Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje ozljeda sakrokokcigealne kralježnične moždine u štakora

Perović, Darko

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:105:855055

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

Darko Perović

Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje ozljeda sakrokokcigealne kralježnične moždine u štakora

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Darko Perović

Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje ozljeda sakrokokcigealne kralježnične moždine u štakora

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Zavodu za mikrobiologiju Škole "Andrija Štampar" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelji rada: prof. dr. sc. Gojko Buljat i prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Čast i zadovoljstvo mi je zahvaliti:

Mojim dragim mentorima i prijateljima, prof. dr. sc. Gojku Buljatu, dr. med. i prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, dr med., na stručnom vodstvu, znanju, potpori i strpljenju tijekom realizacije rada,
prof. dr. sc. Svenu Seiwerthu, dr. med. i dr. sc. Danijeli Kolenc, dr. med. na stručnom doprinosu i savjetima u patohistološkom dijelu,
gospođi Đurđici na utrošenom vremenu i trudu kod izrade histoloških preparata,
a najviše suprugi Zrinki i djeci Magdaleni, Juditi i Margareti na strpljivosti u mnogim danima kada zbog izrade rada nisam bio ni predan muž niti otac. Zahvaljem i pokojnom ocu Vjenceslavu Mihetecu koji mi je pokazao pravi put života. Toliko je isčekivao dovršetak ove disertacije, a dočekao ga je na nebu.

Sadržaj

Sadržaj I

Popis oznaka i kratica IV

1. Uvod i svrha rada 1

1.1. Definicija problema 1

1.2. Svrha rada 3

1.3. Pregled dosadašnjih spoznaja 4

1.3.1. Anatomija kralježnične moždine 4

1.3.2. Epidemiologija ozljede kralježnične moždine 10

1.3.3. Mehanizam nastanka ozljede 11

1.3.4. Neurološke posljedice ozljede kralježnične moždine 13

1.3.5. Razina i stupanj ozljede kralježnične moždine 16

1.3.6. Prognoza neurološkog oporavka 17

1.3.7. Liječenje ozljeda kralježnične moždine 17

1.3.8. Komplikacije ozljede kralježnične moždine 19

1.3.9. Socijalni aspekt ozljeda kralježnične moždine 20

1.4. Patofiziologija ozljede kralježnične moždine 21

1.5. Liječenje sekundarne ozljede kralježnične moždine 24

1.5.1. Neuroprotektivno liječenje 25

1.5.2. Reparatura i regeneracija kralježnične moždine 29

1.6. Model ozljede kralježnične moždine 31

1.6.1. Ozljeda sakrokokcigealne kralježnične moždine štakora 32
1.6.2. Anatomija i funkcija kaudalne kralježnične moždine štakora 33
1.6.3. Anatomija i funkcija repa štakora 34
1.7. Pentadekapeptid BPC 157 36
2. Hipoteza 39
3. Ciljevi rada 40
3.1. Opći cilj 40
3.2. Specifični ciljevi 40
4. Materijali i metode 41
4.1. Životinje 41
4.2. Lijekovi 41
4.3. Metode 42
4.3.1. Kirurški postupak ozljede kralježnične moždine 42
4.3.2. Ispitivanje motorike repa 44
4.3.3. Elektromiografija 44
4.3.4. Patohistološka analiza 45
4.4. Statističke metode 47
5. Rezultati 48
5.1. Rezultati ispitivanja motorike repa 48
5.2. Rezultati elektromiografije 52
5.3. Rezultati histopatologije 56
5.3.1. Rezultati histopatologije kralježnične moždine 56
5.3.2. Rezultati histopatologije kaudalnog živca repa 58
6. Rasprava 61

7. Zaključak 67
8. Sažetak 68
9. Abstract 69
10. Popis citirane literature 70
11. Kratka biografija 80

Popis oznaka i kratica

engl.	– engleski
pogl.	– poglavlje
t.t.	– tjelesna težina
i.p.	– intraperitonealno
s.c.	– subkutano
cAMP	– ciklički adenozin monofosfat
4-HNE	– 4-hidroksinonenal
BDNF	– engl. brain derived neurotophic factor
CCD	– engl. charge-coupled device
DMN	– donji motorni neuron
GMN	– gornji motorni neuron
hESC	– engl. human Embryonic stem cell
IAP	– inhibitori apoptotskih proteina
IL	– interleukin
iPSC	– engl. induced Progenitor stem cell
KM	– kralježnična moždina
MAP	– motorni akcijski potencijal
MDA	– malonildialdehid
MP	– metilprednisolon
MSC	– engl. Mesenchymal stem cell
NaCl	– natrij klorid
NASCIS	– engl. Nacional Acute Spinal Cord Injury Study
NO	– dušikov-monoksid
NSPC	– engl. Neural stem/progenitor cell
L-NAME	– dušik-L-arginin-metilester
LP	– lipidna peroksidacija
LT	– leukotrieni
LTB_4	– leukotrien B 4

OEC – engl. Olfactory ensheathing cell

$PRF_{2\alpha}$ – prostangladin F 2 alfa

TXB_2 – tromboksan B 2

TNF-α – tumorski faktor nekroze alfa

TXA_2 – tromboksan A 2

SC – Schwanove stanice

SCNT – engl. Somatic cell nuclear transfer

1. Uvod i svrha rada

1.1. Definicija problema

Danas je opće poznato da je ozljeda kralježnične moždine (KM) složeno stanje koje je teško liječiti, a ozlijeđenike teško rehabilitirati. Posljedice navedene ozljede za bolesnika, obitelj, te užu i širu zajednicu mogu imati katastrofalan ishod s medicinske, ali i ekonomske, društvene, psihološke i emocionalne strane (1). Do primarne ozljede kralježnične moždine dolazi kad neposredna fizička sila uzrokuje nagnječenje, zgnječenje, razdor ili rezanje tkiva kralježnične moždine. Primarna fizička sila može oštetiti i hranidbene krvne žile KM što dovodi do ishemije. Kao posljedica primarne ozljede nastupa niz međusobno potaknutih procesa: smanjeni protok krvi i hipoksija, povećana propusnost krvnih žila i edem, pretjerano otpuštanje neurotransmitera iz oštećenih stanica, poremećaj stanične homeostaze sa stvaranjem slobodnih radikala i lipidnom peroksidacijom, zatim inflamatorni odgovor s nakupljanjem makrofaga i nekrozom aksona i neurona te konačno apoptoza neurona sa stvaranjem cisti i glijalnog ožiljka. Zajedno se nazivaju sekundarna ozljeda (2,3).

Proces sekundarne ozljede može primarnu manju i/ili djelomičnu ozljedu KM pretvoriti u veću i/ili potpunu sa većim oštećenjem neuroloških funkcija i ta je spoznaja potaknula mnoge istraživače u traženju prikladnih načina liječenja. Početni simptomatski postupci su adekvatna imobilizacija, održavanje dostatne oksigenacije i krvnog optoka. Operacijsko liječenje je preporučeno kod bolesnika s radiološki potvrđenom kompresijom moždine i/ili nestabilnošću kralježničnog stupa. U farmakološkom liječenju sekundarne ozljede KM najraširenija je primjena visokih doza glukokortikoida - metilprednisolona (MP) s dokazanim učinkom u randomiziranim multicentričnim kliničkim studijama (4,5). Međutim, korisnost primjene visokih doza MP danas postaje upitna zbog: slabog funkcionalnog učinka

u svakodnevnoj kliničkoj praksi, isključenja placebo grupe u studiji i velikog broja komplikacija (pneumonija, gastrointestinalno krvarenje, infekcije rane, plućna embolija, tromboflebitis, hiperglikemija, kortikosteroidna miopatija) (6,7). Primjena tirilazada smanjuje navedene nuspojave glukokortikoida, ali do sada nije odobren za liječenju ozljede KM. Isto tako klinički dokazana efikasna primjena monosijalogangliozida GM-1 u kombinaciji s metilprednisolonom nije ušla u kliničku primjenu. Primjena naloksona daje slabiji učinak, te ni on nije odobren za liječenje ozljeda KM (7,8).

Pentadekapeptid BPC 157 je stabilni polipeptid sa lancem od 15 aminokiselina molekularne težine 1419 i aktivna je komponenta proteina BPC. Citoprotektivni učinak ovog peptida incijalno je dokazan u istraživanjima na lezijama GI sustava, kože u termičkim i incizijskim ranama, zatim vezivnog tkiva, kosti i tetive te mišićnog cijeljenja (9). Zaštitini učinak pentadekapeptida BPC 157 na živčano tkivo dokazan je u kontuziji mozga miša smanjenjem posttraumatske hemoragije u zoni, smanjenjem edema mozga i smanjenjem intraventrikularne hemoragije, a u radu s ozljedom ishiadičnog živca štakora u tretiranih životinja dokazana je bolja remijelinizacija i veći broj velikih živčanih vlakana, smanjen intrafascikularni edem i povećana neovaskularizacija (10,11). Navedeni učinak protekcije objašnjava se djelovanjem pentadekapeptida BPC 157 na produkciju dušik-monoksida (NO) koji utječe na autoregulaciju mikrocirkulacije, na očuvanje endotela malih krvnih žila, smanjenje razine leukotriena B 4 (LTB_4), tromboksana B 2 (TXB_2) i metaloproteinaze (MPO) u serumu i inflamiranom tkivu, te smanjenje inflamatornih stanica na mjestu lezije (12,13). Sukladno navedenim činjenicama o peptidu BPC 157 u ovom radu je istraživan učinak pentadekapeptida BPC 157 na ozljedu sakrokokcigealne KM u štakora. Praćeno je neurološko oštećenje funkcije repa, histopatološke promijene u kralježničnoj moždini na mjestu ozljede i elektrofiziološke i histopatološke promijene u živcima repa. Također se nastojao utvrditi terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 u odnosu na primjenjenu dozu.

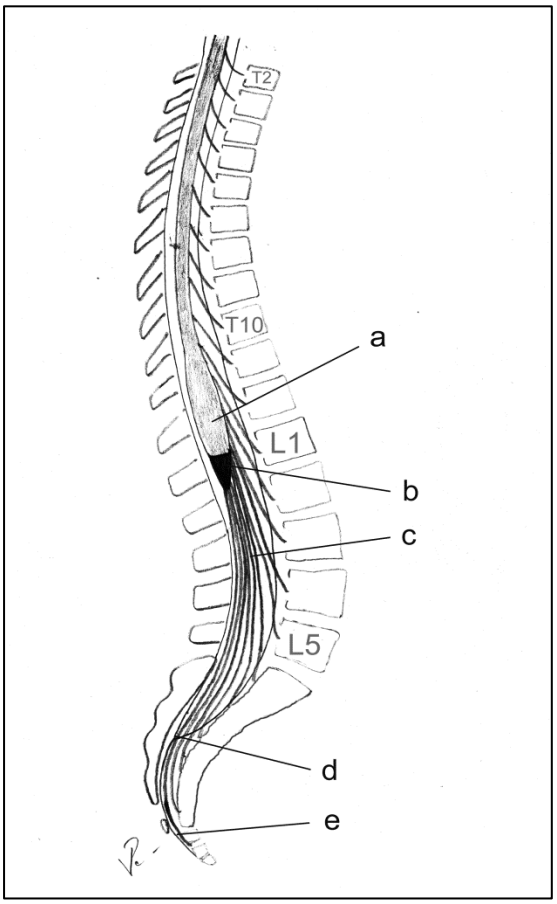
1.2. Svrha rada

Ozljeda kralježnične moždine ima velik medicinski, društveni, emocionalni, psihološki i ekonomski značaj. Do sada je u različitim modelima pokazano da BPC 157, kao lijek bez toksičnih pojava, djeluje protektivno na ozljede središnjeg i perifernog živčanog sustava. Svrha ovog istraživanja je otkriti mogućnost djelovanja BPC 157 na ozljedu sakrokokcigealne moždine štakora što predstavlja značajan znanstveni doprinos i napredak potenciran činjenicom što dosada nije pronađena efikasna terapija sekundarne ozljede kralježnične moždine. Smatramo da će rezultati ovog istraživanja dati nova saznanja u farmakoterapiji ozljede KM te time smanjiti invaliditet i poboljšati kvalitetu života pacijenata s tom ozljedom.

