Učinci pentadekapeptida BPC 157 na otvaranje postojećih kolaterala i na cijeljenje sluznice dvanaesnika nakon podvezivanja prednje pankreatikoduodenalne vene u štakora

Amić, Fedor

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:105:601597

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Fedor Amić

Učinci pentadekapeptida BPC 157 na otvaranje postojećih kolaterala i na cijeljenje sluznice dvanaesnika nakon podvezivanja prednje pankreatikoduodenalne vene u štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Fedor Amić

Učinci pentadekapeptida BPC 157 na otvaranje postojećih kolaterala i na cijeljenje sluznice dvanaesnika nakon podvezivanja prednje pankreatikoduodenalne vene u štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za farmakologiju i Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor: Izv. prof.dr.sc. Ante Tvrdeić
Komentor: Doc.dr.sc. Mario Zovak

Zahvaljujem se djelatnicima laboratorija na Zavodu za farmakologiju na pomoći u izvedbi ovog istraživanja te profesoru Sikiriću na poticaju i prilici za izvođenje ovog eksperimenta. Hvala mojoj Ani na ohrabrenju svaki puta kada je krenulo nizbrdo, kao i kćerkici Riti zbog koje sve ima smisla. Hvala cijeloj mojoj obitelji, svim prijateljima te osobito djedu Ivanu, koji me od malih nogu učio kritičkom promišljanju. Konačno, i ništa manje važno, hvala obojici mojih mentora, osobito profesoru Tvrdeiću koji je utjelovljenje riječi strpljenje.

SADRŽAJ

1.0. UVOD....1
1.1. Pentadekapeptid BPC 157....1
1.1.1. Porijeklo i sastav, izolacija, sinteza....1
1.1.2. Farmakokinetika....2
1.1.3. Farmakodinamika....2
1.1.4. Štetni učinci i klinička ispitivanja....3
1.2. Učinak na probavni sustav....4
1.2.1. BPC 157 u modelima lezija jednjaka....5
1.2.2. BPC 157 u modelima lezija želuca....5
1.2.3. BPC 157 u modelima lezija duodenuma....7
1.2.4. BPC 157 u modelima lezija crijeva....7
1.2.5. BPC 157 u modelima lezija jetre....8
1.2.6. BPC 157 u modelima lezija gušterače....9
1.3. Selye–ov stres i Robert–ova citoprotekcija....10
1.3.1. Robert–ova citoprotekcija i pentadekapeptid BPC 157....14
1.3.2. BPC 157 i citoprotekcija endotela....17
1.3.3. BPC 157 i citoprotekcija živčanog sustava....19
1.4. Fiziologija kapilara....22
1.5. Ideja za istraživanje....24
2.0. HIPOTEZA....26
3.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA....27
3.1. Opći cilj istraživanja....27
3.2. Specifični ciljevi istraživanja....27

4.0. MATERIJALI I METODE 28
4.1. Životinje 28
4.2. Lijekovi....28
4.3. Eksperimentalni protokol 29
4.3.1. Kirurški zahvat....29
4.3.2. Primjena lijekova 30
4.3.3. Postupci i procjena uzorka (broja životinja)....30
4.3.4. Snimanje i brojanje kolaterala....32
4.3.5. Eksplantacija tkiva, patohistologija 36
4.3.6. Oksidativni stres 36
4.3.7. Određivanje NO u tkivu duodenuma 37
4.3.8. Statistička analiza 37
5.0. REZULTATI 38
6.0. RASPRAVA 58
7.0. ZAKLJUČAK 62
8.0. SAŽETAK....63
9.0. SUMMARY....64
10.0. LITERATURA....65
11.0. KRATKA BIOGRAFIJA AUTORA 80

Popis kratica

BPC 157 — Body Protective Compound 157, pentadekapeptid

L–NAME — N^G — nitro–L–arginin metil ester, blokator NOS–a

NO — dušični oksid

NOS — enzim NO sintetaza

COX — enzim ciklooksigenaza

MDA — malondialdehid

ip. — intraperitonealno

sc. — potkožno

po. — peroralno

LD — letalna doza

AST — aspartat–aminotransferaza

ALT — alanin–aminotransferaza

µg — mikrogram

HPLC — visokotlačna tekuća kromatografija

egr 1 — early growth response gen

SAPDV — gornja prednja pankreatikoduodenalna vena

IAPDV — donja prednja pankreatikoduodenalna vena

SMV — gornja mezenterična vena

1.0. UVOD

1.1. Pentadekapeptid BPC 157

1.1.1. Porijeklo i sastav, izolacija, sinteza

Pentadekapeptid BPC 157 je sintetska inačica aktivnog fragmenta endogenog želučanog peptida, prvotno izoliranog iz želučanog soka, a u pretkliničkim istraživanjima je pokazao antiulkusni učinak (1–3). Za razliku od drugih peptida, stabilan je u želučanom soku i za apsorpciju ne treba prijenosnik (4–6). Radi se o peptidu koji ima 15–aminokiselina (Gly–Glu–Pro–Pro–Pro–Gly–Lys–Pro–Ala–Asp–Asp–Ala–Gly–Leu –Val), molekularnu formulu $C_{62}H_{98}N_{16}O_{22}$, te relativnu molekularnu masu 1419 Da. U literaturi se, uz naziv BPC 157, može pronaći i pod sinonimima body protection compound 15, zatim BPC–15, BPC 15, BPC–157, PL, 36, PL–10 te Bepecin.

Osim u želucu, prisutan je u crijevima te u mozgu (1).

BPC 157 je sintetiziran u tvrtci Diagen (Ljubljana, Slovenija). U različitim istraživanjima koristi se u širokom rasponu doza (μg/kg, ng/kg ili pg/kg) i različitim načinima primjene (lokalno u obliku kupki, intraperitonealno, intragastrično, per os, u formi kreme te u kapima za oči).

Sinteza pentadekapeptida BPC 157 se provodi stupnjevitom kondenzacijom pomoću aminokiselina zaštićenih fluoren–9–ilmetoksikarbonilom (Fmoc). Kondenzacija započinje prvom aminokislelinom (valin), vezanom uz polimerni nosač (benzildrilaminorezin). Vezivajući reagens je diisopropilkarodimid. U svakoj etapi kondenzacije se jedna protektivna Fmoc grupa zamijeni piperidinom, dok se jedna aminokiselina nadoveže i tako redom za svaku idući aminokiselinu, sve do završetka sinteze. Razdvajanje se obavlja uz pomoć trifluorometansulfonske i trifluorooctene kiseline u omjeru 2:17:52 te se potom sirova mješavina pročisti u HPLC stupcu (high performance liquid chromatography) 5 mm i.d., duljine 150 mm, silica gel RP–18, s gradijentom elucije u sustavu otapanja: 0,1 trifluorooctena u vodi/acetonitrilu.

Na taj se način dobije peptid 99 %–tne čistoće, dok pritom jedinu nečistoću čini 1–des–glipeptidaza (7–9).

1.1.2. Farmakokinetika

Kako bi se pokazala farmakokinetička svojstva pentadekapeptida BPC 157 (10), za primjer je uzet pokus u kojemu je trinaest grupa štakora (3 mužjaka i 3 ženke u grupi) peroralno primilo BPC 157 obilježen radioaktivnim tricijem (^{3}H — BPC157) i to u dozi 10 mg/kg (otprilike 70 Rci/kg). Nakon žrtvovanja životinja u određenim vremenskim intervalima prikupljana je njihova krv kako bi se odredila razina radioaktivnosti u krvi i plazmi. Pokazalo se kako se ^{3}H — BPC157 brzo apsorbirao iz probavnog trakta. Poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$) mu je iznosilo otprilike 68 sati. U periodu od pola sata do 16 sati nakon administracije razina radioaktivnosti u plazmi je ostala nepromjenjena (10 µg/ml). BPC 157 se uglavnom izlučivao mokraćom (30 %) te nešto manjim dijelom stolicom (12 %). Preostala doza predstavlja eliminirani dio, vjerojatno kao ^3H_2O u izdahnutom traku, i to nakon prethodne biotransformacije i izmjene izotopa tricijem obilježenog pentadekapeptida BPC 157 i tjelesne vode. Što se tiče raspodjele po tkivima, pokazalo se kako su jedan sat nakon aplikacije, povišene vrijednosti koncentracije ^{3}H — BPC157 pronađene u stijenkama tankog crijeva i želuca, čak dva do tri puta veće od onih izmjerenih u plazmi. Došlo je i do nešto manjeg nakupljanja u gušterači i plućima. Sva ostala tkiva koja su promatrana su imala slične vrijednosti radijacije kao one u plazmi.

1.1.3. Farmakodinamika

Istraživan je afinitet pentadekapeptida BPC 157 za neke G protein spregnute receptore (11), počevši od histaminskih i serotoninskih (5–HT1, 5–HT2) do adenozinskih, dopaminskih, muskarinskih (M1, M2, M3) i konačno adrenergičkih (alfa i beta). Pokazalo se kako BPC 157 nema nikakvu interakciju s prethodno navedenim receptorima. BPC 157 je prema podacima iz literature in vivo učinke postizao većinom u mikrogramskim i nanogramskim dozama. Što se tiče ostalih ciljeva uobičajenih za

većinu lijekova (ionotropni receptori, tirozin kinaza receptori, enzimi, prijenosnici, naponski ionski kanali, transdukcijski proteini, DNA, RNA, ribosomi, mitohondriji) nema podataka u literaturi da BPC 157 izravno djeluje na neki od njih, s izuzetkom egr1 gena (kodira EGR1 transkripcijski faktor u sisavaca) kojega stimulira u „in vitro" uvjetima. To nije neuobičajno. U kliničkoj upotrebi danas ima otprilike dvadesetak lijekova kojima i dalje ne znamo molekularni mehanizam djelovanja i/ili metu, a najpoznatiji među njima su paracetamol i inhalacijski opći anestetici (12). Također, istraživan je utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na aktivnost mikrosomalnih enzima jetre miša, citokroma P–448 i P–450 (13) te BPC 157 nije inducirao aktivnost istih.

1.1.4. Štetni učinci i klinička ispitivanja

Literaturni podaci o sigurnosnom profilu BPC 157 su pokazali da se LD1 učinak (smrt u 1 % tretirane populacije životinja ili stanica) nije mogao postići u testiranim dozama (6). Treba istaknuti da je pentadekapeptid BPC 157 bio iskušan u kliničkim istraživanjima faze II (PL–10, PLD–116, PL–36, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Republika Hrvatska), između ostalog i za liječenje ulceroznog kolitisa (4, 14). Za sada, u kliničkim pokusima nije zabilježeno toksično djelovanje (14).

1.2. Učinak na probavni sustav

Pentadekapeptid BPC 157 pokazao je pozitivan učinak u pretkliničkim istraživanjima cijeljenja oštećenja tkiva i to na različitim modelima — na modelu upalnih bolesti jednjaka (15–17), gastrokutanih (18), kolokutanih (19) i cervikalnih ezofagokutanih fistula (20) u štakora. BPC 157 je također potpomogao cijeljenje oštećenja nastalih zbog uspostavljanja anastomoza u štakora (21, 22). U tom modelu je BPC 157 poboljšavao sve ispitivane parametre cijeljenja rane, a samo mjesto anastomoze podnosilo je veće vrijednosti tlaka i one su se približavale normalnim vrijednostima. Pored toga, BPC 157 je djelovao citoprotektivno na sluznicu želuca štakora koja je bila izložena kemijskim oštećenjima alkoholom i nesteroidnim protuupalnim lijekovima (23–25). Također, antagonizirao je učinke etanola i onemogućio je nastanak etanolom izazvanih akutnih i kroničnih lezija želuca i jetre, kao i lezija jetre prouzročenih uporabom nesteriodnih protuupalnih lijekova (26–28).

Homodimer varijanta trombocitnog čimbenika rasta (varijanta PDGF–BB; mitogeni je čimbenik stanica mezenhimskog porijekla) i BPC 157 su pokazali sličnu selektivnost za stimulaciju granulacijskog tkiva u spužvastog granuloma i za cijeljenje ekscizijske rane u normoglikemičnih db/db dijabetičnih miševa. Međutim, BPC 157 je brže od PDGF–BB potaknuo ekspresiju egr–1 i njegovog represornog faktora NGF1–A vežućeg proteina–2 (nab2) u nediferecniranim Caco–2 stanicama. Pored toga, BPC 157 je aktivnije poticao ranu organizaciju kolagena od PDGF–BB. Poznato je da EGR–1 (29) inducira proizvodnju citokina i faktora rasta, te ranu tvorbu izvanstaničnog kolagena, što bi moglo biti objašnjenje za pozitivni učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje ekscizijske rane, ovdje poglavito prilikom tretiranja raznih fistula (30–33).

1.2.1. BPC 157 u modelima lezija jednjaka

Pentadekapeptid BPC 157 je u dosadašnjim modelima ezofagitisa pokazao pozitivan učinak na donji jednjačni sfinkter i piloričnі sfinkter štakora u stanjima njihove disfunkcije. Čak i samo disfunkcija pilorusa uzrokuje ezofagitis sa smanjenim tlakom u području i piloričnog i donjeg jednjačnog sfinktera uzrokujući na taj način poremećaj funkcije oba sfinktera. Pokazano je kako BPC 157 antagonizira navedena oštećenja, dok standardni agensi u ovim slučajevima nisu bili učinkoviti (16, 17). Pokazano je i da BPC 157 ima različit učinak na spomenute sfinktere u stanjima zdravlja ili bolesti. Dok u zdravih životinja djeluje na način da povećava pritisak donjeg jednjačnog sfinktera i uzrokuje slabljenje piloričnog sfinktera, u bolesnih je životinja, odnosno životinja s ezofagitisom, uzrokovao konstantno povećanje pritiska sfinktera. Na taj je način utjecao na kontrolu sfinkteričnog biomehanizma povratne sprege koji je ključan za održavanje integriteta tkiva i predstavlja ključni antirefluksni mehanizam u zdravih životinja (16, 17). Pentadekapeptid BPC 157 je također pokazao sposobnost inhibicije ezofagitisa u štakora s ezofagojejnunalnom anastomozom (15). U spomenutom slučaju, za ulcerogeni efekt su zaslužni tripsin, alkalni refluks i dekonjugirane žučne soli (34).

1.2.2. BPC 157 u modelima lezija želuca

Najvažniji učinak pentadekapeptida BPC 157 na želudac (3, 8, 28, 35–52) je cijeljenje rana odnosno pospješivanje cjeljenja ulkusa koji prije njegove primjene nisu odgovarajuće zacjeljivali (1, 53–55). U podlozi tih ulkusa, odnosno njihove nemogućnosti cijeljenja je ista patologija kao i kod kožnih ulceracija, a ono što ih povezuje je učinak pentadekapeptida BPC 157 na njihovo cijeljenje što je poglavito pokazano u modelima gastrokutanih fistula (18). U tom modelu valja spomenuti učinak na sistemsku primjenu kortikosteroida čiji su negativni učinci poništeni primjenom pentadekapeptida BPC 157 (18). Navedeno je posebno dobro pokazano u opečenih životinja sa stres ulkusima gdje je primjena pentadekapeptida BPC 157 dovela do simultanog zaliječenja kožnih i želučanih lezija uz poništenje učinka sistemske primjene kortikosteroida i imunosupresije (50, 51).

BPC 157 je u različitim studijama pokazao niz pozitivnih učinaka, bilo da se radi o kroničnim ili akutnim lezijama različitog uzroka (28, 35, 38, 42, 48, 49). Na taj je način također pokazano svojstvo citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije djelujući i u kratkim i dugim vremenskim intervalima (28, 35, 42, 48, 49). Osim antagoniziranja lezija uzrokovanih alkoholom, BPC 157 je pokazao izuzetan učinak na lezije želuca uzrokovane podvezivanjem pilorusa (3), lezije uzrokovane rezerpinom i haloperidolom (44–47), samim time i učinak na poremećaje dopaminskog sustava, nadalje lezije uzrokovane nesteroidnim antireumaticima i posljedične poremećaje prostaglandinskog sustava (23, 39), lezije uzrokovane kapsaicinom (28) te zatajenjem somatosenzornih neurona. BPC 157 je također imao antagonizirajući učinak na želučane lezije uzrokovane aloksanom, u isto vrijeme uzrokujući i cijeljenje kožnih ulkusa uzrokovanih istom supstancom (56). Praćen je i učinak na ozljede nastale alkoholom u smislu alkoholom uzrokovanih lezija ne samo sluznice nego i endotela (35) te učinka pentadekapeptida BPC 157 na isti pokazujući pritom i njegov angiogenetski potencijal (1, 30, 57, 58). Slijedom svega navedenog, BPC 157 je ispoljio dva značajna učinka, lokalni i generalizirani. Kod generaliziranog učinka se radi o interakciji s različitim drugim sustavima uzrokujući na taj način cijeljenje želučanih lezija potaknutih različitim vrstama stresa (35, 37), a u nedavnoj studiji učinak i na lezije uzrokovane teškom hipoglikemijom i predoziranjem inzulinom (52). Govoreći o lokaliziranim učincima, BPC 157 je pokazao već spomenuti angiogeni efekt i formiranje granulacijskog tkiva (59), više od omeprazola, H2 blokatora ili sukralfata. Nadalje, pokazao je učinak citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije (43), te konačno učinak na održavanje i obnavljanje zaliha AMP–ADP–ATP u želučanoj sluznici (59).

1.2.3. BPC 157 u modelima lezija duodenuma

U modelima lezija duodenuma odnosno ulceracija, zoran model za pokazivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 predstavlja primjena cisteamina i posljedični razvoj duodenalnih lezija, izvorno pokazan od strane Szabe (60). Nekoliko studija na ovom modelu je pokazalo terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 (35, 38, 61, 62), u smislu atenuiranja lezija uzrokovanih cisteaminom, čak i u slučajevima nakon gastrektomije (38) i sialoadenektomije (62). Treba se prisjetiti i prije spomenutog učinka pentadekapeptida BPC 157 na pilorični sfinkter te posljedično tome i na negativni učinak koji cisteamin ima na motilitet dvanaesnika (16, 17, 60). Valja reći kako je u modelima duodenokutanih fistula (60) BPC 157 pokazao izvrstan učinak na cijeljenje i duodenuma i kožnog defekta (63), gdje se može povući paralela s cijeljenjem gastrokutanih fistula (18), opisanih u poglavlju prije. Na taj se način učinak supstance na lezije duodenuma direktno može povezati s učinkom na lezije želuca, pa i jednjaka, opet radi lokalnog i generaliziranog efekta koji BPC 157 pokazuje, učinka na sfinktere, antirefluksnog mehanizma i ostalih učinaka spomnutih ranije.

1.2.4. BPC 157 u modelima lezija crijeva

Do sada je pentadekapeptid BPC 157 istraživan u pacijenata s upalnim bolestima crijeva, kao što je već spomenuto (1, 4, 6, 53–55) te je pokazano kako uzrokuje protekciju crijeva (64) uz smanjenje medijatora upale, bilo da se radi o akutnim, subakutnim ili kroničnim upalama (1), te pojačava funkciju imunoloških efektorskih stanica (65). Također, BPC 157 je pokazao učinak i u cijeljenju različitih crijevnih anastomoza (21, 65, 66), bilo da se radi o tankocrijevnim anastomozama (21, 66) ili anastomozama debelog crijeva (22). Pokazana je i učinkovitost u liječenju komplikacija upalnih bolesti crijeva (19, 21, 66), učinak na sindrom tankog crijeva uz povećanu adaptivnu sposobnost ostatka crijeva nakon velikih resekcija te kako nakon istih utječe na smanjenje gubitka težine. BPC 157 je pokazao učinak ubrzanog cjeljenja defekata debelog crijeva u štakora s kolokutanim fistulama (19). S obzirom da je pokazao sličan učinak u različitim modelima kutanih fistula (18, 19, 63) zaključak je kako pentadekapeptid BPC 157 može predstavljati alternativnu ili dodatnu terapiju u cijeljenju različitih fistula. Pokazan je i učinak na cijeljenje crijevnih ulkusa izazvanih

primjenom diklofenaka u visokim dozama (23). Valja na kraju spomenuti model ulceroznog kolitisa i učinak koji pentadekapeptid BPC 157 na isti ima. Nadovezujući se na istraživanje o duodenalnim ulkusima uzrokovanim cisteaminom nastao je model ulceroznog kolitisa (31, 61) upravo primjenom cisteaminskih klizmi. Tu je opet pokazan učinak pentadekapeptida BPC 157 uzrokujući uspješno cijeljenje lezija u opisanom modelu (31, 61) sa smanjenom učestalošću recidiva bolesti te se na taj način BPC 157 nameće kao moguća terapijska metoda izbora u pacijenta s ulceroznim kolitisom.

1.2.5. BPC 157 u modelima lezija jetre

BPC 157 je u dosadašnjim studijama pokazao učinak na smanjenje povišenih vrijednosti alanin–aminotransferaze (ALT), aspartat–aminotransferaze (AST) te amilaze, blagotvoran učinak na masnu jetru, hepatomegaliju te ubrzano razlaganje jetrenog glikogena kod izrazite hipoglikemije (52). Primjenjivan je u mnogim modelima jetrenih lezija kao što su podvezivanje struktura hepatoduodenalnog ligamenta, jetrena oštećenja uzrokovana dugoročnom primjenom etanola te primjenama visokih doza paracetamola i diklofenaka. U modelima lezija nastalih primjenom etanola, BPC 157 je utjecao na smanjenje jetrenih i želučanih (67) lezija te je njegova primjena dovela do smanjenja portalne hipertenzije. U modelima u kojima se kao štetni agens koristio paracetamol, BPC 157 je pokazao atenuirajući učinak ne samo na jetrene lezije već i na razvoj hepatalne encefalopatije uzrokovane predoziranjem životinja ovim lijekom (26). Prilikom predoziranja u nekih su se životinja javljale i konvulzije (26), čija je incidencija također primjenom pentadekapeptida BPC 157 smanjena dok je terapijski učinak u ovom modelu postignut kako u ranijim, tako i u kasnijim vremenskim periodima (26). S obzirom na opisane efekte koji nastaju prilikom predoziranja paracetamolom, i u vrlo visokim dozama, primjena pentadekapeptida BPC 157 bi u ovim slučajevima, antagonizirajući štetne učinke paracetamola, mogla utjecati na smanjivanje incidencije pojave encefalopatije te posljedično i jetrenog zatajenja (26). Nadalje, u modelima gdje se kao štetni agens koristio diklofenak, slično kao kod primjene paracetamola, BPC 157 je atenuirao štetne učinke u smislu pojave encefalopatije i jetrenog zatajenja (23). Također se pokazalo kako je došlo do normalizacije serumskih vrijednosti alanin–aminotransferaze i aspartat–

aminotrasferaze te posljedično do smanjenja lezija drugih oštećenih organa, poglavito duodenuma i želuca. Evidentan je utjecaj na mozak na način da je kod velikih doza diklofenaka došlo do značajnog smanjenja edema mozga te smanjenja gubitka neurona, posebno iz cerebelarnih jezgara te korteksa velikog mozga (23). Pokazano je kako je za upravo taj efekt inhibicije negativnog učinka nesteroidnih protuupalnih lijekova na cijeljenje i hepatotoksičnost odgovorna pentadekapeptidom BPC 157 izazvana stimulacija egr 1 gena („early growth response 1" gen, kodira brzodjelujući transkripcijski faktor egr 1 u sisavaca) (23).

