su BPC primale peroralno u mikrogramskim dozama ili u nanogramskim dozama neovisno o načinu aplikacije. Međutim kada se analizira omjer mase jetre prema ukupnoj tjelesnoj masi ili uspoređuju vrijednosti dostignute tjelesne mase između BPC tretiranih štakora žrtvovanih 4. dan, samo prema načinu aplikacije (intraperitonealno ili peroralno), odnosno samo prema dozi (mikrogrami BPC ili nanogrami BPC) sa vjerojatnošću većom od 95% nema statistički značajne razlike (tablica 39), pa su predhodno navedene razlike najvjerojatnije posljedica načina na koji je dizajnirano istraživanje kako je već navedeno.

Iz gore navedenog može se zaključiti (čak i uz sva ograničenja vezana za dizajn istraživanja) da su učinci primjene BPC-a jednako izraženi neovisno o načinu aplikacije ili primjenjenoj dozi, te bi se isti rezultati postigli aplikacijom BPC-a per os u nanogramskim dozama. Tim pristupom pojednostavljuje se eksperimentalni model (nema potrebe za intra peritonealnim injekcijama) i smanjuje se broj eksperimentalnih grupa na dvije (BPC nanogrami per os i kontrola per os), čime se sa istim ili manjim brojem životinja može formirati bolji statistički model.

OVISNOST UČINKA BPC-a O TRAJANJU PRIMJENE

Ovisnost učinka BPC-a o trajanju primjene je različito izražena kod različitih varijabli. Analizirajući vrijednosti albumina, ALT-a, AST-a, bilirubina, mase ostane jetre, ukupne tjelesne mase štakora i omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora vidljivo je da je pozitivan učinak BPC-a proporcionalan trajanju aplikacije, dok se međutim analizom vrijednosti veličine jezgri hepatocita i površine hepatocita ne mogu se utvrditi ovisnosti učinka BPC-a o trajanju primjene. Prilikom analize vrijednosti mase ostane jetre utvrđeno je da je učinak BPC-a proporcionalan duljini primjene (životinje žrtvovane kasnije postižu veće vrijednosti) tijekom cijelog trajanja istraživanja, dok se analizirajući vrijednosti ukupne tjelesne mase štakora pokazalo da je proporcionalnost vidljiva unutar prvih 21 dan (životinje žrtvovane 28. dan postižu iste vrijednosti kao i životinje žrtvovane 21. dan, naravno unutar statističke greške). Shodno navedenom razumljivo je da i analiza omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora pokazuje također učinak BPC-a koji je proporcionalan duljini primjene tijekom cijelog trajanja istraživanja. Analizirajući vrijednosti albumina, ALT-a, AST-a i bilirubina učinak BPC-a je proporcionalan duljini primjene samo unutar prvih 14 dana (životinje žrtvovane kasnije tj. 21. i 28. dan, postižu unutar statističke greške iste vrijednosti kao i životinje žrtvovane 14. dan), unatoč vidljivom blažem porastu ALT (slika 18) i AST (slika 19) kod životinja žrtvovanih nakon 14. dana, ta razlika nije statistički značajna, iako možda postoje stvarne razlike što je može biti posljedica utjecaja malih uzoraka na statističku analizu. Detaljna rasprava za svaku mjerenu varijablu prikazana je kasnije u odgovarajućem podpoglavlju na slijedećim stranicama.

Tablica 44 sumarno prikazuje učinke BPC 157 na oporavak ostatne jetre prema praćenim parametrima i ciljevima istraživanja.

Tablica 44. sumarni učinaka BPC-a po praćenim varijablama na temelju statičke značajnosti

varijabla	učinak BPC-a na oporavak jetre			
	izraženiji nego spontani	manifestni dan žrtvovanja	korelacija sa trajanjem primjene	ovisnost o dozi ili načinu primjene
albumin (↑↑)	da	4.	~ do 14.dan ⁴	ne
AST (↓↓)	da ¹	4. ¹	~ do 14.dan ⁴	ne
ALT (↓↓)	da	14.	~ do 14.dan ⁴	ne
bilirubin (↓↓)	da ¹	14. ¹	~ do 14.dan ⁴	ne
ukupna tjelesna masa (↑↑)	da	4.	~ do 21.dan ⁵	da ²
masa ostatne jetre (↑↑)	da	14.	~ ⁶	ne
omjer mase jetre i tijela (↑↑)	da	14.	~ ⁶	ne
površina hepatocita (↑↓)	da	4.	ne	ne
promjer jezgre hepatoc. (↑↓)	ne ³	ne ³	ne ³	ne ³

(↑↑) porast

(↓↓) pad

(↑↓) promjena

¹ ne dolazi do spontanog oporavaka

² vjerojatno uzrokovano malim uzorcima

³ između životinja žrtvovanih isti dan (BPC i kontrola) ne postoje statistički značajne razlike

⁴ razlike između BPC tretiranih životinja žrtvovanih 14, 21. i 28. dan nisu statistički značajne

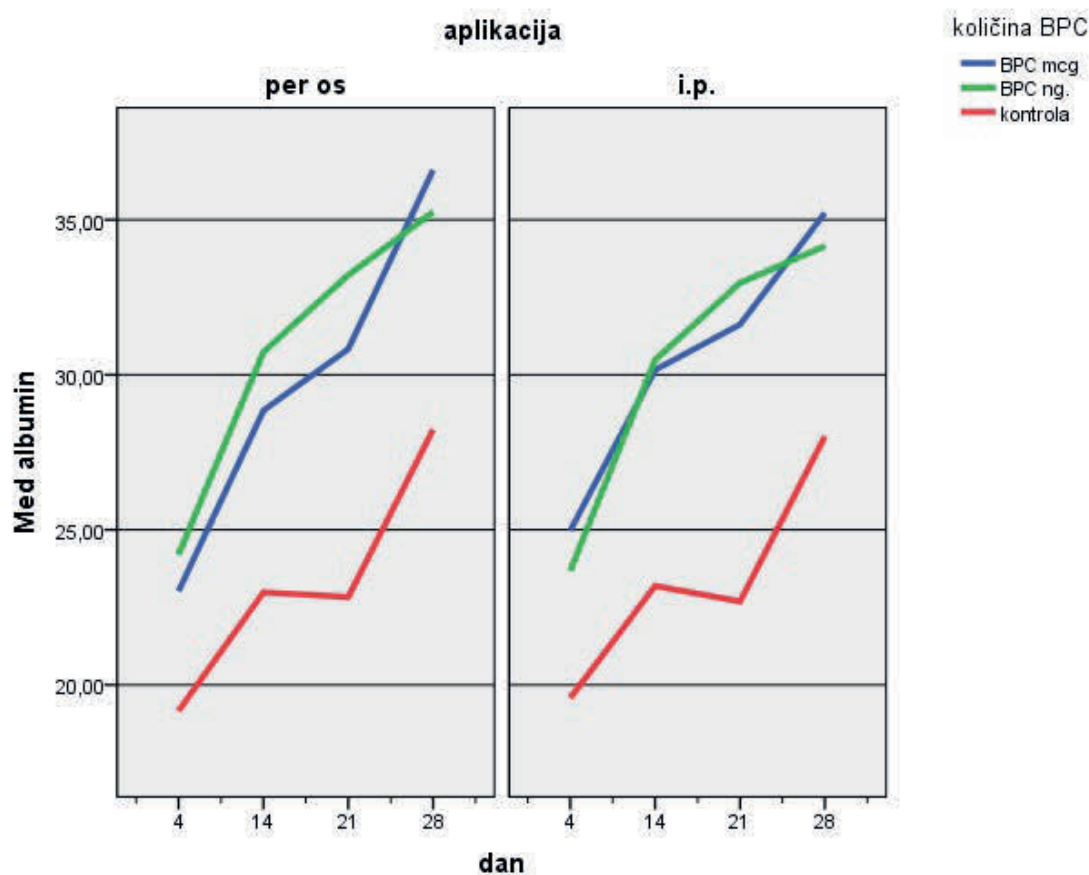
⁵ razlike između BPC tretiranih životinja žrtvovanih 21. i 28. dan nisu statistički značajne

⁶ proporcionalnost do kraja istraživanja

Albumin

Koncentracija albumina (g/lit) je korištena kao biokemijsko - laboratorijski pokazatelj sintetske funkcije hepatocita.

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 5, box plot grafikon slika 17) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: ALBUMIN ŠTAKORA), vidljivo je da se koncentracija albumina kod BPC tretiranih štakora kontinuirano povećava vremenom, dok kod štakora kontrolne grupe između 14. i 21. dana žrtvovanja dolazi prolaznog pada, što također ilustrira i slika 26 koja prikazuje medijane koncentracije albumina (g/lit) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 26. grafikokon medijana koncentracije albumina (g/lit) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: albumin štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije albumina kod štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih isti dan (tablica 6). Iako kod svih štakora (osim kontrolne grupe žrtvovane 21. dana) dolazi do porasta koncentracije albumina, štakori iz kontrolnih grupa (kod kojih dolazi do spontanog oporavka) imaju manje povećanje koncentracije albumina (niže vrijednosti albumina) u odnosu na štakore BPC grupa (više vrijednosti albumina) koji su žrtvovani isti dan. Ta razlika je statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95% i vidljiva je u svim grupama (štakori žrtvovani 4., 14., 21. i 28. dan), neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 7), što ukazuje da BPC ima pozitivan učinak na oporavak sintetske funkcije jetre koji je vidljiv već od 4. dana. Kako svrha istraživanja nije bila spontani oporavak jetre nakon 70% resekcije, razlike između pojedinih kontrolnih grupa nisu analizirane.

Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije albumina kod štakora različitih BPC grupa, dok međutim između štakora BPC grupa koje su žrtvovane nakon 4. dana (14., 21. i 28. dan) bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC-a (mikrogrami ili nanogrami) nema statistički značajne razlike, unatoč tome što su prosječne vrijednosti (medijani) koncentracije albumina (slika 26) više u BPC grupama štakora koje su kasnije žrtvovane (tablica 8), što može biti posljedica malih ispitivanih uzoraka, sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te jakog raspršenja rezultata (tablica 5, box plot grafikon slika 17), a ne stvarnog stanja. Statistički značajna razlika u koncentraciji albumina, sa vjerojatnošću većom od 95%, postoji jedino kod štakora BPC grupa koje su žrtvovane 4. dan (niže vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa koje su žrtvovane 14., 21. i 28. dan (više vrijednosti) neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 9), što upućuje da glavni učinak BPC-a nastaje unutar 14 dana od resekcije, a možda i kraće, ali to nije moguće utvrditi radi načina na koji je dizajnirano istraživanje (poglavlje RASPRAVA).

Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

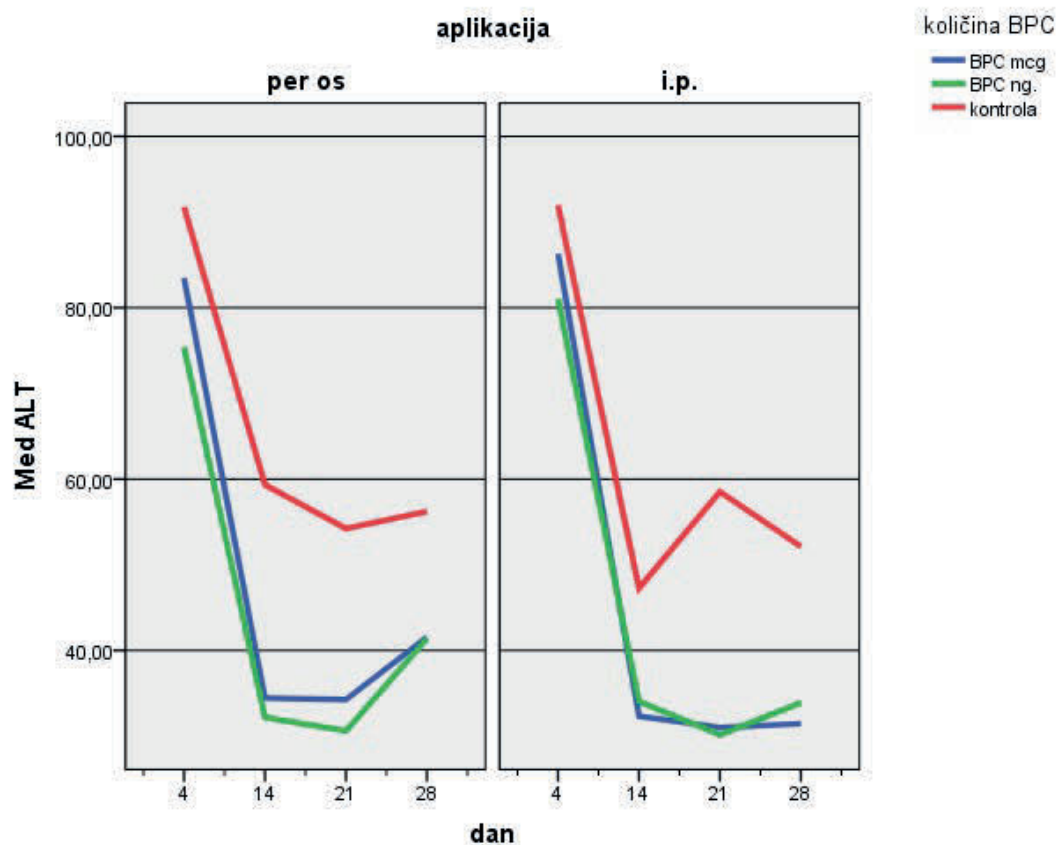
- oporavak sintetske funkcije jetre (izražen koncentracijom albumina) nakon 70% resekcije kod štakora se događa kod svih životinja (spontano ili potpomognuto sa BPC)
- BPC ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate oporavka sintetske funkcije ostatne jetre, nego spontani oporavak

- učinak BPC je u istraživanim uzorcima manifestan je već 4. dana, ali je najjače izražen između 4. i 14. dana od resekcije
- djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)

ALT

Koncentracija ALT (IU/lit) je korištena (zajedno sa ukupnim bilirubinom i AST-om) kao biokemijsko - laboratorijski marker oštećenja hepatocita.

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 10, box plot grafikon slika 18) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: ALT ŠTAKORA), vidljivo je da se koncentracija ALT-a kod svih štakora značajno smanjuje između 4. i 14. dana žrtvovanja, ali jače kod BPC tretiranih štakora (promjene kod BPC tretiranih štakora između 14. i 28. dana žrtvovanja su unutar statističke greške). Isto također ilustrira i slika 27 koja prikazuje medijane koncentracije ALT (IU/lit) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 27. grafikokon medijana koncentracije alanin aminotransferaze - ALT (IU/lit) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: ALT štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije alanin aminotransferaze (ALT) kod štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (tablica 11). Međutim između grupa štakora žrtvovanih 4. dan nema statistički značajne razlike u koncentraciji ALT-a, bez obzira pripadaju li kontrolnoj ili BPC grupi (tablica 11), unatoč tome što su prosječne vrijednosti (medijani) koncentracije ALT-a (slika 27) niže u BPC grupama štakora u odnosu na štakore kontrolnih grupa (tablica 10), što upućuje da unutar prvih 4. dana od 70% resekcije jetre kod štakora, BPC nema utjecaja na smanjenje oštećenja hepatocita, uz napomenu da se radi o malim ispitivanim uzorcima sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te raspršenja rezultata (tablica 10, box plot grafikon slika 18). Kod svih štakora značajno se smanjuje koncentracije ALT-a nakon 4. dana žrtvovanja, s tim da štakori iz kontrolnih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan imaju manje sniženje koncentracije ALT (više vrijednosti ALT) u odnosu na štakore BPC grupa (niže vrijednosti ALT) koji su žrtvovani isti dan. Ta razlika je statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95%, neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC (tablica 12), što upućuje da nakon 4. dana od početka primjene, BPC ima pozitivan utjecaja na smanjenje oštećenja hepatocita ostatne jetre štakora nakon 70% resekcije. Kako svrha istraživanja nije bila spontani oporavak jetre nakon 70% resekcije, razlike između pojedinih kontrolnih grupa nisu analizirane.