1.3. Pregled dosadašnjih spoznaja

1.3.1. Anatomija kralježnične moždine

Kralježnična moždina je najkaudalniji dio središnjeg živčanog sustava koji je zaštićen u kralježničnom kanalu. Nastavak je produžene moždine moždanog debla i započinje u razini velikog zatiljnog otvora baze lubanje, a završava u razini prvog (L1) do drugog (L2) slabinskog kralješka. U prva tri mjeseca intrauterinog razvoja kralježnična moždina završava u razini zadnjeg kokcigealnog segmenta, ali u daljem intrauterinom razvoju ne prati rast koštanog sustava te tri tjedna nakon poroda dolazi u opisani položaj kod odrasle osobe. Zbog toga se kaudalno od L2 kralješka u kralježničnom kanalu nalaze samo korjenovi moždinskih živaca (ukupno 32 korijena) koji čine konjski rep (cauda equina) (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz položaja kralježnične moždine i moždinskih živaca u kralježničnom kanalu. Oznake kombinacijom slova i broja odnose se na kralježke, a slova sa crtama navedene strukture:

a - lumbalna intumescencija – lumbalno zadebljanje KM;

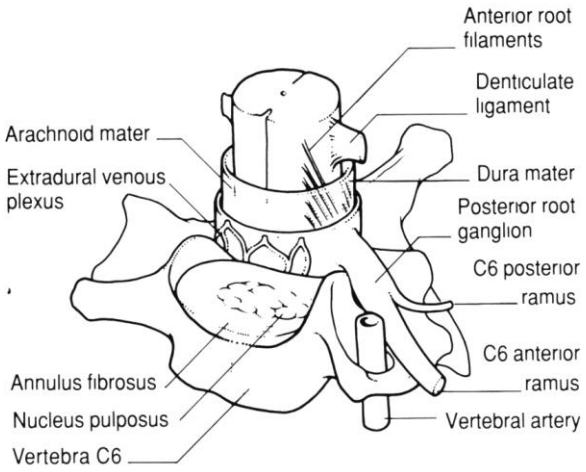
b – conus medularis – završni dio KM;

c – cauda equine – konjski rep;

d – završetak duralne vreće – u prosjeku u razini S3 kralješka

e – filum terminale externum – završni končić KM

Kralježničnu moždinu od kralježničnog kanala odvajaju tri ovojnice: meka, paučinasta i tvrda moždana ovojnica. Tvrda možda ovojnica (dura mater) čini glavnu barijeru prema kralježničnom kanalu i pruža se duž njega do razine trećeg (S3) križnog kralješka. S unutarnje strana tvrde ovojnice srasla je paučinsta ovojnica (arachnoidea). Meka ovojnica je čvrsto pripojena uz KM, a tankim ligamentima povezana je s tvrdom ovojnicom. U prostoru između tvrde i meke ovojnice protiče moždana tekućina - likvor te stoga KM i moždinski živci plivaju u ovom prostoru. Kralježnični kanal čini s prednje strane stražnji zid tijela kralješka (corpus vertebrae) ili stražnji dio međukralježničnog diska (discus intervertebralis), bočno korjenovi kralježničnih lukova (pediculi arcus vertebrae), a straga pločice lukova kralježaka (laminae arcus vertebrae), a dodatnu svezu čini sprijeda stražnji uzdužni ligament (ligamentum longitudinale posterius) i straga žuti ligamenti (ligamenta flava). Prostor između dva korijena kralješka nazivamo međukralježnični otvor (foramen intervertebrale). Prostor između zidova kralježničnog kanala i vanjske strane tvrde moždane ovojnice (durae mater) naziva se epiduralni prostor, a ispunjava ga vezivo, masno tkivo i venski pleksusi (14) (slika 2).

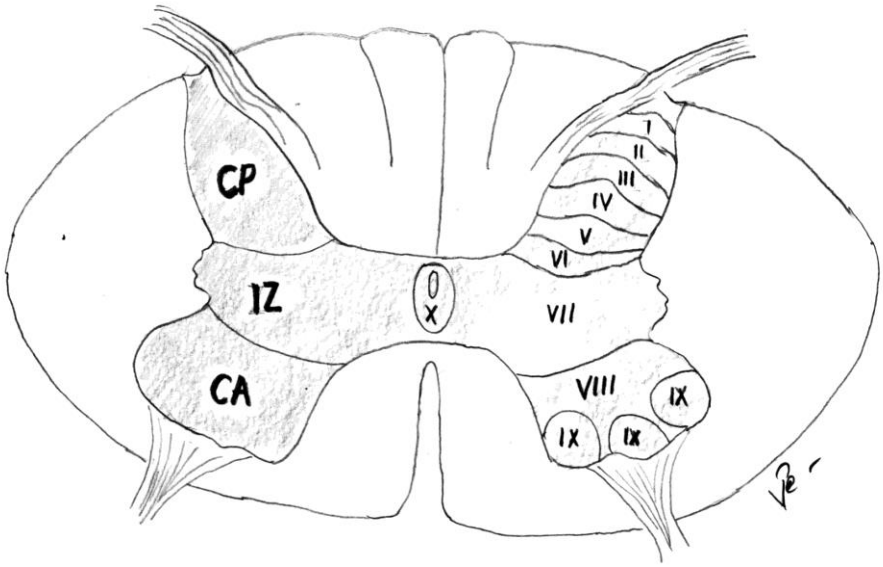


Slika 2. Shematski prikaz kralješka i moždine (preuzeto iz Fitzgerald MJT, Neuroanatomy Basic and clinical. 2. izd. London: Bailliere Tindall; 1992)

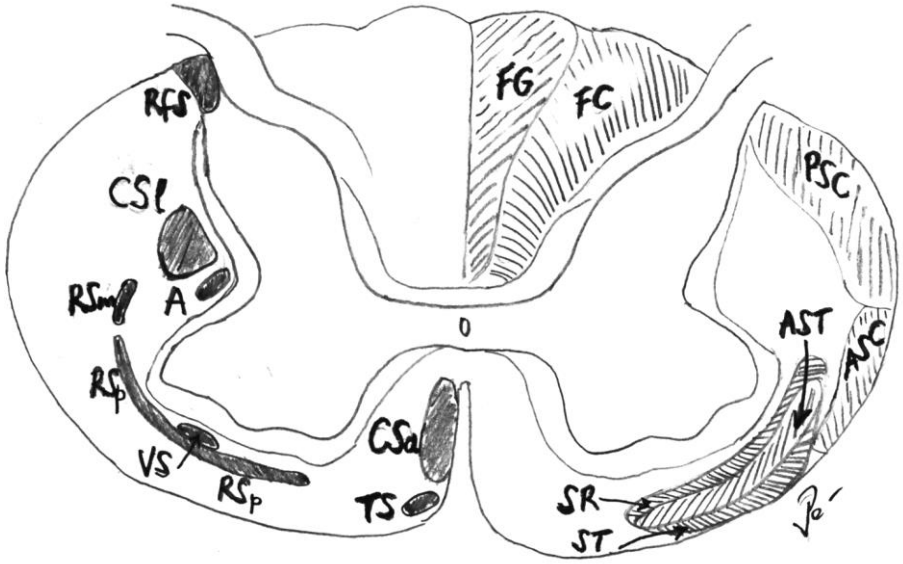
Funkcionalno je KM podijeljena u segmente. Segment je dio KM iz kojeg izlazi par moždanih živaca, pa tako razlikujemo 8 vratnih, 12 prsnih, 5 slabinskih, 5 križnih i 1 trtični segment (ukupno 31 segment). Moždinski živac čini prednji i stražnji korijen koji izlaze na istoimenim dijelu kralježnične moždine, a neposredno prije njihovog spajanja stražnji korijen prolazi kroz stražnji ganglij. Svaki moždani živac je vrlo kratak i po izlasku iz kralježničnog kanala kroz pripadajući međukralježnični otvor odmah se dijeli u četiri grane: spojne grane (rami communicantes), meningealna grana (ramus meningeus), prednja grana (ramus ventralis) i stražnja grana (ramus dorsalis).

Na transverzalnom presjeku KM možemo podijeliti na sivu i bijelu tvar. Siva tvar je smještena u sredini transverzalnog presjeka, ima oblik leptira i najvećim dijelom je čine živčane stanice, međuživčano tkivo i oskudne krvne žile. Morfološki siva tvar tvori prednji i stražnji rog (cornu anterior et et posterior) i srednji dio, te bočni rog (cornu lateralis). Citoarhitektonski siva tvar ima puno složeniju strukturu i dijeli se na deset Rexed-ovih lamina. Lamina I-VI pripada stražnjem rogu i tvori mjesto neuronskih veza za aferentne puteve. VII i VIII lamina pripadaju srednjoj zoni, bočnom i prednjeg rogu i tvori mjesto neuronske veze eferentnih puteva. IX lamina su skupine motoneurona smještene unutar VII i VIII lamine, a X lamina je područje oko središnjeg kanala (canalis centralis). Od T1 do L3 moždinskog segmenta u području VII lamine nalaze se visceralni eferetni neuroni koji čine preganglijske simpatičke neurone (slika 3). Zbog različite morfologije sive tvari na KM razlikujemo vratno zadebljanje (intumescentia cervicalis), lumbalno zadebljanje (intumescentia lumbalis) i završni dio moždine (conus medularis).

Bijela tvar okružuje sivu tvar i morfološki čini prednji, bočni i stražnji snop (funiculus anterior et lateralis et posterior). Ultrastrukturno moždinski putevi su podijeljeni prema funkciji aksonskih skupina u više skupina koje nabrajamo od prednjeg prema stražnjem dijelu moždine: prednji kortikospinalni put, tektospinalni put, retikulospinalni put, vestibulospinalni put, spinotalamički put, prednji i stražnji spinocereberalni put, rubrospinalni put, te gracilni i cunealni snop (slika 4).