1.2.6. BPC 157 u modelima lezija gušterače

Do sada istraživani modeli akutnog pankreatitisa u štakora uzrokovani su ili podvezivanjem ductusa choledocusa (36) ili primjenom kalcijevog klorida — $CaCl_2$ (68). Prilikom podvezivanja glavnog žučnog voda dolazi do bilijarnog pankreatitisa radi opstrukcije bilijarnopankreatičnog sustava i hiperstimulacije gušterače što dovodi do pankreatitisa. BPC 157 je imao pozitivan učinak na pankreatitis, bilo primjenjivan kao profilaksa ili kao terapijsko sredstvo (36). Također je imao antagonizirajući učinak na pankreatitis izazvan primjenom kalcijevog klorida — $CaCl_2$ (68). S obzirom na pokazani učinak u ovim modelima, postoji mogućnost da se pentadekapeptid BPC 157, uz GLP–1 i GIP, tretira i kao inkretin (36).

1.3. Selye–ov stres i Robert–ova citoprotekcija

Prema Sikiriću i suradnicima (69) pentadekapeptid BPC 157 je vjerojatni medijator Robert–ove citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije i organoprotekcije (70, 71) te je također medijator Selye–ovog odgovora na stres (72, 73). Kako bi se jasnije razumjele ove tvrdnje, potrebno je razumjeti i pozadinu i porijeklo ova dva koncepta, počevši od Selye–ovog odgovora organizma na stres te Robert–ove želučane citoprotekcije i organoprotekcije.

Kako je opisano u preglednom radu „Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future" (69), oba ova koncepta, i Robert–ova želučana citoprotekcija i organoprotekcija te Selye–ov odgovor na stres, su u svojoj srži imala uspostavu homeostaze. Selye je (72, 73), prije Robert–a, uveo pojam stresa, odnosno konceptualizirao generalni sindrom adaptacije, van gastrointestinalnog trakta, promatrajući nadbubrežnu žlijezdu. Iz toga je izveo kaskadu događanja koja uključuje hipertrofiju nadbubrežne žlijezde, timolimfatičnu involuciju i želučane stres–ulkuse, a sve navedeno kako bi se postigla homeostaza na razini cijelog organizma. Nešto kasnije, u kasnim sedamdesetim godinama 20.og stoljeća, nastaje Robert-ov koncept (70, 71) citoprotektivne homeostaze koji se odnosio primarno na želudac. Kasnije je taj pojam citoprotekcije proširen na način da je princip koji je korišten u održanju integriteta želučane sluznice primijenjen i u održanju integriteta epitela na drugim mjestima. Od želučane citoprotekcije, koncept je evoluirao do organoprotekcije, prema Sikiriću i suradnicima (69).

Koncept Hansa Selye–a je imao svoje korjene u Hartmann–ovom otkriću kortina (69). Kortin je ekstrahiran iz kore nadbubrežne žlijezde te je prozvan faktorom održanja života (69). On je korišten inicijalno za liječenje Addisonove bolesti te je eksperimentalno održavao adrenalektomirane životinje na životu. To je otkriće s jedne strane dovelo do daljnjih istraživanja te otkrića kortikosteroida (skupine Kendal i Reichstein) te je s druge strane ponukao Selye–a na razvoj svog koncepta koji je prije svega naglašavao adrenotropnu ulogu u odgovoru na stres i uspostavu homeostaze, dok je manji naglasak stavljen na druge koncepte, kao što su tireotropni i histaminergički (69).

Također prema preglednom radu „Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future” (69), ovi navedeni koncepti podrazumjevaju pod pojmom homeostaze zaštitu organa od ozljede kao i oporavak organa nakon ozljede. U svrhu postizanja te iste homeostaze iskorištavani su razni pozitivni učinci raznih agensa koji su imitirali pretpostavljene medijatore citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije, organoprotekcije (69, 70, 71), u prvom redu prostaglandini i kortikosteroidi. Ideja je bila primjenom ovih supstanci i praktično pokazati navedeni teoretski efekt homeostaze, međutim, u praktičnoj primjeni, niti jedna od ovih supstanci to nije uspjela.

Problem s primjenom prostaglandina je u činjenici da koncept citoprotekcije (69) djeluje jedino u slučajevima u kojima su prostaglandini primjenjeni prije ozljede, no ne i nakon što su primjenjeni poslije ozljede. Isto tako primjenjivani su različiti peptidergički faktori rasta u svrhu promoviranja koncepta cjeljenja rane, radi njihovog pretpostavljenog učinka na cijeljenje no praktični rezultat se pokazao sličnom onom prostaglandina. Također, primjenjivani su i angiogeni faktori rasta za cijeljenje i u gastrointestinalnom traktu, kao i na tkiva van gastrointestinalnog trakta, kao što su koža, tetive, ligamenti, mišići i kost, gdje se naišlo na dodatni problem zbog potrebe za različitim nosačima za navedene faktore kako bi se isti dostavili na određeno mjesto djelovanja (69).

S druge strane, manjkavost Selye–ovog adaptivnog odgovora na stres je činjenica da prvi integrativni faktor u toj kaskadi, koji bi mogao biti primjenjivan i kao terapijsko sredstvo, većinom nije otkriven (72, 73), unatoč činjenici da je primjena Sleye–ovog koncepta odgovora na stres u praktičnom rješavanju artritisa dovela do eksplozije u kliničkoj primjeni kortikosteroida (69). Posljedica navedenog je da postoji jaz između teorije i praktične realizacije te iste teorije jer je ovdje aktivnost primjenjivanog agensa ograničena (69, 72, 73) te je uz to moguć i štetan učinak istog. Eklatantan primjer za iznesenu tvrdnju u istom preglednom radu je i tada pogrešno korištena ilustracija kako je kortikotropin–otpuštajući faktor (CRF) upravo taj integrativni medijator koji uključuje adaptivni odgovor tijela na stres. CRF ima ulcerogeni efekt kada se primjeni centralno (69) no, čak i ako se pretpostavi da primjena CRF–a štiti od želučanih ulkusa, ostaje problem egzogene primjene te iste supstance koja tada može dovesti do proljeva kao posljedice iritabilnog kolona, različitih anksioznih oblika ponašanja, pojačane sekrecije

sluzi u debelom crijevu, pojačanog motiliteta crijeva te povećanja propusnosti sluznice debelog crijeva za različite bakterije. Time se pokazuje kako taj konkretni medijator (CRF) ovdje nema taj inicijalno predloženi Selye–ov integrativni efekt jer s druge strane ima i cijeli niz ovdje nabrojanih negativnih efekata (69). U radu se nadalje govori i o kortikosteroidima koji uzrokuju želučane lezije dok prednizolon uzrokuje karakteristično intestinalne lezije što je korišteno kako bi se pokazala citoprotekcija u crijevima posredovana prostaglandinima. Nakon svih navedenih pokusa je pokazana sva manjkavost Selye–ovog koncepta (72) jer je izostao spomenuti prvi medijator, odnosno integrativni faktor koji bi u sebi sadržavao već navedeni adaptivni odgovor tijela na stres te je radi te manjkavosti došlo do spoznaje kako bi Selye–ov koncept trebao biti zamjenjen nešto skromnijim, ali i mnogo preciznijim idejama (69, 73).

Slijedom svih navedenih tvrdnji došlo se do zanimljive poveznice između Robert–ovog koncepta i Selye–ovog odgovora na stres (69). Robert sa svojom želučanom citoprotekcijom/adaptivnom citoprotekcijom i organoprotekcijom posredovanom prostaglandinima zapravo usmjerava Selye–ov koncept stresa prema želucu i gastrointestinalnom traktu. Robert–ova protekcija (70, 71), odnosno citoprotekcija želučanih stanica se manifestira kao Selyeov odgovor na oštećenje (72, 73). Također, Robert–ov koncept kako slabi iritans štiti od jakog iritansa (adaptivna citoprotekcija) korelira sa Selye–ovim konceptom generalne adaptacije u kojem mali stres štiti od velikog stresa. Robert–ova protekcija/citoprotekcija želučanih stanica je nadalje proširena na druge organe te se tada govori o organoprotekciji koja pak predstavlja Selye–ovu uspostavu homeostaze. Čak i Robert–ova primjena nespecifičnih nekrotizirajućih agensa, kao što su jaki alkoholi, hipertonične otopine, vruća voda primjenjivani intragastrično, i NSAID–i i prednizolon primjenjivani sistemski, korelira sa Selye–ovim različitim agensima nokse koji su primjenjivani sistematski i na taj su način uzrokovali teška organska oštećenja (69).

Sumirano, u srži Selyeovog koncepta je od početka agens („first mediator") koji bi trebao biti uključen u odgovor na stres, odnosno pokrenuti kaskadu odgovora koji nastaju na oštećenje organizma uzrokovanim različitim agensima nokse (72, 73).

Isto tako, i za razrješenje Robertovog koncepta želučane citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije i njenog generaliziranog oblika (70, 71), organoprotekcije, je potreban

agens koji bi mogao dovesti do navedenih učinaka i time postizanja Selyeove homeostaze u praktičnom smislu, a ne samo u teoriji.

Prema Sikiriću i suradnicima (69) mnogobrojni pozitivni citoprotektivni/ organoprotektivni učinci nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 upućuju na mogućnost da bi BPC 157 mogao biti (primarni) medijator Robert-ove citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije i organoprotekcije.

1.3.1. Robert–ova citoprotekcija i pentadekapeptid BPC 157

Koncept citoprotekcije se temelji na zaštiti želučanih stanica od različitih agensa koji su instilirani intragastrično (etanol, NSAID) kako bi postigli maksimalni štetan učinak na želučane stanice (1, 7, 8). Dalje je opisani koncept proširen sa želučanih stanica na potekciju stanica u drugim tkivima i organima (citoprotekcija — organoprotekcija) (75), odnosno sa želučanog epitela na druge epitele, kao što su koža, jetra, gušterača, srce te na koncept cijeljenja rane, pod pretpostavkom da je želučani ulkus vrlo sličan kožnoj leziji, promatrani u smislu rane koja iz bilo kojeg razloga ne cijeli (69).

U originalnom konceptu citoprotekcije je citoprotektivni agens prisutan u želučanoj sluznici, što znači da je isti učinkovit primjenjen prije ozlijede (profilaktički), kao što bi trebao biti kada je primjenjen i nakon ozlijede (terapeutski). Navedeno nije slučaj sa standardnim agensima, kao što su prostaglandini, koji su učinkoviti samo kad su primjenjivani prije ozlijede, odnosno profilaktički.

Za razliku od spomenutih medijatora citoprotekcije, pentadekapeptid BPC 157 u potpunosti zadovoljava potonje kriterije. S obzirom da je BPC 157 stabilan i prisutan u želučanom soku ljudi ima i profilaktički i terapeutski učinak u cijelom gastrointestinalnom traktu (1, 2). Pentadekapeptid BPC 157 je učinkovit bez obzira na način primjene, bilo to intraperitonealno, intravenozno, intragastrički, kao lokalna kupka, kao klizma, kao krema ili pak razrijeđen u vodi za piće. Time BPC 157 pokazuje ranije navedena svojstva istinskog medijatora Robert–ove citoprotekcije s obzirom da ima i pleiotropnu aktivnost, te uz učinak na želučane i gastrointestinalne lezije ima i učinak na lezije drugih organa poglavito jetre, pluća, gušterače, mozga te srca (69). Unatoč tome što različiti štetni agensi različito štetno djeluju na pojedine organe, različite su studije pokazale kako su dovoljne uvijek iste ili slične doze pentadekapeptida BPC 157 kako bi ispoljio svoj protektivan učinak na zahvaćeni organ. Prema istom preglednom radu „Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future” (69), opisan je primjer protektivne aktivnosti u srcu nakon kardiomiopatije izazvane doksorubicinom, različitih aritmija izazvanih digitalisom, hiperkalemije, hipokalemije i nekih drugih stanja.

Prema ranijim navodima standardni agensi korišteni u Robert–ovim demostracijama želučanih lezija i citoprotekcije su alkohol i nesteroidni antireumatici (69). Te supstance također uzrokuju različite štetne lezije u drugim organima te na taj način ispoljavaju pleiotropnu štetnu aktivnost (69). Svaki citoprotektivni agens bi stoga trebao imati antagonizirajući učinak, ne samo na lezije nastale primjenom alkohola i nesteroidnih antireumatskih lijekova na želudac već i na lezije nastale primjenom istih tih supstanci na druge organe poput jetre, pluća i mozga. Pentadekapeptid BPC 157 u različitim pokusima ispoljava navedene učinke, jer antagonizira ne samo želučane lezije nastale primjenom alkohola i nesteroidnih antireumatika, već antagonizira i lezije drugih organa uzorkovane primjenom drugih supstanci (69). Na primjer, pentadekapeptid BPC 157 djeluje antagonizirajuće i na alkoholom uzorkovane želučane lezije, ali i na posljedice akutne i kronične intoksikacije alkoholom (69). Također antagonizira kronične želučane lezije nakon kroničnog konzumiranja alkohola kroz tri mjeseca, kao i jetrene lezije s portalnom hipertenzijom. Što se tiče štetnih učinaka nesteroidnih antireumatskih lijekova, pentadekapeptid BPC 157 je pokazao antagonizirajuće djelovanje koje uključuje COX–1 i COX–2 blokatore (69), pokazuje kako smanjuje krvarenje nakon amputacije te može utjecati na smanjenje aspirinom induciranog krvarenja i trombocitopeniju (69). Navedenim učincima BPC 157 postiže, za razliku od svih spomenutih medijatora citoprotekcije, učinak želučane citoprotekcije odnosno organoprotekcije.

Također, prema istom preglednom radu „Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future” (69), postavlja se pitanje proširivanja želučane citoprotekcije na koncept cijeljenja rana. Pentadekapeptid BPC 157 poboljšava cijeljenje kožnih rana, mišića, tetiva, ligamenata i različitih koštanih defekata. Također BPC 157 uzrokuje značajan oporavak istih tih tkiva nakon velikih ozlijeda koje ne bi mogle spontano zacijeliti čime se prepostavlja i učinak pentadekapeptida BPC 157 na simultano cijeljenje različitih tkiva i struktura (69). Navedene tvrdnje podupiru pokusi u kojima se promatra cijeljenje fistula u štakora, jer se u tim eksperimentima fistule izazivaju anastomoziranjem između različitih tkiva, kao što su ezofagokutane, gastrokutane, duodenokutane, kolokutane, vezikovaginalne, te rektovaginalne fistule. Na sličan se način pokazuje isti učinak na cijeljenje različitih gastrointestinalnih anastomoza, kao što su ezofagogastrične,

ezofagojejunalne, ileoilealne, jejunoilealne, te kolon–kolon anastomoze. Na opisane načine je demonstriran biomehanički i mikroskopski učinak pentadekapeptida BPC 157 na simultano cijeljenje različitih tkiva što se može shvatiti kao dokaz provođenja koncepta cijeljenja rane (69).

Prilikom razmatranja koncepta cijeljenja rana treba se osvrnuti na primjenu peptidergičkih fakotra rasta na cijeljenje različitih ozlijeda kože i mekih tkiva, prvenstveno zahvaljujući utjecaju na angiogenezu (69). U nekoliko je stavki pentadekapeptid BPC 157 uspoređivan s angiogenim faktorima rasta pri čemu je BPC 157 uvijek bio u prednosti. Primarno BPC 157 ima znatno izraženiji učinak na angiogenezu nego što to imaju različiti antiulkusni agensi, a taj se učinak temelji na nizu raznih molekularnih puteva te pokazuje jednak učinak unutar iste doze duž cijelog gastrointestinalnog trakta kao i na cijeljenja kožnih rana, različih mekih tkiva i kosti, kao što je spominjano ranije (69). Za razliku od navedenog, standardni angiogeni faktori rasta (poput epidermalnog čimbenika rasta (EGF), bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) te vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF)) imaju različit učinak na različite dijelove gastrointestinalnog trakta te na cijeljenje kožnih rana, mekih tkiva i kosti, gdje su im potrebni različiti nosači i time pokazuju uglavnom vrlo lokaliziran učinak (69).

1.3.2. BPC 157 i citoprotekcija endotela

Prema preglednom radu „Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future" (69), bitan dio koncepta citoprotekcije je ideja kako će ozlijeda endotela želučanih krvnih žila dovesti do ozlijede želučanog epitela, odnosno kako će protektivni učinak citoprotektivnih agensa na endotel želučanih krvnih žila imati protektivni učinak i na želučani epitel. Navedeno se može proširiti na način da se protekcija endotela želučanih krvnih žila proširi na protekciju endotela drugih krvnih žila, u što se uklapa djelovanje pentadekapeptida BPC 157. Kao primjer te tvrdnje se koristi učinak pentadekapeptida BPC 157 u nekoliko eksperimenata, u štakora s anastomozom abdominalne aorte i trombozom, zatim okluzije donje šuplje vene i venske tromboze, te amputacije. U štakora s anastomozom abdominalne aorte primjena pentadekapeptida BPC 157 je dovela do prevencije tromboze ili do razgradnje tromba ako je već bio prisutan. U štakora s okluzijom donje šuplje vene je pokazan sličan učinak, dok je u štakora s amputiranim repom ili ekstremitetom te nakon primjene heparina, varfarina ili aspirina antagoniziran učinak tih supstanci na produljeno krvarenje i trombocitopeniju.

Na opisane je načine pokazano kako pentadekapeptid BPC 157 ima učinak i na cijeljenje različitih rana i lezija, utječući pritom na sve faze cijeljenja rane, te na razne poremećaje krvarenja (69).

Proizlazeći iz navedenog i s obzirom na do sada opisane učinke potrebno je spomenuti i interakciju pentadekapeptida BPC 157 s NO–sustavom (74). Ta interakcija je uvijek prisutna, te je u mnogim istraživanjima do sada pokazano da BPC 157 modulira učinke NO–sustava antagonizirajući NOS–blokadu uzrokovanu s L–NAME, hiperstimulaciju uzrokovanu L–argininom ili imobilizaciju NOS–sustava simultanom primjenom navedenih supstanci (69, 74). Kao jedan od primjera koristi se učinak pentadekapeptida BPC 157 na hipertenziju uzrokovanu s L–NAME te hipotenziju uzrokovanu L–argininom dok sam BPC 157 nema učinak na normalni krvni tlak. S ovog aspekta je još važno naglasiti učinak na sva događanja nakon gubitka vaskularnog integriteta. Ovisno o okolnostima BPC 157 antagonizira trombozu, kako je opisano ranije te različite poremećaje krvarenja i trombocitopeniju, te uzrokuje cijeljenje nakon

velikih ozlijeda različitih tkiva koja inače ne bi spontano zacijelila, te stimulira egr–1 i B2 gene i različite puteve (29). Time se pokazuje kako BPC 157 ima efektivnu kompetitivnost prema analozima L–arginina i L–argininu samom. U konačnici primjena pentadekapeptida BPC 157 je dovela do normalizacije razina NO u tkivima kao i do smanjenja količine slobodnih radikala (69, 74).

Potrebno je još spomenuti, također prema istom preglednom radu „Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future" (69), poseban učinak pentadekapeptida BPC 157 na krvne žile, izuzev spomenutog, u smislu premoštenja i zaobilaženja različitih područja okluzije i uspostave normalnog krvotoka. Jedna od ilustracija za navedeno je učinak na ishemijsko–reperfuzijski kolitis, gdje dolazi do brzog premošćivanja ozlijede putem arkadnih krvnih žila (69). Sličan je učinak i prilikom podvezivanja gornje prednje pankreatikoduodenalne vene i posljedične kongestije duodenuma, koje su u potpunosti sanirane i premošćene nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 putem donje prednje pankreatikoduodenalne vene u gornju mezenteričnu venu (69).

Dodatni dokaz brzog citoprotektivnog učinka na endotel tijekom ishemije i reperfuzije pokazuju i normalne vrijednosti NO i MDA u tkivima kolona, odnosno markera oksidativnog stresa. Za spomenuti je još model podvezivanja donje šuplje vene pri kojem BPC 157 antagonizira sve negativne posljedice ligacije kao što su staza, tromboza, arterijska hipotenzija te poglavito zanimljiv antagonizirajući učinak na smanjenje venske hipertenzije, s obzirom da je vrijednost tlaka u tih životinja četiri puta veća od normalne (69).

Promatrana je naposlijetku i propagacija krvih žila prema defektu nakon perforacije cekuma, te je nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 došlo do smanjenja krvarenja, značajnog cijeljenja lezija tijekom sedam dana te su zabilježene normalne vrijednosti NO i MDA u tkivu kolona već nakon petnaest minuta (69).