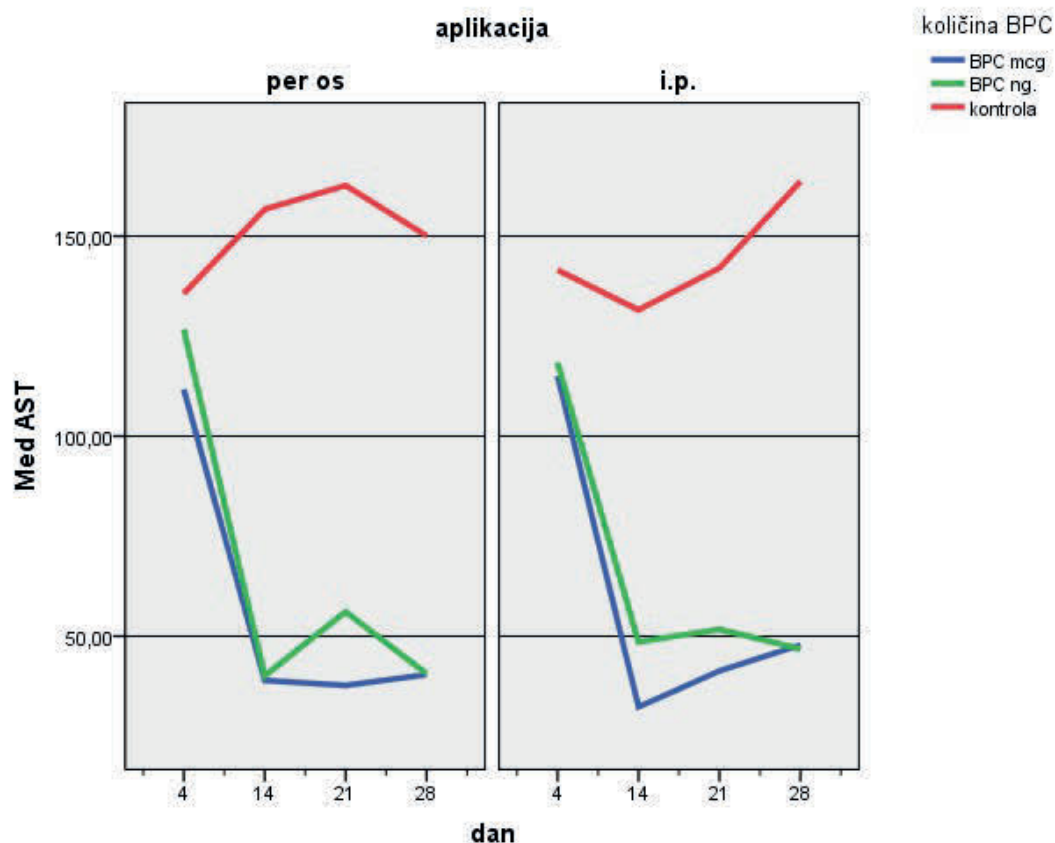
Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije ALT-a kod štakora različitih BPC grupa, dok međutim između štakora BPC grupa koje su žrtvovane nakon 4. dana (14., 21. i 28. dan) bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami) nema statistički značajne razlike (tablica 13), unatoč tome što su prosječne vrijednosti (medijani) koncentracije ALT (slika 27) kod životinja žrtvovanih 28. dan (osim BPC mcg i.p.) veći, u odnosu na životinje žrtvovane 21. dan, uz napomenu da se radi o malim ispitivanim uzorcima, sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te raspršenja rezultata (tablica 10, box plot grafikon slika 18). Statistički značajna razlika u koncentraciji ALT, sa vjerojatnošću većom od 95%, postoji jedino kod štakora BPC grupa koje su žrtvovane 4. dan (više vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa koje su žrtvovane 14., 21. i 28. dan (niže vrijednosti) neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC (tablica 14), što upućuje da glavni hepatoprotektivni učinak BPC-a nastaje između 4 i 14 dana od resekcije, a točan interval nije moguće utvrditi radi načina na koji je dizajnirano istraživanje (poglavlje RASPRAVA).

Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak jetre u smislu zaustavljanja oštećenja hepatocita (izražen koncentracijom ALT-a) nakon 70% resekcije kod štakora se događa kod svih životinja (spontano ili potpomognuto sa BPC)
- unutar prvih 4. dana primjene u istraživanim uzorcima se ne uočava se učinak BPC
- BPC ima hepatoprotektivni učinak i daje bolje rezultate, nego spontani oporavak ostatne jetre
- učinak BPC je u istraživanim uzorcima manifestan između 4. i 14. dana od resekcije
- hepatoprotektivno djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)

AST

Koncentracija AST (IU/lit) je korištena (zajedno sa ukupnim bilirubinom i ALT - om) kao biokemijsko - laboratorijski marker oštećenja hepatocita. Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 15, box plot grafikon slika 19) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: AST ŠTAKORA) vidljivo je da se kod štakora koji su primali BPC koncentracija AST značajno smanjuje između 4. i 14. dana žrtvovanja (promjene između 14. i 28. dana su unutar statističke greške), za razliku od štakora kontrolnih grupa kod kojih ne dolazi do značajnijeg smanjivanja koncentracije AST-a. Isto ilustrira i slika 28 koja prikazuje medijane koncentracije AST (IU/lit) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju linearno).



Slika 28. grafikokon medijana koncentracije aspartat aminotransferaze - AST (IU/lit) u spitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: AST štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije aspartat aminotransferaze (AST) kod štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih isti dan (tablica 16). Štakori iz kontrolnih grupa imaju više vrijednosti AST u odnosu na štakore BPC grupa (niže vrijednosti AST) koji su žrtvovani isti dan. Ta razlika je statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95% i vidljiva je u svim grupama (štakori žrtvovani 4., 14., 21. i 28. dan), neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 17), što ukazuje da BPC djeluje hepatoprotektivno, tim više što kod netretiranih životinja (kontrolne grupe) ne dolazi do značajnijeg smanjivanja koncentracije AST-a. Kako svrha istraživanja nije bila spontani oporavak jetre nakon 70% resekcije, razlike između pojedinih kontrolnih grupa nisu analizirane.

Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije AST kod štakora različitih BPC grupa, dok između štakora BPC grupa koje su žrtvovane nakon 4. dana (14., 21. i 28. dan) bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami) nema statistički značajne razlike (tablica 18), unatoč tome što su prosječne vrijednosti (medijani) koncentracije AST (slika 28) kod životinja žrtvovanih 21. i 28. dan (osim BPC mcg p.o. 21. dan) čak i više u odnosu na životinje žrtvovane 14. dan, uz napomenu da se radi o malim ispitivanim uzorcima, sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te raspršenja rezultata (tablica 15, box plot grafikon slika 19). Statistički značajna razlika u koncentraciji AST-a, sa vjerojatnošću većom od 95%, postoji jedino kod štakora BPC grupa koje su žrtvovane 4. dan (više vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa koje su žrtvovane 14., 21. i 28. dan (niže vrijednosti) neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 19), što upućuje da glavni hepatoprotektivni učinak BPC-a nastaje između 4. i 14. dana od resekcije, a točan interval nije moguće utvrditi radi načina na koji je dizajnirano istraživanje (poglavlje RASPRAVA).

Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

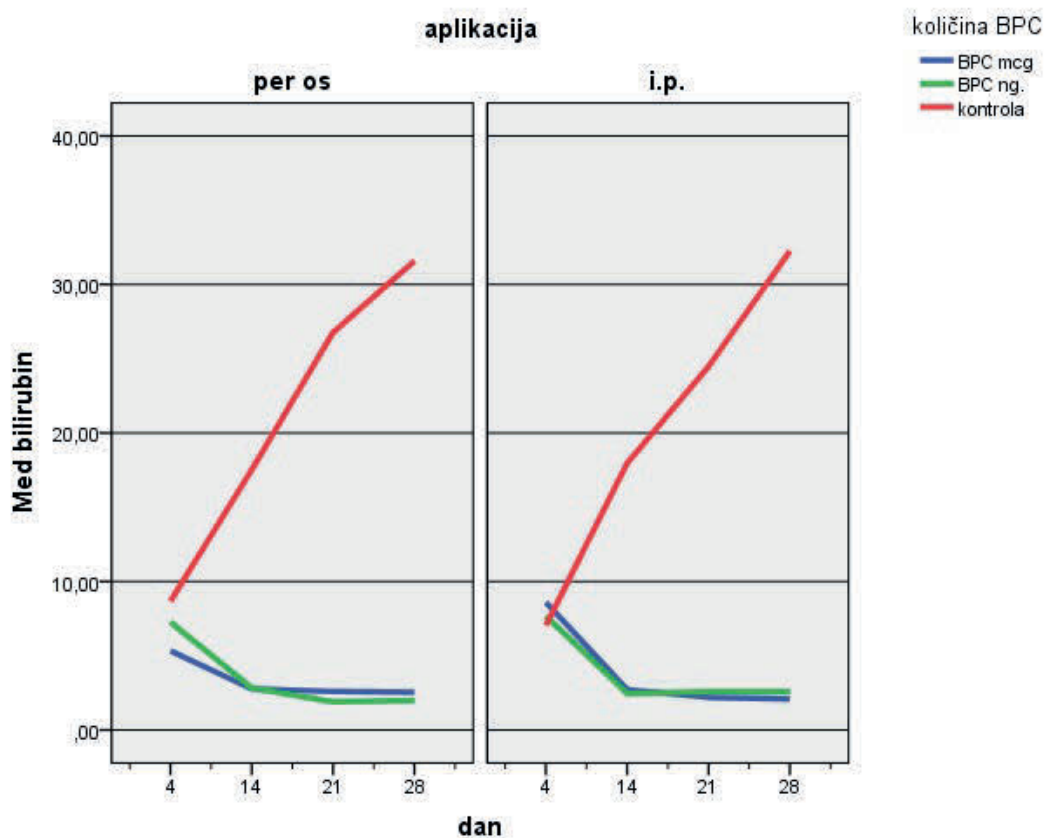
- oporavak jetre u smislu zaustavljanja oštećenja hepatocita (izražen koncentracijom AST-a) nakon 70% resekcije kod štakora, se događa samo kod životinja koje su tretirane BPC-om, dok kod netretiranih životinja ne dolazi do spontanog oporavka
- BPC ima hepatoprotektivni učinak na oporavak ostatne jetre
- učinak BPC je u istraživanim uzorcima manifestan već i 4. dana, ali glavno djelovanje je između 4. i 14. dana od resekcije

- hepatoprotektivno djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma).

Bilirubin

Koncentracija ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) je korištena (zajedno sa AST i ALT) kao biokemijsko - laboratorijski marker oštećenja hepatocita.

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 20, box plot grafikon slika 20) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: BILIRUBIN ŠTAKORA), vidljivo je da kod štakora koji su primali BPC, koncentracija bilirubina značajno smanjuje između 4. i 14. dana žrtvovanja (promjene između 14. i 28. dana su unutar statističke greške), za razliku od štakora kontrolnih grupa kod kojih ne dolazi do smanjivanja već povećanja koncentracije bilirubina. Isto ilustrira i slika 29 koja prikazuje medijane koncentracije ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 29. grafikokon medijana koncentracije ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/lit}$) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: bilirubin štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije ukupnog bilirubina kod štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (tablica 21). Međutim između grupa štakora žrtvovanih 4. dan nema statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnog bilirubina, bez obzira pripadaju li kontrolnoj ili BPC grupi (tablica 21), unatoč tome što su prosječne vrijednosti (medijani) koncentracije bilirubina (slika 29) niže u BPC grupama štakora u odnosu na štakore kontrolnih grupa (tablica 20), što upućuje da unutar prvih 4. dana od 70% resekcije jetre kod štakora, BPC nema utjecaja na smanjenje oštećenja hepatocita, uz napomenu da se radi o malim ispitivanim uzorcima sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te raspršenja rezultata (tablica 20, box plot grafikon slika 20). Nakon 4. dana žrtvovanja (14., 21. i 28. dan) kod štakora iz kontrolnih grupa dolazi do povišenja koncentracije ukupnog bilirubina, za razliku od štakora iz BPC grupa kod kojih dolazi do sniženja koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na štakore koji su žrtvovani 4. dan. Štakori iz kontrolnih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan imaju više vrijednosti koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na štakore BPC grupa koji su žrtvovani isti dan i ta je razlika statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95%, neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 22), što upućuje da nakon 4. dana od početka primjene, BPC ima pozitivan utjecaja na smanjenje oštećenja hepatocita ostatne jetre štakora nakon 70% resekcije. Kako svrha istraživanja nije bila spontani oporavak jetre nakon 70% resekcije, razlike između pojedinih kontrolnih grupa nisu analizirane.

Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između koncentracije ukupnog bilirubina kod štakora različitih BPC grupa, ali između štakora BPC grupa koje su žrtvovane nakon 4. dana (14., 21. i 28. dan) bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami) nema statistički značajne razlike (tablica 23), što je vidljivo i iz prosječnih vrijednosti (medijani) koncentracije ukupnog bilirubina (slika 29). Statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnog bilirubina, sa vjerojatnošću većom od 95%, postoji jedino kod štakora BPC grupa koje su žrtvovane 4. dan (više vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa koje su žrtvovane 14., 21. i 28. dan (niže vrijednosti) neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC (tablica 24), što upućuje da glavni hepatoprotektivni učinak BPC-a nastaje između 4 i 14 dana od resekcije, a točan interval nije moguće utvrditi radi načina na koji je dizajnirano istraživanje (poglavlje RASPRAVA).