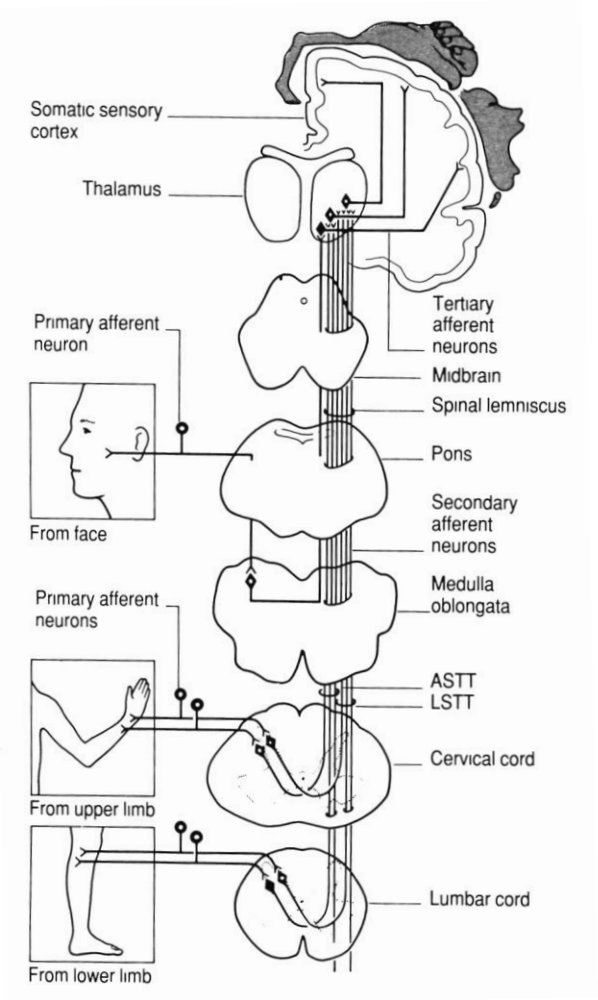


Slika 3. Citoarhitektonski prikaz sive tvari ljudske kralježnične moždine
Na slici lijevo: CP – cornu posterior; IZ – intermedijarna zona; CA – cornu anterior; Na slici desno: Rexed-ove lamine, I – X (opis u tekstu)

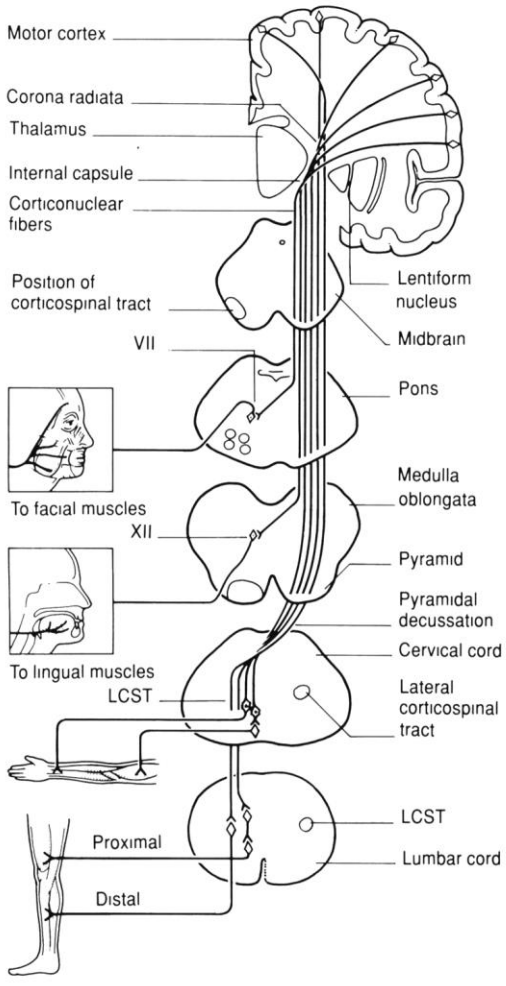


Slika 4. Citoarhitektonski prikaz bijele tvari ljudske kralježnične moždine
Na slici lijevo: eferentni putevi; CSl – kortikospinalni lateralni; CSa – kortikospinalni anteriorni; RSm – retikulospinalni medularni; RSp – retikulospinalni pontini; VS – vestibulospinalni; TS – tektospinalni; RfS – raphespinalni; A – autonomni
Na slici desno: aferentni putevi: FG – fascikulus gracilis; FC – fascikulus cuneatus; PSC – posteriorni spinocerebelarni; ASC – anteriorni spinocerebelarni; AST – anteriorni spinotalamički; SR – spinoretikularni; ST - spinotektalni

Mikroskopski funkcionalna organizacija svakog kralježničnog segmenta je izuzetno složena, ali možemo prepoznati dva ključna sustava: ulazni (aferentni) i izlazni (eferentni). Aferentni sustav čini unipolarni 1. neuron aferentnog puta koji se nalazi u stražnjem gangliju. Njegov periferni dio polazi iz slobodnih živčanih završetaka, kožnih receptora, visceralnih receptora, mišićnih vretena i Golgijevih tetivnih organa i putem moždinskog živca dolazi do njegovog ganglija, a centralni dio kroz stražnji korijen ulazi u stražnji dio kralježnične moždine. Vlakna većeg promjera, koja dijelimo na Ia (A-alfa), Ib (A-alfa) i II (A-beta, A-gama), ulaze medijalno od stražnjeg roga u stražnji snop (gracilis ili cuneatus) i putuju kranijalno do istoimenih jezgara u produženoj moždini gdje se spajaju na 2. neuron aferentnog puta, te odatle polaze prema talamusu. Ova vlakna tvore moždinski put fasciculus dorsalis – lemniscus medialis i prenose osjet svjesne propriocepcije i osjet diskriminacije dodira. Jedan dio debljih centralnih vlakana, čiji periferni dio dolazi iz mišićnog vretena i Golgijevih tetivnih organa, na mjestu ulaska u kralježničnu moždinu ulazi u sivu tvar i tvori sinapsu s interneuronima u II, III i IV Rexed-ovoj lamini, čiji aksoni tvore sinapse s motoneuronima istog segmenta (aferentni dio nesvjesnih mišićnih refleksa). Vlakna manjeg promjera, koja označavamo III (A –delta) i IV (C vlakna), ulaze lateralno od stražnjeg roga i tvore posterolateralni Lissauer snop čiji aksoni imaju sinapse s interneuronima uglavnom u I (marginalna zona) i II (substancija gelatinoza) Rexed-ovoj lamini. Ovdje se nalazi 2. neuron čiji akson prelazi na suprotnu stranu kralježnične moždine i lateralnim spinotalamičkim putem dolazi u talamus. Na ovom 2. neuronu događa se fenomen presinaptičke inhibicije (neuromodulacija) somatske boli, temperature i visceralne boli, poznat pod nazivom „gate control“ (slika 5).



Slika 5. Aferentni spinotalamički put (preuzeto iz Fitzgerald MJT, Neuroanatomy Basic and clinical. 2. izd. London: Bailliere Tindall; 1992)



Slika 6. Eferentni kortikospinalni put (preuzeto iz Fitzgerald MJT, Neuroanatomy Basic and clinical. 2. izd. London: Bailliere Tindall; 1992)

Svjesni eferetni sustav započinje gornjim motornim neuronom (GMN - 1. neuron kortikospinalnog puta) koji je smješten Brodmanovom korteksu velikog mozga, a njegov akson prolazi kroz moždano deblo, na nivou produžene moždine prelazi na suprotnu stranu (decussatio pyramidalis) i konačno stiže u kralježničnu moždinu gdje tvori bočni i prednji kortikospinalni put. Akson gornjeg motornog neurona, na somatotopski odgovarajućem segmentu KM, izlazi iz kortikospinalnog puta i ulazi u prednji rog te tvori sinapsu s motoneuronom u IX Rexed-ovoj lamini. Njega nazivamo donji motorni neuron (DMN - 2. neuron kortikospinalnog puta) i iz njega polazi akson veće debljine koja izlazi na prednjem dijelu kralježnične moždine i putem prednjeg korijena ulaze u moždinski živac te perifernim živcem dolazi do motorne ploče. Dodatnu kompleksnost motoričkog puta daje činjenica da sinapsu s istim motoneuronom prednjeg roga tvore inhibitorni aksoni koji su u sinapsi s aferetnim putevima iz mišićnih vretena i Golgijevih tetivnih organa istog mišića. U kontroli stajanja i pokreta osim svjesnog eferetnog sustava sudjeluju i nesvjesni eferentni putevi. Ovdje samo spominjemo retikulospinalni, vestibulospinalni, tektospinalni i rubrospinalni put koji imaju tu ulogu (15) (slika 6).

Krvna opskrba kralježnične moždine počinje na bazi mozga gdje vertebralne arterije formiraju prednju i stražnju spinalnu arteriju, a iste dobivaju pritoke iz više radikulospinalnih vratnih arterija i interkostalnih arterija. U donjem prsnom i gornjem lumbalnom dijelu s lijeve strane nalazi se veća radikulospinalna arterija Adamkiewicz koja je ključna za krvnu opskrbu conus medularisa.

1.3.2. Epidemiologija ozljede kralježnične moždine

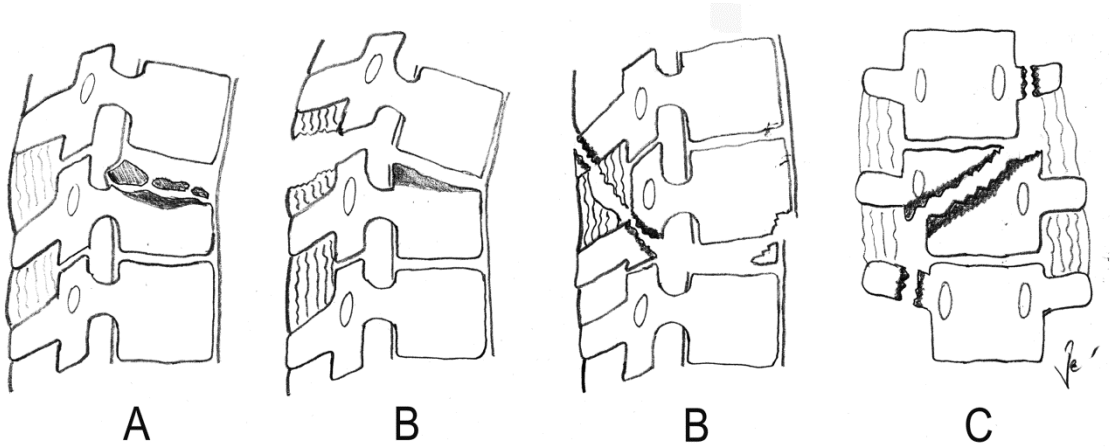
Ozljeda kralježnične moždine događa se godišnje u 11-53 osoba na milion stanovnika. Većina bolesnika je u dobi 16 do 30 godina, a 80% ozlđenika je muškog spola. Nema točnih podataka o prevalenciji ozljeda KM u Hrvatskoj, ali se pretpostavlja da oko 3 500 bolesnika s ozljedom KM danas živi u Hrvatskoj. Iako je ozljeda KM niske incidencije ozbiljnost ovog stanja potvrđuje visoka smrtnost na

mjestu ozljede (čak 48-79%) kao i nakon dolaska u bolnicu (4-16%). Preživjeli ozlijeđenici često boluju od komplikacija ozljede KM i imaju kraći životni vijek zbog češće pnemonije, sepse, plućne embolije, neishemijske i ishemijske bolesti srca i suicida. Zato ovi bolesnici zahtijevaju stalnu evaluaciju stanja i održavajuće liječenje do kraja njihovog životnog vijeka. Najugroženiji su ozlijeđenici s ozljedom KM iznad C4 kralješka koji mogu postati doživotno ovisni o respiratoru (1).