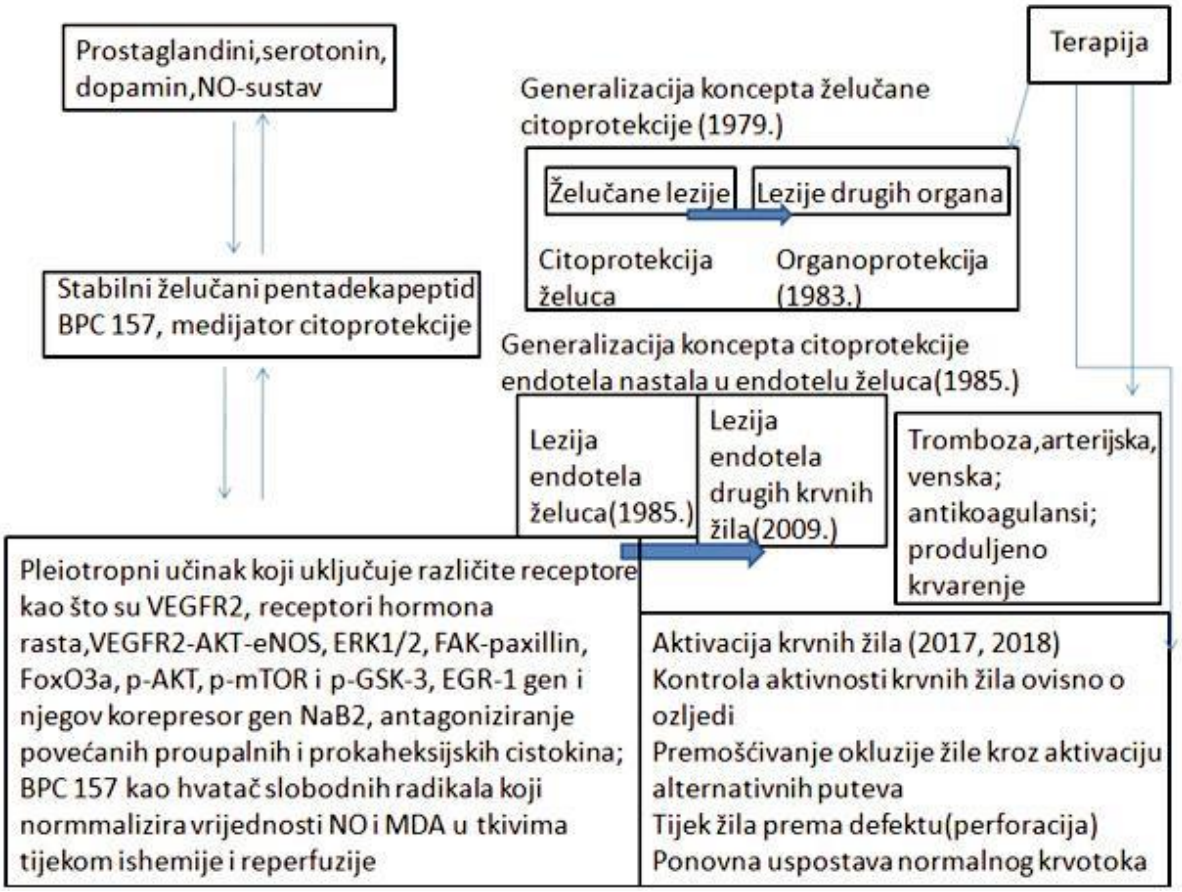
1.3.3. BPC 157 i citoprotekcija živčanog sustava

Ideja učinka pentadekapeptida BPC 157 na centralni živčani sustav i različite poremećaje istoga proizlazi iz činjenice da interakcija mozak–crijevo ovisi i o interakciji i osovini crijevo–mozak (75), te činjenice da peptidergički faktori rasta koji su prisutni u probavnom traktu imaju i snažno antiulkusno djelovanje i na taj način mogu od periferije pozitivno utjecati na različite poremećaje centralnog živčanog sustava (69). Među prvima je promatran učinak pentadekapeptida BPC 157 na serotoninski sustav nakon periferne primjene te je notirano da je značajno poraslo otpuštanje serotonina u određenim područjima mozga, poglavito nigrostriatalnom te je došlo do potpune antagonizacije serotoninskog sindroma (69, 75). Promatran je i učinak na dopaminski sustav koji se temeljio na poništenju različitih efekata amfetamina, rezerpina, MPTP-a (1–metil–4–fenil–1, 2, 3, 6–tetrahidrofiridin), haloperidola te drugih dopaminskih antagonista (69). Navedeno uključuje, osim učinka na želučane lezije koje su nastale pod utjecajem dopaminskih antagonista i utjecaj na centralne poremećaje kao što su katalepsija, akinezija i produljeni QTc intervali. Opisano predstavlja dokaze moduliranja dopaminskog sustava što dodatno potkrijepljuje i činjenica da BPC 157 anulira akutni i kronični toksični učinak amfetamina (69). Zaključno, BPC 157 ne djeluje kao serotoninski supstrat već inhibira MAO–inhibiciju, modulira serotoninergički i dopaminergički sustav te na taj način utječe na različite poremećaje ponašanja nastale prikom oštećenja raznih neurotransmiterskih sustava. Više je primjera koji potkrijepljuju neuroprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157: nakon transekcije ishijadičnog živca, po primjeni (lokalno, intraperitonealno ili intragastički) pentadekapeptida BPC 157 dolazi do njegove regeneracije; umanjuje posljedice traumatske ozlijede mozga; u štakora s kompresijom kralježničke moždine koji su razvili aksonalnu i neuralnu nekrozu, demijelinizaciju i paralizu repa, BPC 157 je doveo do značajnog oporavka te uspostavljanja funkcije repa u svim intervalima; prilikom predoziranja kuprizonom ili inzulinom uspješno su uklonjene posljedice encefalopatije dok je nakon predoziranja paracetamolom došlo do potpunog prestanka konvulzija (69).

Važan je i utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na više molekularnih puteva pri čemu je od posebnog značaja, kada je riječ o citoprotekciji, utjecaj na tumorsku kaheksiju (69). Primjena pentadekapeptida BPC 157 dovodi do smanjenja proupalnih citokina IL–6,

TNF–a, pozitivno utječe na metabolizam mišića te na promjene u ekspresiji FoxO3a, p–AKT, p–mTOR i p–GSK–3 (69).

Sve navedene činjenice i spomenuta istraživanja govore kako je pentadekapeptid BPC 157 mogući odgovor na pitanje Robert–ove citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije/organoprotekcije te Selye–ovog odgovora na stres (69).



Slika 1. Adaptirano na hrvatski jezik prema slici iz: Sikiric P, Hahm KB, Blagaic AB, Tvrdeic A, Pavlov KH et al. 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 Jun 4. doi: 10.5009/gnl18490. 2007 © Copyright by Gut and Liver.

Učinci pentadekapeptida BPC 157 dovode do želučane citoprotekcije → organoprotekcije cijelog gastrointestinalnog sustava te ima i profilaktičko i terapeutsko djelovanje. Uočen je poseban učinak na cjelovitost endotela koji se može očitovati u aktivaciji krvnih žila prilikom ozljede, okluzije različitih žila ili perforacije organa kako bi se premostio određeni defekt.

Svi su ti učinci ostvareni međudjelovanjem i modulacijom NO–sustava te utjecajem na slobodne radikale, i njima uzrokovane lezije, imajući za posljedicu normalizaciju razina NO i MDA u različitim tkivima tijekom reperfuzije i ishemije. Za istaknuti je i pleiotropni učinak koji uključuje različite receptore kao što su VEGFR2, receptori hormona rasta, VEGFR2–AKT–eNOS, ERK1/2, FAK–paxillin, FoxO3a, p–AKT, p–mTOR i p–GSK–3, EGR–1 gen i njegov korepresor gen NaB2 te antagoniziranje povećanih proupalnih i prokaheksijskih citokina.

1.4. Fiziologija kapilara

Prema radu Fabera i suradnika (76), kolateralna cirkulacija je mreža specijaliziranih premošćujućih krvnih žila. One su prisutne u većini tkiva u tijelu i pružaju zaštitu od ishemijskih ozljeda u slučajevima ishemijskog moždanog udara, koronarne ili periferne okluzivne bolesti arterija te drugim stanjima i bolestima. Kolaterale ne treba promatrati jednoznačno već kao dinamičnu pojavu (76). Izuzetno su varijabilne i razlikuju se od jedinke do jedinke unutar iste vrste, dok su razlike među vrstama tolike da ih je teško uspoređivati (76,77). Kolaterale se primarno razlikuju u svojoj veličini, promjeru te adaptivnoj sposobnosti (77). Dapače, kolaterale se po svojim obilježjima toliko razlikuju od areterija i vena da bi se moglo reći kako predstavljaju treći i posebni aspekt cirkulacije (77). Zadnjih se godina cijeli niz radova bavi problematikom kolaterala, s obzirom na njihovu nedovoljnu istraženost. Istražuju se mehanizmi aktivacije kolateralne cirkulacije ili pak načini za poticanjem kolateralnog krvotoka u različitim opstruktivnim bolestima i stanjima. Poznato je da lokalna regulacija porotoka, u zavisnosti od hemodinamskih potreba, dovodi do promjene dijametra krvne žile (76,77). Mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: kolateralne arterije i mikrovaskularne kolaterale. U prvom se slučaju radi o žilama koje su na više ili manje standardnim anatomskim lokacijama (npr. art. ulnaris superior collateralis, anteriorne i posteriorne arterije Willisijevog kruga i druge), formiraju se još za vrijeme embriološkog razvoja, te u načelu nemaju toliku sposobnost povećanja lumena u stanjima opstrukcije. U drugom slučaju se radi o anastomozama između dviju arteriola, prosječne veličine < 100 mikrona promjera, te su prisutne u većini, ali ne i u svim tkivima. Nepravilnog su tijeka, imaju sposobnost povećanja promjera 5–10 puta, razlikuju se od jedinke do jedinke u porijeklu, fazi nastanka pa i promjeru (76, 77). Općenito se pri korištenju pojma kolaterale podrazumjeva ovaj tip žila koji se nadalje može podijeliti u dvije podgrupe: arkadne arterije i anastomoze među ograncima. Arkadne arterije formiraju arkade/lukove te mogu ili ne moraju anastomozirati s drugom arterijom, npr. vasa vasorum aorte, pankreatikoduodenalna arkada, gastroepiploična i druge. Anastomoze među ograncima su kolaterale koje povezuju susjedne ogranke iste žile, također premošćuju defekt u slučaju opstrukcije, ali štite mnogo manje područje s obzirom da povezuju ogranke unutar opskrbnog područja iste žile (76). Kako bi se dodatno razumjela terminologija korištena u ovom istraživanju, potrebno se na kraju osvrnuti na dva pojma koja se koriste, a to su nativne, odnosno već postojeće kolaterale te na

pojam aktivacije kolaterala. Nativne kolaterale su kolateralne krvne žile koje postoje u zdravim tkivima, to jest u tkivima bez opstrukcije krvnih žila (77). To također znači kako, u fiziološkim stanjima, nema dovoljne razlike tlaka u tim krvnim žilama te su one, čak koristeći se i različitim visoko razlučljivim slikovnim metodama, praktički nevidljive (76). Nevidljivima ostaju i različitim in vivo angiografskim metodama, dok se tek u zadnje vrijeme primjenom kriomikrotoma ili 3D rekonstrukcijama s mikro CT–om neke postojeće kolaterale ipak mogu detektirati, ali samo do određenog promjera (77). Nadalje, pojam aktivacije kolaterala se odnosni na pojačan protok krvi kroz kolateralni sustav, uzrokovan promjenom tlaka radi opstrukcije, bilo akutne ili kronične (76).

1.5. Ideja za istraživanje

U ovom radu smo se usredotočili na značajnu vensku okluziju i, posljedično, pojavu duodenalnih lezija u štakora te na terapiju iste stabilnim gastričkim pentadekapeptidom BPC 157, prototipnim citoprotektivnim agensom, do sada korištenim u terapiji ulceroznog kolitisa, u zadnje vrijeme multiple skleroze, te je pokazao učinak na cijeljenje duodenalnih lezija (1, 7–9, 74, 75, 78–80). Dosadašnja istraživanja duodenalnih lezija u štakora su se temeljila na modelima u kojima su lezije uzrokovane cisteaminom i acetičkom kiselinom (81–84), dok lezije uzrokovane venskom opstrukcijom, uz naglasak na aktivaciju kolateralnog krvotoka, nisu bile istraživane. S druge strane, u štakorskim modelima okluzije nekih drugih krvnih žila (npr. lijeva količna arterija i vena, te infrarenalni dio donje šuplje vene) (85, 86), primjena pentadekapeptida BPC 157 je dovela do premoštenja okludiranih žila brzom prezentacijom/aktivacijom kolaterala i na taj način je umanjen štetan učinak spomenutog fenomena. Brza prezentacija/aktivacija kolateralnog krvotoka po aplikaciji pentadekapeptida BPC 157 je dovela do smanjenja štetnih učinaka koji nastaju podvezivanjem lijeve količne arterije i vene, te posljedično na prezentaciju ishemijskog kolitisa (85). U štakora s okludiranom donjom šupljom venom infrarenalno, terapijski efekt se pak očituje brzom prezentacijom/aktivacijom lijeve ovarične, i nekih drugih vena koje premošćuju mjesto opstrukcije (86). Navedeni učinci pentadekapeptida BPC 157 u svojoj pozadini imaju međudjelovanje s NO–sustavom, što je pokazano mjerenjem razine oksidativnog stresa u tkivima (normalne razine NO i MDA) kao i kontriranjem efekata L–NAME i L–arginina.

Spomenuti se nalazi odnose (85, 86) na zajednički bazični efekt svih citoprotektivnih agensa, a koji je prvo primjećen u želucu, a očituje se kao brzi protektivni mehanizam endotela koji se može koristiti za sprječavanje i terapiju ishemijskih lezija mukoze (35, 87–90). Uz opisane, mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157 se može proširiti kako bi isti predstavljao prototipni citoprotektivni agens koji bi mogao utjecati i na specifičnu aktivaciju kolateralne cirkulacije kako bi se premostile opstrukcije i uspostavio normalan krvotok (85, 86). Učinak se pokazao kao dugotrajan, a javlja se u periodu neposredno nakon nastanka ozljede/opstrukcije (faktor koji nije bio istraživan u dosadašnjim vaskularnim studijama o ishemijskom kolitisu ili venskoj trombozi) (91–

94). Također se pokazalo kako se učinak može postići i u kasnijim periodima, odnosno čak i nakon dužeg vremena od pojave velike venske opstrukcije (85, 86).

Primjena pentadekapeptida BPC 157 može predstavljati fundamentalnu citoprotekciju/protekciju endotela koja je esencijalna (85, 86) kako bi se brzo uspostavio protok krvi u ishemijom oštećenim područjima, te rapidno aktivirale kolaterale tijekom različitih štetnih događaja kao što su vaskularna opstrukcija, kratkotrajna deprivacija krvi, reperfuzija, dugotrajna deprivacija krvi kao i crijevna opstrukcija kao što je već predloženo (85, 86). Navedeni učinci mogli bi imati pozitivan učinak na mukozne lezije duodenuma nastale kao posljedica poremećene duodenalne cirkulacije.

Referirajući se na opisani pozitivni učinak pentadekapeptida BPC 157 (85, 86) treba imati u vidu kako venska opstrukcija može imati gori učinak na crijevo od opstrukcije pripadajuće arterije, te kako ista dovodi do brze pojave lezija sluznice (npr. unutar 5 minuta u slučaju SMV) (95). BPC 157 uvelike međudjeluje s NO–sustavom u različitim modelima i vrstama, kako je pokazano u različitim studijama koje se bave citoprotekcijom, poglavito u studijama koje koriste L–NAME i L–arginin, bilo kao individualne agense ili u kombinacijama (74, 75, 78–80). Radi navedenog, u ovom istraživanju smo odlučili primjeniti stabilni gastrični pentadekapeptid BPC 157, kao i L–NAME i L–arginin na model okluzije SAPDV i posljedično nastale duodenalne lezije koje bi inače, bez ikakve terapije, brzo nastajale i sustavno progredirale.

2.0. HIPOTEZA

Primjena pentadekapeptida BPC 157 u štakora će povećati broj postojećih venskih kolaterala i smanjiti incidenciju oštećenja sluznice dvanaesnika nakon kirurškog podvezivanja prednje pankreatikodudodenalne vene (mjereno u intervalima od 5 i 30 minuta te 24 sata nakon podvezivanja), a protektivan učinak pentadekapeptida BPC 157 bit će posredovan NO–sustavom.

3.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj istraživanja

Pokazati učinak pentadekapeptida BPC 157 i njegovo međudjelovanje s NO–sustavom na novom modelu oštećenja sluznice dvanaesnika izazvanog kirurškim podvezivanjem pankreatikoduodenalne vene u štakora.

3.2. Specifični ciljevi istraživanja

a) pokazati stupanj i incidenciju oštećenja sluznice dvanaesnika podvezivanjem pankreatikoduodenalne vene.

b) pokazati da lokalna primjena pentadekapeptida BPC 157 na dvanaesnik u testiranim dozama može povećati otvaranje postojećih venskih kolaterala i smanjiti oštećenja sluznice dvanaesnika zbog venskog zastoja nakon kraćeg (5 i 30 minuta) i duljeg (24 sata) intervala po podvezivanju vene.

c) pokazati na koji način prekursor (L–arginin) i inhibitor NO (L–NAME) utječu na otvaranje venskih kolaterala i oštećenja sluznice dvanaesnika u ovom modelu i kako, u istom modelu, moduliraju protektivni učinak BPC 157 na otvaranje kolaterala i oštećenja sluznice dvanaesnika.

4.0. MATERIJALI I METODE

4.1. Životinje

Istraživanje je provedeno na 147 štakora Wistar soja, ženskog spola, starosti 2–3 mjeseca, težine 200–300 grama. Životinje su iz vlastitog uzgoja u nastambi za laboratorijske životinje, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zavod za farmakologiju (dozvola HR–POK–007). Voda za piće iz vodovoda i standardna peletirana hrana (4RF21, Mucedola, Italija) bili su dostupni *ad libitum*. Dan–noć ciklus trajao je 12/12 sati (07/19 sati, paljenje/gašenje svjetla). Životinje su bile smještene po 3–4 u jedan standardni kavez za štakore (Eurostandard IIIH) sa metalnim poklopcem i drvenom sječkom kao podlogom (Scobis Zero, Mucedola, Italija). Držane su u prostoriji temperaturue ≈ 22 °C i vlažnosti zraka 40–50 %. U istraživanju je poštovana Direktiva 2010/63/EU, Zakon o zaštiti životinja RH (NN br. 135/2006, 37/2013 i 55/2013), FELASA smjernice, a slijedili smo također i odluke, preporuke i postupnike lokalnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

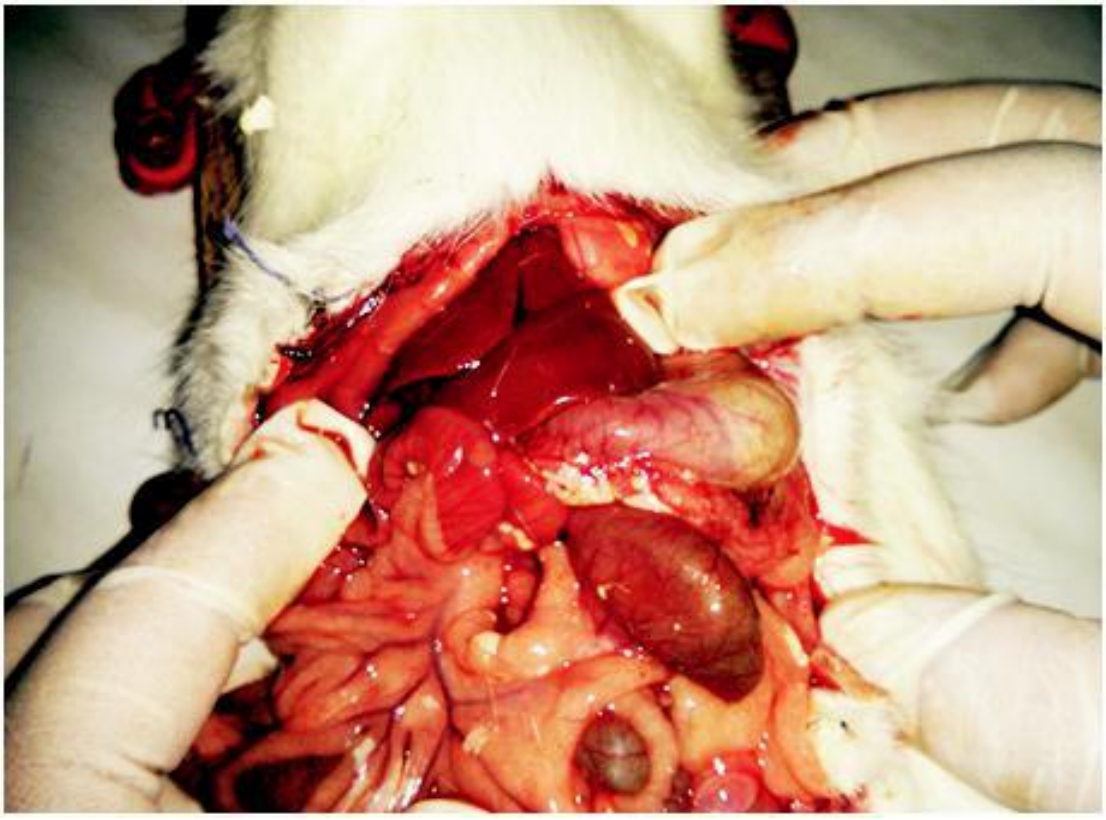
4.2. Lijekovi

Pentadekapeptid BPC 157 (Diagen, Ljubljana, Slovenija, čistoća 99 %) je bio otopljen u destiliranoj vodi (1, 7–9, 74, 75, 78–80), u volumenu od 1 mL/200g t.t. štakora. Primijenjen je jednokratno, lokalno na dodenum (kroz otvor u trbušnoj šupljini štakora koji je u dubokoj anesteziji, kapanjem iz brizgalice) u dozama od 10 µg/kg ili 10 ng/kg. Također, korišteni su L–NAME, kompetitivni inhibitor NO sintetaze, te prekursor NO, L–arginin. L–NAME je primijenjen u dozi od 5 mg/kg, a L–arginin u dozi od 100 mg/kg primijenjeni na isti način i u istom volumenu kao i BPC 157. Za opću anesteziju koristili smo tiopental (30–50 mg/kg intraperitonealno /ip/) i diazepam (10 mg/kg ip.), za analgeziju ketoprofen (3 mg/kg, subkutano /sc/), a za eutanaziju diazepam u dozi od 30 mg/kg, intraperitonealno.