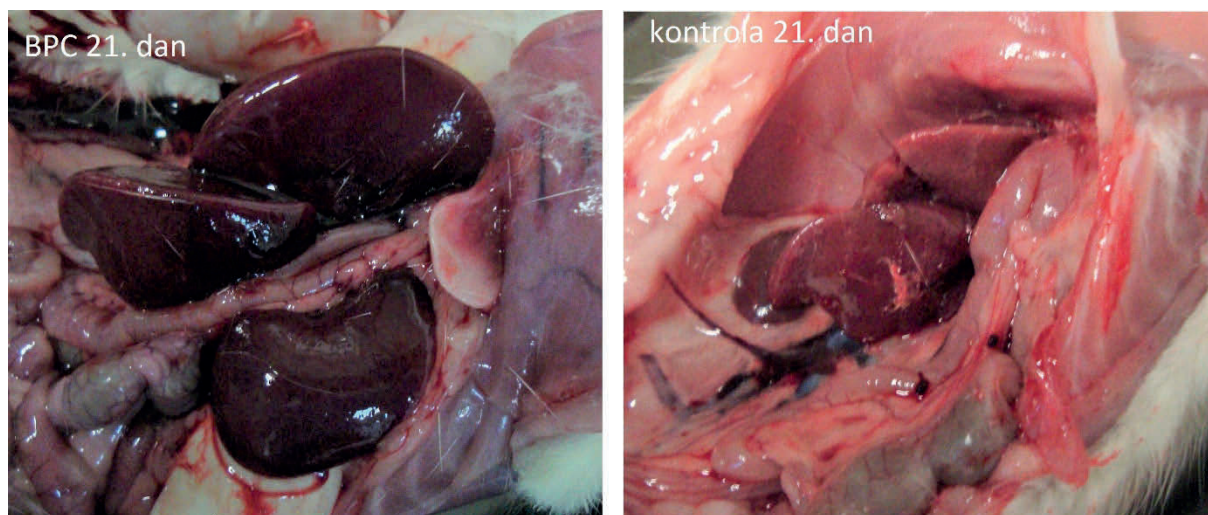
Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak jetre u smislu zaustavljanja oštećenja hepatocita (izražen koncentracijom bilirubina) nakon 70% resekcije kod štakora, se događa samo kod životinja koje su tretirane BPC-om, dok kod netretiranih životinja ne dolazi do spontanog oporavka
- unutar prvih 4. dana primjene u istraživanim uzorcima se ne uočava se učinak BPC
- BPC ima hepatoprotektivni učinak na oporavak ostatne jetre i taj učinak je u istraživanim uzorcima manifestan između 4. i 14. dana od resekcije
- hepatoprotektivno djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)

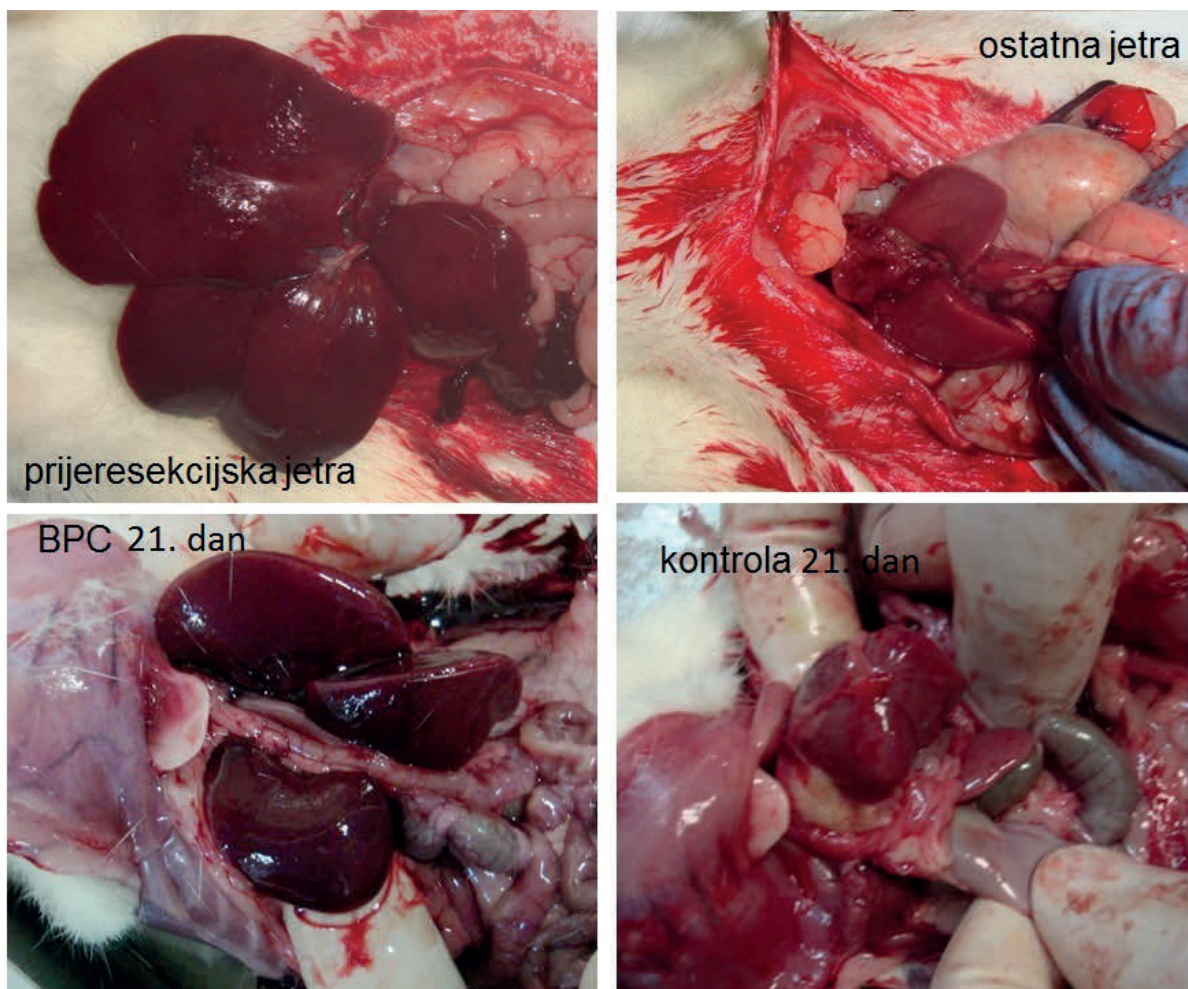
Masa ostatne jetre štakora

Masa ostatne jetre (FLR) štakora (g) korištena je kao makroskopski marker obnavljanja jetre i mjerena je preciznom vagom sa preciznošću 10^{-3} grama. Ostatna jetra ekstripirala se zajedno sa donjom šupljom venom, koja je kod štakora inkorporirana u jetru, jer je tehnički teško precizno odvojiti parenhimski dio ostatne jetre (stražnji kaudalni režnjić, prednji kaudalni režnjić, gornji desni režnjić, donji desni režnjić, kaudalni procesus) od donje šuplje vene, koja predstavlja neparenhimski dio (10,105,108,109,112) ^{10, 56, 59, 60, 63}. Relativni udio neparenhimskog dijela u ukupnoj masi ostatne jetre nakon 70% resekcije, je u postotku to veći, što je ostatna jetra manja. Povećanjem mase ostatne jetre (koje se događa se u parenhimu, dok neparenhimski dio ostaje nepromijenjen) smanjuje se relativni udio neparenhimskog dijela u ukupnoj masi. Greška koja nastaje prilikom procjene obnavljanja jetre mjerenjem mase cijelog jetrenog ostatka, umjesto mjerenjem mase samo parenhimskog dijela je zanemarena u analizi.

Slika 30 prikazuje in situ ostatne jetre štakora žrtvovanih 21. dan (BPC i kontrola), dok slika 31 prikazuje usporedbu ostatne jetre štakora žrtvovanih 21. dan (BPC i kontrola), sa intaktnom (prije resekcijom) i resekcijom (ostatnom) jetrom.

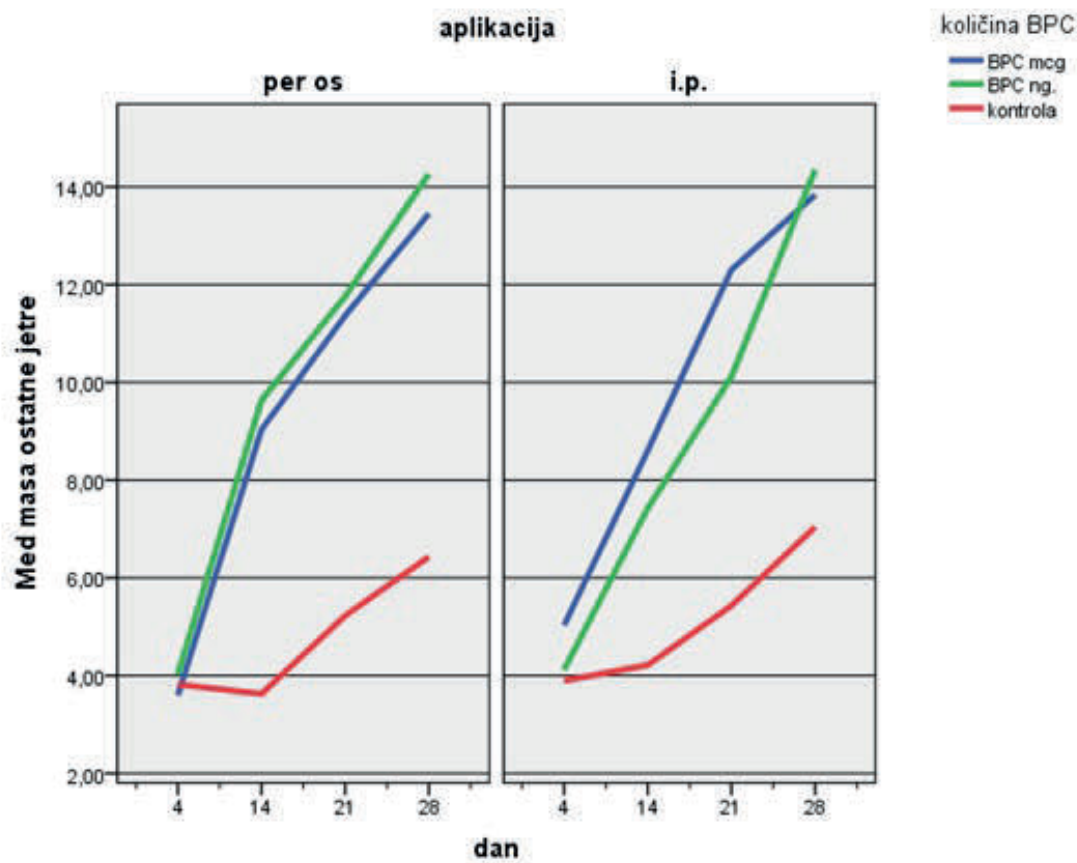


Slika 30. in situ ostatna jetra kod štakora (BPC i kontrola) žrtvovanih 21. dan



Slika 31. in situ usporedba prije i post resekcijske jetre sa ostatnom jetrom kod štakora (BPC i kontrola) žrtvovanih 21. dan (ostatna jetra kontrole rotirana medijalno)

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 25, box plot grafikon slika 21) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: MASA OSTATNE JETRE ŠTAKORA) vidljivo je da se masa ostatne jetre kod svih štakora povećava vremenom, što također ilustrira i slika 32 koja prikazuje medijane mase ostatne jetre (g) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 32. grafikokon medijana mase ostatne jetre štakora (g) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: masa ostatne jetre štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između mase ostatne jetre kod štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (tablica 26). Međutim između grupa štakora žrtvovanih 4. dan nema statistički značajne razlike u masi ostatne jetre, bez obzira pripadaju li kontrolnoj ili BPC grupi (tablica 26), unatoč tome što su prosječne vrijednosti (medijani) mase ostatne jetre (slika 32) više u BPC grupama štakora u odnosu na štakore kontrolnih grupa (tablica 25), uz iznimku štakora koji su BPC u mikrogramskim dozama primali peroralno, što upućuje da unutar prvih 4. dana od 70% resekcije jetre kod štakora, BPC nema utjecaja na povećanje mase ostatne jetre, uz napomenu da se radi o malim ispitivanim uzorcima sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te raspršenja rezultata (tablica 25, box plot grafikon slika 21) i značajnog udjela neparenhimskog dijela. Kod svih štakora dolazi do povećanja mase ostatne jetre nakon 4. dana žrtvovanja, s tim da

štakori iz kontrolnih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan imaju manje povećanje mase ostatne jetre (niže vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa koji su žrtvovani isti dan (više vrijednosti). Ta je razlika statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95%, neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 27), što upućuje da nakon 4. dana od početka primjene, BPC ima pozitivan utjecaja na povećanje mase ostatne jetre štakora nakon 70% resekcije. Kako svrha istraživanja nije bila spontani oporavak jetre nakon 70% resekcije, razlike između pojedinih kontrolnih grupa nisu analizirane.

Masa ostatne jetre se kod BPC tretiranih životinja povećava vremenom, a analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između mase ostatne jetre kod štakora različitih BPC grupa, a također i između štakora BPC grupa koje su žrtvovane 14., 21. i 28. dan, dok između štakora BPC grupa koji su žrtvovani isti dan (14., 21. i 28. dan), bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami) nema statistički značajne razlike u masi ostatne jetre (tablica 28), što je vidljivo i iz prosječnih vrijednosti (medijani) mase ostatne jetre kod štakora (slika 32).

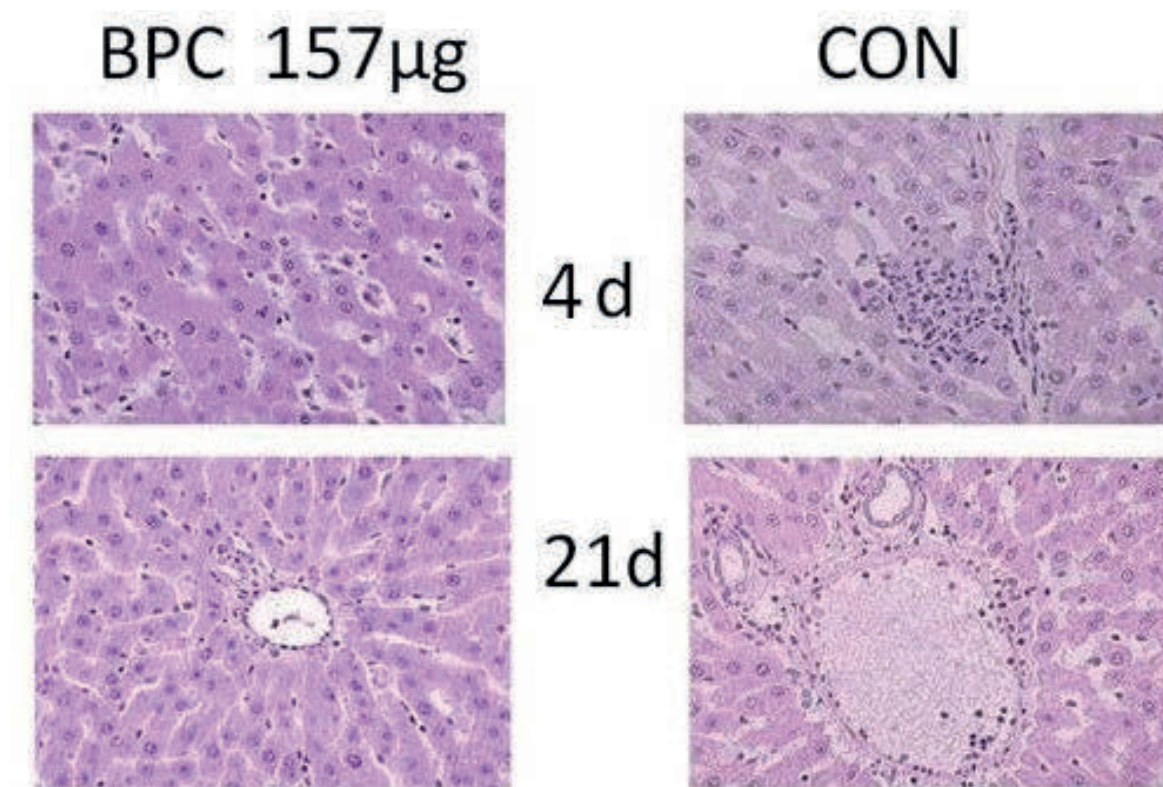
Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak jetre u smislu povećanja mase ostatne jetre nakon 70% resekcije kod štakora se događa kod svih životinja (spontano ili potpomognuto sa BPC)
- unutar prvih 4. dana primjene u istraživanim uzorcima se ne uočava se učinak BPC-a
- BPC ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate, nego spontani oporavak ostatne jetre
- učinak BPC je u istraživanim uzorcima manifestan nakon 4. dana od resekcije i proporcionalan je duljini primjene BPC-a
- djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)

Površina hepatocita

Površina hepatocita (μm^2) u ostatnoj jetri (FLR) korištena je kao histološki marker obnavljanja ostatne jetre (hipertrofija hepatocita).