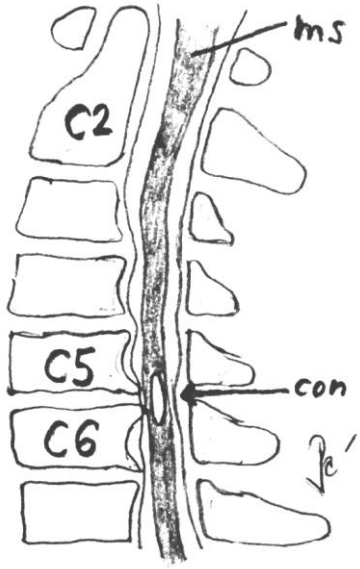
1.3.3. Mehanizam nastanka ozljede

Najčešći uzrok ozljede KM su prometne ozljede (45%), pad s visine (15%) i skok u plitku vodu, zatim slijede ozljede u sportu, ozljede na poslu i nasilje (10-25% u svakoj grupi), a može nastati i nehotice tijekom kirurškog zahvata.

Tijekom navedenih vanjskih događaja neposredna fizička sila ozlijeđuje kralješke, ligamente ili diskove kralježnice što rezultira prijelomom ili iščašenjem kralježničnog stupa. Samo kod 10-15% ovih ozljeda nastupa i ozljeda KM, a najčešći neposredni uzrok su prijelomi s dislokacijama (40%) i „burst“ prijelomi (30%), dok manji prijelomi bez dislokacije rijeđe uzrokuju njenu ozljedu (10%) (slika 7). U 15% ozljeda KM neposredni uzrok nije prijelom ni iščašenje nego uganuće kralježničnog stupa koje KM ozlijeđuje istezanjem i nagnječenjem u normalnom ili suženom spinalnom kanalu (slika 8). Kod ozljeda kralježnice s pratećom ozljedom KM postoje i pridružene ozljede drugih vitalnih dijelova tijela. Tako je u 25-50% ovih ozlijeđenika prisutna ozljeda glave, a u 20% ozljede toraksa i abdomena (2).



Slika 7. Shematski prikaz tri grupe prijeloma kralježnice: A – manji prijelom bez dislokacije; B – lijevo prednja dislokacija s manjim prijelomom, desno stražnja dislokacija bez prijeloma; C – veći prijelom s rotacijskom dislokacijom



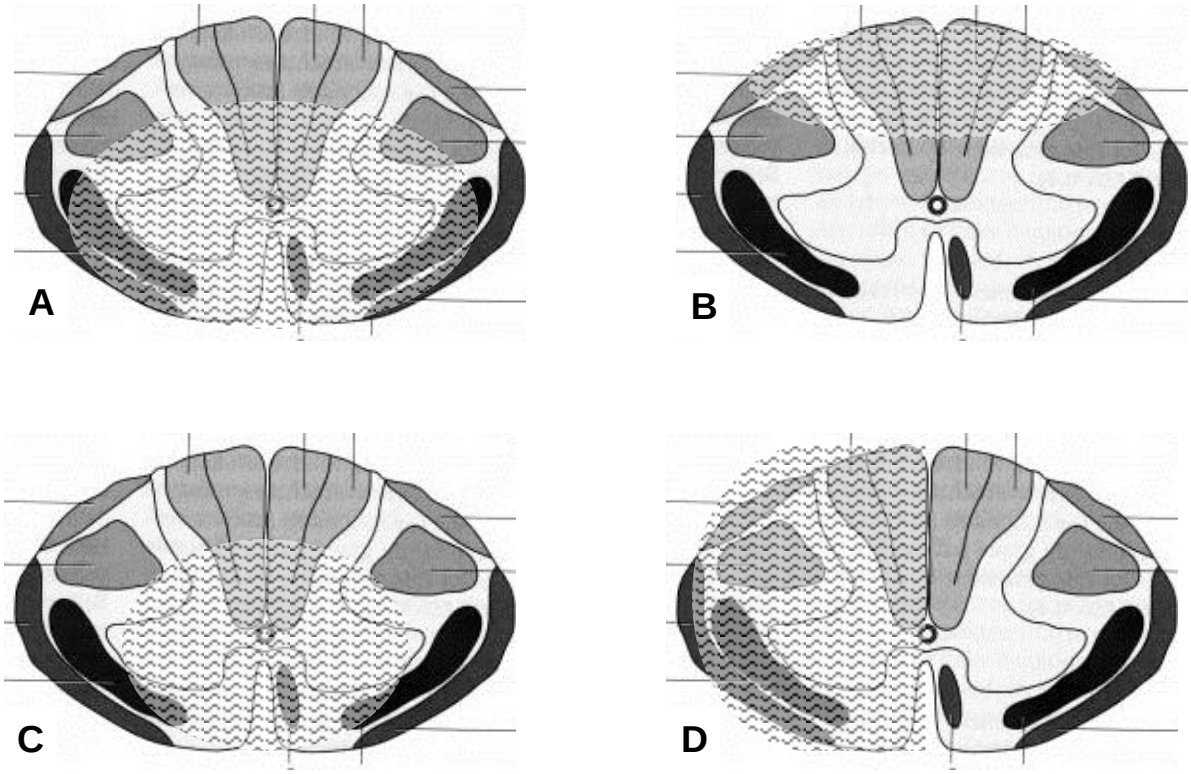
Slika 8. Shematski prikaz vratne kralježnice sa spinalnom stenozom i nagnječenjem kralježnične moždine između 5. i 6. vratnog kralješka. C5, C6 – peti i šesti vratni kralježak; ms – kralježnična moždina; con – mjesto nagnječenja.

1.3.4. Neurološke posljedice ozljede kralježnične moždine

Direktna posljedica ozljede KM je neurološki poremećaj funkcije moždinskih segmenata na mjestu ozljede, ali i svih segmenata ispod mjesta ozljede. Neurološki poremećaj je klinički vidljiv poremećajem pokreta, poremećajem osjeta, poremećajem kontrole uretralnog i analnog sfinktera i poremećajem autonomnih funkcija živčanog sustava.

Najčešći nivo ozljede je vratna regija (55% ozljeđenika), a nivo prsne, prsnoslabinske i slabinskokrižne regije je zastupljen s 15% u svakoj nabrojanoj regiji, a neurološki nalaz je direktno ovisan o nivou ozljede (2). Na mjestu ozljede nastupa gubitak funkcije segmentnih neurona po principu ozljede DMN, a to znači da mišići inervirani iz tog segmenta postaju hipotonični (flakcidni). Nasuprot tome mišići inervirani segmentima ispod mjesta ozljede postaju hipertonični (spastični) po principu ozljede GMN. Zato ozljede KM u vratnom dijelu izazovu hipotoničnost mišića gornjih ekstremiteta u segmentu ozljede, a hipertoničnost mišića prsnog koša i abdomena, te donjih ekstremiteta (spastična tetraplegija). Ozljede u prsnom dijelu KM izazivaju hipertoničnost mišića abdomena i mišića donjih ekstremiteta (spastična paraplegija). Ozljede KM u prsnoslabinskom dijelu izazivaju hipotoničnost mišića donjih ekstremiteta (flakcidna paraplegija), a slabinskokrižne ozljede hipotoničnost mišića mjehura (neurogeni mjehur).

Drugi čimbenik koji utječe na neurološki nalaz je jačina ozljede koja može biti poptuna (kompletna) ili djelomična (inkompletna). Potpunu ozljedu KM (complete cord syndrome) ima 45% ozljeđenika, a ostali ozljeđenici imaju djelomično neurološko oštećenje (2). Različita zastupljenost motornog i osjetnog oštećenja kod djelomičnih ozljeda opisana je u sljedećim neurološkim sindromima: prednja ozljeda KM (anterior cord syndrome), stražnja ozljeda KM (posterior cord syndrome), centralna ozljeda KM (central cord syndrome), Brown-Sequard sindrom, konus sindrom i kauda ekvina sindrom (slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz neuroloških sindroma kod djelomične ozljede kralježnične moždine: A – prednja ozljeda moždine; B – stražnja ozljeda moždine; C – središnja ozljeda moždine; D – Brown-Sequardov sindrom. Mjesto ozljede kralježnične moždine prikazano isjenčanim poljem.

Potpuna ozljeda moždine. Presijecanje KM dovodi do trenutne, potpune i mlohave paralize (uključujući i gubitak tonusa analnog sfinktera), gubitka svih osjeta i refleksa te autonomne disfunkcije ispod razine ozljede. Ozljeda KM iznad razine C3 segmenta KM može dovesti do potpune plegije disanja i ovisnosti o respiratoru, dok ozljede na razini C5 i C6 KM uzrokuju dišnu insuficijenciju. Kod potpune ozljede KM svih razina iznad T6 segmenta nastupa autonomna disfunkcija s bradikardijom i hipotenzijom, što se naziva spinalnim neurogenim šokom. U ovoj vrsti šoka koža ostaje topla i suha. Tijekom nekoliko sati ili dana spinalni šok prelazi u drugu fazu kada mlohava paraliza postupno prelazi u spastičnu paralizu

kao posljedice gubitka funkcije inhibitornih cerebrospinalnih eferentnih puteva u KM. U trećoj fazi (tjedan dana kasnije) i četvrtoj fazi (mjesec dana kasnije) spinalnog šoka pojavljuju se spazmi fleksornih mišića uz hiperrefleksiju vlastitih tetivnih refleksa i pojavu patoloških refleksa (16).

Djelomična ozljeda moždine. Nagnječenje ili laceracija KM dovodi do djelomičnog poremećaja motorike i osjeta, koji može biti trajan ili prolazan. Poremećaj funkcije motorike i osjeta može biti nalik onom kod potpunog presijecanja moždine te se naziva spinalnim šokom. Nakon 24-72 sata nastupa oporavak te se tada može odrediti stvarni poremećaj neurološke funkcije. Navodi se nekoliko karakterističnih neuroloških sindroma:

- **prednja ozljeda moždine** nastaje zbog direktne ozljede prednje spinalne arterije. Ozljeđenici obostrano gube motoriku i osjet boli ispod promjene. Funkcija stražnjeg dijela moždine (osjet vibracije i položaja) je očuvan,
- **stražnja ozljeda moždine** nastaje ozljedom stražnjih kolumni. Ozljeđenicima izgube osjet finog dodira, vibracije i propriocepcije ispod mjesta ozljede,
- **središnja ozljeda moždine** obično nastaje najčešće u bolesnika sa suženim vratnim kralježničnim kanalom (prirođeno ili degenerativno) nakon uganuća kralježničnog stupa. Patofiziološki nastaje krvarenje u KM (hematomijelija) koje je ograničeno na sivu tvar. Ako su zahvaćeni stražnji rogovi, izgubljen je osjet položaja, vibracije i laganog dodira. Ako su zahvaćeni prednji rogovi izgubljen je osjet boli, temperature, i grubog dodira, ali i donjeg motornog neurona mišića ruku. Motorička funkcija ruku teško se oporavlja i ostaju trajna oštećenja, dok je motorička funkcija nogu blaže oštećena i najčešće se potpuno oporavi,
- **Brown–Séquardov sindrom** nastaje uslijed polovičnog prekida KM. Ozljeđenici imaju istostranu spastičnu paralizu i gubitak osjeta položaja tijela iste strane tijela, te gubitak osjeta boli i topline na suprotnoj strani tijela.