4.3. Eksperimentalni protokol

4.3.1. Kirurški zahvat

Po uspostavi kirurške anestezije (gubitak refleksa uspravljanja), štakor je postavljen na drvenu ploču i fiksirane su mu šape. Kirurškom zahvatu laparotomije se pristupa po negativnoj reakciji u testu uzmicanja šape na bolni pritisak. Načini se medijalna laparotomija od ksifoidnog nastavka do pubične kosti te se otvori trbušna šupljina (Slika 2.). Prikaže se dvanaesnik, te se potom identificira, preparira i podveže prednja pankreatikoduodenalna vena 0.5 cm ispod dvanaesnika šavom PDS 5–0 vezanim 4 puta (96). Brzo po podvezivanju vene, unutar pola minute, na stjenci dvanaesnika se izvana, golim okom uočava demarkaciona zona venske staze (duljine otprilike 30 mm), pravilnih rubova i tipične lividne boje. Duljina zone venske staze mjerena je od pilorusa do zadnje zahvaćene vene na ventralnoj strani, u milimetrima (85, 97).



Slika 2. Prikaz štakora nakon obavljene medijane laparotomije

4.3.2. Primjena lijekova

Primijenjena je kupka pentadekapeptida (BPC 157 10 µg/kg ili 10 ng/kg u volumenu od 1 ml po štakoru), NOS blokatora L–NAME (5 mg/kg u volumenu od 1 ml po štakoru) i supstrata NOS–a L–arginina (100 mg/kg u volumenu od 1 ml po štakoru). Lijekovi su primjenjivani samostalno ili u kombinacijama. Kao kontrola služila je fiziološka otopina primijenjena u istom volumenu, na isti način i u istom vremenu kao gore spomenuti lijekovi. U štakora kojima se broj kolaterala mjeri 24 sata nakon podvezivanja vene i primjene lijekova pa ih se vraća na 24 satni oporavak i njegu u nastambu, analgezija je provedena primjenom ketoprofena (3 mg/kg, sc). Sedirani i u dubokoj kirurškoj anesteziji, svi se štakori eutanaziraju na kraju pokusa predoziranjem diazepamom (30 mg/kg, ip.). Tek nakon utvrđivanja znakova smrti (prestanak disanja i rada srca), učinjena je eksplantacija dvanaesnika za patohistološku analizu (1, 7–9, 70, 71, 73–75, 80, 92).

4.3.3. Postupci i procjena uzorka (broja životinja)

Sve ispitivane životinje podvrgnute su kirurškom podvezivanju vene, te su zatim podijeljene u šest skupina koje su primale jedan lijek (BPC 157, L–NAME ili L–arginin) ili kombinaciju lijekova (BPC 157+L–NAME ili BPC157+L–arginin), dok sedma (kontrolna) skupina nije primila niti jedan od lijekova već samo fiziološku otopinu. Lokalna primjena lijekova na dvanaesnik provedena je unutar 1 min od podvezivanja vene. Životinje su redom podvrgnute ovim postupcima: **opća anestezija → laparotomija → kirurško podvezivanje vene → primjena lijekova lokalno na duodenum → video snimanje duodenuma radi mjerenja broja kolaterala → eutanazija → eksplantacija duodenuma**. Izuzetak su već spomenute skupine u kojih se kolaterale broje 24 sata nakon podvezivanja vene i primjene lijekova (1/3 ukupnog broja). Njima smo, nakon primjene lijekova, kirurškim šavovima zatvorili trbušnu šupljinu i zašili kožu, te su puštene da se oporave od anestezije. Ove su životinje 24 sata nakon primjene lijekova reanesteziranе, otvorena im je trbušna šupljina i dalje učinjeno kao kod ostalih životinja (snimanje dvanaesnika → eutanazja → eksplantacija). Eksplantacija dvanaesnika je učinjena ≈ 10 minuta nakon početka snimanja (5 minuta snimanje + ≈5 minuta eutanazija). Obzirom na anticipiranu razliku

u srednjim vrijednostima među eksperimentalnim skupinama od 25 % i očekivani koeficijent varijacije od 10–15 %, za željenu snagu testa 0,90 i P vrijednost <0,05 bilo je potrebno 7 životinja po skupini, što čini ukupno 147 životinja (Tablica 1).

	TRAJANJE VENSKE STAZE		
SKUPINA	**5 MINUTA**	**30 MINUTA**	**24 SATA**
Kontrola (KON) tj. venska staza	7	7	7
(KON +) BPC 157 10 ng/kg	7	7	7
(KON +) BPC 157 10µg/kg	7	7	7
(KON +) L–arginin 100mg/kg	7	7	7
(KON +) L–NAME 5mg/kg	7	7	7
(KON +) L–arginin 100mg/kg + BPC157 10µg/kg	7	7	7
(KON +) L–NAME 5mg/kg + BPC157 10µg/kg	7	7	7
BROJ ŽIVOTINJA	49	49	49

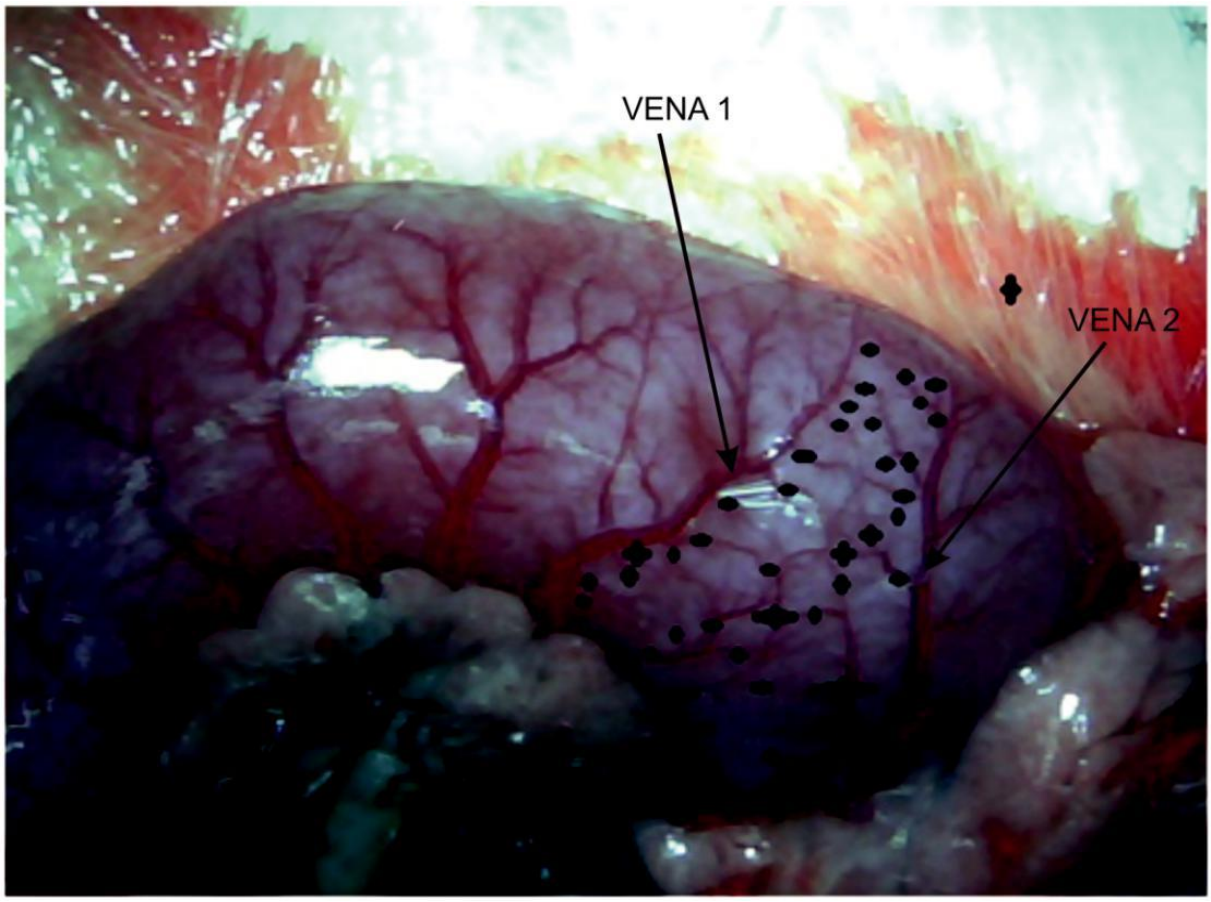
Tablica 1. Skupine životinja i vremenski intervali

4.3.4. Snimanje i brojanje kolaterala

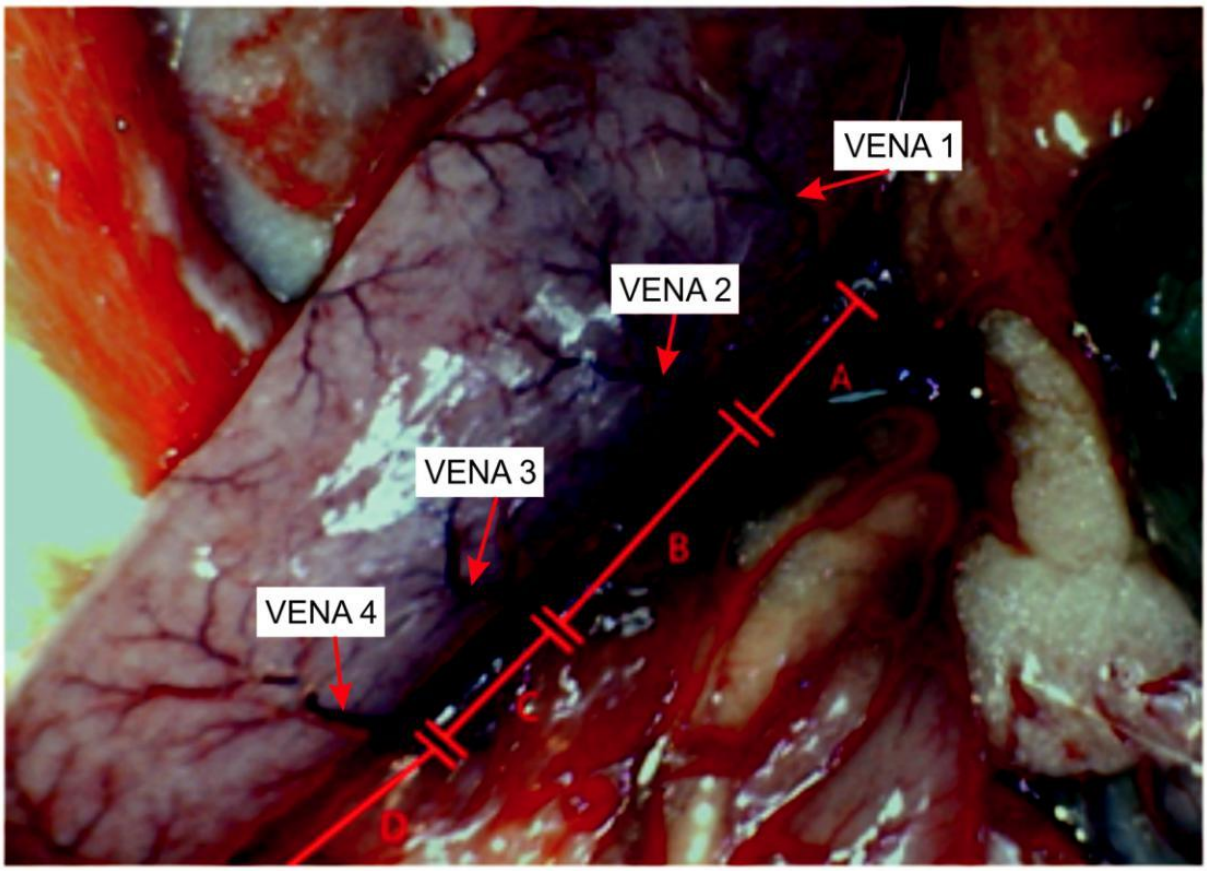
Duodenum se snima 5 minuta video mikrokamerom (uvećanje 40 x, 30 sličica/min.). Za testni interval podvezivanja od 5 minuta snimalo se svih 5 minuta, a za ostale testne intervale snimalo se zadnjih 5 minuta (od 25. do 30. minute za interval od 30 minuta, a za interval od 24 sata snimalo se od 23. sata i 55. minute do kraja intervala). Kamera je korištena jer može uvećati prikaz duodenuma i lokalnih krvnih žila za 40x, što ljudsko oko ne može. Kamera snima u boji, a odnos boja je važan za promatranje zastojnih promjena u tkivu i venama. Konačno, video snimka omogućuje da se parametri mjere iz snimke nakon završetka pokusa, a ne u stvarnom vremenu, što je puno praktičnije i štedi vrijeme.

Iz video snimke je slika transformirana u digitalnu fotografiju za brojanje kolaterala nakon 5 minuta snimanja. Za brojenje su koirištene fotografije snimljene u zadnjoj minuti petominutnog snimanja u svim testnim intervalima. Bilo je ukupno 30 fotografija u zadnjoj minuti (brzina snimanja je 30 sličica u minuti), a fotografije iz kojih su konačno izbrojane kolaterale odabrane su nasumice među tih zadnjih 30 sličica. Kolaterale se broje po segmentima (Slika 4.) — prvi segment je prostor pilorusa do prve duodenalne vene u zastoju, drugi segment je prostor prve i druge vene u zastoju, treći segment je prostor druge i treće vene i tako sve do zadnje vene u zastoju. Unutar segmenta broje se i križićem označavaju (Slika 3.) svi postranični ogranci vena vidljivi mikrokamerom (sa ili bez vidljivih anastomoza), ali samo na unutarnjim stranama susjednih vena. Određivan je i indeks podudarnosti kao mjera za pouzdanost očitavanja (98), u postotku (očitač koji je izbrojao manji broj kolaterala/očitač koji je izbrojao veći broj kolaterala x 100) u tri odvojena pokusa. Kod određivanja indeksa podudarnosti kolaterale su brojali eksperimentator (upoznat s tretmanom i redoslijedom životinja kod davanja lijekova, nije upoznat s tretmanom i redoslijedom životinja kod očitavanja rezultata iz fotografija) i slijepi promatrač (ne zna tretmane niti redoslijed životinja kod očitavanja rezultata, nije sudjelovao kod primjene lijekova). Indeks podudarnosti iznosio je preko 85 % (pokus 1 BPC 157= 94%, kontrola= 86,8%; pokus 2 BPC 157= 92,8%, kontrola= 92,9%; pokus 3: BPC 157= 94,2, kontrola = 88,8%). Fotografije s označenim kolateralama arhivirane su u računalo zajedno s kodom pokusa, životinje i tretmana. Također je praćena težina venskog zastoja donje prednje pankreatikoduodenalne vene i gornje mezenterične vene nakon podvezivanja gornje

prednje pankreatikoduodenalne vene. Težina staze u tim venama ocjenjivana je ocjenskom ljestvicom od 0-3 (0 — prezentacija kao u zdravih štakora; 1 — blaga kongestija; 2 — umjerena kongestija; 3 — teška kongestija) tijekom 5 minuta, 30 minuta i na kraju perioda od 24 sata (Slika 6.). Ocjenska skala je definirana na slijedećem principu: Ocjena 0- nema promjene, prezentacija kao u u zdravih štakora; Ocjena 1 - Vene vidljive, blago lividne boje, ali nisu zadebljale; Ocjena 2 - vene pune i jasno proširene, jasno lividno-plave boje; Ocjena 3 – pune, proširene, tamnoljubičaste do gotovo crne boje. Procjena obima kongestije crijeva je učinjena po otvaranju duodenuma *in vivo* te nakon žrtvovanja i ekstirpacija duodenuma i izražena kao zbroj promjera najvećih lezija (35, 62, 100, 101).



Slika 3. Križićem su označene kolaterale na unutarnjim stranama dviju susjednih vena koje se broje.



Slika 4. Označavanje zahvaćenih segmenata venske staze. A = segment od pilorusa do prve zahvaće ne vene. B = prostor prve i druge za hvaćene vene. C = prostor druge i treće zahvaćene vene. D = prostor treće i četvrte zahvaćene vene.



Slika 5. Ligatura SAPDV (krug)

4.3.5. Eksplantacija tkiva, patohistologija

Eksplantirali smo želudac i dvanaesnik distalno ispod demarkacione zone. Otvorili smo duodenum i promatrali lezije sluznice. Zatim smo ga fiksirali u 10 % formalina, uklopili u parafin, izrezali mikrotomom, obojili hemalaun eozinom i gledali preparat pod svjetlosnim mikroskopom. Opisuje se stanje resica duodenuma (edem, denudiranje epitela, zahvaćenost dijelova resica promjenama). Više edema/zadebljanja epitela, više ogoljenja epitela i veći opseg zahvaćenosti resica znači veće oštećenje. Gleda se također submukozni prostor, kapilare u njemu i odnos prema mukozi. Odizanje epitela i odvajanje od lamine proprije, a pogotovo stvaranje subepitelijalnih prostora kao i jača kongestija submukoznih kapilara znači jače oštećenje. Konačno, gleda se infiltracija limfocitima kao znak oštećenja (više limfocita je znak jačeg oštećenja, manje limfocita je znak blažeg oštećenja). Sve navedene promjene se opisuju, bez posebnih kvantitativnih parametara.

4.3.6. Oksidativni stres

Razina oksidativnog stresa (85, 86, 99, 102, 103), je procjenjivana kvantificiranjem reaktivnosti tiobarbiturne kiseline (TBA) kao ekvivalenata malondialdehida (MDA), te određivanjem razina NO u tkivu duodenuma. Uzorak tkiva eksplantiran za analizu oksidativnog stresa je uzet na istom mjestu kao i za patohistološku analizu, ali od različitih životinja. Uzorci tkiva su homogenizirani u PBS (pH 7.4) koji sadrži 0.1 mmol/L butiliziranog hidrotoluena (BHT, TissueRuptor, Qiagen, SAD) i sonificirani tijekom 30 sekundi u ultrazvučnoj kupelji (Ultrasonic batth, Branson, SAD). Deset postotna triklorooctena kiselina je potom dodana u homogenat, mješavina je centrifugirana na 3000 rpm tijekom 5 minuta i prikupljen je supernatant. Potom je dodana 1 % TBA, te su uzorci prokuhani na 95 °C kroz 60 minuta. Tube su potom stavljene u led tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja (14000 rpm, 10 min), određivana je apsorpcija mješavine na valnoj duljini od 532 nm. Koncentracija MDA je očitana sa standardne kalibracijske krivulje koristeći 1, 1, 3, 3'–tetraetoksi propan (TEP). Opseg lipidne peroksidacije je izražen kao MDA koristeći MEF (molarni ekstinkcijski koeficijent/molar extinction coefficient) za MDA od 1.56 x 105 mol/L/cm. Koncentracija proteina je

određena komercijalnim testom (BioRad Protein DR Assay Reagent Kit, United States). Rezultati su izraženi u nmol po miligramu proteina.

4.3.7. Određivanje NO u tkivu duodenuma

Razina NO (85, 86, 99, 102, 103), je određivana u uzorcima tkiva duodenuma uzetima nakon intervala od 5 minuta, 30 minuta i 24 sata nakon ligacije koristeći Greiss reakciju (Griess Reagent System, Promega, SAD). Sulfanilamid je dodan u homogenizirano tkivo, mješavina je inkubirana, te je potom dodan N–1–naftiletilendiamin dihidroklorid. Griess reakcija je bazirana na reakciji diazotizacije u kojoj acidirani nitrit reagira s diazonij ionima te je, u daljnjem koraku, uparen s N–1–naftiletolendiamid dihidrokoridom formirajući kromorfni azo derivat. Apsorbancija je mjerena pri 540 nm, koristeći otopinu natrij nitrita kao standard. Razine NO su izražene u mikromolima po mg proteina. Koncentracije proteina su određene komercijalnim testom (BioRad Protein DR Assay Reagent Kit, United States).

4.3.8. Statistička analiza

Za obradu parametrijskih podataka u slučaju jedne neovisne varijable (tretman) kod više od 2 eksperimentalne skupine koristili smo ANOVA–u za jednu varijablu, a za usporedbu među skupinama nakon ANOVA–e koristili smo Newman–Keuls test. Za neparametrijske podatke koristili smo Kruskal Wallis test (104). Mann–Whitney U–test smo koristili za usporedbe među skupinama nakon Kruskal Walis testa. Vrijednost $P < 0.05$ smo smatrali statistički značajnim.

5.0. REZULTATI

Problem kongestivnih lezija duodenuma do sada nije pobliže izučavan u eksperimentalnim studijama. Kako je prikazano na Slici 2., okluzija SAPDV vrlo brzo dovodi do velikih kongestivnih lezija duodenuma, ako se ne aktiviraju alternativni zaobilazni putovi, te se na taj način održi integritet duodenalne sluznice, unatoč postojećoj okluziji. To se postiže primjenom pentadekapeptida BPC 157. Dobiveni učinci se dodatno verificiraju primjenom NO–agensa, blokatora NOS–a, L–NAME, kao i supstrata NOS–a, L–arginina.