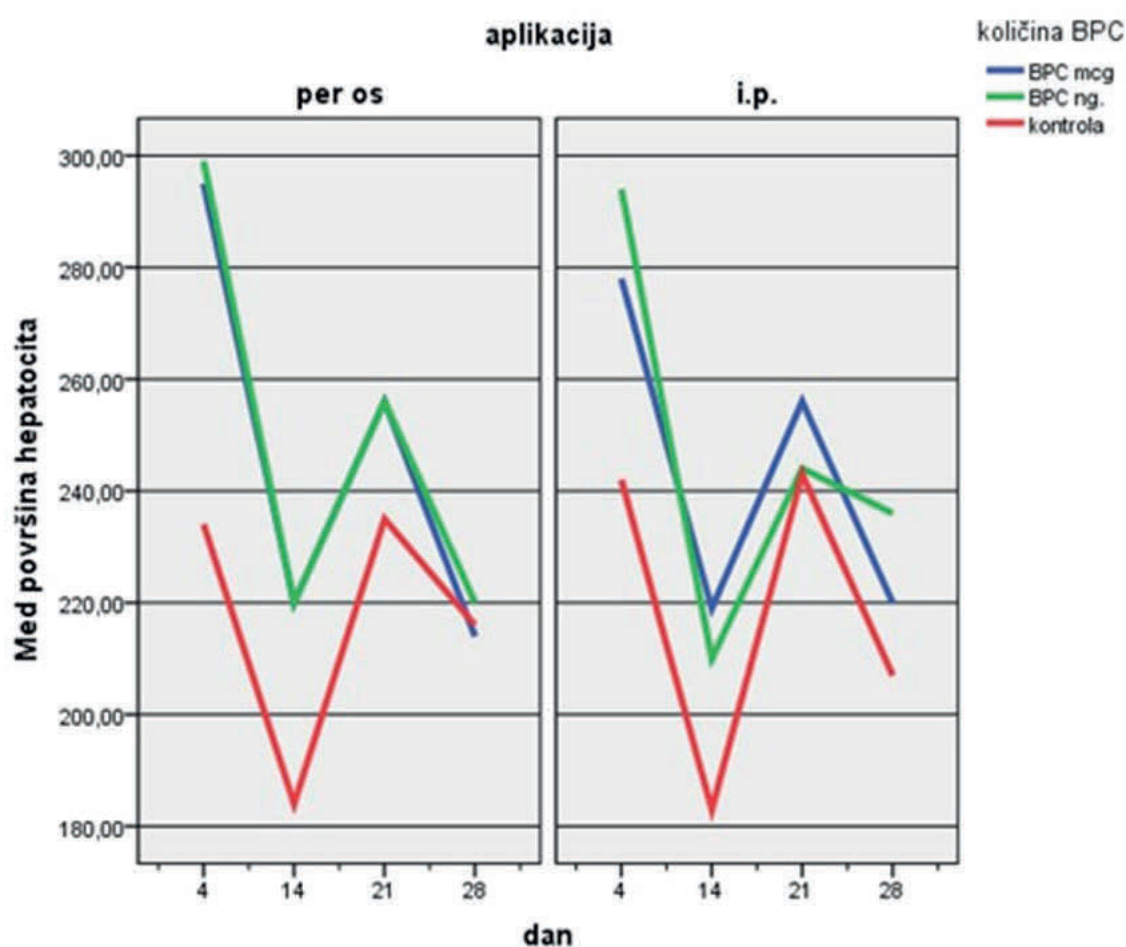
Slika 33 prikazuje hemalaun eozinom bojane histološke preparate ostatne jetre štakora žrtvovanih 4. i 21. dan (BPC i kontrola).



Slika 33. usporedba histoloških preparata (HE, povećanje 200x) ostatne jetre štakora žrtvovanih 4 i 21. dan u BPC (BPC 157 $\mu\text{g/kg}$ p.o.) i kontrolnoj (CON) grupi

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 29, box plot grafikon slika 22) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: POVRŠINA HEPATOCITA ŠTAKORA) vidljivo je da površina hepatocita ispitivanih štakora oscilira vremenom, na način da se kod svih štakora žrtvovanih 14. dan smanjuje površina hepatocita u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, dok je kod štakora žrtvovanih 21. dana došlo do porasta površine hepatocita u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, s tim da su postignute vrijednosti niže nego kod štakora žrtvovanih 4. dan. Potom ponovo dolazi do smanjenja površine hepatocita; štakori žrtvovani 28. dan imaju manju površinu hepatocita u odnosu na jednako

tretirane štakore žrtvovane 4. i 21. dan, ali veću u odnosu na štakore žrtvovane 14. dan. Navedenu dinamiku također ilustrira i slika 34 koja prikazuje medijane površine hepatocita (μm^2) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 34. grafikokon medijana površina hepatocita (μm^2) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: površina hepatocita štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između vrijednosti površine hepatocita kod štakora različitih grupa, te također između te također između grupa štakora žrtvovanih isti dan (tablica 30), s

napomenom da je za štakore žrtvovane 28. dan $p = 0,048$. Štakori iz kontrolnih grupa imaju manju površinu hepatocita (niže vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa (više vrijednosti) koji su žrtvovani isti dan i ta je razlika statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95% i vidljiva je u svim grupama (štakori žrtvovani 4., 14., 21. i 28. dan), neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 31).

Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između vrijednosti površine hepatocita kod štakora različitih BPC grupa, ali unutar BPC grupa štakora koje su žrtvovane isti dan (4., 14., 21. i 28. dan) bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami) nema statistički značajne razlike (tablica 32), što je vidljivo i iz prosječnih vrijednosti (medijani) površine hepatocita (slika 34).

Usporedbom dinamike u promjenama vrijednosti površine hepatocita i biokemijskih markera, te mase jetre, jasno je vidljivo da nema sličnosti u trendu promjena, pa nije niti rađena korelacija (oporavak sintetske funkcije hepatocita mjerene porastom koncentracijom albumina (tablica 5, box plot grafikon slika 17 poglavlje REZULTATI: ALBUMIN ŠTAKORA, te slika 26 poglavlje RASPRAVA: albumin), oporavak mase ostatne jetre (FLR) (tablica 25, box plot grafikon slika 21 poglavlje REZULTATI: MASA OSTATNE JETRE ŠTAKORA, te slika 30, slika 31 i slika 32 poglavlje RASPRAVA: masa ostatne jetre štakora) i smanjenja oštećenja hepatocita mjerene padom koncentracije ALT-a (tablica 10, box plot grafikon slika 18 poglavlje REZULTATI: ALT ŠTAKORA, te slika 27 poglavlje RASPRAVA: ALT), AST-a (tablica 15, box plot grafikon slika 19 poglavlje REZULTATI: AST ŠTAKORA, te slika 28 poglavlje RASPRAVA: ALT) i bilirubina (tablica 20, box plot grafikon slika 20 poglavlje REZULTATI: BILIRUBIN ŠTAKORA, te slika 29 poglavlje RASPRAVA: bilirubin))

Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak jetre u smislu hipertrofije (izražen površinom hepatocita) nakon 70% resekcije kod štakora, ima sličnu dinamiku kod svih životinja
- površina hepatocita najveća je nakon 4. dana od resekcije
- BPC ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate hipertrofije hepatocita, nego spontani oporavak
- djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)

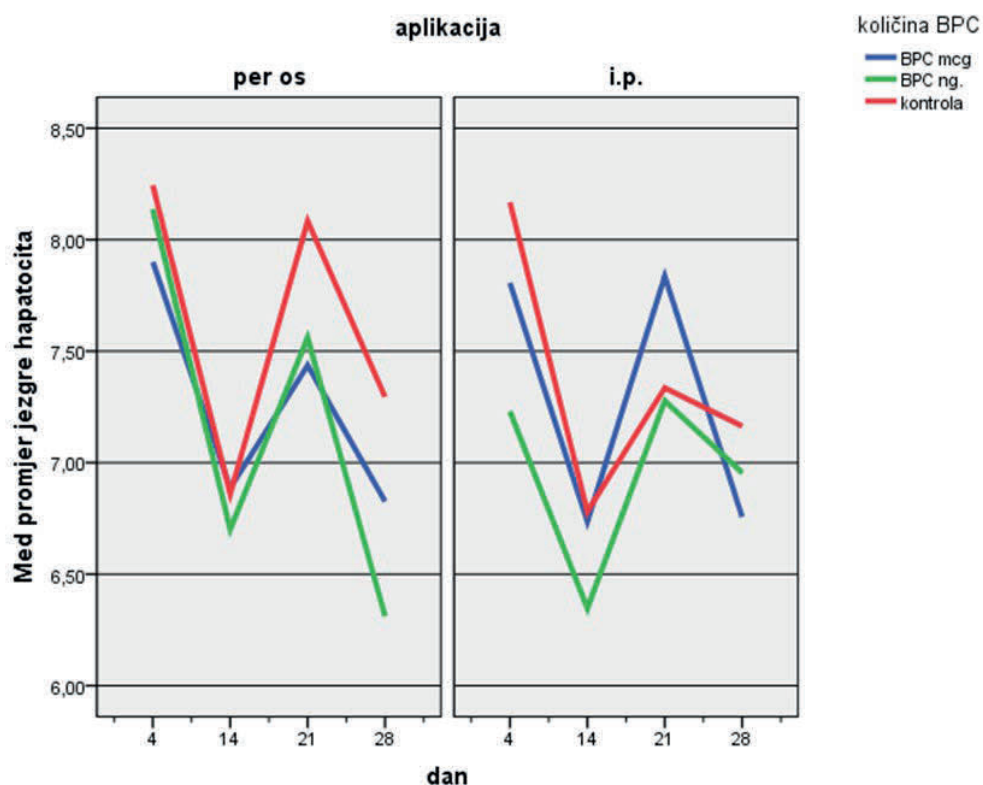
Promjer jezgre hepatocita

Promjer jezgre hepatocita (μm) u ostatnoj jetri (FLR) je korišten kao histološki marker obnavljanja ostatne jetre (hiperplazija hepatocita).

Slika 33 (poglavlje RASPRAVA - površina hepatocita) prikazuje histološke preparate ostatne jetre štakora žrtvovanih 4. i 21. dan (BPC i kontrola).

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 33, box plot grafikon slika 23) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: PROMJER JEZGRE HEPATOCITA ŠTAKORA) vidljivo je da promjer jezgre hepatocita ispitivanih štakora oscilira vremenom, na način da se kod svih štakora žrtvovanih 14. dan smanjuje promjer jezgre hepatocita u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. dan, dok je kod štakora žrtvovanih 21. dana došlo do porasta promjera jezgre hepatocita u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 14. dan, s tim da su postignute vrijednosti niže nego kod štakora žrtvovanih 4. dan, osim štakora koji su BPC dobivali intraperitonealno u nanogramskim dozama. Potom ponovo dolazi do smanjenja promjera jezgri hepatocita; štakori žrtvovani 28. dan imaju manji promjer jezgri hepatocita u odnosu na jednako tretirane štakore žrtvovane 4. i 21. dan, ali veći u odnosu na štakore žrtvovane 14. dan, izuzev štakora koji su BPC dobivali peroralno neovisno o dozi.

Navedenu dinamiku također ilustrira i slika 35 koja prikazuje medijane površine hepatocita (μm) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 35. grafikokon medijana promjera jezgre hepatocita (μm) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: promjer jezgri hepatocita štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, ali manjom od 99% (98,5%) da postoje značajne razlike između vrijednosti promjera jezgri hepatocita kod štakora različitih grupa, dok između grupa štakora žrtvovanih isti dan ne postoji statistički značajna razlika (tablica 34). Razlike u postignutim vrijednostima promjera jezgri hepatocita između kontrolnih i BPC tretiranih životinja, žrtvovanih isti dan, koje su vidljive i iz prosječnih vrijednosti (medijana) promjera jezgri hepatocita (slika 35) su unutar granica slučajne greške.

Usporedbom dinamike u promjenama vrijednosti promjera jezgri hepatocita i biokemijskih markera, te mase jetre, jasno je vidljivo da nema sličnosti u trendu promjena, pa nije niti rađena korelacija (oporavak sintetske funkcije hepatocita mjerene porastom koncentracijom albumina (tablica 5, box plot grafikon slika 17 poglavlje REZULTATI: ALBUMIN ŠTAKORA, te slika 26 poglavlje RASPRAVA: albumin), oporavak mase ostatne jetre (FLR) (tablica 25, box plot grafikon slika 21 poglavlje REZULTATI: MASA OSTATNE JETRE ŠTAKORA, te slika 30, slika 31 i slika 32 poglavlje RASPRAVA: masa ostatne jetre štakora)

i smanjenja oštećenja hepatocita mjerene padom koncentracije ALT-a (tablica 10, box plot grafikon slika 18 poglavlje REZULTATI: ALT ŠTAKORA, te slika 27 poglavlje RASPRAVA: ALT), AST-a (tablica 15, box plot grafikon slika 19 poglavlje REZULTATI: AST ŠTAKORA, te slika 28 poglavlje RASPRAVA: ALT) i bilirubina (tablica 20, box plot grafikon slika 20 poglavlje REZULTATI: BILIRUBIN ŠTAKORA, te slika 29 poglavlje RASPRAVA: bilirubin))

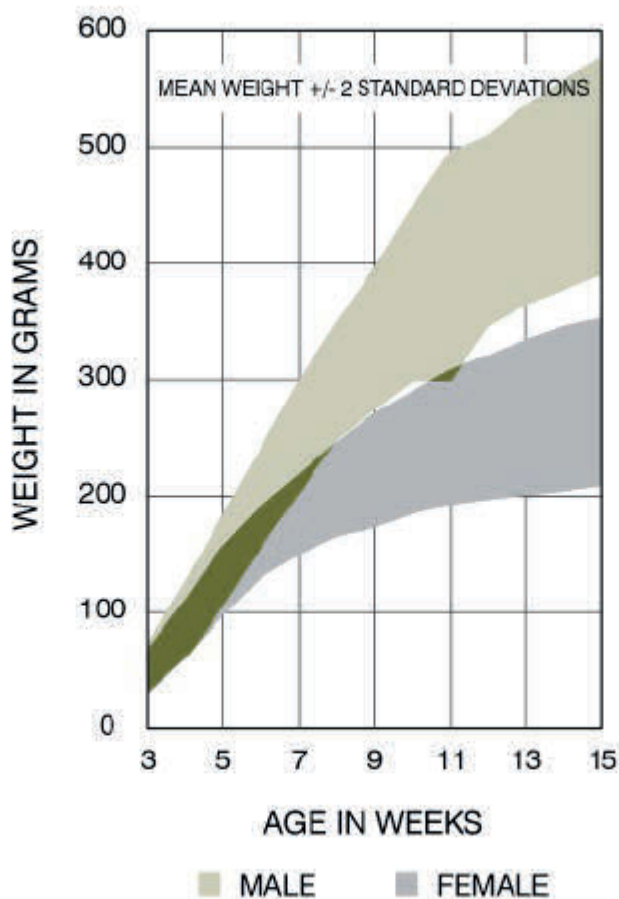
Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak jetre u smislu hiperplazije (izražen promjerom jezgri hepatocita) nakon 70% resekcije kod štakora, ima sličnu dinamiku kod svih životinja
- promjer jezgri hepatocita najveći je nakon 4. dana od resekcije
- BPC ne pokazuje nikakav učinak i ne daje bolje rezultate u promjeru jezgri hepatocita nego spontani oporavak

Ukupna tjelesna masa štakora

Ukupna tjelesna masa štakora (g) je korištena kao makroskopski marker općeg stanja štakora, koji je indirektni pokazatelj održavanja i obnavljanja funkcije ostatne jetre.