- **ozljeda konus medularisa.** Osjet je oslabljen u perianalnom području. Tonus analnog sfinktera je oslabljen. Oštećenje funkcije crijeva i mokraćnog mjehura manifestira se opstipacijom, retencijom i inkontinencijom,
- **ozljeda kaude ekvine.** Ispod konus medularisa se u kralježničnom kanalu nalaze samo moždinski živci te ozljede tih razina nisu tipične za ozljedu KM.

1.3.5. Razina i stupanj ozljede kralježnične moždine

Funkcijski se ostatna mišićna sposobnost određuje testiranjem 10 ključnih skupina mišića na svakoj strani tijela, koristeći manuelni mišićni test i ocjenom brojevima od 0 do 5 prema bazičnoj neurološkoj propedeutici. Ostatna osjetna sposobnost provodi se testiranjem osjeta boli ubodom i finim dodirom od C2 do S5 dermatoma (17).

Razina ozljede KM utvrđuje se određivanjem najkranijalnijeg segmenta KM s ocjenom mišićne snage 3/5 ili manjom. Susjedni kranijalni segment iznad njega s obostranom normalnom mišićnom i osjetnom funkcijom predstavlja neurološku razinu ozljede (od engl. *neurological level of injury* – NLI).

Stupanj ozljede KM određuje se ljestvicom neurološkog oštećenja, AIS (engl. *American Spinal Injury Association*, ASIA*; Impairment Scale*, IS; ASIA + IS = AIS). Navedena ljestvica razdjeljuje ozljedu KM u 5 kategorija s oznakama od slova A do E. AIS-A je ozljeda s gubitkom osjeta i motorne funkcije u S4-S5 segmentu (gubitak osjeta duboko u anusu, gubitak voljne kontrakcije vanjskog analnog sfinktera). Ovaj stupanj odgovara potpunoj ozljedi moždine. U AIS-B osjet boli i dodira je očuvan u segmentima S4-S5, ali nema motorne funkcije ispod razine ozljede. AIS-C stupanj ozljede ima očuvan osjet boli i dodira u segmentima S4-S5, a u više od polovice mišića ispod razine ozljede ocjena mišićne snage je manja od 3/5. AIS-D ima očuvan osjet boli i dodira u segmentima S4-S5, a više od polovice mišića ispod razine ozljede ima ocjenu mišićne jednaku ili veću od 3/5. AIS E ima urednu osjetnu i motornu funkciju, uz moguće promjene u refleksnim odgovorima. Stupnjevi od AIS B do E su djelomične ozljede KM i klinički se očituju različitim neurološkim sindromima opisanim u prethodnom poglavlju. Neurološki pregled i

AIS klasifikacija provedeni u bolesnika 72 sata od ozljede i u prvom tjednu od ozljede ključni su za procjenu neurološkog oporavka (18).

1.3.6. Prognoza neurološkog oporavka

Prognoza oporavka lezije kralježnične moždine ovisi o razini i stupnju ozljede Bolesnici s vratnom razinom ozljede i potpunom ozljedom KM (tetraplegija) imaju najlošiju prognozu za oporavak i mogućnost hoda. Samo 2 - 3% bolesnika koji su u početku ocjenjeni kao AIS-A u godinu dana dostignu AIS-D. Kod djelomičnih ozljeda (tetrapareza) stupnja AIS-B 47% bolesnika hodat će unutar jedne godine, a kod stupnja AIS-C 87% bolesnika hodati će unutar prve godine.
Kod bolesnika s prsnom razinom ozljede i potpunom ozljedom (paraplegija), 75% bolesnika nema poboljšanja u prvoj godini nakon ozljede, 20% se poboljša za jedan stupanj, a 5 % za dva stupnja. U bolesnika s potpunom ozljedom (AIS-A) na razini T1-T8 ne može se očekivati oporavak aktivnih voljnih pokreta u nogama. No kod istog stupnja oštećenja na razini T9-T11 očekuje se djelomični oporavak motorne funkcije u 15% bolesnika, te čak u 55% bolesnika na razini T12 i niže. Bolesnici s djelomičnom ozljedom (parapareza) imaju najbolju prognozu za hod i 80% njih unutar prve godine uspostavi aktivnu fleksiju u kuku i ekstenziju u koljenu (19).

1.3.7. Liječenje ozljeda kralježnične moždine

Spoznaje o ozljedi KM kroz povijest mijenjale su terapijske stavove. Polovinom prošlog stoljeća je i dalje vladalo uvjerenje da se sve dogodi u trenutku ozljede KM i nema terapijskih efekata. Liječenje se stoga svodilo na održavanje dišnih putova, disanja i cirkulacije. Kod nestabilnih ozljeda kralježničnog stupa pomaci kralježnice mogu izazvati dodatno neurološko oštećenje, te su stvorena stroga pravila o

imobilizaciji ozljeđenika sa sumnjom na ozljedu kralježnice (stavljanje na tvrdu ravnu dasku i imobilizacija vratne kralježnice krutim ovratnikom). Tako imobiliziranog ozljeđenika treba prevesti u traumatološki centar.

Održavanje homeostaze. Dalju zdravstvenu skrb treba usmjeriti na održavanje parcijalnog tlaka kisika u krvi i održavanju fiziološke razine srednjeg krvnog tlaka, kako bi se spriječila hiopoksija i hipoperfuzija KM. Postizanje ovih učinaka nije jednostavno kod potpunih ozljeda visoke razine zbog pratećog spinalnog neurogenog šoka i/ili respiratorne insuficijencije. Kod liječenja spinalnog neurogenog šoka nije dovoljna samo nadoknada volumena nego i primjena inotropa i vazokonstriktora, a zbog respiratorne insuficijencije često je potrebna intubacija. Ova liječenja je teško provesti u transportu te se obično započinju nakon bolničkog prijema. U medikamentnom liječenju primjenjuju se i visoke doze glukokortikoida. O tome postoje brojne kontraverze, a problem je detaljno razrađen u pogl. 1.5.1.

Kirurško liječenje. Stabilne ozljede kralježničnog stupa liječe se imobilizacijom, a nestabilne ozljede operacijom. Princip operacije je otvorena repozicija i unutarnja fiksacija (stabilizacija kralježničnog stupa), no u istom operacijskom pristupu treba ukloniti i mehanički pritisak na KM ukoliko je on prisutan i radiološki potvrđen (dekompresija KM). Nažalost, kod potpunih ozljeda KM, ne očekuje se poboljšanje neurološke funkcije operacijom dekompresije, a razlog je nepovratno oštećenje tkiva KM o čemu se raspravlja kasnije (pogl. 0.). Ozljeđenici s djelomičnom ozljedom KM mogu nakon operacijske dekompresije imati značajan neurološki oporavak funkcije, ako se kirurškom zahvatu pristupilo unutar 24 sata. Naravno pri odluci o optimalnom vremenu operacije treba voditi računa o pratećim ozljedama i općem stanju ozljeđenika, a imati na umu i da intraoperacijska hipotenzija može izazvati pogoršanje neurološke funkcije. U pravo vrijeme provedeno kirurško liječenje povezano je s boljim neurološkim oporavkom, ranom mobilizacijom i rehabilitacijom.

Prevencija komplikacija. U daljnju njegu spada sprječavanje komplikacija redovitim pražnjenjem mokraćnog mjehura, vježbama disanja i okretanjem nepomičnog bolesnika u prevenciji nastanka mokraćnih i plućnih infekcija te dekubitalnih vrijedova. Medikamentna profilaksa tromboze i plućne embolije te ulkusna profilaksa, smanjuje rizik tih životno ugrožavajućih bolesti.

Rehabilitacija je potrebna u intermedijarnoj i kroničnoj fazi sekundarnog procesa kako bi se pomogao što brži i potpuniji oporavak. Najbolji je timski pristup, kombinacija fizikalne terapije, aktivnosti za poboljšanje umješnosti i savjetovanja, čime se zadovoljavaju društvene i emocionalne potrebe. Rehabilitacijski tim vodi iskusan liječnik u području rehabilitacije (fizijatar), a uz njega su u timu traumatolog, anesteziolog, urolog, medicinske sestre, fizikalni i radni terapeuti, socijalni radnici, nutricionisti, psiholozi, rekreacijski terapeuti i savjetnici za odabir struke. Fizikalna terapija se usmjerava na vježbe za jačanje mišića i pravilnu uporabu pomoćnih sredstava, poput štake, hodalica ili invalidskih kolica, što je potrebno za što bolju pokretljivost. Podučavaju se umješnosti za nadzor nad spatičnošću, autonomnom disrefleksijom i neurogenom boli. Radna terapija se usmjerava na obnavljanje motoričkih umijeća. Kod oštećenja funkcije mokraćnog mjehura i crijeva podučavaju se načini obavljanja nužde. Pri tome može biti potrebna i povremena kateterizacija. Često je potrebna stimulacija crijeva laksativima. Bitne su i strukovna rehabilitacija, rekreacijska terapija i emocionalna skrb (1).

1.3.8. Komplikacije ozljede kralježnične moždine

Kao posljedica oštećene pokretljivosti, oštećenog osjeta i oštećenih autonomnih funkcija, nastaje niz komplikacija na drugim organskim sustavima.

Respiratorni sustav: pneumonija, atelektaze, respiratorna insuficijencija, plućna embolija.

Kardiovaskularni sustav: ishemijska i neishemijska bolest srca. Autonomna disfunkcija: ortostatska hipotenzija, bradikardija, autonomna disrefleksija i gubitak regulacije tjelesne temperature.

Gastrointestinalni sustav: opstipacija, želučani i duodenalni vrijed, bolesti žučnog mjehura i pankreatitis.

Genitourinarni sustav: neurogeni mjehur, spastični mjehur, detrusor-sfinkter disinergija, hidronefroza, urolitijaza.

Mišićno-koštani sustav: kontraktura zgloba, neprepoznata fraktura, neuropatski zglob, heterotopičke osifikacije, osteoporoza.

Seksualne funkcije: izostanak psihogene erekcije u muškaraca i vaginalne lubrikacije i vaginalne vazodilatacije u žena.

Koža: dekubitus.

Bol: mijelopatska bol, mišićno-koštana bol.

Spazam.

1.3.9. Socijalni aspekt ozljeda kralježnične moždine

Bolesnici s ozljedom KM dolaze iz svih dijelova društva, a dominantno su mlađe osobe koje još nisu završile svoju edukaciju ili su tek počele raditi. Starijim bolesnicima s ozljedom KM, koji nemaju obitelji, potrebni su osobni asistenti, što za njih predstavlja trošak. Ukoliko ozlijeđenici nisu financijski zbrinuti, Centar za socijalnu skrb dodjeljuje skrbnika, a jedan dio bolesnika bude smješten u domove sa sestrinskom njegom. Obzirom na sve navedeno u ovom poglavlju može se tvrditi da ozljeda kralježnične moždine ima velik medicinski, ekonomski, društveni, psihološki i emocionalni značaj.