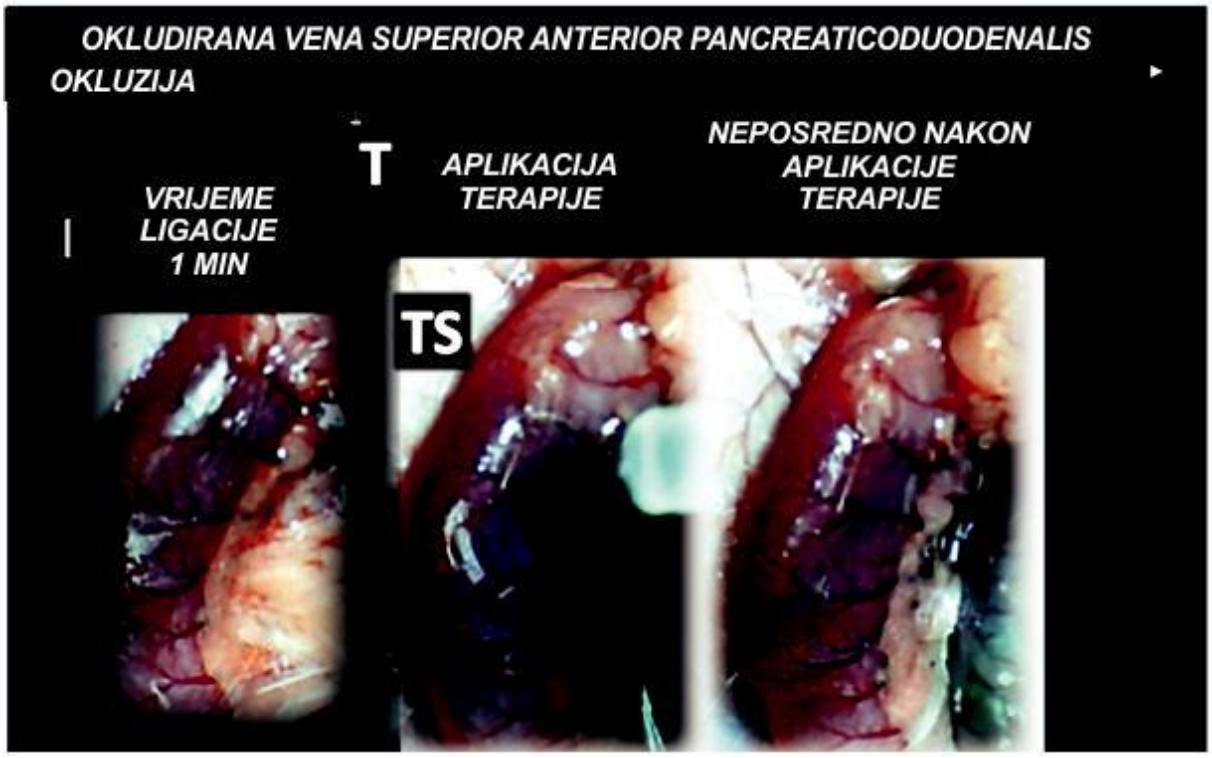


Slika 6. Ilustracija modela okluzije velike vene i lezija na duodenumu u štakora, te terapijskog rješenja s primjenom BPC 157.

U štakora SAPDV ulazi kao utok u venu pyloricu koja jest utok vene portae. S druge strane, SAPDV preko arkadnih krvnih žila komunicira s IAPDV koja ulazi kao utok u venu mesentericu superior. Dakle, postoji venski cirkulatorni luk *vena portae–vena superior anterior pancreaticoduodenalis–vena inferior anterior pancreaticoduodenalis –vena mesenterica superior–vena portae*. Prekidanje toga tijeka okluzijom SAPDV dovodi do kongestije IAPDV i SMV. S obzirom na činjenicu da je okluzijom vene spriječeno otjecanje krvi iz tkiva, posljedično je smanjen i arterijski dotok krvi u isto tkivo te radi istog vrlo brzo nastaju vidljive promjene na duodenumu (105). Zastoj se

može mimoići aktiviranjem preostalog dijela luka, preko „granjanja” arkadnih krvnih žila, aktiviranja IAPDV i SMV (engl. *Blood vessels recruitment*). *Vena superior anterior pancreaticoduodenalis* je okludirana ligacijom (PDS 5/0), 5 arkadnih žila na duodenalnoj serozi unutar tributarija SAPDV te 30–mm duodenalni segment s poremećenim krvotokom, jest označeno područje.

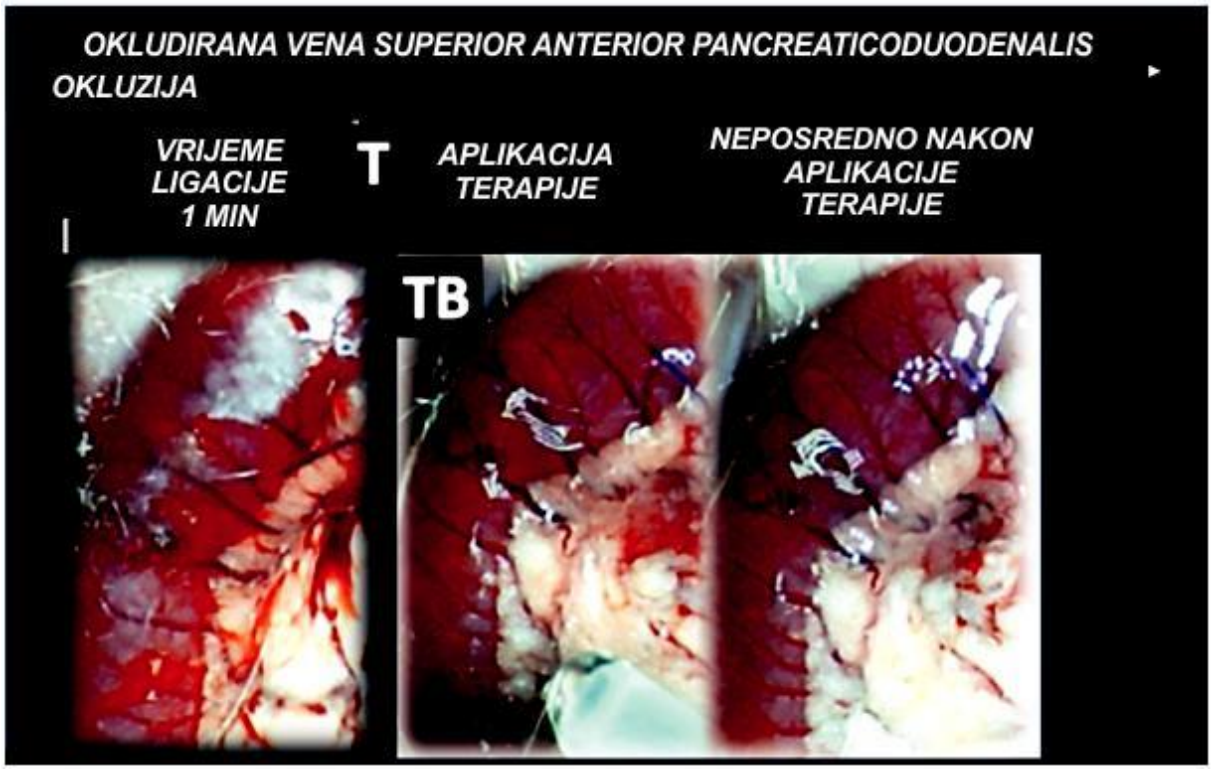
Kao što se dalje vidi, u kontrolnih štakora, nakon okluzije SAPDV, kao što je pobliže prikazano u Slici 7., nastaje kongestija duodenuma, arkadne žile su kongestirane, ne vidi se dodatno „grananje” arkadnih krvnih žila.



Slika 7. Prikaz kongestije arkadnih krvnih žila i duodenuma kao neposrednih posljedica okluzije SAPDV na arkadnim krvnim žilama i duodenumu, nakon 1 minute (lijevo).

Direktna primjena fiziološke otopine (sredina) (TS), kao što se vidi neposredno po aplikaciji (desno) ne popravlja kongestiju, i ne dovodi do „grananja" arkadnih krvnih žila na duodenumu. Arkadne krvne žile ostaju kongestirane i nerazgranate, te je prikladna usporedba „stabla u jesen ili zimu".

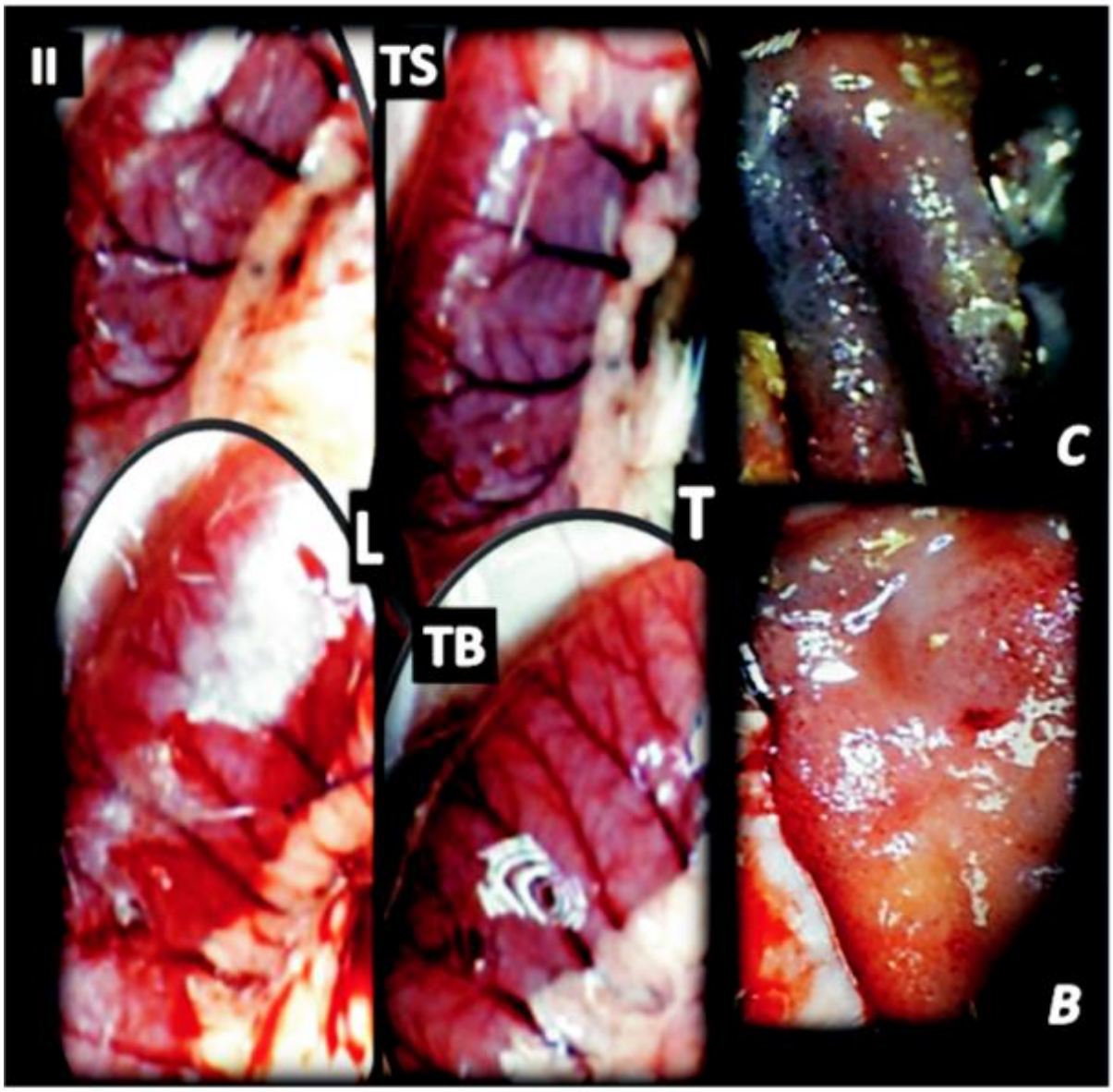
Nasuprot tome, u štakora koji su primili BPC 157, nakon okluzije SAPDV, kongestije duodenuma i arkadnih krvnih žila (gube „grananja", Slika 8.) situacija se brzo mijenja. Krvne žile pokazuju otvaranje dodatnih malih ogranaka po aplikaciji pentadekapeptida BPC 157 i neposredno nakon nje.



Slika 8. Prikaz kongestije arkadnih krvnih žila i duodenuma uz okluziju SAPDV na arkadnim krvnim žilama i duodenumu, nakon 1 minute (lijevo), te njihovo antagoniziranje već kod direktne primjena otopine BPC 157 (sredina) (TB), te neposredno po aplikaciji (desno).

Arkadne krvne žile izgledaju razgranate, te izgleda prikladna usporedba kao „stablo u proljeće ili ljeto”.

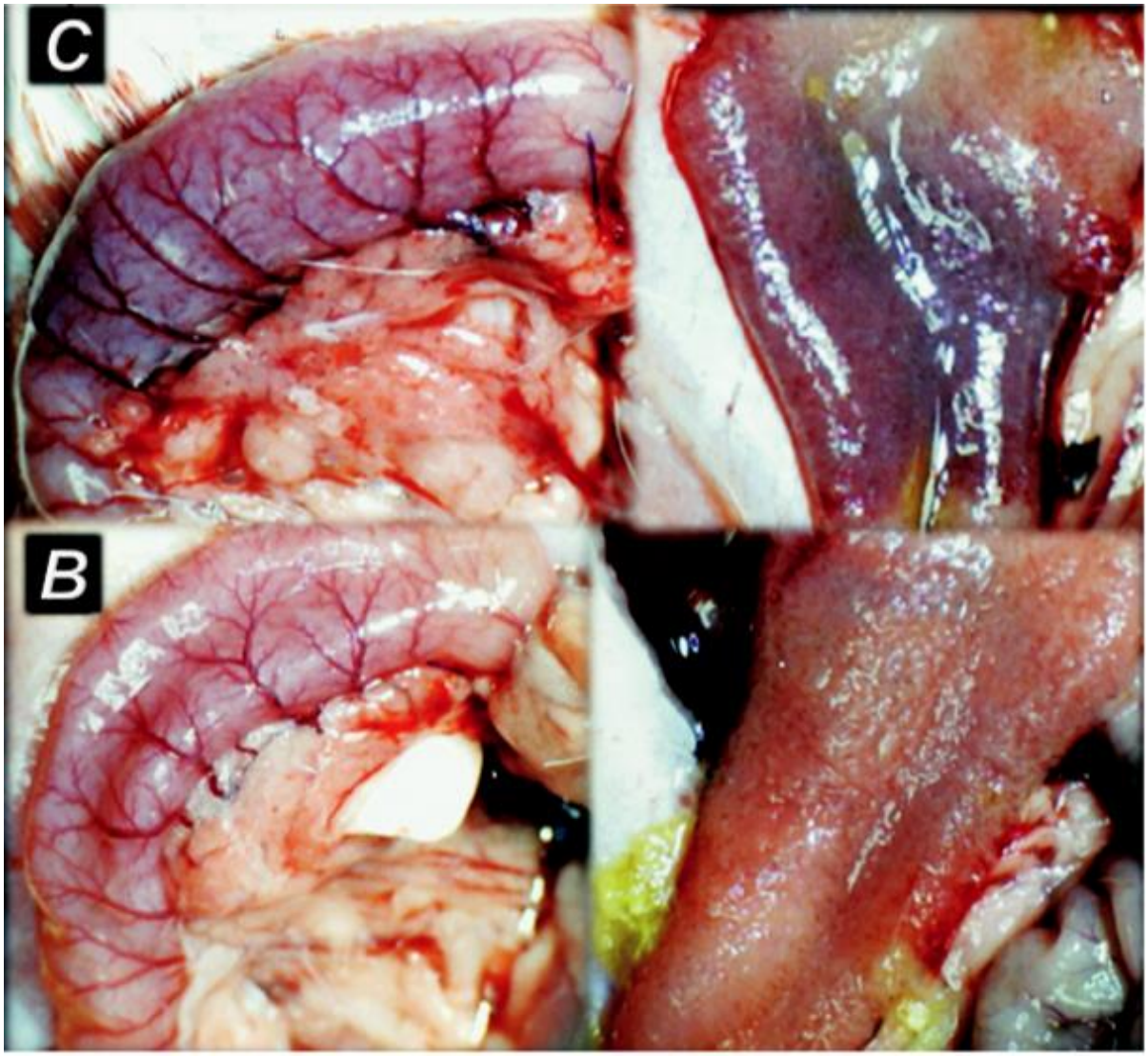
Okluzija SAPDV i kongestija arkadnih krvnih žila duodenuma dovodi do značajne kongestije sluznice duodenuma i multiplih erozija u kontrolnih životinja, kako je pobliže opisano u Slici 9. Nasuprot tome, u štakora kod kojih je aplicirana BPC 157 otopina, dolazi do antagoniziranja znakova venske staze i očuvanja sluznice duodenuma.



Slika 9. Prikaz kongestije arkadnih krvnih žila i lezija duodenuma (nakon okluzije SAPDV), nakon 5 minuta.

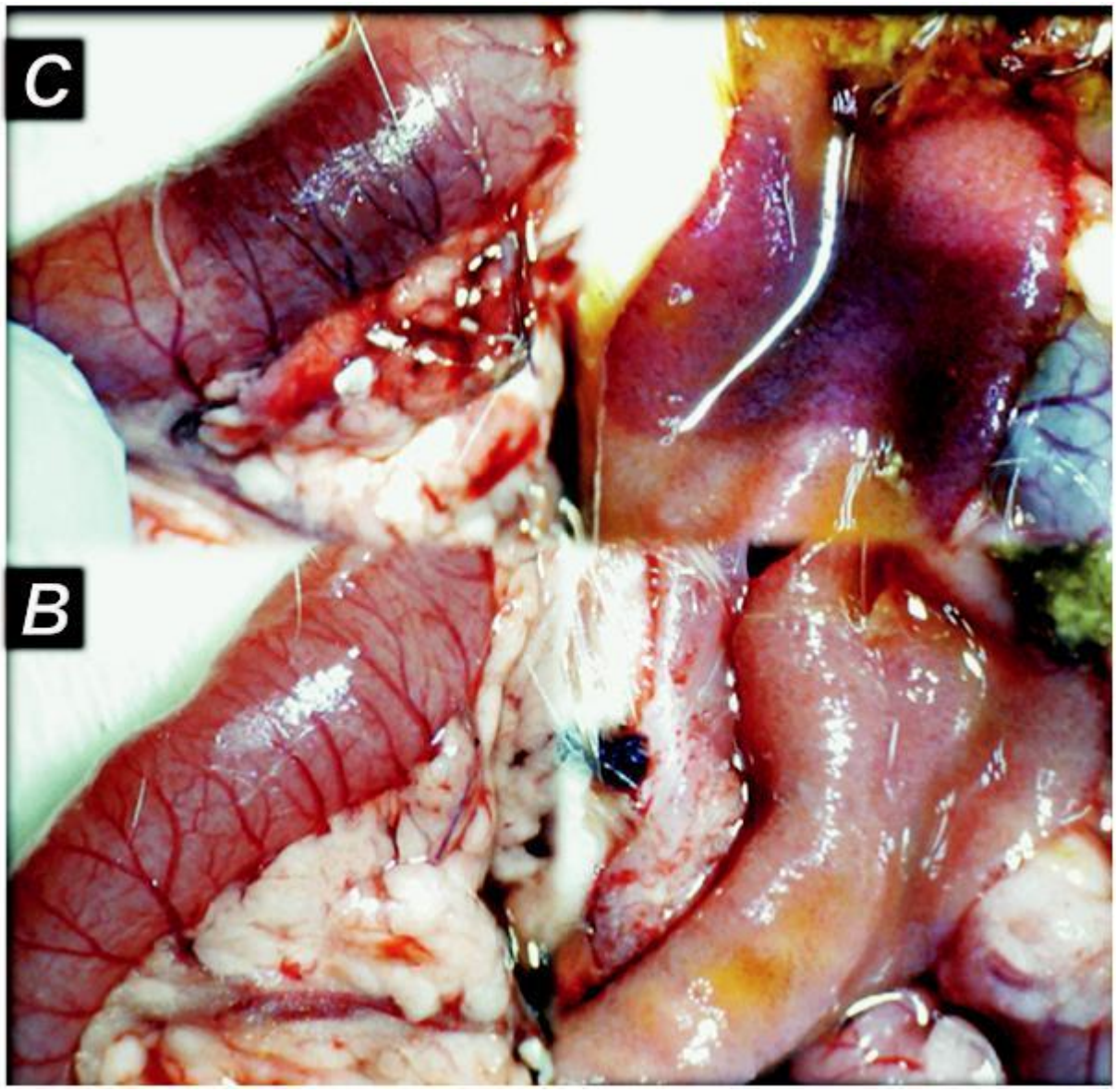
Po terapiji (T), perzistentna kongestija duodenuma, kongestirane arkadne žile bez ramifikacije neposredno nakon direktne primjene fiziološke otopine na duodenum (gore sredina) (TS), nasuprot već značajno smanjenoj kongestiji duodenuma, krvnim žilama koje pokazuju otvaranje dodatnih malih ogranaka („grananje”), neposredno nakon aplikacije pentadekapeptida BPC 157 (TB) (sredina dolje). Kongestirana sluznica duodenuma s prisutnim erozijama nakon 5 minuta u štakora koji su primili direktnu primjenu fiziološke otopine na duodenum (gore sredina) (gore desno) (C), te značajna antagonizacija i značajno očuvana sluznica u štakora koji su primili direktnu primjenu BPC 157 otopine na duodenum (dolje desno) (B).

U daljnjem regularnom slijedu dolazi do tek slabe ramifikacije arkadnih krvnih žila, koje ostaju kongestirane i vidljive kongestije duodenuma, te progresije kongestivnih lezija sluznice duodenuma, uz brojne erozije, kako je pobliže opisano u Slici 10. (30 minuta) i Slici 11. (24 h). Značajna antagonizacija, ramifikacija arkadnih krvnih žila i značajno očuvana sluznica u štakora koji su primili otopinu pentadekapeptida BPC 157 direktno na duodenum, postoji i u daljnjim intervalima.



Slika 10. Prikaz kongestije arkadnih krvnih žila i duodenuma nakon 30 minuta.