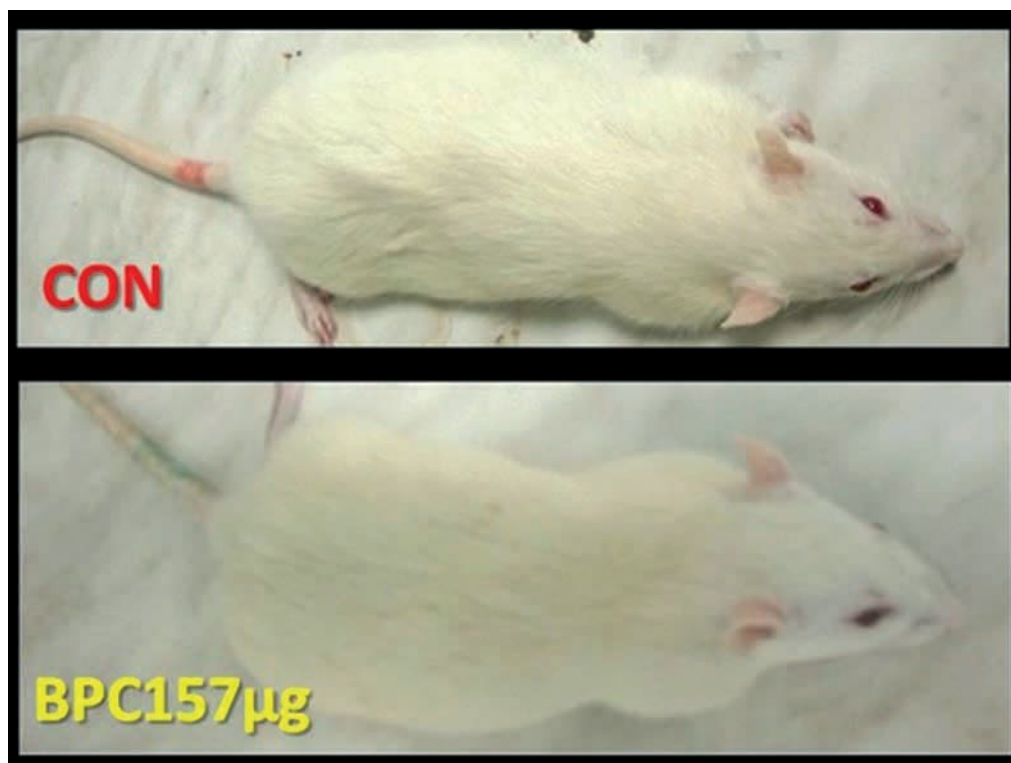
Kriterij za odabir štakora koji su korišteni u istraživanju bila je tjelesna masa od 200 g, koja je utvrđivana neposredno prije resekcije, pa su u istraživanje ušle životinje različite dobi (između 6 i 7 tjedana). Dob životinja nije korištena kao parametar u istraživanju, pa se prirast (oporavak) tjelesne mase mogao uspoređivati samo u odnosu na početnu (prijeresekcijsku) masu životinja (200 g) i međusobno između pojedinih grupa, ali ne i u odnosu na krivulju prirasta tjelesne mase zdravih životinja koju prikazuje slika 36.



Slika 36. prirast ukupne tjelesne mase Wistar štakora prema dobi i spolu

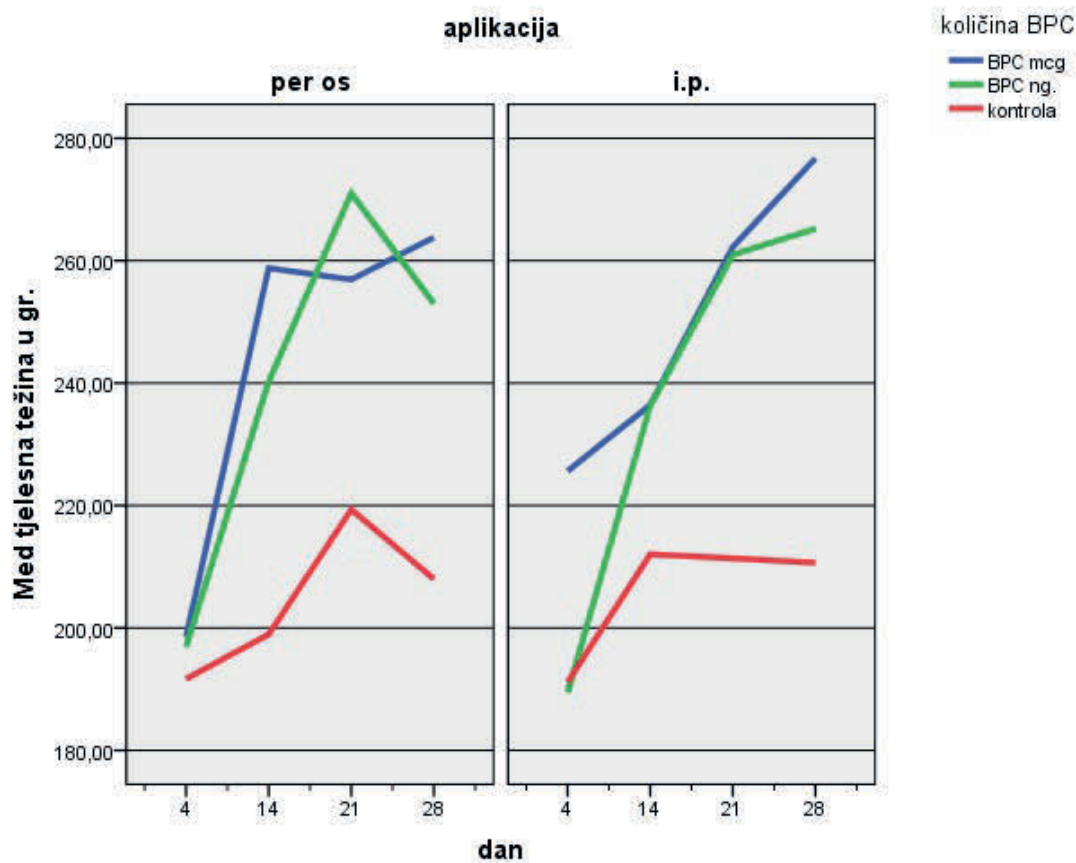
iz: http://www.criver.com/files/pdfs/rms/us-model-pricing/rm_rm_c_wistar_rats.aspx

Utvrđene promjene tjelesne mase, posljedica su promjene u masi tkiva, jer kod niti jednog žrtvovanog štakora nije verificiran ascites. Slika 37 prikazuje usporedbu su štakora koji je primao vodu za piće (CON) i štakora koji je primao BPC u mikrogramskim dozama peroralno (BPC157 μ g), oba žrtvovana 14. dana.



Slika 37. usporedba štakora kontrolne (CON) i štakora BPC grupe (μ g/kg p.o.) 14. dana po učinjenoj 70% resekciji jetre

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 35, box plot grafikon slika 24) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: UKUPNA TJELESNA MASA ŠTAKORA) vidljivo je da se tjelesna masa većine štakora povećava vremenom, što također ilustrira i slika 38, koja prikazuje medijane tjelesne mase štakora (g) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 38. grafik kon medijana tjelesne mase štakora (g) u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: ukupna tjelesna masa štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između tjelesne mase štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih isti dan (tablica 36). Štakori iz kontrolnih grupa imaju manju tjelesnu masu (niže vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa (više vrijednosti) koji su žrtvovani isti dan i ta je razlika statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95% i vidljiva u svim grupama (štakori žrtvovani 4., 14., 21. i 28. dan), neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC-a (tablica 37), uz napomenu da je za štakore žrtvovane 4. dan razlika u postignutoj tjelesnoj masi između štakora kontrolnih grupa i štakora BPC grupa statističkom značajna sa vjerojatnošću većom od 95%, ali manjom od 99% (točnije 98%).

Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između štakora različitih BPC grupa. Ukupna tjelesna masa BPC tretiranih štakora raste između 4. i 21. dana, što je prikazuje i slika 37. Razlika u

tjelesnoj masi štakora koji su primali BPC, koja je vidljiva kod životinja žrtvovanih različitih dana je statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95%, između grupa životinja žrtvovanih 4., 14. i 21. dan, dok između štakora koji su žrtvovani 21. i 28. dan nema statistički značajne razlike (tablica 38). Razlika u ukupnoj tjelesnoj masi štakora koji su primali BPC, žrtvovanih istog dana, nije statistički značajna za štakore koji su žrtvovani 14., 21. ili 28. dan, bez obzira na način aplikacije BPC (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami), dok kod štakora koji su žrtvovani 4. dan postoji statistički značajna razlika sa vjerojatnošću većom od 95%, ali manjom od 99% (točnije 98%) (tablica 38). Životinje žrtvovane 4. dan, koje su BPC primale intraperitonealno u mikrogramskim dozama, imaju veću ukupnu tjelesnu masu u odnosu na životinje žrtvovane isti dan, koje su BPC primale u mikrogramskim dozama peroralno ili u nanogramskim dozama, što prikazuje i slika 37 i ta je razlika statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95% (tablica 39). Međutim kada se uspoređuju vrijednosti dostignute tjelesne mase između BPC tretiranih štakora žrtvovanih 4. dan, prema načinu aplikacije (intraperitonealno ili peroralno), odnosno prema dozi (mikrogrami BPC ili nanogrami BPC) sa vjerojatnošću većom od 95% nema statistički značajne razlike (tablica 39), pa su predhodno navedene razlike najvjerojatnije posljedica načina na koji je dizajnirano istraživanje (poglavlje RASPRAVA).

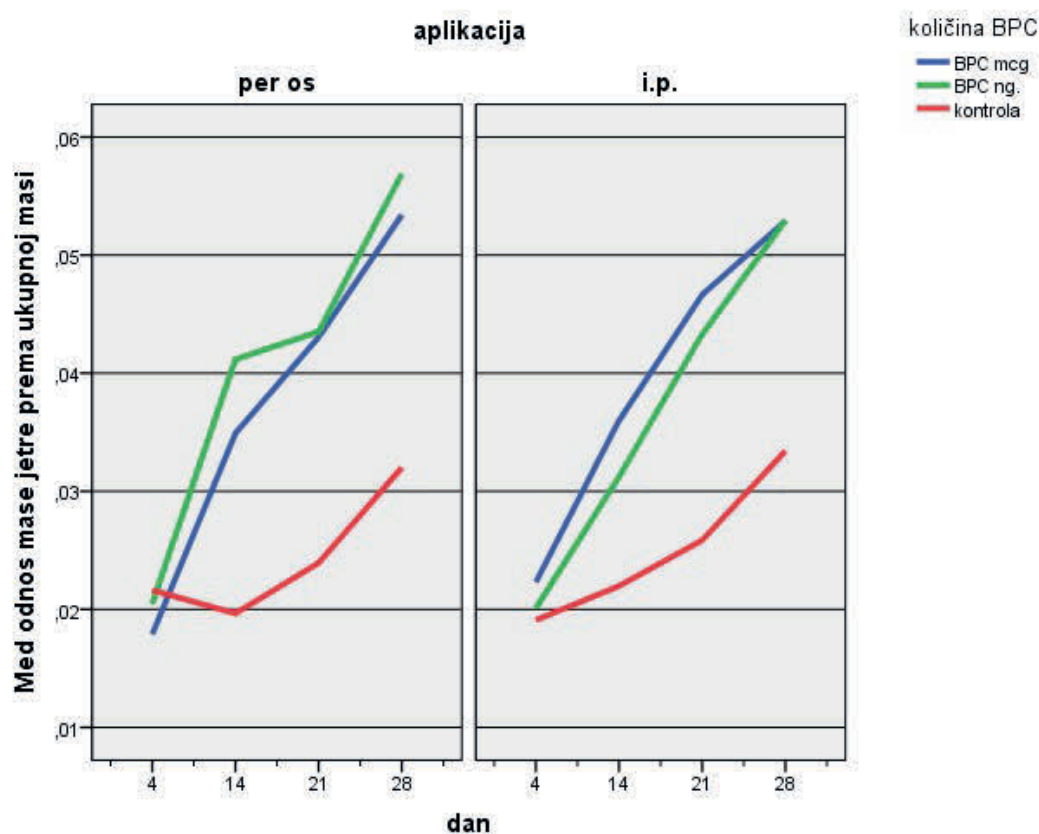
Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak ukupne tjelesne mase štakora nakon 70% resekcije jetre je proporcionalan vremenu proteklom od resekcije i ima sličnu dinamiku kod svih životinja
- BPC ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate povećanja ukupne tjelesne mase, nego spontani oporavak
- učinak BPC je u istraživanim uzorcima manifestan je već 4. dana, ali je najjače izražen između 4. i 14. dana od resekcije
- djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)
- kako dob životinja nije korištena kao parametar u istraživanju, prirast (oporavak) tjelesne mase ne može se točno uspoređivati sa krivuljom prirasta tjelesne mase zdravih životinja (Slika 36), u grubo je vidljivo da BPC tretirane životinje u trenutku žrtvovanja ne dostižu ukupnu tjelesnu masu životinja slične dobi (između 6 i 7 tjedana)

Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora

Omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora je korištena kao marker obnavljanja ostatne jetre.

Iz izmjerenih vrijednosti (tablica 40, box plot grafikon slika 25) i opisa dinamike promjene vrijednosti (poglavlje REZULTATI: OMJER MASE JETRE PREMA UKUPNOJ MASI ŠTAKORA) vidljivo je da se masa ostatne jetre većine štakora povećava vremenom više nego tjelesna masa, što također ilustrira i slika 39, koja prikazuje medijane omjera mase jetre prema ukupnoj tjelesnoj masi štakora u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (NAPOMENA: linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe samo naglašavanju trenda - prikazani medijani su diskriminantne vrijednosti jer se odnose na 4., 14., 21. i 28. dan, te bi bilo neispravno isčitati iz grafikona vrijednost između tih intervala, tim više što nema nikakvih dokaza da se promjene zbivaju kontinuirano i / ili linearno).



Slika 39. grafikokon medijana omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora u ispitivanim grupama, prema danu žrtvovanja i načinu aplikacije (vidjeti napomenu u tekstu)

Analizom (poglavlje REZULTATI: omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora – statistička analiza) na svim eksperimentalnim grupama utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora različitih grupa, te također između grupa štakora žrtvovanih 14., 21. i 28. dan (tablica 41). Međutim između grupa štakora žrtvovanih 4. dan nema statistički značajne razlike u omjerima mase jetre prema ukupnoj masi štakora, bez obzira pripadaju li kontrolnoj ili BPC grupi (tablica 41), što upućuje da unutar prvih 4. dana od 70% resekcije jetre kod štakora, BPC nema utjecaja na omjer mase jetre prema ukupnoj masi štakora, što odgovara dinamici brojnika u omjeru (masa ostatne jetre), uz napomenu da se radi o malim ispitivanim uzorcima sa samo 5 štakora po uzorku (poglavlje RASPRAVA), te raspršenja rezultata (tablica 40, box plot grafikon slika 25). Kod svih štakora (osim kontrolne grupe žrtvovane 14. dana koja je primala vodu za piće), dolazi do porasta omjera mase jetre prema ukupnoj masi štakora nakon 4. dana žrtvovanja, s tim da štakori iz kontrolnih grupa žrtvovani 14., 21. i 28. dan (kod kojih dolazi do spontanog oporavka) imaju manje povećanje omjera (niže vrijednosti) u odnosu na štakore BPC grupa (više vrijednosti) koji su žrtvovani isti dan. Ta razlika je statistički značajna sa vjerojatnošću većom od 95%, neovisno o dozi i načinu aplikacije BPC (tablica 42), što upućuje da nakon 4. dana od početka primjene, BPC ima pozitivan utjecaja na oporavak mase ostatne jetre. Kako svrha istraživanja nije bila spontani oporavak jetre nakon 70% resekcije, razlike između pojedinih kontrolnih grupa nisu analizirane.