1.4. Patofiziologija ozljede kralježnične moždine

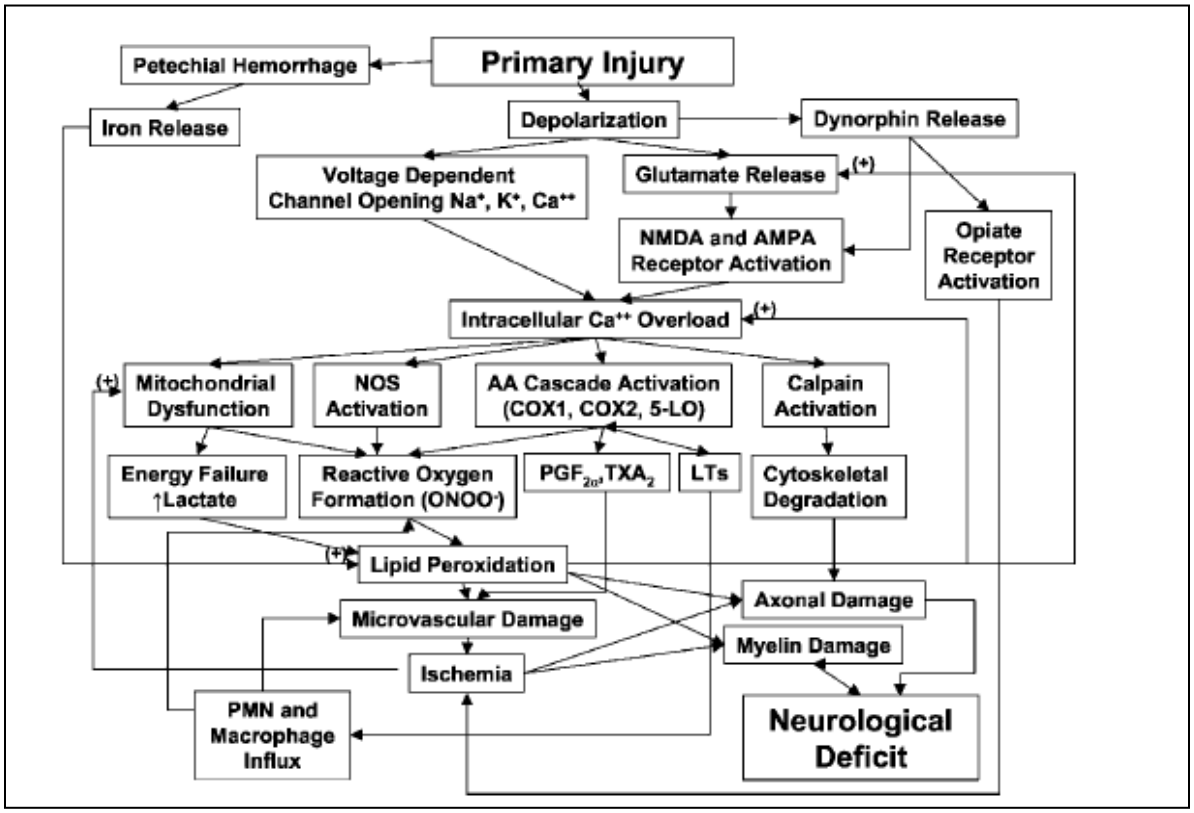
Patofiziologija ozljede KM je bifazični proces sastavljen od primarne i sekundarne ozljede ili procesa. Primarna ozljeda je mehanička deformacija tkiva, a sekundarna ozljeda slijed molekulskih i staničnih procesa potaknutih primarnom ozljedom.

Primarna ozljeda nastaje djelovanjem neposredne fizičke sile koja ozljeđuje kralješke, ligamente ili diskove kralježnice koji zatim uzrokuju nagnječenje, zgnječenje i razdor tkiva kralježnične moždine, dok kod penetrirajućih ozljeda presijecanje ili direktan razdor KM nastupa vanjskim materijalom (npr. metkom ili nožem). Izuzetno rijetko dolazi do potpunog presijecanja kontinuiteta KM. Neposredna fizička sila može ozlijediti i snadbjevajuće krvne žile KM što dovodi do ishemije i epiduralnog ili intramedularnog hematoma. Histopatološke karakteristike primarne ozljede su oštećenja krvnih žila, aksona i staničnih membrana (2).

Sekundarna ozljeda je kontinuirani slijed zbivanja u minutama, satima i danima nakon primarne ozljede i dovodi do širenja nekroze tkiva. Nastavlja se oštećenje vaskularizacije i posljedična ishemija, hemoragija, edem, lokalni elektrolitski disbalans, stvaranje slobodnih radikala, prostangladina i leukotriena, inflamacija, aksonalna i neuronalna nekroza, demijelinizacija i formiranje cisti (slika 10).

Cijeli sekundarni proces je kompleksan te se dijeli u četiri faze: perakutna, akutna, intermedijarna i kronična (20).

Perakutna faza su prva dva sata nakon primarne ozljede. Nastupa oštećenje funkcije aksona, neurona i glije koje klinički odgovara stanju spinalnog šoka (pogl. 1.3.4.). Potaknuto je nastajanje edema, mikrohemoragije, nekroze stanica, sekundarno oštećenje krvnih žila i potom ishemija. Oštećenje krvnih žila dovodi do hemoragije i ishemije u bijeloj tvari rostralno i kaudalno od mjesta ozljede (3). Iako u ovoj fazi nema većih histopatoloških promjena, imunohistološki i biokemijski dokazan je porast proinflamatornih citokina TNF-α, interleukina (IL) i glutamata, već jedan sat nakon primarne ozljede (21,22).



Slika 10. Shematski prikaz patofizoloških zbivanja u sekundarnoj ozljedi kralježnične moždine. NOS – dušik-oksid sintetaza; AA – arahnoidonska kiselina; COX1 – ciklooksigenaza 1; COX2 – ciklooksigenaza 2; 5-LO – 5-lipooksigenaza; $PGF_{2\alpha}$ – prostangaldin F 2-alfa; TXA_2 – tromboksan A 2; LTs – leukotrieni; $ONOO^-$ - peroksinitrite; PMN – polimorfonuklearni leukociti

Akutna faza je period koji traje od 2 sata do 2 tjedna nakon primarne ozljede. Početak ove faze od 2 sata do 48 sati nakon primarne ozljede je najkritičniji period kada dolazi do kolapsa autoregulacijskih mehanizama i elektrolitskog disbalansa otvaranjem ionskih kanala natrija (Na^+), kalcija (Ca^{2+}) i kalija (K^+) zbog posttraumatske depolarizacije. Povećana razina unutarstaničnog kalcija povećava ekstracelularnu razina glutamata, a koji putem membranskih kanala nastavlja povećavati unutarstaničnu koncentraciju Ca^{2+} i Na^+. Povećana koncentracija unutarstaničnog kalcija izaziva poremećaj stanične homeostaze više metaboličkih

puteva: 1. disfunkcija mitohondrija i aerobnog metabolizma te porast laktata; 2. aktivacija sinteze dušik-monooksida (NO); 3. aktivacija fosfolipaze koja razgradnjom lipidnog sloja staničnih membrana stvara prostangladin, a iz kojeg se putem ciklooksigenaze (COX) stvaraju vazokonstriktori prostangladin $PGF_{2\alpha}$ i tromboksan TXA_2, a putem lipooksigenaze nastaju leukotrieni (LT); 4. aktivira kalpainom omogućeno oštećenje neurofilamenata; 5. potiče kaspaza proces koji izaziva apoptozu stanica. Slobodni radikali kisika direktno oštećuju stanične membrane, ali potiču i proces *lipidne peroksidacije* (LP). U eksperimentalnim radovima se već 30 minuta nakon primarne ozljede nalazi povećanje lokalne koncentracije malondialdehida (MDA) - razgradnog produkta lipidne peroksidacije, koji svoju maksimalnu vrijednost postiže nakon jednog sata i smanjuje se nakon 12 sati. Završni produkt lipidne peroksidacije 4-hidroksinonenal (4-HNE) uočava se u tkivu ozljeđene KM nakon jednog sata, vrh koncentracije postiže nakon 24 sata, a porast je pratljiv i nakon 2 tjedna. Koncentracija slobodnih radikala maksimalno jer povećana 12-24 sata nakon ozljede, a smanjuje se tijekom 2-4 tjedna nakon primarne ozljede (8,23). Povećana koncentracija laktata stimulira otpuštanje iona željeza iz feritina, a posttraumatske hemoragijske zone su dodatni izvori iona željeza, što zajedno dodatno potiče proces LP. Konačni rezultat LP je nastavak oštećenja membrana tijela neurona i aksona, te oštećenje mikrovaskularizacije. Posljedično odumiru oligodendrociti i nastupa demijelinizacija. Traumom je potaknuto otpuštanje i *endogenih opijata*, čiji najvažniji predstavnik je dinorfin A, koji dovode do vaskularne disfunkcije, te ionskih i metaboličkih promijena. Prisustvo inflamatornih čimbenika povećava propusnost krvno-moždane barijere 24 sata nakon ozljede, a traje do 2 tjedna nakon ozljede. Zbog povećane propusnosti krvno-moždane barijere, započinje *inflamatorni proces* u intersticiju s infiltracijom T limfocita, neutrofila i makrofaga i posljedičnim dodatnim oštećenjima neurona i aksona (8,22,23). Povećava se produkcija fibrilarnog kiselog proteina glije (GFAP) koji potiče stvaranje *astrocitnog ožiljka*. U drugom dijelu akutne faze, u periodu od 2 dana do 2 tjedna, nastavlja se stanični odgovor formiranjem astrocitnog ožiljka koji stvara fizičku i kemijsku barijeru za aksonalnu regeneraciju,

ali s druge strane obnavlja krvno-moždanu barijeru čime smanjuje nastavak edema i inflamacije, a to je početak regenerativnih procesa.

Intermedijarna faza traje od 2 tjedna do 6 mjeseci i za to vrijeme sazrijeva astrocitni ožiljak, ali započinje aksonalna regeneracija i remijelinizacija, iako učinak te regeneracije na neurološko poboljšanje nije razjašnjen.

Kronična faza počinje 6 mjeseci nakon primarne ozljede i traje cijelog života. Karakterizirana je nastavkom formiranja glijalnog ožiljka, nastavkom demijelinizacije i formiranjem cisti i sirinksa. Dvije do tri godine nakon primarne ozljede formira se završno stanje s cistama i mijelomalacijom KM.

1.5. Liječenje sekundarne ozljede kralježnične moždine

Osnova specifičnog liječenja sekundarne ozljede je djelovanje na postojeće patofiziološke procese ili već ustanovljena oštećenja KM. Postupci koji se primjenjuju u svrhu očuvanja stanične cjelovitosti neozlijeđenih stanica nazivaju se neuroprotekcijom, a postupci obnavljanja ili stvaranja novog tkiva regeneracijom. Na mogućnost liječenja sekundarne ozljede KM prvi je ukazao Allen 1911. godine. Utvrdio je neurološko poboljšanje u pasa nakon odstranjenja posttraumatskog hematoma iz eksperimentalno ozlijeđene KM (25). Nakon toga, razvija se niz ideja o liječenju sekundarne ozljede kirurškim putem. Nakon niza istraživanja, danas je poznato da kirurško uklanjanje mehaničkog pritiska KM pomaže boljoj funkciji moždinskih snadbjevajućih arterija i time očuvanju krvne opskrbe KM. Potvrđeno je da je kirurški učinak značajniji što je operacija provedena ranije, a više autora se slaže da je optimalni period unutar 24 sata od ozljede (26,27). Ovakav kirurški postupak preporuča se samo u ozlijeđenika gdje je radiološki potvrđen značajan mehanički pritisak na KM. Za ostale vrijedi pravilo da operacija dekompresije nije potrebna, a operaciju stabilizacije treba odgoditi do hemodinamske stabilizacije, jer intraoperacijska hipotenzija s hipoperfuzijom može izazvati pogoršanje sekundarne ozljede i neurološkog oštećenja.