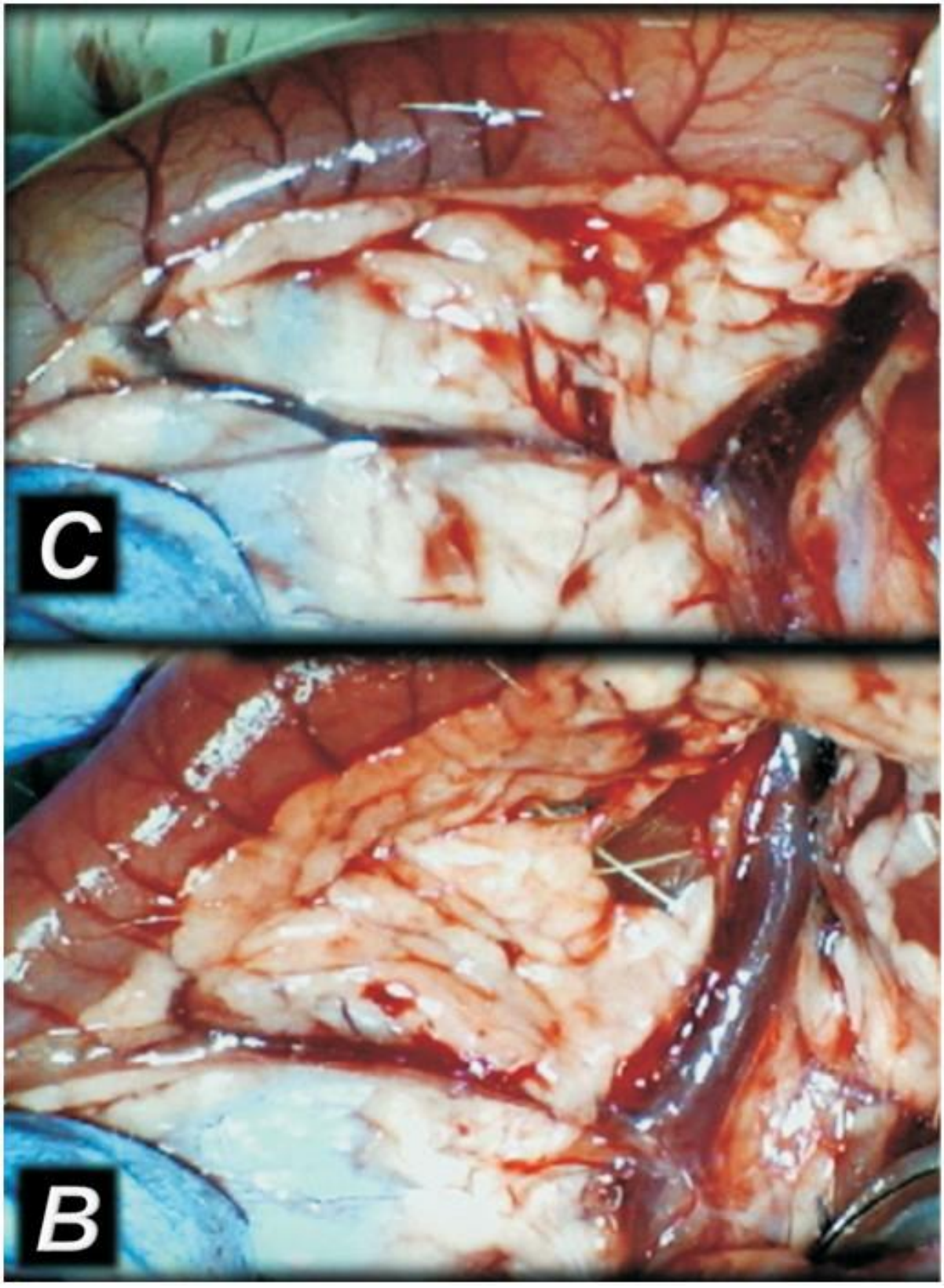
Perzistentna kongestija duodenuma, kongestirane arkadne žile bez ramifikacije neposredno nakon direktne primjene fiziološke otopine na duodenum (gore lijevo), nasuprot nakon BPC 157 aplikacije već sasvim smanjenoj kongestiji duodenuma, krvnim žilama koje pokazuju uznapredovalo otvaranje dodatnih malih ogranaka („grananje”), neposredno (dolje lijevo). Kongestirana sluznica duodenuma s prisutnim erozijama nakon 30 minuta u štakora koji su primili fizološku otopinu direktno na duodenum (gore desno) (C), te značajna antagonizacija i značajno očuvana sluznica u štakora koji su primili pentadekapeptid BPC 157 direktno na duodenum (dolje desno) (B).



Slika 11. Prikaz kongestije arkadnih krvnih žila i duodenuma nakon 24 h.

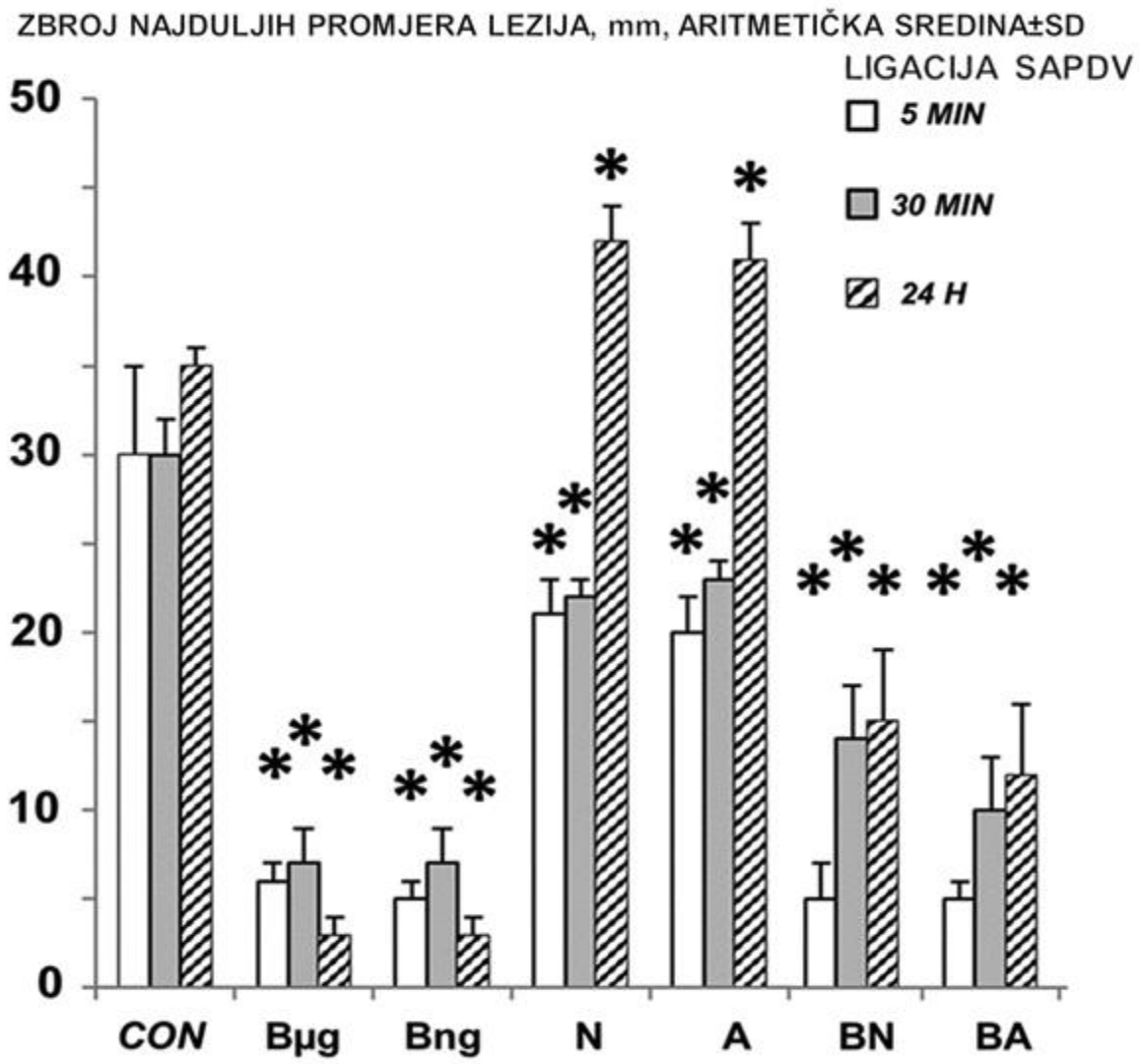
Nakon direktne primjene fiziološke otopine na duodenum, perzistira kongestija duodenuma, kongestirane arkadne žile su bez ramifikacije (gore lijevo), nasuprot nakon aplikacije pentadekapeptida BPC 157 je vidljiva sasvim smanjena kongestija duodenuma, krvne žile pokazuju uznapredovalo otvaranje dodatnih malih ogranaka („grananje”), neposredno (dolje lijevo). Kongestirana sluznica duodenuma s prisutnim erozijama nakon 24 h u štakora koji su primili fiziološku otopinu direktno na duodenum (gore desno) (C), te značajna antagonizacija i značajno očuvana sluznica u štakora koji su primili direktnu primjenu BPC 157 otopine na duodenum (dolje desno) (B). Pokazuje se kongestirana SAPDV (gore lijevo) u kontrolnih životinja, nasuprot punokrvnoj prezentaciji iste vene u štakora koji su primili BPC 157 otopinu (dolje lijevo).

Kod toga se jasno vidi da opisani kolateralni luk preko IAPDV i SMV jest slabo funkcionalan nakon okluzije SAPDV i prekidanja funkcioniranja regularnog luka vena portae–vena superior anterior pancreaticoduodenalis–vena inferior anterior pancreaticoduodenalis–vena mesenterica superior–vena portae, te dolazi do kongestije SAPDV i SMV, kako je pobliže opisano u Slici 12. Nasuprot tome, u štakora koji su primili BPC 157 otopinu, IAPDV i SMV jesu punokrvne, i izgledaju kao funkcionalni kolateralni luk, te se izbjegava inače neizbježna kongestija duodenuma zbog okluzije SAPDV.



Slika 12. Prikaz kongestije arkadnih krvnih žila i duodenuma, uz kongestiju IAPDV i SMV, nakon 24 h, te nakon primjene terapije pentadekapeptidom BPC 157.

Nakon direktne primjene fiziološke otopine na duodenum, nakon 24 h vidi se značajna kongestija arkadnih krvnih žila duodenuma te kongestija IAPDV i SMV, (gore (C)), te nasuprot tome, u štakora koji su primili BPC 157 otopinu, značajna antagonizacija, IAPDV i SMV jesu punokrvne, i izgledaju kao funkcionalni kolateralni luk (dolje) (B). Daljnja analiza rezultata je pokazala da nakon što je okludirana SAPDV, na duodenumu nastaju značajne lezije (Slika 13.), koje su kako je već navedeno, značajno antagonizirane s primjenom pentadekapeptida BPC 157, jednako u obje doze, u svim intervalima. S druge strane, primjena NOS–blokatora, L–NAME i kao i primjena L–arginina, NOS–substrata, imala je dvojni učinak. U prvim intervalima (5 i 30 min) antagoniziranje lezija. Na krajnjem intervalu, 24 h, pokazao se međutim, obratni, agravirajući učinak. Primjena pentadekapeptida BPC 157 je imala redovito pozitivni učinak i uz dodatnu primjenu L–NAME, jednako kao i uz dodatnu primjenu L–arginina.

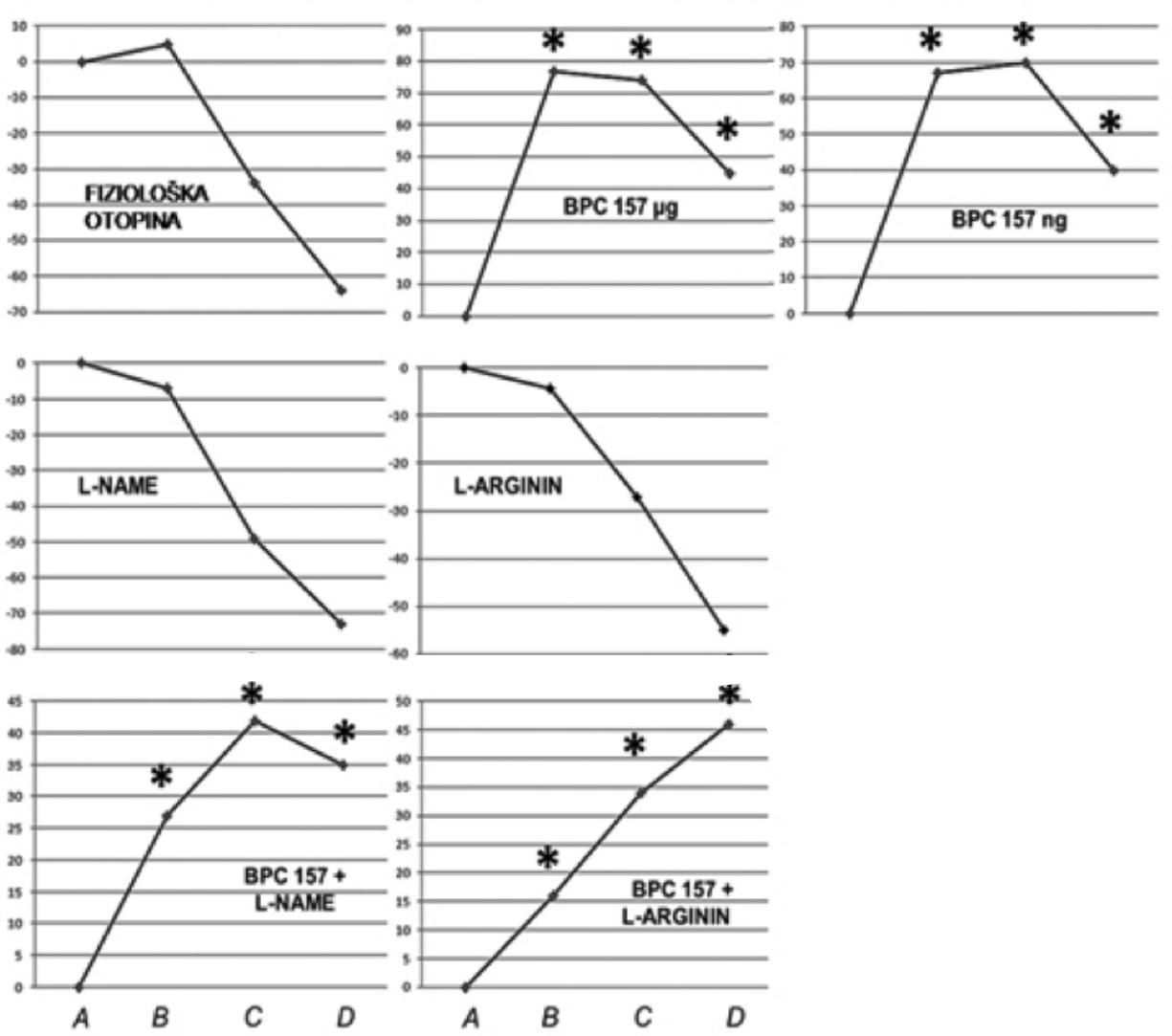


Slika 13. Duodenalne lezije kao zbroj najduljih promjera lezija, utvrđivano mikroskopskom kamerom.

Jednu minutu nakon okluzijle SAPDV, na duodenum su kao 1 mL kupka primijenjeni BPC 157 (Bμg — 10 mikro grama; (Bng — 10 nano grama)), L–NAME (N; 5 mg/kg), L–arginin (A; 100 mg/kg) ili njihove kombinacije (BN, BA), te fiziološka otopina (KON). Štakori su žrtvovani nakon 5 minuta, 30 minuta, 24 h nakon okluzije SAPDV. *P < 0,05 prema kontroli.

Nadalje, nakon što je okludirana SAPDV, na serozi duodenuma dolazi do značajno manje prezentacije krvnih žila, a to smanjenje vremenom dalje progredira (Slika 14., fiziološka otopina). Kako je već navedeno, te su promjene značajno antagonizirane s primjenom pentadekapeptida BPC 157, jednako u obje doze, u svim intervalima, te dolazi obratno, do povećanja broja prisutnih krvnih žila (Slika 14., paneli BPC 157 mikrogrami i BPC 157 nanogrami, točke B,C i D). S druge strane, primjena NOS–blokatora, L–NAME kao i primjena L–arginina, NOS–substrata, imala je učinak kao i primjena fiziološke otopine (Slika 14., paneli u sredini). Povećanje prezentacije krvnih žila s pentadekapeptidom BPC 157 nije se promijenilo niti uz dodatnu primjenu L-NAME, jednako kao i uz dodatnu primjenu L–arginina (Slika 14., donji paneli).

Postotak žila u životinja s podvezanom SAPDV, srednja vrijednost±SD

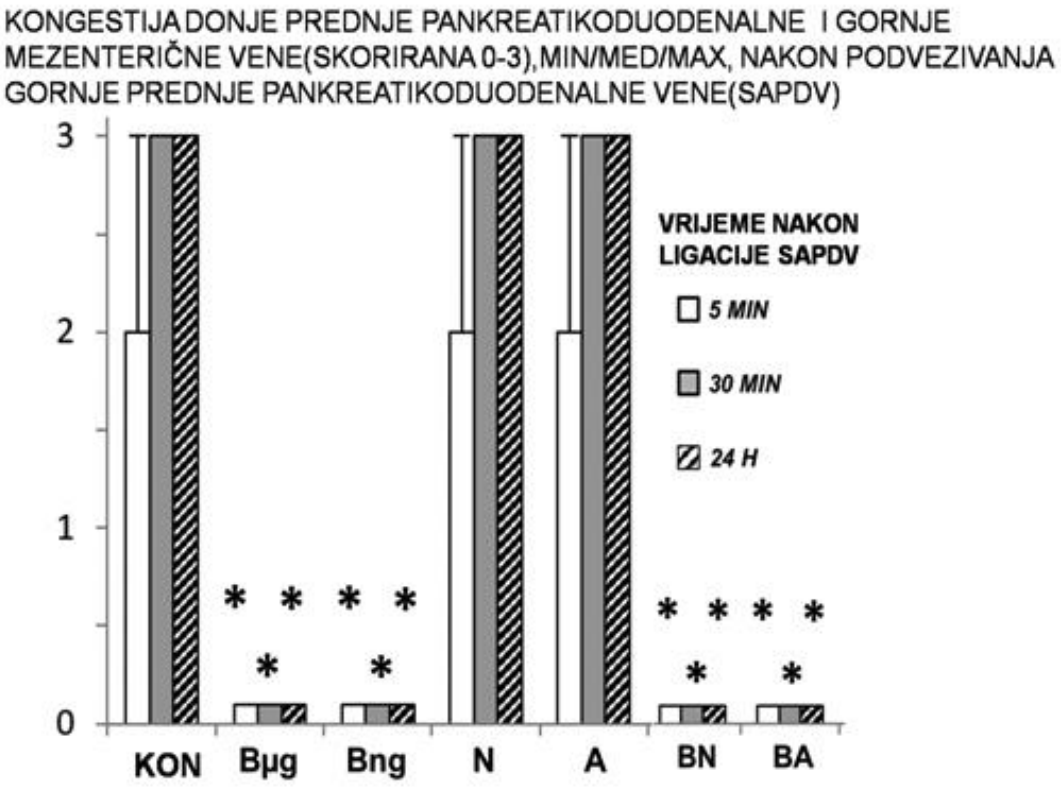


Slika 14. Promjena prezentacije krvnih žila u različitim vremenskim intervalima (A — 1 minuta nakon ligacije, a prije primjene terapije; B — 5 minuta nakon aplikacije; C — 30 minuta nakon aplikacije; D — 24 h nakon aplikacije) prikazana kao postotak (srednja vrijednost ±SD) u odnosu na krvne žile prisutne na ventralnoj strani duodenuma nakon 1 minute ligacije, a prije primjene terapije kao 100 % (A), utvrđivano mikroskopskom kamerom.

Nakon 1 minute nakon lezije, dana je medikacija BPC 157, [10 µg/kg (Bµg), 10 ng/kg (Bng), L–NAME, 5 mg/kg (N), L–arginin, 100 mg/kg (A) zasebno i/ili zajedno (BN, BA) 1 mL kupka/štakor] ili jednaki volumen fiziološke otopine je primijenjen na duodenum štakora kod kojih je okludirana SAPDV.

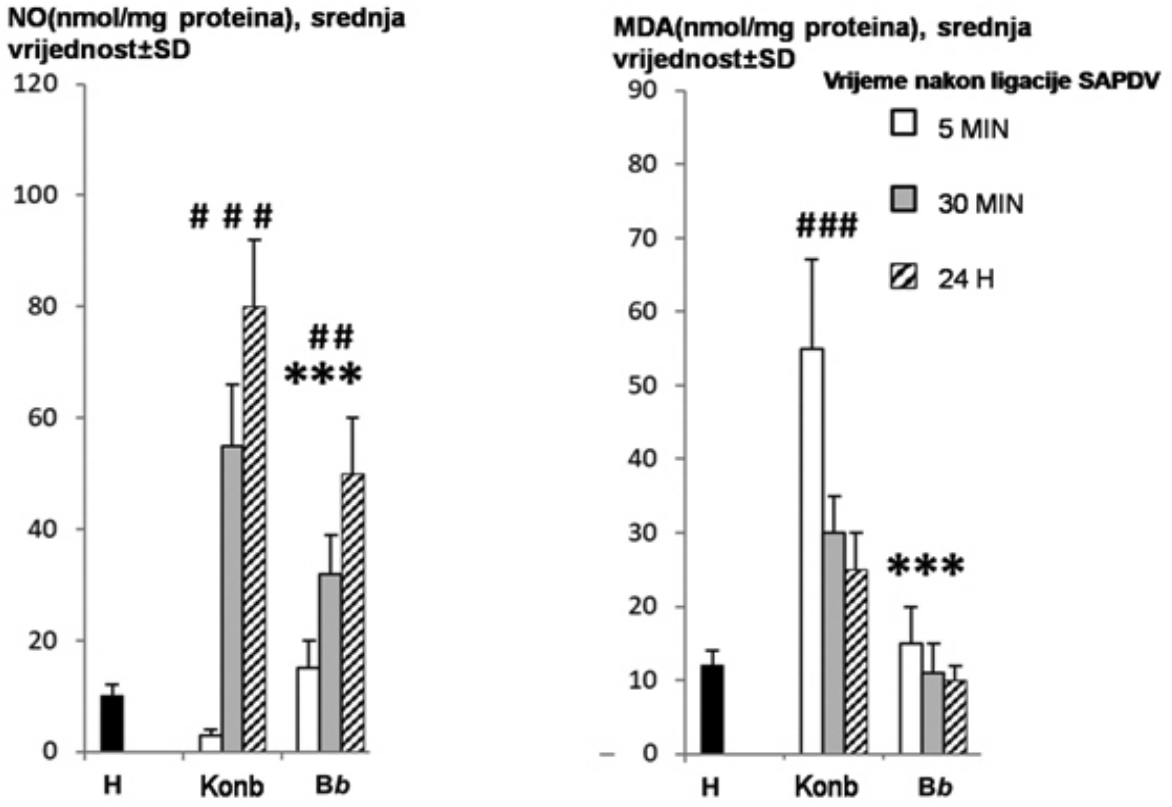
Zbog jasnoće prikaza, vrijednosti SD nisu prikazane. Štakori su žrtvovani nakon 5 minuta, 30 minuta, 24 h. *P < 0.05 prema kontroli.