Analizom svih BPC eksperimentalnih grupa utvrđeno je sa statističkom vjerojatnošću većom od 95%, da postoje značajne razlike između omjera mase jetre prema ukupnoj masi kod štakora različitih BPC grupa, te između BPC grupa štakora koje su žrtvovane nakon 4. dana (14., 21. i 28. dan), dok između štakora BPC grupa koji su žrtvovani isti dan nema statistički značajne razlike (tablica 43), bez obzira na način aplikacije (per os ili intra peritonealno) ili količinu apliciranog BPC (mikrogrami ili nanogrami).

Iz navedene obrade prikupljenih podataka, dobijenih na istraživanim uzorcima je vidljivo:

- oporavak ostatne jetre štakora nakon 70% resekcije, zbiva se kod svih životinja (spontano ili potpomognuto sa BPC) brže nego prirast tjelesne mase (izražen omjerom mase jetre prema tjelesnoj masi)
- BPC ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate oporavka ostatne jetre, nego spontani oporavak
- učinak BPC je u istraživanim uzorcima manifestan nakon 4. dana od resekcije i proporcionalan je duljini primjene

- djelovanje BPC je neovisno o načinu aplikacije (per os ili intra peritonealno) i jednako je učinkovito i u nanogramskoj dozi (10^{-3} mikrograma)

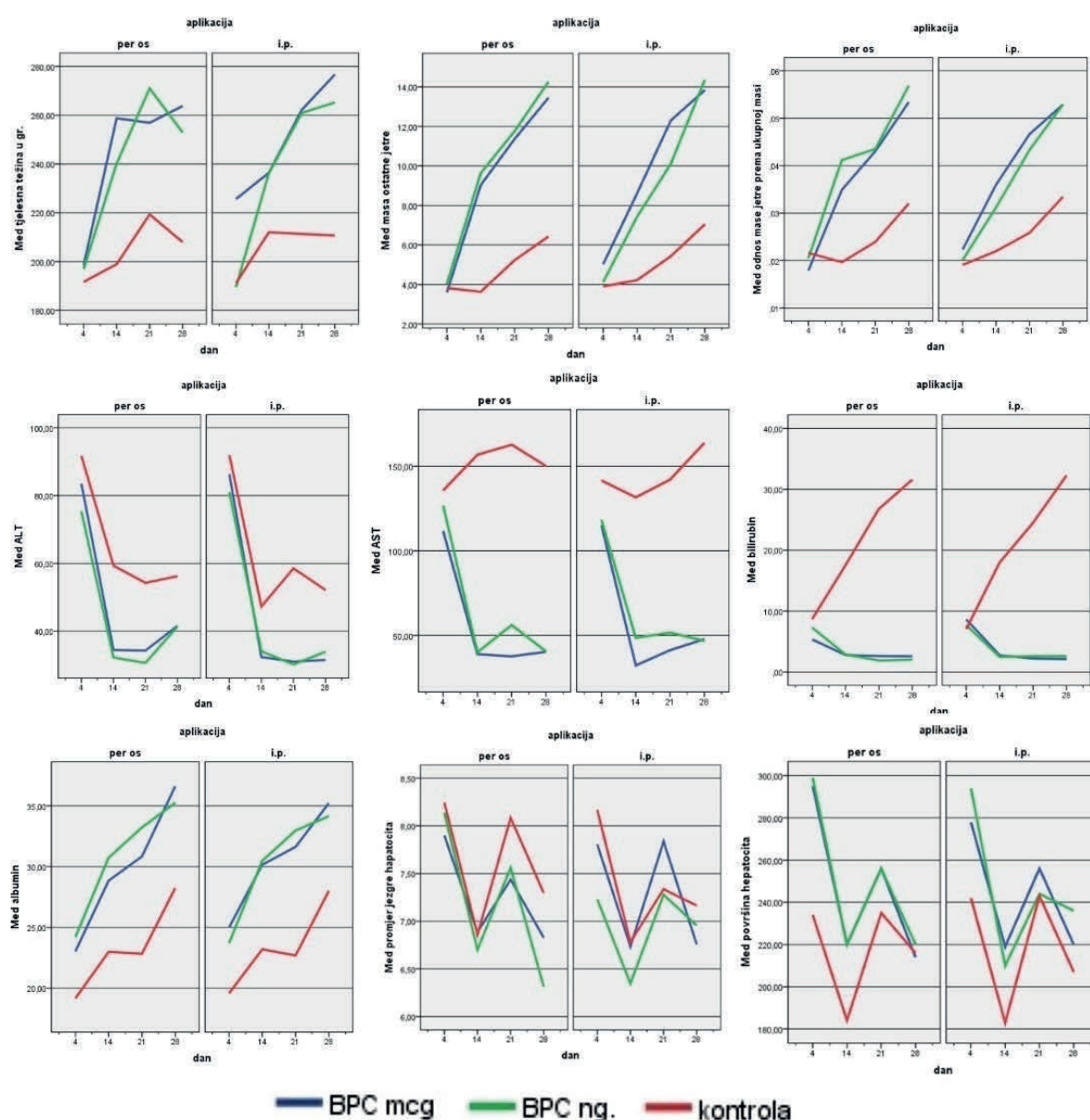
7. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem utvrđeno je da BPC 157 posjeđuje obnavljanje postresekcijske jetre štakora, što je bio primarni cilj istraživanja i što je u skladu sa njegovom hepatoprotektivnom ulogom prikazanom u drugim radovima. Kako je dokazana učinkovitost, analizirani su sekundarni ciljevi, odnosno povezanost učinka BPC 157 sa načinom aplikacije, primjenjenom dozom i duljinom primjene, te mehanizam djelovanja. Kao model za istraživanje odabrana je 70% resekcija štakorske jetre, što je prihvaćeni životinjski model za pokuse regeneracije jetre, a korišteni statistički model (neparametrijska statistika za nezavisne uzorke), bio je determiniran dizajnom istraživanja, koji je uključivao veliki broj grupa sa malim brojem uzoraka (25 grupa sa po 5 štakora). Statistička značajnost svih analiza je definirana na razini pouzdanosti 95%.

Sve su životinje (kontrolne i one tretirane sa BPC 157) preživjele do trenutka žrtvovanja, što je u skladu sa odabranim animalnim modelom. Kod svih životinja je bio vidljiv oporavak jetrene mase i funkcije, s tim da su svi parametri opravka statistički značajno izraženiji kod životinja koje su dobivale BPC 157 (porast mase jetre i ukupne tjelesne mase štakora, sniženje vrijednosti transaminaza i bilirubina, te povišenje vrijednosti albumina), uz napomenu da kod štakora kontrolne grupe nije došlo do pada vrijednosti AST-a i bilirubina (vrijednosti bilirubina u toj grupi permanentno rastu). Unatoč značajnom prirastu ukupne tjelesne mase kod BPC tretiranih životinja, one u trenutku žrtvovanja ipak ne dostižu ukupnu tjelesnu masu zdravih životinja slične dobi. Analizirajući vrijednosti veličine jezgri hepatocita nisu se mogle utvrditi statistički značajne razlike između BPC tretiranih i ne tretiranih životinja.

Najučinkovitije djelovanje BPC-a (ovisno o promatranom parametru) je do 4. odnosno do 14. dana žrtvovanja, a nakon 21. dana nema statistički značajne razlike u djelovanju, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja na istom animalnom modelu, koja pokazuju da je najveći intenzitet oporavka jetrenog ostatka u prvih 7 dana od resekcije. Nije utvrđena statistički značajna razlika u djelovanju BPC temeljem načina aplikacije (intraperitonealno ili peroralno) odnosno primjenjene doze (10 ng ili 10 μ g po kg tjelesne težine). Ovim radom nije razriješen mehanizam djelovanja BPC 157, što je bio jedan od sekundarnih ciljeva, iako se u dostupnoj literaturi na temu regeneracije postresekcijske štakorske jetre, apoptoza navodi kao glavni uzrok propadanja, a hiperplazija kao temeljni mehanizam povećanja mase jetrenog ostatka. Slika 40 prikazuje medijane analiziranih parametara prema ispitivanim grupama,

danu žrtvovanja i načinu aplikacije, pri čemu linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već samo služe naglašavanju trenda, jer su medijani diskriminantne vrijednosti, a način na koji je dizajnirano istraživanje onemogućuje zaključivanje da se promjene zbivaju kontinuirano, a kamo li linearno.



Slika 40. grafikoni medijana praćenih parametara prema ispitivanim grupama, danu žrtvovanja i načinu aplikacije, uz napomenu da linije koje povezuju medijane ne predstavljaju stvarne vrijednosti već služe naglašavanju trenda

Standardni histološki hemalaun eozinski (HE) preparat nije se pokazao pogodan za analizu propadanja i regeneracije parenhima, kao niti morfometrija površine hepatocita i veličine njihovih jezgri za procjenu i distinkciju hipertrofije i hiperplazije. Nužno je primjeniti osjetljivije tehnike detekcije proliferacije stanica (npr. određivanje faze staničnog ciklusa mjerenjem količine stanične DNK fluorescentnim bojama za nukleinske kiseline ili imunohistokemijskim određivanjem cilina i ciklin zavisnih kinaza, odnosno dokazivanje replikacije DNK bilo direktno npr. obilježenim mononukleozidom (BrdU) ili indirektno mjerenjem aktivnosti jezgrenih enzima (PCNA, Ki67) povezanih sa replikacijom DNK itd.). Analogno se apoptoza, kao dominantni proces propadanja stanica prema dostupnoj literaturi, za razliku od nekroze, ne može adekvatno detektirati svjetlosnom mikroskopijom u standardnom HE preparatu, pa je potrebno primjeniti modernije metode (npr. dokazivanje patološke permeabilnosti stanične membrane vitalnim bojama za isključno bojenje ili dokazivanje pojave fosfolipida nutarnje (fosfatidil serin) na vanjskoj strani stanične membrane, utvrđivanje fragmentacije DNK fluorescentnim bojama za nukleinske kiseline ili TUNEL protokolom, određivanje aktivnih kaspaza i fosforilacije BCL2 itd.).

Međutim neovisno o tome, da li je u podlozi propadanja hepatocita apoptoza ili nekroza, odnosno da li je regeneracija jetre posljedica hiperplazije ili hipertrofije, neosporno je stimulativno djelovanje BPC 157 na oporavak rezidualne štakorske jetre nakon resekcije, pa shodno navedenom, ima smisla nastaviti istraživanja, pri čemu se mogu koristiti drugačije dizajnirani modeli. Kako je učinak BPC 157, prema rezultatima ovog istraživanja, neovisan o dozi i načinu primjene, vidljivo je da se istraživanje može učiniti sa samo jednom eksperimentalnom grupom životinja koje bi primale BPC 157 peroralno u dozama od 10 ng/kg tjelesne težine i kontrolnom grupom koje bi dobijale vodu „ad libitum“ (slobodno pile vodu). Time se smanjuje ukupni broj potrebnih životinja, uz istovremeno povećanje broja životinja u grupama, a ukoliko se primijeni 70% resekcija, nema potrebe da istraživanje traje dulje od 3 tjedna, uz napomenu da se moraju dodati grupe u kojima se životinje žrtvuju u ranoj poslijeresekcijskoj fazi (npr. 1., 3., 5., 7., 10. dan), jer to razdoblje najdinamičnije obnove. Iako u dostupnoj literaturi ne postoje referentne vrijednosti za zdrave životinje korištene u istraživanju, nije potrebno provesti žrtvovanje zdravih životinja (kao u nekim predhodnim radovima), jer se iste vrijednosti mogu dobiti uzimanjem uzoraka od životinja prije resekcije. Jednako tako nije potrebno provoditi periodično žrtvovanje životinja kako bi se prikazao vremenski slijed odnosno dinamika promjena analiziranih parametara, jer se biokemijski markeri (albumin, transaminaze, bilirubin) mogu dobiti redovitim uzimanjem krvi

neanesteziranih životinja iz vene safene ili dorzalne vene stopala, a praćenje prirasta jetrenog ostatka može se vršiti u predhodno anesteziranih životinja pomoću MSCT ili MR, kada se mogu i uzimati uzorci krvi iz vena u repu štakora (taj oblik venepunkcije se preporučuje izvesti u anesteziji). Ukoliko se obilježi svaka životinja, smještanjem u vlastiti kavez ili eventualno markiranjem direktno na dlaku ili na predhodno očišanu kožu repa, leđa, trbuha ili uški flomasterom (očekivano trajanje istraživanja je do 3 tjedna, što je dovoljno kratko da markacija ne izblijedi), moguće je pratiti oporavak svake životinje pojedinačno do završetka istraživanja, te tada žrtvovati sve životinje i usporediti masu odstranjenjih (reseciranih) reznjeva svake životinje, koji ukupno čine 70% mase intaktne jetre, sa masom njenog jetrenog ostatka. Tako dizajnirano istraživanje omogućilo bi usporedbu dobijenih rezultata, ne samo između eksperimentalnih grupa međusobno, nego i u odnosu na zdrave životinje, te analizu primjenom parametrijske statistike za zavisne uzorke, što je preciznijih statističkih model od modela korištenog u radu. Nedostatak ovako dizajniranog istraživanja je nemogućnost preiodičnog praćenja indikatora apoptoze i stanične proliferacije, nužnih za obješnjenje mehanizma oporavka, a za koje se materijal mora uzimati iz tkiva jetre.

Povećavanje šanse za preživljenje bolesnika prilikom resekcije jetre i smanjivanje broja i težine komplikacija, povezano je sa dobrom operativnom tehnikom (u prvom redu u smislu smanjenja krvarenja), te ostavljanjem dovoljne količine jetrenog parenhima nakon resekcije. Potonje se postiže procjenom funkcionalne rezerve jetrenog ostatka (FLR) prije zahvata (Child Pough klasifikacija, MSCT volumetrija itd.) i pravilnim odabirom kandidata pogodnih za zahvat, odnosno povećanjem prijeoperacijskog volumena neresekcijskog dijela jetre metodom portalne venske embolizacije (PVE), koja je trenutno dominantna procedura. PVE je tehnički složena i zahtjevna, jer iziskuje odgovarajuću opremu i educirani kadar (bilo da se radi perkutano inteventnom radiologijom ili operativno kirurški), a sam zahvat je rizičan. S obzirom na dokazan pozitivan učinak BPC 157 na regeneraciju postresekcijske štakorske jetre, te da je za razliku od PVE, BPC pripravak koji se može jednostavno aplicirati (per os), nema registriranih nuspojava i njegova primjena ne zahtijeva edukaciju medicinskog osoblja, BPC 157 predstavlja neinvazivnu alternativu PVE. **Drugim riječima BPC 157 kao hepatoprotektiv i postresekcijski regeneratorski ima potencijal spriječavanja razvoja sindroma nedostatne jetre nakon resekcijskog zahvata i time ukidanja potrebe kondicioniranja jetre prije resekcije.** Iako između štakorske i humane jetre ne postoje funkcionalne razlike, postoje razlike u anatomske organizaciji hepatobilijarnog sistema, jer kod štakora ne postoji žučnjak, donja šuplja vena je u cijelosti smještena intrahepatično, postoje brojne intrahepatalne arterio - portalne anastomoze, jetra je jasno lobulirana (za

razliku od humane), iako podjela na segmenate ne odgovara Couinaud segmentaciji humane jetre. Međutim najbitnije razlike su u udjelu mase zdrave jetre u ukupnoj tjelesnoj masi (5% u štakora odnosno 2,5% kod čovjeka), maksimalnom volumenu odstranjenog jetrenog parenhima pri kojem se resekcija smatra sigurnom (90% u štakora odnosno 70% kod čovjeka), minimalno potrebnom odnosu mase ostatne jetre (FLR) prema ukupnoj tjelesnoj masi da omogući preživljenje i urednu regeneraciju ($> 0,2\%$ kod štakora, odnosno $> 0,8\%$ kod čovjeka), te u puno većoj brzini regeneracije štakorske jetre. S obzirom na navedene razlike i činjenicu da štakor u cijelosti regenerira ostatnu jetru i nakon 90% (čak i 95% resekcije), odnosno ligiranja vene porte (PVL) za 90% parenhima, moguće je umjesto standardne dvotrećinske parcijalne resekcije kao regeneracijskog animalnog modela (70% resekcija štakorske jetre), koristiti suptotalnu hepatektomiju kao insuficijencijski animalni model (90% - 95% resekcija štakorske jetre), te mjeriti vrijeme preživljenja do trenutka spontane smrti životinja i dobijene podatke analizirati Kaplan Meier survival analysis testom. Iako je suptotalna hepatektomija model koji je bliži proćavanju prevencije poslijeresekcijske jetrene insuficijencije, ona je tehnički i organizacijski puno složenija i mora se raditi mikrokirurškom tehnikom, koja zahtjeva dodatnu opremu i educirani kadar, što su preduvjeti koji se ne daju jednostavno ispuniti.