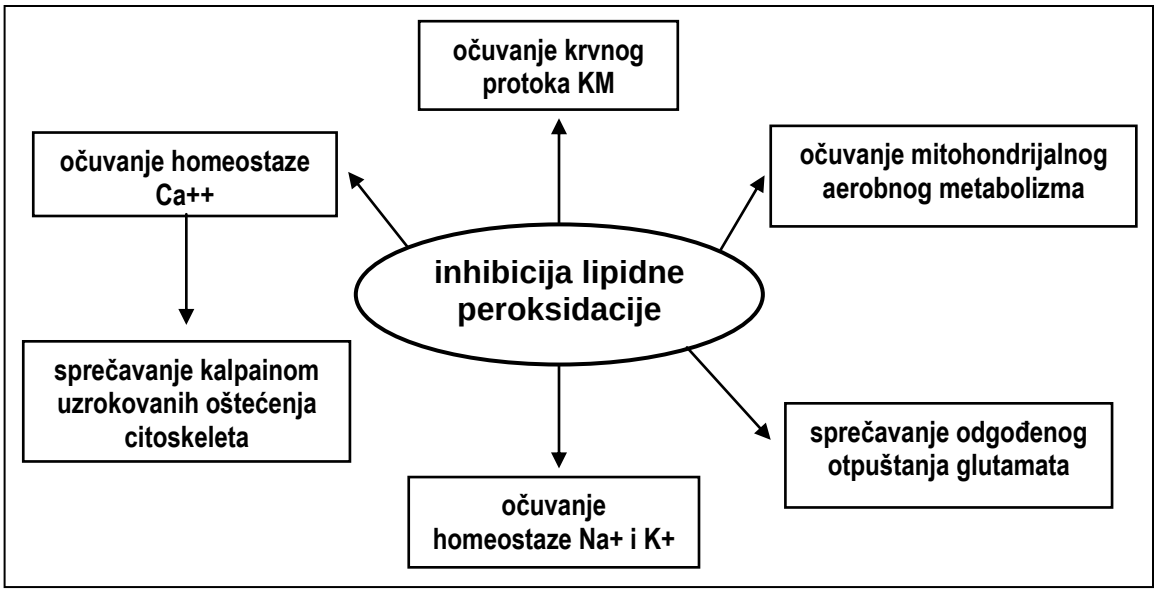
1.5.1. Neuroprotektivno liječenje

Jedan od ključnih procesa akutne faze sekundarne ozljede je stvaranje slobodnih radikala s posljedičnom lipidnom peroksidacijom. Nalaženje optimalnog inhibicijskog mehanizma ovog procesa može zaustaviti dalju sekundarnu ozljedu. Navodi se četiri moguće kategorije inhibicije ovog procesa. Prva kategorija je blokada stvaranja NO. Druga kategorija su kemijski hvatači slobodnih radikala. Treću kategoriju čine stabilizatori staničnih membrana koji sprečavanju širenje procesa lipidne peroksidacije, a pretpostavlja se da tako djeluje metilprednisolon. Četvrtu kategoriju čine hvatači stvorenih lipidnih radikala, a jedan od takvih je sustav antioksidansa koji čine vitamin E, vitamin C i glutation. Prvi od niže navedenih lijekova već su primjenjeni u kliničkim randomiziranim multicentričnim studijama, a ostali nabrojeni su u predkliničkim istraživanjima.

Metilprednizolon. U sedamdestim godina prošlog stoljeća provedena je klinička prva nacionalna studija za ozljedu KM (engl. National Acute Spinal Cord Injury Study, NASCIS I) na temelju dotadašnje spoznaje o korištenju glukokortikoida kod ozljeda mozga. Korištene su doze 100 mg i 1000 mg metilprednisolona (MP), a rezultati studije pokazali su slabu korisnost u očuvanju neurološke funkcije. Nastavljena su pretklinička istraživanja na mačkama koja su pokazala da je za neuroprotektivni učinak potrebna visoka doza metilprednisolona – 30 mg/kg t.t. Manje doze 15 mg/kg t.t. imale su slabi učinak, a u većim dozama 60 mg/kg t.t. učinak se izgubio (28). Istim istraživanjima potvrđeno je da je učinak visokih doza MP inhibicija LP. Daljnjim istraživanjima otkriveno je da MP izaziva i smanjenje akumulacije laktata, očuvanje mikrovaskularne perfuzije, očuvanje normalne funkcije krvno-moždane barijere i smanjenje inflamatornih procesa, ali je inhibicija LP ključni neuroprotektivni učinak (29) (slika 11).

Također je zaključeno da je potrebna rana primjena, jer se LP razvija brzo nakon primarne ozljede, a optimalno trajanje liječenja je 24-48 sati. Novi eksperimentalni radovi potvrdili su neuroprotektivni učinak i na modelima ozljede KM u štakora (30).

Zato je već u ranim 90-tim godinama 20. stoljeća provedena je klinička druga nacionalna studija za ozljedu KM (NASCIS II) u kojoj je potvrđen neuroprotektivni učinak visoke doze MP u poboljšanom oporavku neurološke funkcije u komparaciji s placebo grupom. Osim toga, potvrđeno je da protektivni učinak postoji kod primjene u prvih 8 sati od ozljede, a primjena nakon toga može dovesti i do pogoršanja neurološke funkcije (4).



Slika 11. Hipoteza neuroprotektivnog učinka visoke doze metilprednisolona

Nakon toga počela je široka primjena MP u liječenju akutne ozljede KM prema protokolu primjene u prvih 8 sati nakon ozljede KM bolus dozom 30 mg/kg t.t. koja se primjenjuje u prvih 45 minuta, te nakon pauze od 15 minuta kontinuirana primjena doze 5,4 mg/kg/sat t.t. sljedećih 23 sata. Samo sedam godina kasnije provedena je i klinička treća nacionalna studija za ozljedu KM (NASCIS III) u kojoj je ispitivan učinak ranije primjene i učinak novog neglukokortikoidnog lijeka, a obzirom na učinak prethodne studije, etički je bilo neprihvatljivo koristiti placebo grupu. Rezultati su potvrdili dvije bitne spoznaje: 1. optimalno je započeti terapiju u prva 3 sata od primarne ozljede KM; 2. kod početka primjene od 3 do 8 sati, treba

terapiju produžiti na 48 sati (5). Međutim, ova studija je pokazala i neke neželjene efekte: povišen rizik pneumonije, sepse, usporenog cijeljenja rana i dijjabetičke komplikacije. Početak primjene nakon 8 sati može inhibirati fosfolipazu A 2 koja uklanja peroksidirane lipide i tako povećati ozljedu LP, a glukokortikoidi mogu inhibirati aksonalnu sinaptogenezu i djelovati neurotoksično. Navedeni efekti, manjak placebo grupe i neki prigovori na izmjene koncepta u tijeku studije, navele su niz autora da iznesu stavove protivne primjeni visokih doza MP u liječenju akutne ozljede KM (6,7). Stav većine liječnika, koji provode liječenje ozljede KM o primjenom visokih doza MP, objavio je Fehlings:

a. u akutnoj ozljedi KM do 3 sata MP treba primjeniti bolus dozom 30 mg/kg t.t. kroz prvih 45 minuta, a nakon pauze od 15 minuta kontinuirana primjena doze 5,4 mg/kg/sat t.t. sljedećih 23 sata;
b. u akutnoj ozljedi od 3 do 8 sati MP treba primjeniti bolus dozom 30 mg/kg t.t. kroz prvih 45 minuta, a nakon pauze od 15 minuta kontinuirana primjena doze 5,4 mg/kg/sat t.t. sljedećih 47 sati;
c. u akutnoj ozljedi KM nakon 8 sati primjena MP nije preporučena;
d. u akutnoj penetrantnoj ozljedi KM primjena MP nije preporučena.

Unatoč mogućim komplikacijama autor preporučuje primjenu visokih doza MP kod ozljede KM prema navedenim kriterijima, dok se ne otkriju lijekovi s istim ili boljim učinkom, ali s manje nuspojava (31,32).

Tirilazad. Ovo je kemijski derivat glukokortikoida u kojem je hemisukcinat na peteročlanom prstenu zamijenjen s ugljikovodičnim prstenima bogatim dušikom. Dobiveni spoj 21-aminosteroid tirilazadmesilat oznake U-74006F koji je zadržao inhibicijski efekt na LP, a bez nusefekta glukokortikoida (33). Lijek je ispitan u NASCIS III studiji u trećoj grupi koja je dobila bolus dozu MP, a nakon toga je nastavljena kontinuirana 48 satna primjene tirilazada. Rezultat studije je pokazao jednaki neuroprotektivni učinak tirilazada kao i MP u 24 satnoj primjeni, a nešto slabiji učinak u 48 satnoj primjeni, a bez nuspojava glukokortikosteroida (5). Ipak, do danas lijek nije odobren u redovnoj kliničkoj primjeni kod akutne ozljede KM.

Nalokson. Ozljeda kralježnične moždine dovodi do povećanog lučenja beta endorfina iz hipofize. Posljedica je pad arterijskog tlaka sa smanjenom spinalnom perfuzijom. Eksperimentalna istraživanja pokazala su pozitivan učinak naloksona (opoidnog antagonista) na očuvanje protoka krvi kroz KM nakon ozljede i time boljeg neurološkog oporavka (34). Klinički je primjenjen u NASCIS II studiji gdje je pokazao poboljšani oporavak neurološke funkcije samo kod djelomične ozljede KM (4). Stoga se nije pokazao interes za dalju primjenu u ozljedi KM.

Monosijalogangliozid GM1. To je glikolipid sa sijalinskom kiselinom koji je sastavni dio membrane neurona. U eksperimentalnim životinjskim modelima pokazano je svojstvo neuroprotekcije i neuroregeneracije. Kontrolirana multicentrična primjena GM1 počela je nakon završetka NASCIS II studije kada je primjena MP postala uvriježena kod svake ozljede KM. Rezultati su pokazali nešto brži neurološki oporavak, ali je konačni funkcionalni oporavak sličan pa stoga nije nastavljena šira primjena u liječenju akutne ozljede KM (35).

Vitamin E. Prirodni je sakupljač slobodnih lipidnih radikala, ali za aktivnost treba prisutnost reducensa vitamina C i glutationa. U eksperimentalnim radovima pokazan je neuroprotektivni učinak, ali samo u primjeni visokih doza 5 dana prije nastupile ozljede KM. Dokazano je da za visoke doze vitamina E u parenhimu mozga potrebna višetjedna primjena prije ozljede, te ovaj lijek nije našao svoje mjesto u liječenju ozljede KM (23).