Nadalje, nakon što je okludirana SAPDV, dolazi do kongestije IAPDV i SMV. Promjene odgovaraju onima koje se vide kada na serozi duodenuma dolazi do značajno manje prezentacije krvnih žila, a to smanjenje vremenom dalje progredira (Slika 15.). Kako je već navedeno, kongestije IAPDV i SMV su značajno antagonizirane s primjenom pentadekapeptida BPC 157, jednako u obje doze, u svim intervalima. S druge strane, primjena NOS–blokatora, L–NAME kao i primjena L–arginina, NOS–supstrata, je bila bez dodatnog učinka, te je imala učinak kao i primjena fiziološke otopine. Primjena pentadekapeptida BPC 157 je imala redovito nepromijenjeni pozitivni učinak i uz dodatnu primjenu L–NAME, jednako kao i uz dodatnu primjenu L–arginina.



Slika 15. Kongestija IAPDV i SMV, skor 0–3, Min/Med/Max, utvrđivano mikroskopskom kamerom.

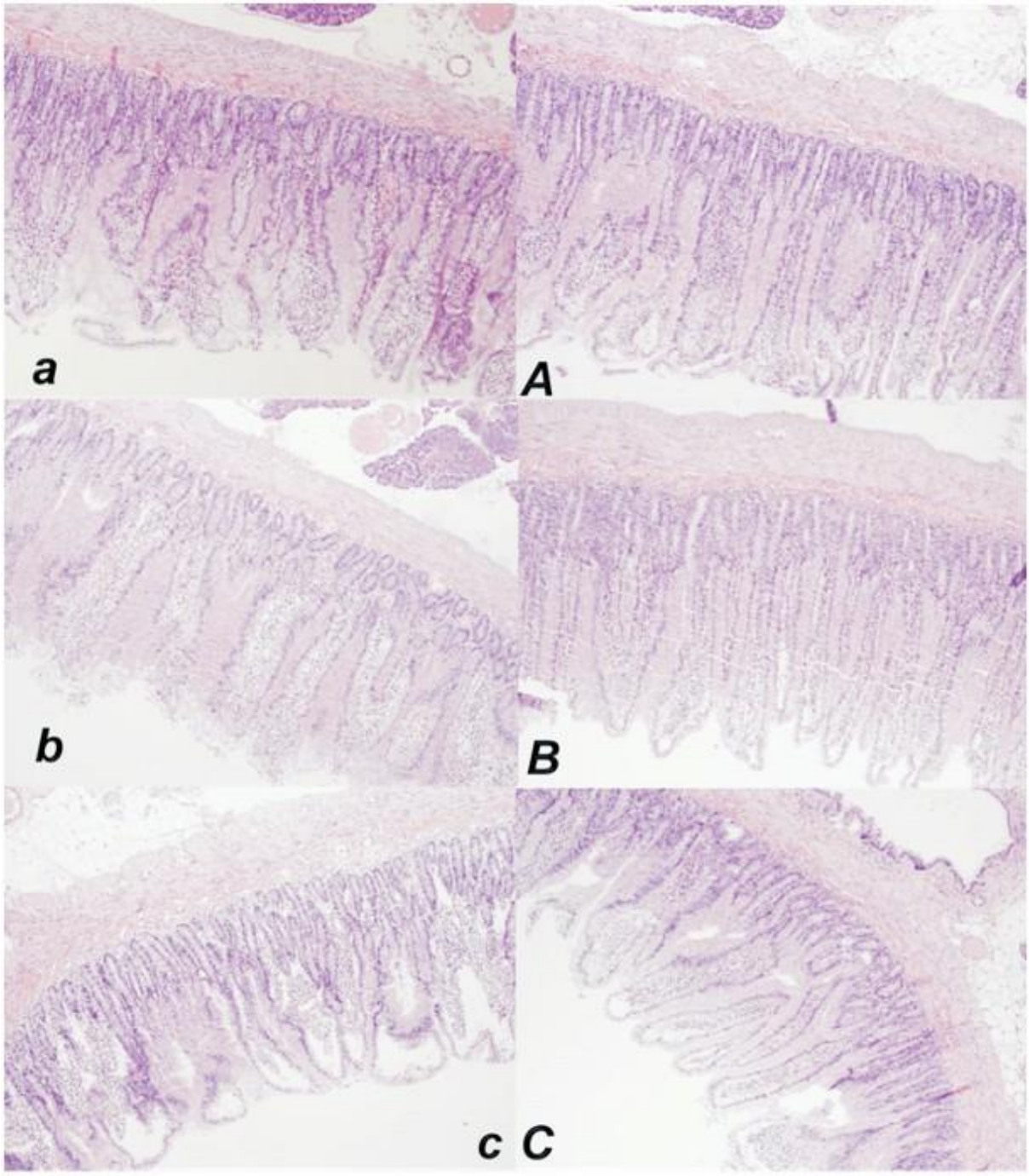
Jednu minutu nakon okluzijle SAPDV, na duodenum su kao 1 mL kupka primijenjeni BPC 157 (Bμg — 10 mikro grama; (Bng — 10 nano grama)), L–NAME (N; 5mg/kg), L-arginin (A; 100 mg/kg) ili njihove kombinacije (BN, BA), te fiziološka otopina (KON). Štakori su žrtvovani nakon 5 minuta, 30 minuta, 24 h nakon okluzije SAPDV. * $P < 0.05$ prema kontroli



Slika 16. Razine NO i malondialdehida u tkivu duodenuma nakon ligacije gornje prednje pankreatikoduodenalne vene, u vremenskim intervalima od 5 i 30 minuta te 24 sata

Pentadekapeptid BPC 157 ili jednak volumen fiziološke otopine (kontrola) primjenjeni kod životinja s podvezanom prednjom pankreatikoduodenalnom venom. *P 0.05 vs fiziološka otopina; #P 0.05 vs zdrav duodenum. H: zdrav duodenum; Bb: BPC 157 10 µg/kg, 1 mL kupke/štakoru; KONb: 1 mL fiziološke otopine; NO: Nitrit oksid; MDA: Malondialdehid.

Određivana je razina oksidativnog stresa i NO u tkivu duodenuma tretiranom pentadekapeptidom BPC 157 te je pokazan porast vrijednosti NO dok su vrijednosti MDA bile normalne, u usporedbi s izrazito visokim vrijednostima u kontrolnih životinja.



Slika 17. Histološki prikaz (HE; uvećanje 10 x) lezija sluznice duodenuma 5 (gore), 30 minuta (sredina) i 24 sata (dolje) po podvezivanju SAPDV u kontrolnih (lijevo; a, b, c) i BPC157 tretiranih štakora (desno; A, B, C).

Mikroskopske lezije su u kontrolnih životinja (Slika 17.) progredirale od blagog viloznog edema (histološki prisutnog no bez značajnije promjene strukture tkiva) s blagim limfocitnim infiltratom (pokoji limfocit) u periodu 5 minuta nakon ligacije (a) prema denudiranim viloznim vršcima sa naglašenim viloznim edemom (histološki prisutan

edem u toj mjeri da mijenja strukturu tkiva) i submukoznom kapilarnom kongestijom u periodu 30 minuta nakon ligacije) (b), pa sve do pojave subepitelijalnog prostora s opsežnim odizanjem epitelnog sloja od lamine proprije koji se proteže duž strana resica, viloznog edema s kapilarnom kongestijom te submukozne kongestije i limfocitnog infiltrata u periodu 24 sata po ligaciji (c).

Štakori tretirani pentadekapeptidom BPC 157 (A, B, C) su imali očuvano crijevo s tek blagim viloznim edemom i blažim limfocitnim infiltratom. Elevacija epitela od lamine proprije je nađena samo u apikalnom dijela resica i to u periodu od 24 sata nakon ligacije (C).

6.0. RASPRAVA

Pokušali smo razjasniti terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 na velike venske opstrukcije i duodenalne lezije u štakora kao i njegovo međudjelovanje s NO–sustavom (1, 7–9, 74, 75, 78–80). Ključni faktor u nastanku duodenalnih lezija je upravo okluzija SAPDV (kao što je ranije pokazano modelima okluzije drugih krvnih žila, primjerice ligacija lijeve količine arterije i vene ili ligacija donje šuplje vene (85, 86), uz nemogućnost regulacije uobičajnim kompenzatornim mehanizmima kao niti uz dodatnu terapiju različitim NO agensima (hiperaktivacija NOS–a L–argininom ili NOS blokada primjenom L–NAME).

Slijedom navedenog, u studiji smo se usredotočili na činjenicu da nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 dolazi do brze i jasne prezentacije krvnih žila te posljedično smanjenja broja duodenalnih lezija. Ova studija također produbljuje dosadašnje spoznaje o tome kako bi BPC 157 mogao predstavljati esencijalni tretman nakon kojega brzo dolazi do ponovne uspostave krvotoka u kongestiranoj regiji brzom aktivacijom kolaterala, umanjujući tako štetan učinak nastao po podvezivanju krvne žile. Navedeno je ranije pokazano u modelu ishemijskog kolitisa (85) koji nastaje nakon podvezivanja ICV infrarenalno (86). Na tom se modelu vidi uloga NO-sustava kao i smanjena formacija slobodnih radikala (85,86).

Sve štetne posljedice koje nastaju nakon ligacijom izazvane okluzije SAPDV, uz nemogućnost regulacije uobičajnim kompenzatornim mehanizmima, regrediraju u kratkom vremenu nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 koji bi mogao biti ključni faktor cijeljenja lezija. Nakon aplikacije pentadekapeptida BPC 157, kako u mikro tako i u ng dozama, štakori su ispoljili povećanu prezentaciju krvnih žila uz obilje ogranaka koji su se pokazivali u 60% većem broju između arkada u odnosu na inicijalnu vrijednost. IAPDV i SMV nisu bile kongestirane te je uvelike smanjen broj lezija na duodenumu (Slika 6., Slika 7., Slika 8., Slika 9., Slika 10.).

Terapija pentadekapeptidom BPC 157, kao što je pokazano ranije (85, 86) ispoljava poseban „premošćujući" učinak, čineći vaskularnu (vensku) okluziju bezopasnom na način da reorganizira krvotok kako bi spriječila inače neizbježnu pojavu duodenalnih lezija u životinja s podvezanom SAPDV.

Kao i u modelima okluzije drugih krvnih žila, navedeno jasno ukazuje kako BPC 157 ima rano pozitivno djelovanje koje može biti neophodno za saniranje ozljeda čak i u stanjima produljene (trajne) okluzije.

Pokazalo se da BPC 157 ima kongruentan učinak na modele okluzije SAPDV i okluzije lijeve količne arterije i vene iz čega slijedi kako se modeli duodenum/kolon preklapaju u smislu učinaka nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 (85, 86). Sličnost u ta dva modela je važna i očituje se u „premošćujućem" učinku u oba modela (85, 86), međudjelovanju u oba slučaja s NO sustavom, učinkom na cirkulaciju SAPDV i lijeve količne arterije i vene te osobitosti duodenalnih i kolonalnih lezija (85, 86). Spomenuti „premošćujući" učinak pentadekapeptida BPC 157, koji djeluje na očuvanje sluznice duodenuma (i kolona) bi mogao biti prilično složen (85, 86), kao što je i pokazano primjenom L–NAME (NOS blokada) i L–arginina (NOS hiperaktivnost) koji u slučajevima kada su primjenjivani samostalno ili kombinirano (NO–sustav imobiliziran) nisu niti u jednom slučaju pokazali niti „premošćujući" učinak kao niti posljedično učinak na očuvanje sluznice duodenuma (85, 86). Međutim, kada su navedeni preparati primjenjeni uz BPC 157 (L–NAME+BPC 157; L–arginin+BPC 157), bilo u modelu ligacije duodenuma ili lijeve količne arterije/vene, opet se pokazao spomenuti pozitivan učinak na premoštenje i učinak na zaštitu sluznice kompenzirajući tako efekte i L-NAME i L-arginina.

Moguće je da su upravo specifične okolnosti nastale nakon okluzije krvnih žila uvjet za već spominjani učinak na premošćivanje lezija sluznice. U konkretnom primjeru se radi o lezijama dvanaesnika nastalim nakon podvezivanja SAPDV i kompenzatornim mehanizmom putem IAPDV-SMV koji pruža protekciju sluznice. Taj je učinak induciran primjenom pentadekapeptida BPC 157 i njegovim učinkom na NO-sustav. No, zanimljiv je i učinak pentadekapeptida na agense NO-sustava, L-NAME i L-arginin. L–NAME i L–arginin su ovdje dani u dozi koja bi trebala momentalno uzrokovati hipertenziju ili hipotenziju (42), dok su oba ta učinka poništena primjenom pentadekapeptida BPC 157 (42). U uobičajnim okolnostima, BPC 157 ne djeluje na

normalan krvni tlak (42) no učinci se razlikuju u ovisnosti o tome je li primijenjen uz L-NAME ili L-arginin. L-NAME inducira arterijsku (106) i vensku (86) hipertenziju, dok L-arginin inducira hipotenziju (86). Evidentirani su pozitivni učinci nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 i to prvenstveno na različite različite poremećaje proizašle iz povećanih vrijednosti krvnog tlaka kao što su venska hipertenzija u sistemski hipotenzivnih štakora s podvezanom donjom šupljom venom (86), Virchowljev trijas (86), aritmije uzrokovane hipernatrijemijom (106) te kronično zatajenje srca uzrokovano doksorubicinom u hipotenzivnih štakora i miševa (107). Iz navedenog slijedi kako u životinja s ligiranom SAPDV venska okluzija uzrokuje ozbiljnu kongestiju i povećan intravaskularni tlak (95) te takve okludirane žile nikako ne uspjevaju odgovoriti na niti jedan NO agens. S druge strane, u štakora s podvezanom lijevom količnom arterijom i venom (85), arteriovenska okluzija može izbalansirati alteraciju u pritoku i odtoku rezultirajući u ekvilibriju intravaskularnog tlaka i tonusa (95), što možda objašnjava lošiju (L–NAME) ili bolju (L–arginin) prezentaciju krvnih žila, ali uz manjak međusobnih konekcija i uvijek pogoršanje duodenalnih lezija (možda i nakon kratkotrajnog inicijalnog protektivnog učinka).

Svi simptomi koji nastaju nakon podvezivanja SAPDV, ili lijeve količne arterije i vene (85), i predstavljaju praktički nerješivo patofiziološko stanje, ukazuju na izvanrednu paralelnu aktivnost L–NAME/L–arginina, koja je pokazana i u drugim modelima (85, 107, 108), kao specifikuma dualne uloge NO–sustava (L–NAME vs. L–arginin vs. kombinacije) (74, 75, 78–80), i koji predstavljaju dva farmakološki zasebna mehanizma sa suprotnim učincima na isti signalni put. U životinja s podvezanom SAPDV, upravo taj paralelni način primjene pokazuje različite zasebne učinke, od pozitivnog djelovanja na lezije (u ranim intervalima) naspram pogoršanja lezija u kasnim. Ovdje je pokazano, kao i ranije (85, 99,107, 108) kako je svaki od tih učinaka specifičan, u odnosu na NO–sustav. Pentadekapeptid BPC 157 može modulirati NO–sustav kako bi ispoljio učinkovitije cijeljenje potičući interkonekcije među arkadama kako bi se premostila opstrukcija, što nije slučaj prilikom aplikacije L–NAME i L–arginina (85). Tvrdnju o toj specifičnoj ulozi pentadekapeptida BPC 157 podupiru i vrijednosti NO i MDA koje su određivane u tkivima dvanaesnika. Pozitivan učinak se očituje u kolapsu negativnog slijeda događanja (naglo smanjenje opskrbe krvlju, smanjene razine NO u tkivu dvanaesnika, trenutni gubitak endotela zida krvnih žila, smanjena mogućnost produkcije eNOS (109); oksidativni stres kao rezultat lize endotelnih stanica (110, 111);

te potom ekscesivno otpuštanje NO generirano inducibilnim izoenzimima koji oštećuju stijenku žila i druga tkiva, poglavito u kombinaciji s reaktivnim posrednicima kisika uz oštećenje endotela (97, 107, 108).

BPC 157 je s druge strane pokazao kako uzrokuje obnavljanje endotelijalnog integriteta i uspješno sanira oksidativna oštećenja (85, 86, 102, 103) te ima značajnu interakciju s NO–sustavom (74, 75, 78–80) kao što i endotel ima značaj u pokazivanju povećanih vrijednosti NO u dvanaesniku, uz normalne vrijednosti MDA i adekvatnu funkciju eNOS sistema (74, 75, 78–80). Nadalje, BPC 157 je pokazao sposobnost obnavljanja endotela i reverzibilni učinak na većinu oksidativnih oštećenja čak i tijekom reperfuzije (koja se događa dok je okluzija žile još prisutna) kao i tijekom pretjerane reperfuzije (koja se događa nakon uklanjanja okluzije) (85). U kombinaciji s navedenim nalazima, pokazani brzi učinak na postojeće krvne žile koje bi inače loše reagirale na povećane zahtjeve koji se javljaju nakon štetnog događaja, bi mogao ukazivati kako BPC 157 utječe na još nekoliko drugih molekularnih puteva (20, 29, 86, 114–117). Navedeno bi moglo i staviti dodatan naglasak na originalno razumijevanje citoprotekcije (očuvanje endotela — očuvanje epitela) (87–90, 35) uz kompleksnost ponovnog uspostavljanja krvotoka premošćivanjem okluzije (85, 86) SAPDV putem IAPDV — SMV, ili okluzije ICV putem donje ovarične vene i drugih vena (86), ili čak dvije opstrukcije, kao što su proksimalna i distalna ligacija lijeve količne arterije i vene preko arkada u štakora s kolitisom (85). Nadalje, specifična aktivacija kolateralne cirkulacije (85, 86) može biti odgovorna i za kasniji jaki angiogeni učinak i učinke cijeljenja istog (29, 53, 57, 58, 109–112), mnogo potentnije od standardnih antiulkusnih agensa (57). Ilustrativno, BPC 157 ubrzava oporavak krvotoka i uzrokuje povećan broj krvnih žila u štakora s ishemijom stražnjeg uda. BPC 157 pospješuje ekspresiju VEGFR2 u štakora s ishemijom stražnjeg uda i endotelijalnom kulturom stanica te promovira internalizaciju VEGFR2 u sprezi sa VEGFR2–Akt–eNOS aktivacijom (109). Kao što je spomenuto ranije, za razliku od standardnih citoprotektivnih agensa koji ispoljavaju samo profiaktičku učinkovitost (35, 82–85, 118, 114), BPC 157 kao medijator Robert–ove citoprotekcije (1, 7–9, 70, 71, 73–75), nativan i stabilan u ljudskom želučanom soku s pozitivnim djelovanjem na integritet gastrointestinalne sluznice (1, 7–9, 70, 71, 73–75), predstavlja prototip efektivnije klase citoprotektivnih agensa, s jasnim profilaktičkim, a također i terapeutskim svojstvima (1, 7–9, 70, 71, 73–75).

7.0. ZAKLJUČAK

1. U kontrolnih životinja se pokazala progresija promatranih lezija nastalih nakon podvezivanja SAPDV (5 min, 30 min, 24h). Promatrani kongestirani segment crijeva je bio dulji od 30 mm s prisutnim brojnim hemoragijskim lezijama sluznice uz kongestiju seroze sa smanjenjem broja kolaterala i ogranaka te u konačnici smanjenom prezentacijom krvnih žila na ne više od 30 % inicijalne vrijednosti.

2. U životinja tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 (primjenjen kao kupka direktno na duodenum), samo je u nekoliko životinja zahvaćeni segment crijeva bio dulji od 10 mm uz smanjenu kongestiju seroze. Prati se povećana prezentacija i broj kolateralnih krvnih žila na više od 60 % od inicijalne vrijednosti.

3. L–NAME i L–arginin su u intervalima od 5 i 30 minuta, primjenjeni samostalno, imali pozitivan učinak na smanjenje lezija mukoze i seroze duodenuma, dok se taj učinak pogoršao na intervalu od 24 sata. Nije bilo značajnijeg učinka na smanjenje prezentacije krvnih žila i kolaterala.

4. U životinja s podvezanom SAPDV, u kojih je BPC 157 apliciran uz L–NAME ili L–arginin, učinak se pokazao jednakim kao u slučajevima u kojima je BPC 157 primjenjen samostalno.

5. BPC 157 je pokazao iznimno djelovanje utječući na brzu aktivaciju kolaterala umanjujući pritom štetne efekte koji nastaju kao posljedica podvezane krvne žile, u ovom slučaju vene, te je uspješno očuvao integritet duodenalne sluznice, pokazano i patohistološki.

8.0. SAŽETAK

Fokus ovog istraživanja je na značajnoj venskoj okluziji SAPDV i posljedičnoj pojavi duodenalnih lezija u štakora te terapijski učinak stabilnog gastričnog pentadekapeptida BPC 157, prototipnog citoprotektivnog agensa. Primjena pentadekapeptida BPC 157 je u životinja s okluzijom različitih krvnih žila (npr. lijeva količna arterija i vena; infrarenalni dio donje šuplje vene) dovela do premošćujućeg efekta na okluziju djelujući na brzu prezentaciju kolateralnog krvotoka i time na (smanjen) broj različitih lezija (ishemijski kolitis, duboka venska tromboza, Virchowljeva trijada). U štakora s podvezanom SAPDV, primjenjena je kupka pripravaka (BPC 157 10 ug, 10 ng/kg/1ml kupke po štakoru), NOS blokator L–NAME (5 mg/kg/1ml kupke po štakoru); supstrat NOS–a L–arginin (100 mg/kg/1ml kupke po štakoru), primjenjivani samostalno ili u kombinacijama; te fiziološka otopina u istom omjeru za kontrolne životinje unutar 1 minute po podvezivanju žile. Nakon aplikacije pentadekapeptida BPC 157, kako u mikro tako i u ng dozama, štakori su ispoljili povećanu prezentaciju krvnih žila uz obilje ogranaka koji su se pokazivali u 60 % većem broju između arkada u odnosu na inicijalnu vrijednost; niti IAPDV niti SMV nisu bile kongestirane te je uvelike smanjen broj lezija na duodenumu. Uočeno je također, kako je učinak L–NAME i L–arginina u intervalima od 5 i 30 minuta doveo do smanjenja broja lezija sluznice, dok se broj lezija u intervalu od 24 sata pogoršavao, bez efekta na kolaterale i prezentaciju krvnih žila. U životinja koje su uz BPC 157 tretirane i s L–NAME ili L–argininom, učinak se pokazao jednakim kao u životinja tretiranih samo pentadekapeptidom BPC 157. Zaključno, djelovanje pentadekapeptida BPC 157 se očituje brzom aktivacijom kolaterala i prezentacijom krvnih žila, premošćivanjem okluzije putem IAPDV — SMV te malim brojem duodenalnih lezija, što je ostvareno posredstvom NO–sustava.