Shodno dobijenim rezultatima djelovanja BPC 157, kao i rezultatima učinaka drugih regeneratorskih faktora, potrebna su daljnja istraživanja, da bi se ustanovilo da li se dobijeni rezultati mogu primijeniti i na resekciju humane jetre, uz oprez i napomenu da stimuliranje regeneracijskih procesa u jetrenom ostatku može aktivirati karcinogezu prijeoperacijski neregistriranih okultnih mikrometastaza.

8. SAŽETAK

Resekcija jetre je standardna kirurška metoda i smatra se superiornom u odnosu na druge metode liječenja (sistemska kemoterapija, radiofrekventna ablacija, transarterijalna kemoembolizacija, selektivna interna kemo ili radio terapija) primarnih i sekundarnih neoplastičkih tvorbi jetre. Resekcijskim se zahvatom osim patološkog (afunkcionalnog) tkiva, odstranjuje i dio zdravog (funkcionalnog). Razvojem hepatalne kirurgije resekcije se izvode sa minimalno komplikacija, pogotovo u centrima specijaliziranim za kirurgiju jetre, pa selekcija bolesnika pogodnih za zahvat kao i ishod liječenja u velikoj mjeri ovise o opsegu resekcije i funkciji ostatne jetre tj. jetrenog parenhima koji ostaje nakon resekcije. Prilikom opsežnih resekcija (npr. 70% zdrave jetre donora ili manji postotak u tumorom zahvaćene jetre, pogotovo ako je istovremeno prisutna i difuzna bolest jetre npr. hepatitis ili ciroza, razvija se postresekcijska jetrena insuficijencija koja vodi u hepatalnu dekompenzaciju i letalni ishod.

S obzirom da je utvrđeno, da pentadekapeptid BPC 157 pozitivno djeluje na jetru oštećenu različitim agensima, proučavano je da li BPC 157 pospješuje regeneraciju parenhima i restituciju funkcije ostatne jetre. U radu je korištena 70% resekcija štakorske jetre što je prihvaćeni animalni model za istraživanje postresekcijske regeneracije jetre. Analiza krvi i žrtvovanje zdravih životinja, kako bi se dobile referentne vrijednosti promatranih varijabli, kao niti prije resekcijska mjerenja vrijednosti albumina, transaminaza, bilirubina niti mase odstranjenjih (reseciranih) režnjeva eksperimentalnih životinja nisu provedene.

Resekcija jetre izvedena je na 120 muških Wistar štakora mase 200 gr., koji su nakon zahvata randomizirano podijeljeni u 6 grupa (4 BPC grupe i 2 kontrolne grupe), da bi 4., 14., 21. i 28. dana od zahvata, iz svake grupe metodom slučajnog uzorka bilo odabrano po 5 jedinki za žrtvovanje (ukupno 24 uzorka sa po 5 štakora). BPC 157 je svakodnevno primjenjivan u dozama od 10 µg/kg odnosno 10 ng/kg tjelesne težine, intraperitonealno (u 1 ml fiziološke otopine) ili peroralno (u 12 ml vode za piće), a životinje kontrolne grupe su svakodnevno primale 1ml fiziološke otopine intraperitonealno, odnosno slobodno uzimale vodu za piće. Neposredno prije usmrćivanja izmjerena je ukupna tjelesna masa štakora i uzeti su uzorci krvi za biokemijsku analizu koncentracije ukupnog bilirubina, transaminaza (AST i ALT) i albumina, a po žrtvovanju je ekstripirana jetra, izmjerena njena masa i uzet uzorak tkiva za patohistološku morfometrijsku analizu površine hepatocita i promjera njihovih jezgri.

Tijekom resekcije nije bilo intraoperativnog krvarenja, sve su životinje preživjele do trenutka usmrćivanja, a kod žrtvovanih životinja nije nađen ascites. Radi malih uzoraka primjenjene su neparametrijske statističke metode za nezavisne uzorke, a statistički značajna razlika je definirana na razini greške 5%.

Kod gotovo svih eksperimentalnih životinja dolazi do oporavka praćenih parametara i gotovo sve životinje dostižu prijeresekcijske vrijednosti ukupne tjelesne mase (200 gr.) do žrtvovanja 14. dan. Analizirajući vrijednosti albumina, ALT-a, AST-a, bilirubina, mase ostane jetre, ukupne tjelesne mase i omjera mase ostatne jetre prema ukupnoj masi, te površine hepatocita, vidljivo je da BPC 157 ima pozitivan učinak i daje bolje rezultate, nego spontani oporavak (statistički značajna razlika). Pri tome je djelovanje BPC-a vidljivo (ovisno o praćenom parametru) već u grupama životinja žrtvovanih 4. dan (AST, albumin, ukupna tjelesna masa štakora, površina hepatocita), odnosno u grupama životinja žrtvovanih 14. dan (ALT, bilirubin, masa ostatne jetre, omjer mase jetre prema ukupnoj tjelesnoj masi), uz napomenu da jedino kod životinja tretiranih sa BPC-om dolazi do pada vrijednosti AST-a i bilirubina (vrijednost bilirubina u kontrolnoj grupi je trajno rasla). Analizirajući vrijednosti veličine jezgri hepatocita ne mogu se utvrditi statistički značajne razlike između BPC tretiranih i ne tretiranih životinja.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u djelovanju BPC-a temeljem načina aplikacije odnosno primjenjene doze (intraperitonealno, peroralno ili μg , ng), kao niti kod prolongirane primjene dulje od 21. dana.

Provedenim istraživanjem utvrđeno je da BPC 157 pospješuje obnavljanje postresekcijske jetre štakora, što je u skladu sa njegovom hepatoprotektivnom ulogom prikazanom u drugim radovima.

Ključne riječi: postresekcijska regeneracija jetre štakora, pentadekapeptid BPC 157

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

THE EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 ON RAT LIVER REGENERATION AFTER SUBTOTAL RESECTION

Dalibor Crvenković, 2020

Liver resection is a standard surgical procedure and at the moment considered superior to other methods of treatment for primary and secondary liver neoplasm (eg. chemotherapy, radiofrequency ablation, transarterial chemoembolisation, selective hepatic intra-arterial chemotherapy). During liver resection surgery, pathological (afunctional) tissue is surgically removed, in addition to some healthy (functional) liver tissue. Advances in hepatal surgery in recent years have resulted in operative procedures with minimal complications, especially if performed in centers specialized in liver surgery, thus selection of patients suitable for surgical procedure, as well as treatment outcome, depends largely on the extent of resection and *function* of the *remnant liver*. Extensive liver resection (eg. 70% resection of living donor liver resection or a smaller percentage in a tumor affected liver, particularly if associated with a diffuse liver illness (eg. hepatitis or cirrhosis) can result in post hepatectomy liver failure (small-for-size syndrome), leading to hepatic decompensation and fatal outcome.

Previous studies established that pentadecapeptid BPC 157 can have a positive impact on liver damaged by various toxic agents. The purpose of this study is to establish whether BPC 157 can improve parenchimal regeneration and funcnional rescitution of remaining liver. 70% liver resection in rats was chosen as a widely accepted experimental animal model for postresectional liver regeneration. Blood tests and healthy animal sacrificing in order to achieve reference values of analyzed parameters, as well as preresectional measuring of experimental animals for albumin, transaminases, bilirubin and weight of resected lobes were not preformed.

Resection was performed on 120 male Wistar rats each with total body mass of 200 gr..

Animals were postoperativly randomly divided into 6 grups (4 BPC and 2 control groups). On postoperative days 4, 14, 21 and 28, five animals from each group were randomly selected for sacrificing (24 groups of five rats in total). BPC 157 was applied (to animals) daily in dosage of 10 µg/kg and 10 ng/kg total body mass, injected intraperitoneally (in 1 ml saline solution) or given perorally (in 12 ml drinking water) respectively, while control group animals recived

daily 1ml saline solution intraperitoneally or drinking water only. Just before sacrificing, animals were measured for total body mass and blood samples were taken (measurement of total bilirubin, AST, ALT and albumin). After sacrificing, liver remnant was extirpated and weighted and a tissue sample was taken for patohystological morfometric analysis of hepatocyte surface area and nuclei diametar. All resections were made without intraoperative bleeding, postoperative mortality rate was 0% and no ascites were recorded in sacrificed animals. Small data samples lead to use of nonparametric statistics for independent samples and statistically significant difference was calculated with a 5% error.

In almost all experimental animals (both BPC treated and untreated) a notable improvement was observed in measured variables and almost all of the animals reached preresectional total body mass (200 gr.) until being sacrificed on postoperative day 14. Analysys of albumin, ALT, AST, bilirubin, hepatocyte surface area, also liver remnant mass, total body mass and their ratio, showed that BPC 157 had positive impact on liver remnant and results in better outcome compared to spontaneous liver regeneration (statistically significant difference). The positive BPC impact was already detectable (depending on the variable) in groups of animals sacrificed on postoperative day 4 (AST, albumin, total body mass, hepatocyte surface area), as well as in groups of animals sacrificed on postoperative day 14 (ALT, bilirubin, liver remnant mass, liver remnant mass to total body mass ratio) respectively. It should be noted that only in BPC treated animals AST and bilirubin decreased in value (while bilirubin values in control groups kept rising).

There was no statistically significant difference in hepatocyte nuclei diametar between BPC treated and untreated animals. Additionally, there was no statistically significant difference in BPC efficiency related either to the way or dosage of application (eg. intraperitoneally, perorally or µg, ng), or to prolonged application time over 21 days.

This research suggests that BPC 157 stimulates postresectional liver regeneration in rats, which corresponds to the hepatoprotective effect of BPC 157 found in other studies.

Keywords: postresectional liver regeneration in rat, pentadecapeptide BPC 157

10. POPIS LITERATURE

1. Healy A, Tracey J, Habib NA, Jiao LR. Indications for Liver Resection. U: Karaliotas CC, Broelsch CE, Habib NA. Liver and Biliary Tract Surgery. Atena: Springer Wien NewYork: 2006. str. 357-362
2. Patrlj L, Kopljar M, Kliček R, i sur. The surgical treatment of patients with colorectal cancer and liver metastases in the setting of the “liver first” approach. Hepatobiliary Surg Nutr. 2014; 3(5): 324–329.
3. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. Cancer. 1996;77:1254-62.
4. Stoot JHMB, Coelen RJS, Vugt van JLA, Dejong CHC. General Introduction : Advances in Hepatic Surgery. U: Abdeldayem H, ur. Hepatic Surgery: [internet].: InTech; 2013 – [ažurirano 13.02.2013.; pristupljeno 22.01.2014.]. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/hepatic-surgery/general-introduction-advances-in-hepatic-surgery>
5. Ito K, Govindarajan A, Ito H, Fong Y. Surgical treatment of hepatic colorectal metastasis: evolving role in the setting of improving systemic therapies and ablative treatments in the 21st century. Cancer J. 2010;16:103-10.
6. Adam R, Avisar E, Ariche A. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal liver metastases. Ann Surg Oncol. 2001;8:347-53.
7. Scheele J. Liver resection for colorectal metastases. World J Surg. 1995;19:59-71.
8. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, i sur. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. J Clin Oncol. 2007;25:4575-80
9. Park J, Chen YJ, Lu WP, Fong Y. The Evolution of Liver-Directed Treatments for Hepatic Colorectal Metastases. Oncology (Williston Park). 2014;28(11):991-1003.
10. Shi H, Yang G, Zheng T, i sur. A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model. Sci Rep. 2015; 5:17567
11. Damrah O, Canelo R, Jiao L, Habib NA. Portal Vein Embolisation. U: Karaliotas CC, Broelsch CE, Habib NA. Liver and Biliary Tract Surgery. Atena: Springer Wien NewYork: 2006. str. 380-396

12. Sgourakis G, Christofides T, Karaliotas CC. Preoperative Assessment of Liver Function. U: Karaliotas CC, Broelsch CE, Habib NA. Liver and Biliary Tract Surgery. Atena: Springer Wien NewYork: 2006. str. 339-356
13. Abdeldayem H, El Shaarawy A, Salman T, Hammad ES. Preoperative Evaluation and Management of Patients with Liver Disease. U: Abdeldayem H, El Shaarawy A, Salman T, ur. Recent Advances in Liver Diseases and Surgery: [internet].: InTech; 2015 – [ažurirano 28.10.2015.; pristupljeno 25.01.2016.]. Dostupno na <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-liver-diseases-and-surgery/preoperative-evaluation-and-management-of-patients-with-liver-disease>
14. Hammond JS, Gilbert TW, Howard D, i sur. Scaffolds containing growth factors and extracellular matrix induce hepatocyte proliferation and cell migration in normal and regenerating rat liver. J Hepatol. 2011;54(2):279-87.
15. Greif F, Ben-Ari Z, Taya R, i sur. Dual effect of erythropoietin on liver protection and regeneration after subtotal hepatectomy in rats. Liver Transpl. 2010;16(5):631-8.
16. Bockhorn M, Fingas CD, Rauen U, i sur. Erythropoietin treatment improves liver regeneration and survival in rat models of extended liver resection and living donor liver transplantation. Transplantation. 2008;86(11):1578-85.
17. Nishino M, Iimuro Y, Ueki T, Hirano T, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes. Surgery. 2008;144(3):374-84.
18. Tiberio GAM, Tiberio L, Benetti A, i sur. IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy. Cytokine. 2008;42(3):372-8.
19. Schmeding M, Boas-Knoop S, Lippert S, i sur. Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. J Gastroenterol Hepatol. 2008;23(7 Pt 1):1125-31.
20. Dinant S, Veteläinen RL, Florquin S, van Vliet AK, van Gulik TM. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. J Surg Res. 2007;141(2):176-82.
21. Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, i sur. Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF-beta receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. Surgery. 2006;139(4):563-73.
22. Lai HS, Chung YC, Chen WJ, Chen KM. Rat liver regeneration after partial hepatectomy: effects of insulin, glucagon and epidermal growth factor. J Formos Med Assoc. 1992;91(7):685-90.

23. Tanaka Y, Nagasued N, Kanashima R, Inokuchi K, Shirota A. Effect of doxorubicin on liver regeneration and host survival after two-thirds hepatectomy in rats. *Cancer*. 1982;49(1):19-24.
24. Deng M, Huang H, Dirsch O, Dahmen U. Effect and risk of AEE788, a dual tyrosine kinase inhibitor, on regeneration in a rat liver resection model. *Eur Surg Res*. 2010;44(2):82-95.
25. Davies N, Yates J, Kynaston H, Taylor BA, Jenkins SA. Effects of octreotide on liver regeneration and tumour growth in the regenerating liver. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12(1):47-53.
26. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Brain-gut axis and pentadecapeptide bpc 157: Theoretical and practical implications. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(8).
27. Sikiric P, Hahm K-B, Blagaic AB, i sur. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future. *Gut Liver*. 2019;1–15.
28. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Med Chem*. 2012;19(1):126–32.
29. Sikiric P, Rucman R, Turkovic B, i sur. Novel Cytoprotective Mediator, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Vascular Recruitment and Gastrointestinal Tract Healing. *Curr Pharm Des*. 2018;24(18):1990–2001.
30. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Pharm Des*. 2013;19(1):76–83.
31. Kang EA, Han Y-M, An JM i sur. BPC157 as Potential Agent Rescuing from Cancer Cachexia. *Curr Pharm Des*. 2018;24(18):1947–56.
32. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Des*. 2014;20(7):1126–35.
33. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Des*. 2010;16(10):1224–34.
34. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des*. 2011;17(16):1612–32.
35. Sikiric P, Petek M, Rucman R, i sur. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris*. 1993;87(5):313–27.

36. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, i sur. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des.* 2014;20(7):1121–5.
37. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Stress in Gastrointestinal Tract and Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Finally, do we have a Solution? *Curr Pharm Des.* 2017;23(27):4012–28.
38. Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, i sur. BPC 157 and Standard Angiogenic Growth Factors. *Gastrointestinal Tract Healing, Lessons from Tendon, Ligament, Muscle and Bone Healing.* *Curr Pharm Des.* 2018;24(18):1972–89.
39. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Boban Blagaic A, Zoricic I, Sever M, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology.* 2006;14:1–8.
40. Veljaca M, Pavic-Sladoljev D, Mildner B, i sur. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut.* 2003;51(Suppl III):A309.
41. Veljaca M, Krnic Z, Brajsa K, i sur. The development of PL 14736 for treatment of inflammatory bowel disease. *Inflammopharmacology.* 2002;10(4-6):564-5.
42. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M, Oreskovic K, Peterson J. Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL 14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2005;128:A584
43. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, i sur. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris.* 2001;95(1–6):295–301.
44. Sever M, Kliceck R, Radic B, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci.* 2009;54(10):2070-83.
45. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today.* 2007;37(9):768-77.
46. Ilic S, Drmic D, Franjic S, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci.* 2011;88(11-12):535-42.
47. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, i sur. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable

- gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(2):241-50.
48. Ilic S, Brcic I, Mester M, i sur. Over-dose insulin and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Attenuated gastric ulcers, seizures, brain lesions, hepatomegaly, fatty liver, breakdown of liver glycogen, profound hypoglycemia and calcification in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(Suppl 7):107-14.
 49. Zoricic I, Sikiric P, Seiwerth S. Pentadecapeptide BPC 157 beneficially influences the healing of colon-colon anastomoses in rats. U: Mozsik G, Nagy L, Par A, Rainsford KD, ur. *Cell injury and protection in the gastrointestinal tract. From basic sciences to clinical perspectives 1996.* Dodrecht, ect: Kluwer Academic Publishers;1997. str. 249-258.
 50. 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(3):285-90.
 51. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. The beneficial effect of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci.* 1994;54:63–68.
 52. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. Beneficial effect of novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci.* 1996;41:1604–14.
 53. Xue XC, Wu YJ, Gao MT, i sur. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1032–6.
 54. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, i sur. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in rat and therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2006;102:269–77.
 55. 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 BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2007;104(1):7-18.
 56. 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.
 57. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, i sur. Corticosteroids-impairment healing and gastric pentadecapeptide BPC 157 creams in burned mice. *Burns.* 2003;29:323–34.

58. Veljaca M, Chan K, Guglietta A. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-15 in human gastric juice. *Gastroenterology*. 1995;108:A761.
59. Seveljevic JD, Cuzic S, Dominis Kramaric M, i sur. Accelerated healing of excisional skin wound by PL 14736 in alloxan-hyperglycemic rats. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19:266–74.
60. Xue XC, Wu YJ, Gao MT. Study of the protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on wounds in small type pigs. *Chin New Drugs J*. 2004;12:602–4.
61. 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.
62. 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.
63. 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;95:295-301.
64. Bedekovic V, Mise S, Anic T, i sur. Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacology*. 2003;477:73-80.
65. Staresinic M, Sebecic B, Jadrijevic S, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthopaed Res*. 2003;21:976-83.
66. Sebecic B, Nikolic V, Sikiric P, i sur. Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide BPC 157, on the healing of segmental bone defect in rabbits. A comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone*. 1999;24:195-202.
67. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. The influence of a novel pentadecapeptide BPC 157 on NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosal integrity and blood pressure. *EurJPharmacol*.1997;332:23–33.
68. Jandric I, Vrcic H, Jandric Balen M, i sur. Salutory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 in two different stress urinary incontinence models in female rats. *Med Sci Monit Basic Res* 2013;19:93-102.
69. Vukojević J, Siroglavić M, Kašnik K, i sur. Rat inferior caval vein (ICV) ligation and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Vascul Pharmacol* 2018;106:54-66.

70. Duzel A, Vlainic J, Antunovic M, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in the treatment of colitis and ischemia and reperfusion in rats: New insights. *World J Gastroenterol.* 2017;23(48):8465–88.
71. Amic F, Drmic D, Bilic Z, i sur. Bypassing major venous occlusion and duodenal lesions in rats, and therapy with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157, L-NAME and L-arginine. *World J Gastroenterol.* 2018;24(47):5366–78.
72. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, i sur. Inhibition of methyl digoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: A relation with NO-system. *Regul Pept.* 2009;156(1–3):83–9.
73. Barisic I, Balenovic D, Klicek R, i sur. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. *Regul Pept.* 2013;181(1):50–66.
74. Balenovic D, Barisic I. Mortal Furosemide-Hypokalemia-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 Cardiol.* 2012;03(07):1–15.
75. Becejac T, Cesarec V, Drmic D, i sur. An endogenous defensive concept, renewed cytoprotection/adaptive cytoprotection: intra(per)-oral/intraaortic strong alcohol in rat. Involvement of pentadecapeptide BPC 157 and nitric oxide system. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(3): 429-40.
76. Drmic D, Kolenc D, Ilic S, i sur. Celecoxib-induced gastrointestinal, liver and brain lesions in rats, counteraction by BPC 157 or L-arginine, aggravation by L-NAME. *World J Gastroenterol.* 2017;23(29):5304–12.
77. Lojo N, Rasic Z, Sever AZ, i sur. Effects of Diclofenac, L-NAME, L-Arginine, and pentadecapeptide BPC157 on gastrointestinal, liver, and brain lesions, failed anastomosis, and intestinal adaptation deterioration in 24 hour-short-bowel rats. *PLoS One.* 2016;11(9).
78. Stupnisek M, Kokot A, Drmic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin, L-NAME and L-Arginine. *PLoS One.* 2015;10(4).
79. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb Res.* 2012;129(5):652–9.

80. 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(4):581–90.
81. 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(1):7–17.
82. Djakovic Z, Djakovic I, Cesarec V, i sur. Esophagogastric anastomosis in rats: Improved healing by BPC 157 and L-Arginine, aggravated by L-NAME Basic Study. *World J Gastroenterol*. 2016;22(41):9127–40.
83. Zemba M, Cilic AZ, Balenovic I, i sur. BPC 157 antagonized the general anaesthetic potency of thiopental and reduced prolongation of anaesthesia induced by l-NAME/thiopental combination. *Inflammopharmacology*. 2015;23(6):329–36.
84. 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(4):439–49.
85. Kokot A, Zlatac 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. *Eur J Pharmacol*. 2016;771:211–9.
86. 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(2):255–64.
87. 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(5):511–22.
88. Drmic D, Samara M, Vidovic T, i sur. Counteraction of perforated cecum lesions in rats: Effects of pentadecapeptide BPC 157, L-NAME and L-arginine. *World J Gastroenterol*. 2018;24(48):5462–76.
89. Brennan PA, Moncada S. From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann R Coll Surg Engl*. 2002;84(2):75–8.
90. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524–6.

91. Ghalayini IF. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *Int J Impot Res.* 2004;16(6):459–69.
92. Viteček J, Lojek A, Valacchi G, Kubala L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:1-22.
93. Robbins RA, Grisham MB. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(6):857–60.
94. Kochar NI, Chandewal A V., Bakal RL, Kochar PN. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *Int J Pharmacol.* 2011;7(1):31–9.
95. Stuehr DJ, Vasquez-Vivar J. Nitric oxide synthases-from genes to function. *Nitric Oxide.* 2017;63:1-29.
96. Groves JT, Wang CCY. Nitric oxide synthase: Models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol.* 2000;4(6):687–95.
97. Abu-Soud HM, Feldman PL, Clark P, Stuehr DJ. Electron transfer in the nitric-oxide synthases: Characterization of L- arginine analogs that block heme iron reduction. *J Biol Chem.* 1994;269(51):32318–26.
98. Luiking YC, Deutz NEP. Biomarkers of Arginine and Lysine Excess. *J Nutr.* 2007;137(6):1662S-1668S.
99. Hegyi P, Rakonczay Z. The Role of Nitric Oxide in the Physiology and Pathophysiology of the Exocrine Pancreas. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(10):2723–41.
100. Helling TS. Liver failure following partial hepatectomy. *HPB.* 2006; 8(3): 165–174.
101. Sánchez-Hidalgo JM, Naranjo A, Ciria R, i sur. Impact of age on liver regeneration response to injury after partial hepatectomy in a rat model. *J Surg Res.* 2012;175(1):e1-9.
102. Sun HZ, Zhao SZ, Ai HB. Role of nitric oxide in the control of the gastric motility within the nucleus ambiguus of rats. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(6):623–9.
103. Glavin GB, Szabo S. Dopamine in gastrointestinal disease. *Dig Dis Sci.* 1990;35(9):1153–61.
104. Glavin GB, Hall AM. Brain-gut relationships: gastric mucosal defense is also important. *Acta Physiol Hung.* 1992;80(1–4):107–15.
105. Martins PNA, Neuhaus P: Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int.* 2007; 27:384-92.
106. Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1999;6(2):171-5.

107. Di Domenico S, Santori G, Balbis E, i sur. Biochemical and morphologic effects after extended liver resection in rats: preliminary results. *Transplant Proc.* 2010;42(4):1061-5.
108. Martins PNA, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int.* 2008; 28:3-11.
109. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal Hepatectomy in the Rat: From Anatomy to Surgery. *Ann Surg.* 2006; 244(1):89-98.
110. Vdoviaková K, Petrovová E, Maloveská M, Krešáková L, Teleky J, Zefanias M, i sur. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterol Res Pract.* 2016; 2016:1-11.
111. Sängler C, Schenk A, Schwen LO, Wang L, Gremse F, Zafarnia S, i sur. Intrahepatic Vascular Anatomy in Rats and Mice - Variations and Surgical Implications. *PLoS One.* 2015; 10(11).
112. Aller MA, Arias N, Prieto I, i sur. A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol.* 2012; 4(7):199–208.
113. Rowe A, Zhang L, Hussain A, Braet F, Ramzan I. Assessment and histological analysis of the IPRP technique for sequential in situ liver biopsy. *Comp Hepatol.* 2011;10(7):1-7.
114. Jiménez-Castro MB, Elias-Miró M, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Experimental Models in Liver Surgery. U: Abdeldayem H, ur. *Hepatic Surgery: [internet].: InTech; 2013 – [ažurirano 13.02.2013.; pristupljeno 22.01.2014.]. Dostupno na:*
<http://www.intechopen.com/books/hepatic-surgery/experimental-models-in-liver-surgery>
115. Teutsch HF, Schuerfeld D, Groezinger E: Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. *Hepatology.* 1999; 29:494-505.
116. Ren YS, Qian NS, Tang Y, i sur. Beneficial effects of splenectomy on liver regeneration in a rat model of massive hepatectomy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11(1):60-5.
117. Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery.* 1997;121(2):142-9.
118. Teixeira ARF, Machado MCC, Kubrusly MS, i sur. A new experimental model for acute hepatic failure in rats. *Acta Cir Bras.* 2010; 25(3):269–74.
119. Ekici Y, Tez M, Sökmensüer C, Baskan S. Mechanism of Cell Death After Extensive Liver Resection: Apoptosis or Necrosis?. *Internet J Pathol.* 2012; 3(2) :1–6.

120. Rahman TM, Hodgson HJF. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol*. 2000; 81(2): 145–57.
121. Cobb L. Cell Based Assays: the Cell Cycle, Cell Proliferation and Cell Death. *Mater Methods*. 2013;3:1–21.
122. Johns Hopkins Animal Care and Use Committee. Policies and Guidelines [Internet]. Baltimore: [pristupljeno 09.09.2013.]. Dostupno na: <http://web.jhu.edu/animalcare/policies/index.html>
123. Johns Hopkins Animal Care and Use Committee. Procedures [Internet]. Baltimore: [pristupljeno 09.09.2013.]. Dostupno na: <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/index.html>
124. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – Laboratory rat; [ažurirano 28.05.2015; pristupljeno 07.09.2013.]. Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Laboratory_rat
125. Johns Hopkins Animal Care and Use Committee. The Rat [Internet]. Baltimore: [pristupljeno 09.09.2013.]. Dostupno na: <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>
126. Johns Hopkins Animal Care and Use Committee. Laboratory Animal Anesthetic and Analgesic Formulary [Internet]. Baltimore: [pristupljeno 09.09.2013.]. Dostupno na: <http://web.jhu.edu/animalcare/COMPLETE%20JHU%20ACUC%20FORMULARY.pdf>
127. Biologic Resources Laboratory University of Illinois at Chicago. Euthanasia of laboratory animals. *BRL Bull*. 2014.;29(1):1–3.
128. Jablonski P, Howden BO. Oral buprenorphine and aspirin analgesia in rats undergoing liver transplantation. *Lab Anim*. 2002;36(2):134-43.
129. The University of British Columbia Animal Care and Use Program. Guideline Rodent Anesthesia Analgesia Formulary [Internet]. Vancouver, BC Canada: [pristupljeno 12.09.2013.]. Dostupno na: <http://ors.ubc.ca/contents/animal-care-sops-guidelines>
130. The University of North Carolina at Chapel Hill Division of Laboratory Animal Medicine. Rat Analgesia and Anesthesia formulary [Internet]. Chapel Hill NC: [pristupljeno 08.09.2013.]. Dostupno na: http://research.unc.edu/ccm/groups/public/@research/@iacuc/documents/content/ccm3_025009.pdf
131. Panis Y1, Ribeiro J, Chrétien Y, Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg*. 1992;79(3):221-3.

132. Panis Y1, Nordlinger B, Delelo R, Herve JP, Infante J, Kuhnle M, i sur. Experimental colorectal liver metastases. Influence of sex, immunological status and liver regeneration. J Hepatol. 1990;11(1):53-7.
133. DIAGEN d.o.o.. Description of BPC 157 [Internet]. Ljubljana: 2015 [pristupljeno 20.12.2015.]. Dostupno na: <http://www.bpc157.si/description-of-bpc-157/>

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Rođen u Zagrebu 1965. godine, u kojem završio osnovno i srednje školsko obrazovanje, Medicinsk fakultet, te specijalizaciju iz opće i užu specijalizaciju iz digestivne kirurgije. Zaposlen kao liječnik kirurg na Klinici za kirurgiju u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ u Zagrebu.