Ključne riječi: premošćivanje; venska okluzija; duodenalne lezije; stabilni gastrični pentadekapeptid BPC 157; L–NAME; L–arginin.

9.0. SUMMARY

We focused on the major venous occlusion (superior anterior pancreaticoduodenal vein (SPADV)–ligation) and duodenal lesions in rat, and therapy with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prototype cytoprotective agent. BPC 157 application in rats underwent other vessels occlusions (i.e., left colic artery and vein; infrarenal inferior caval vein) induced bypassing of occlusion through rapid collaterals presentation, and lesions and whole consequent syndrome (ischemic colitis; deep vein thrombosis, Virchow triad) were largely attenuated. In rats underwent SPDAV–ligation, medication was bath at the ligated SAPDV (BPC 157 10 µg, 10 ng/kg/1ml bath/rat; L–NAME 5 mg/kg/1ml bath/rat; L–arginine 100 mg/kg/1ml bath/rat, alone and/or together); at 1 min ligation–time. Unlike severe course in controls, after BPC 157 application, rats commonly exhibited strong attenuation of mucosal lesion and serosal congestion, improved vessels presentation, much more interconnections, branching raised more than 60 % from the initial value; inferior anterior pancreaticoduodenal vein (IAPDV) and superior mesenteric vein (SMV) were both non congested. Interestingly, while at 5 min and 30 min period alone L–NAME and L–arginine decreased mucosal and serosal duodenal lesions, their effect was worsening at 24 h period, no effect on the vessels collaterals and branching. With BPC 157 all SAPDV–igated rats receiving L–NAME and/or L–arginine appear like rats treated with BPC 157 alone. Concluding, by rapid bypassing occlusion, BPC 157 rescued original duodenal flow through IAPDV to SMV flow, duodenal lesions largely mitigated, NO–system related effect.

Key words: Bypassing; major venous occlusion; duodenal lesions; stable gastric pentadecapeptide BPC 157; L–NAME; L–arginine; rat.

10.0. LITERATURA

1. Sikirić P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, 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;87:313–27.

2. Veljaca M, Chang K, Guglietta A. Digestion of h–EGF, h–TGF alpha and BPC–15 in human gastric juice. Gastroenterology. 1995;108:761.

3. Xue XC, Wu YJ, Gao MT, Li WG, Zhao N, Wang ZL, i sur. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. World J Gastroenterol. 2004;10:1032–6.

4. 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.

5. Veljaca M, Krnic Z, Brajsa K, Mildner B, Pavic–Saladojev D, Seveljevic–Jaran D, i sur. The development of PL 14736 for treatment of inflammatory bowel disease. IUPHAR–GI section symposium, Honolulu, Hawaii, 2002, 13–15 July, O–32.

6. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B, Brajsa K, Bubenik M, Stipanicic S, i sur. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. Gut. 2003;51:A309.

7. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, 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;16:224–34.

8. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des. 2011;17:1612–32.

9. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem. 2012;19:126–32.

10. Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. BPC 157 and standard angiogenic growth factors. Gastrointestinal tract healing, lessons from tendon, ligament, muscle and bone healing. Curr Pharm Des. 2018;24-:1972–89.

11. Pharmacological receptor binding affinity of PL–10.1. RBM Exp. 950020. Torino: Instituto di Ricerche Biomediche „Antoine Marxer" RBM S.p.A.; 1995.

12. Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(10):821–34.

13. In vitro microsomal enzyme activity in mouse liver after repeated intravenous administration. RBM Exp. 950021. Torino: Instituto di Ricerche Biomediche „Antoine Marxer" RBM S.p.A.; 1995.

14. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, 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;37:768–77.

15. Sikiric P, Jadrijevic S, Seiwerth S, Sosa T, Deskovic S, Perovic D, i sur. Long–lasting cytoprotection after pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, sucralfate, or cholestyramine application in reflux esophagitis in rats. J Physiol Paris. 1999;93:467–77.

16. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, i sur. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. J Pharmacol Sci. 2006;102:269–77.

17. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, 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;104:7–18.

18. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, Brcic L, Blagaic Boban A, Batelja L, i sur. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. Dig Dis Sci. 2009;54:46–56.

19. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic, 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 oxi- de–system. J Pharmacol Sci. 2008;108:7–17.

20. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujic D, Drmic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. Eur JPharmacol 2013;701:203–12.

21. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, 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;37:768–77.

22. Zoricic Z, Sikiric P, Seiwerth S. Pentadecapeptide BPC 157 beneficially influences the healing of colon–colon anastomoses in rats. Cell injury and protection in the gastrointestinal tract. From basic sciences to clinical perspectives 1996. Dodrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1997,249–58.

23. Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on an NSAID toxicity model: diclofenac — induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. Life Sci 2011;88:535–42.

24. Boban–Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, i sur. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N (G) 151 Nitro–L–arginine methyl ester and L–arginine. MED Sci Monit 2006;12:36–45.

25. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. Eur J Pharmacol 2004;499:285–90.

26. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Coric M, Brcic L, i sur. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL14736). J Physiol Pharmacol 2010;61:241–50.

27. Kolenc D, Aralica G, Safic H, Suran J, Rak D, Dzidic S, i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Pharm Des 2012;19:76–83.

28. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, i sur. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. Dig Dis Sci. 1996;41:1604–14.

29. Tkalcević VI, Cuzić S, Brajsa K, Mildner B, Bokulić A, Situm K, i sur. Enhancement by PL14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr–1 expression. Eur J Pharmacol 2007;570:212–21.

30. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, i sur. BPC 157's effect on healing. J Physiol Paris. 1997;91:173–8.

31. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G, Perovic D, Staresinic M, Anic T, i sur. Therapeutic effect of antiulcer agents of new chronic systemic colon lesion in rat. J Physiol Paris. 2001;95:283–8.

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

33. 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.

34. Lambert R. Relative importance of biliary and pancreatic secretions in the genesis of esophagitis in rats. Am J Dig Dis 1962;7:1026–33.

35. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, i sur. The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restraint stress, cysteamine and 96 % ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promotors and gut peptides. Life Sci 1994;54(5):PL63–8.

36. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, i sur. Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. Dig Dis Sci 1996;41:1518–26.

37. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M. Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. Dig Dis Sci. 1997;42:661–71.

38. Sikirić P, Mikus D, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, i sur. Pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, bromocriptine, and atropine effect in cysteamine lesions in totally gastrectromized rats: a model for cytoprotective studies. Dig Dis Sci 1997;42:1029–37.

39. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non–steroidal anti–inflammatory agent–induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. J Physiol Pa- ris 1997;91:113–22.

40. Bódis B, Karádi O, Nagy L, Dohoczky C, Kolega M, Mózsik G. Direct cellular effects of some mediators, hormones and growth factor–like agents on denervated (isolated) rat gastric mucosal cells. J Physiol Paris 1997;91:183–7.

41. Bódis B, Karádi O, N233meth P, Dohoczky C, Kolega M, Mózsik G. Evidence for direct cellular protective effect of PL–10 substances (synthesized parts of body protection compound, BPC) and their specificity to gastric mucosal cells. Life Sci 1997;61:PL 243–8.

42. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, i sur. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)–nitro–L–arginine methylester and L–arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol. 1997;303:32:23–33.

43. Sikirić P, Seiwerth S, Desković S, Grabarević Z, Marović A, Rucman R, i sur. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. Eur J Pharmacol 1999;364:23–31.

44. Sikiric P, Marovic A, Matoz W, Anic T, Buljat G, Mikus D, i sur. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1–methyl–4–phenyl–1, 2, 3, 6–tetrahydrophyridine. J Physiol Paris 1999;93:505–12.

45. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Marovic A, Perovic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. Eur J Pharmacol. 1999;379:19–31.

46. Sikiric P, Separovic J, Buljat G, Anic T, Stancic–Rokotov D, Mikus D, i sur. Gastric mucosal lesions induced by complete dopamine system failure in rats. The effects of dopamine agents, ranitidine, atropine, omeprazole and pentadecapeptide BPC 157. J Physiol Paris. 2000;94:105–15.

47. Bilic I, Zoricic I, Anic T, Separovic J, Stancic–Rokotov D, Mikus D, i sur. Haloperidol–stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC 157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. Life Sci. 2001;68:1905–12.

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

49. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric–Bencic M, 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;95:295–301.

50. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, i sur. Penta-decapeptide BPC 157 cream improves burn–wound healing and attenuates burn–gastric lesions in mice. Burns. 2001;27:817–27.

51. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, i sur. Corti-costeroid–impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC–157 creams in burned mice. Burns. 2003;29:323–34.

52. Ilic S, Brcic I, Mester M, Filipovic M, Sever M, Klicek R, 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;60:107–14.

53. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL–10, PLD–116, PL14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. Inflammopharmacology. 2006;14:214–21.

54. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Drmic, i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. Curr Pharm 2010;16:1224–34.

55. Sikiric P. The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL–10). Inflammopharmacology. 1999;7:1–14.

56. Seveljević–Jaran D, Cuzić S, Dominis–Kramarić M, Glojnarić I, Ivetić V, Radosević S, i sur. Accelerated healing of excisional skin wounds by PL 14736 in alloxan–hyperglycemic rats. Skin Pharmacol Physiol 2006;19:266–74.

57. Sikiric P, Separovic J, Anic T, Buljat G, Mikus D, Seiwerth S, i sur. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H2–blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. J Physiol Paris. 1999;93:479–85.

58. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwerth S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. J Physiol Pharmacol. 2009;60 Suppl 7:191–6.

59. Mozsik G, Sikiric P, Seiwerth S. Pentadecapeptide BPC 157 (PLD116, PL14736, Pliva) infl uences ATP energy system and antagonizes 0.6 M HCl– and 96 % ethanl–gastric lesion in rat. Digestion 2006;73:41.

60. Szabo S, Neumeyer JL. Dopamine agonists and antagonists in duodenal ulcer disease. U: Kaiser C, Kebabian W, ur.Symposium Series. Washington: ACS American Chemical Society Publications 1983;224:175–96.

61. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Balen I, Aralica G, Gjurasin M. Cysteami- ne–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.

62. Bedekovic V, Mise S, Anic T, Staresinic M, Gjurasin M, Kopljar M, i sur. Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine–induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. Eur J Pharmacol 2003;477:73–80.

63. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in esophageal, gastric and duodenal lesions. J Physiol Pharmacol 2009;60:87.

64. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC–15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid–induced colonic damage in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1995;272:417–22.

65. Orsolic N, Seiwerth S, Sikiric P. BPC 157 enhances function of immunological effector cells in mice. J Physiol Pharmacol. 2009;60(Suppl2):69.

66. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. Dig Dis Sci 2009;54-:2070–83.

67. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, i sur. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. J Physiol Paris 1997;91:139–49.

68. Barisic I, Radic B, Klicek R, Sever M, Ilic S, Bilic V, i sur. Prolonged severe hypercalcemia induces an acute pancreatitis in rats, and shortening of QT interval and prolongation of PQ interval. The effect of the therapy with stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL14736). J Physiol Pharmacol 2009;60:8.

69. Sikiric P, Hahm KB, Blagaic AB, Tvrdeic A, Pavlov KH, Petrovic A, 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 Jun 4. doi: 10.5009/gnl18490. [Epub ahead oif print]

70. Mózsik, G. Gastric cytoprotection 30 years after its discovery by André Robert: a personal perspective. Inflammopharmacol 18, 209–21 (2010).

71. Szabo S., Tache Y. Tarnawski A. The ‘Gastric Cytoprotection’ Concept of Andre Robert and the Origins of a New Series of International Symposia.U: Filaretova LP, Takeuchi K, ur.Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection in the Gastrointestinal Tract: Mechanisms, Prevention and Treatment. Front Gastrointest Res. Basel, Karger, 2012;30:1–23.

72. Jackson M. Evaluating the Role of Hans Selye in the Modern History of Stress. U: Cantor D, Ramsden E, ur.Stress, Shock, and Adaptation in the Twentieth Century. Rochester (NY): University of Rochester Press; 2014.

73. Szabo S. Hans Selye and the development of the stress concept. Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis. Ann N Y Acad Sci. 1998;851:19-27.

74. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157–NO–system relation. Curr Pharm Des. 2014-;20:1126–35.

75. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Kolenc D, Vuletic LB, Drmic D, i sur. Brain–gut axis and pentadecapeptide BPC 157: Theoretical and practical implications. Curr Neuropharmacol. 2016;14:857–65.

76. Faber JE, Chilian WM, Deindl E, van Royen N, Simons M. A brief etymology of the collateral circulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:1854–9.

77. Jennifer L. Lucitti, , Jessica K. Mackey, , Jeffrey C. Morrison, , Jody J. Haigh, , Ralf H. Adams and James E. Faber. Formation of the Collateral Circulation Is Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor-A and A Disintegrin and Metalloprotease Family Members 10 and 17. Circulation Research. 2012;111:1539–50.

78. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Drmic D, Stupnisek M, Kokot A, i sur. Stress in gastrointestinal tract and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Finally, do we have a Solution? Curr Pharm Des. 2017;23:4012–28.

79. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M, i sur. BPC 157 and blood vessels. Curr Pharm Des. 2014;20:1121–5.

80. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Pharm Des. 2013;19:76–83.

81. Szabo S, Vincze A, Sandor Z, Jadus M, Gombos Z, Pedram A, i sur. Vascular approach to gastroduodenal ulceration: new studies with endothelins and VEGF. Dig Dis Sci. 1998:43:40–5.

82. Szabo S. Pathogenesis of duodenal ulcer disease. Lab Invest. 1984 Aug;51:121–47.

83. Szabo S. Dopamine disorder in duodenal ulceration. Lancet. 1979;2:880–2.

84. Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models—the history and state of the art of peptic ulcer research. Biol Pharm Bull. 2005:1321–41.

85. Duzel A, Vlainic J, Antunovic M, Malekinusic D, Vrdoljak B, Samara 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;23:8465–88.

86. Vukojević J, Siroglavić M, Kašnik K, Kralj T, Stanćić D, Kokot A, i sur. Rat inferior caval vein (ICV) ligature and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Vascul Pharmacol. 2018;106: 54-66.

87. Szabo S. Mechanism of mucosal protection.U: Hollander D, Tarnawski A, ur**.** Gastric cytoprotection. A clinician's guide. NewYork, London: Plenum Medical Book Company, 1989:49–90.

88. Szabo S, Trier JS. Pathogenesis of acute gastric mucosal injury: Sulfhydrils as a protector, adrenal cortex as a modulator, and vascular endothelium as a target. U: Allen A, Flemstrom G, Garner A, Silen W, Turnberg LA, ur. Mechanism of mucosal protection in the upper gastrointestinal tract. New York: Raven, 1984:387–93.

89. Trier JS, Szabo S, Allan CH. Ethanol–induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin F2 beta and cysteamine. Gastroenterology 1987;92:13–22.

90. Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. Gastroenterology 1985;88:228–36.

91. Turhan A, Konerding MA, Tsuda A, Ravnic DJ, Hanidziar D, Lin M, i sur. Bridging mucosal vessels associated with rhythmically oscillating blood flow in murine colitis. Anat Rec (Hoboken) 2008;291:74–82.

92. Konerding MA, Turhan A, Ravnic DJ, Lin M, Fuchs C, Secomb TW, i sur. Inflammation–induced intussusceptive angiogenesis in murine colitis. Anat Rec (Hoboken) 2010;293:849–57.

93. Ravnic DJ, Konerding MA, Tsuda A, Huss HT, Wolloscheck T, Pratt JP, i sur. Structural adaptations in the murine colon microcirculation associated with hapten–induced inflammation. Gut 2007;56:518–23.

94. Albadawi H, Witting AA, Pershad Y, Wallace A, Fleck AR, Hoang P, i sur. Animal models of venous thrombosis. Cardiovasc Diagn Ther. 2017; Dec;7:197–206.

95. Guzmán–de la Garza FJ, Cámara–Lemarroy CR, Alarcón — Galván G, Corde- ro–Pérez P, Muòoz–Espinosa LE, Fernández–Garza NE. Different patterns of intestinal response to injury after arterial, venous or arteriovenous occlusion in rats. World J Gastroenterol. 2009;15 (31):3901-07.

96. Amic F, Drmic D, Bilic Z, Krezic I, Zizek H, Peklic M, Klicek R, Pajtak A, Amic E, Vidovic T, Rakic M, Milkovic Perisa M, Horvat Pavlov K, Kokot A, Tvrdeic A, Boban Blagaic A, Zovak M, Seiwerth S, Sikiric P. 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.

97. Meilahn JM, Morris JB, Ceppa EP, Bulkley GB. Effect of prolonged selective intramesenteric arterial vasodilator therapy on intestinal viability after acute segmental mesenteric vascular occlusion. Annals of Surgery. 2001;234:107–15.

98. de Brouwer, G., Fick, A., Harvey, B.H. et al. A critical inquiry into marble-burying as a preclinical screening paradigm of relevance for anxiety and obsessive–compulsive disorder: Mapping the way forward. Cogn Affect Behav Neurosci. 2019;19: 1–39.

99. Lojo N, Rasic Z, Zenko Sever A, Kolenc D, Vukusic D, i sur. Effects of diclofenac, L–NAME, L–arginine, and pentadecapeptide BPC 157 on gastrointestinal, liver, and brain lesions, failed anastomosis, and intestinal adaptation deterioration in 24 hour–short–bowel rats. PLoS One. 2016 Sep 14;11(9):e0162590. doi: 10.1371/journal.pone.0162590.

100. Klicek R, Kolenc D, Suran J, Drmic D, Brcic L, Aralica G, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine–colitis and colon–colon–anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. J Physiol Pharmacol. 2013;64:597–612.

101. Mise S, Tonkic A, Pesutic V, Tonkic M, Mise S, Capkun V, i sur. The presentation and organization of adaptive cytoprotection in the rat stomach, duodenum, and colon. Dedicated to André Robert the founder of the concept of cytoprotection and adaptive cytoprotection. Medical science monitor. 2006;12(4): 146-53.

102. Belosic Halle Z, Vlainic J, Drmic D, Strinic D, Luetic K, Sucic M, 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.

103. Luetic K, Sucic M, Vlainic J, Halle ZB, Strinic D, Vidovic T, i sur. Cyclophosphamide induced stomach and duodenal lesions as a NO–system disturbance in rats: L–NAME, L–arginine, stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Inflammopharmacology. 2017;25:255–64.

104. H. J. Motulsky. Prism 5 Statistics Guide. 2007, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, www.graphpad.com.

105. Thompson JE, Vane,JR. The effect of venous occlusion on arterial blood flow in the extremities. An experimental study. Surgery. 1952; 31(1), 55 – 61.

106. Barisic I, Balenovic D, Klicek R, Radic B, Nikitovic B, Drmic D, i sur. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO–system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. Regul Pept. 2013;181:50–66.

107. Lovric–Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwerth S, Rogic D, Kusec V, i sur. Doxorubicine–congestive heart failure–increased big endothelin–1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci. 2004;95:19–26.

108. Medvidovic–Grubisic M, Stambolija V, Kolenc D, Katancic J, Murselovic T, Plestina–Borjan I, i sur. Hypermagnesemia disturbances in rats, NO–related: pentadecapeptide BPC 157 abrogates, L–NAME and L–arginine worsen. Inflammop- harmacology. 2017:439–49.

109. Berra–Romani R, Avelino–Cruz JE, Raqeeb A, Della Corte A, Cinelli M, Montagnani S, i sur. Ca2+–dependent nitric oxide release in the injured endothelium of excised rat aorta: a promising mechanism applying in vascular prosthetic devices in aging patients. BMC Surg. 2013;13:S40.

110. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Antioxidant therapy. Crit Care Med. 1993;21:92–102.

111. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical–mediated tissue injury. Br Med Bull. 1993;49:700–18.

112. Matthys KE, Bult H. Nitric oxide function in atherosclerosis. Mediators Inflamm. 1997;6:3–21.

113. Yousefipour Z, Ranganna K, Newaz MA, Milton SG. Mechanism of acrolein–induced vascular toxicity. J Physiol Pharmacol. 2005;56:337–53.

114. Hsieh MJ, Liu HT, Wang CN, Huang HY, Lin Y, Ko YS, i sur. Therapeutic potential of pro–angiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and up–regulation. J Mol Med (Berl) 2017;95:323–33.

115. Huang T, Zhang K, Sun L, Xue X, Zhang C, Shu Z, i sur. Body protective compound–157 enhances alkali–burn wound healing in vivo and promotes proliferation, migration, and angiogenesis in vitro. DrugDes Devel Ther 2015;9:2485–99.

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

117. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Pang JH. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. J Appl Physiol (1985) 2011;110(3):774–80.

118. Robert A. Cytoprotection by prostaglandins. Gastroenterology 1979; 77:761–67.

11.0. KRATKA BIOGRAFIJA AUTORA

Fedor Amić rođen je 16.12.1985. u Novoj Gradišci. Diplomirao je 2010. godine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Od 2010. do 2011. je obavljao pripravnički staž u KB Dubrava te je 2011. položio državni ispit za doktora medicine. Od 2012.–2014. radio je kao liječnik u Zavodu za hitnu medicinsku pomoć grada Zagreba te je od svibnja 2014. godine na specijalizaciji iz abdominalne kirurgije na Klinici za kirurgiju KBC „Sestre Milosrdnice" Zagreb, a od travnja 2015. na specijalizaciji iz abdominalne kirurgije na Klinici za kirurgiju KB Dubrava. Bio je na edukaciji u Južnoj Koreji u svibnju i lipnju 2018. u sklopu programa „2018 1st Medical Korea Academy". Specijalistički ispit položio je u listopadu 2019.

Aktivno je sudjelovao na mnogim domaćim i stranim kongresima te ima desetak kongresnih sažetaka. Objavio je kao koautor 6 znanstvenih radova te 1 znanstveni rad kao prvi autor (dio rezultata disertacije). Osim znanstvenog rada, rekreativno se bavi boksom te svira harmoniku i klavir.