Ostali lijekovi. Kako je štetno djelovanje slobodnih radikala kisika i lipidna peroksidacija ključan moment u sekundarnoj ozljedi KM nastavljena su eksperimentalna istraživanja supstancama koji utječu na navedene procese. Tako se ispitivano: metilensko plavilo, tiopentala, β-glukan, N-acetilcisteine, γ-glutamilcisteine, polietilenglikol, ciklosporin A, NIM811, eritropoetin i α-lipoična kiselina (36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46). Drugim istraživanjima nastoji se

pronaći liječenje i drugih patofizioloških procesa u sekundarnoj ozljedi KM. Tako se ispituje učinak inhibitora COX2 (rofecoxib, celecoxib) na inflamatorni odgovor (47). Mogući neuroprotektiv je inhibitor kalpaina. On blokira aktivnost kalcijem aktiviranog enzim kalpaina koji dovodi do oštećenja citoarhitekture aksona (48). Tirotropni otpuštajući hormon (TRH) djeluje kao antagonist opijatnih receptora te time čuva normalnu krvnu opskrbu (49).

Sprečavanje apoptoze. Potencijalno obećavajuće područje u liječenu ozljede KM je sprečavanje stanične apoptoze. Unutarstanični faktor koji potiče apoptozu je kaspaza-3 (50). Međutim i izvanstanični stimulusi mogi potaknuti procese u mitohondriju koji djelovanjem citokroma c i Smac/DIABLO aktiviraju kaspazu-9 koja potom aktivira kaspazu-3 i nastupa apoptoza (51,52). U cijeli proces uključeni su i inhibitori apoptotskih proteina (IAP). Potencijalni inhibitor kaspaze-3 je peptid z-DEVD-fmk čija primjena je otežana u ozljedi KM, jer proteaze na mjestu ozljede otežavaju postizanje primjerene unutarstanične koncentracije tog inhibitora. Druga skupina inhibitora iz IAP obitelj od kojih je najpoznatiji p35 koji suprimira apoptozu u većini stanica. Konačno, moguća je i primjena antiapoptotskih gena koji se u stanicu mogu unijeti adenovirusom te ostaju aktivni 4 do 6 tjedana, bez ugradnje u stanični genom. Apoptotski procesi u ozljedi KM još uvijek su slabo istraženi. Potvrđen je specifičan učinak apoptoze na oligodendroglijalne stanice udaljene od mjesta ozljede, što uzrokuje demijelinizaciju i dugotrajni gubitak neurološke funkcije. Daljnjim istraživanjima na području apoptoze nakon ozljede KM očekuje se stvaranje strategije za ovo područje specifičnog liječenja ozljede KM (53).

1.5.2. Reparatura i regeneracija kralježnične moždine

Liječenje ozljede KM može početi u intermedijarnoj i kroničnoj fazi sekundarne ozljede kada se otvara mjesto za potencijalnu intervenciju faktorima rasta i matičnim stanicama. Nije moguće potpuno razdvojiti ova djelovanja, jer faktori rasta potiču proliferaciju i diferencijaciju stanica, a svaka matična stanice luči i

faktore rasta, a konačni učinak obje terapije sveden je na popravak (reparaturu) i obnavljanje (regeneraciju) KM. Brojna istraživanja na ovom području utvrdila su niz dodatnih problema pri ovoj vrsti terapije. Kod primjene matičnih stanica u kojima je izvor ljudski embrij (hESC), ili prijenos stanične jezgre odraslog organizma u tuđu oocitu (SCNT) postavljena su i brojna etička pitanja (54).

U istraživanjima liječenja ozljede KM koriste se većinom autologni izvori matičnih stanica odraslih osoba (iPSC). Tako postoji više potencijalnih izvora korisnih matičnih stanica: mezenhimne matične stanice (MSC), olfaktorne stanice (OEC), neuralne matične progenitorske stanice (NSPC) i Schwanove stanice (SC). Kod istraživanja s faktorima rasta najčešće se koriste rekombinantnom sintezom proizvedeni faktori rasta (55). Eksperimentalni radovi u području primjene faktora rasta i matičnih stanica ukazuju na složenost postupaka i brojne ometajuće čimbenike koji otežavaju proces reparacije i regeneracije (56,57). Ovdje predstavljamo dva rada u kojima se može uočiti kako je liječenje ozljede KM matičnim stanicama još daleko od uspješnog liječenja (20,58).

U prvom prikazanom istraživanju učinjena je srednje teška djelomična ozljeda vratnoprsne KM i transplantacija NSPC 2 mm rostralno i 2 mm kaudalno od mjesta ozljede uz intratekalnu primjenu faktora rasta (PDGF, bFGF, EGF). Kada je primjena izvršena u subakutnoj fazi (2 tjedna od ozljede), preživjelo je 40% transplantiranih stanica uz blago neurološko poboljšanje funkcije hoda. Kada su NSPC transplantirane u intermedijarnoj fazi (6 tjedana od ozljede), transplatirane stanice nisu preživjele. Autori rada smatraju da kronično oštećen okoliš s gubitkom lokalnih stanica, cistama i inhibitornim astrocitnim ožiljkom ometa očuvanje transplantiranih stanica. Nakon modifikacije lokalnog stanja primjenom hondroitinaze i naknadnom transplantacijom NSPC i uz intratekalnu primjenu faktora rasta matične stanice su zadržane, što je potvrđeno blagim poboljšanjem funkcije hoda. Vjerojatni mehanizam neurološkog oporavka je: a. lokalno lučenje faktora rasta iz transplantiranih stanica; b. remijelinizacija; c. poticanje neuralne plastičnosti, dok je očekivano preraštavanje aksona kortikospinalnog trakta

zabilježeno samo na mjestu ozljede, a bez kaudalnije propagacije. Autori zaključuju da je efikasna transplantacija izvediva u subakutnoj fazi sekundarne ozljede, dok je kod kronične sekundarne ozljede potrebno primjeniti dodatne postupke koji bi omogućili preživljavanje i razvoj matičnih stanica (20).

U tehnički složenijem radu, gdje se nastojalo zaobići više ometajućih čimbenika regeneracije, učinjena je potpuna ozljeda KM na T3 segmentu. U područje pontine retikularne jezgre primjenjen je cAMP koji descedentnim putevima treba potaknuti lučenje endogenih faktora rasta živčanog tkiva. Na mjesto ozljede transplantirane su koncentrirane matične stanice koštane srži kako bi stvorile optimalnu matricu za rast aksona. I konačno je 1,5 mm i 2,5 mm kaudalno od ozljede postavljen viralni vektor koji sadrži BDNF (engl. brain derived neurotophic factor) koji treba potaknuti distalni rast aksona. Testovi hoda pokazali su oporavak neurološke funkcije, ali je spastičnost bila pojačana. Imunohistopatološke tehnike pokazale su rast aksona kroz mjesto ozljede tek dva milimetra kaudalnije, a ponovljena lezija istog mjesta nije promijenila neurološku funkciju. Autori zaključuju da je nakon potpune ozljede KM proces regeneracije izuzetno složen, i često bezuspješan unatoč istovremenoj primjeni više mehanizama regeneracije (58). Liječenje matičnim stanicama mjestimično je započelo i u kliničkim pokusima, ali za sada nema objavljenih rezultata .

1.6. Model ozljede kralježnične moždine

Za istraživanje ozljede KM dostupno je više modela, a zbog jednostavnosti zbrinjavanja najčešće su korišteni modeli na laboratorijskom štakoru (59). Primarnu ozljedu je moguće provesti kontuzijom KM, kompresijom KM i poprečnom sekcijom KM. Model oštećenja KM kompresijom je najsličniji primarnoj ozljedi ljudske KM. Ekstraduralna kompresija neurokirurškom vaskularnom klipsom u trajanju od 5-60 sekundi na izloženi dio duralne vreće je reproducibilan model koji je zbog svoje jednostavnosti široko prihvaćen (60,61,62,63). Ako se ozljeda provede u razini

prsne ili slabinske KM, posljedica je neurološko oštećenje tipa paraplegije, poremećaj kontrole sfinktera, otežano hranjenje i brojne komplikacije koje zahtjevaju posebnu njegu životinja. Unatoč tome one ubrzano ugibaju. Kliničko praćenje mišićne funkcije donjih ekstremiteta životinja otežano je zbog automatskog refleksa hoda nižih sisavaca, a zbog kraćeg životnog vijeka nije moguće pratiti dugotrajni oporavak (64). Dio autora rješenje ovog problema nalazi u elektrofiziološkom ispitivanju motornih evociranih potencijala (MEP) i somatosenzornih evociranih potencijala (SSEP) koji su pak skloni velikim varijacijama, uz zahtjev strogo kontroliranih uvjeta testiranja i tehnički skupe opreme (65). Osim toga, moguće je pratiti samo neposredni učinak na ozljedu KM, a ne i vremenski slijed oporavka neurološke funkcije paralelno s razvojem intramedularnih promjena.

1.6.1. Ozljeda sakrokokcigealne kralježnične moždine štakora

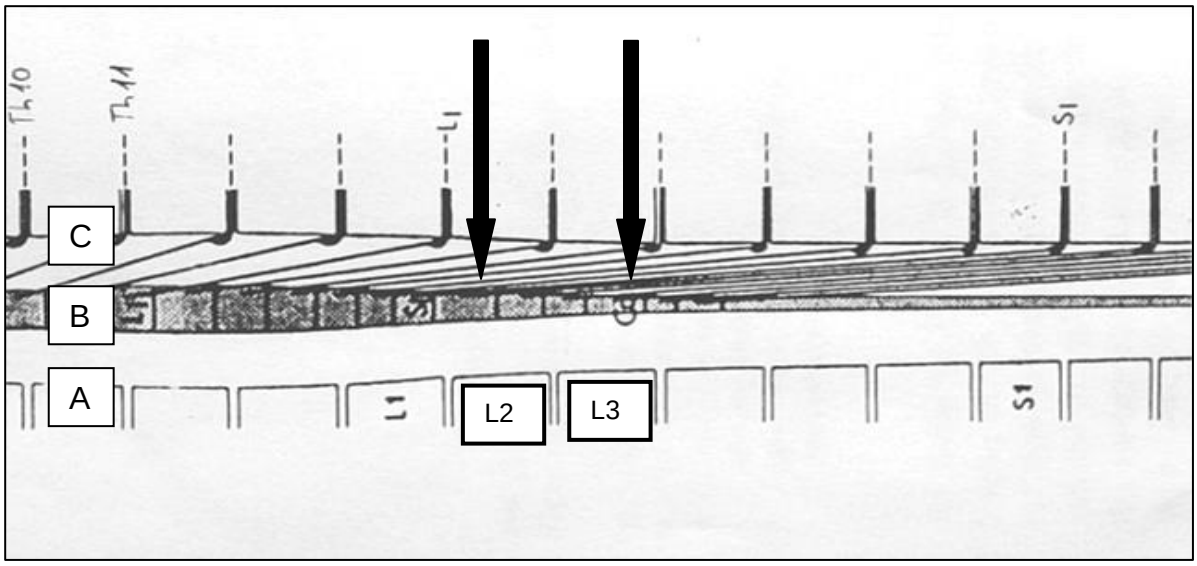
U istraživanjima Bennetta i suradnika razvijen je model mišićnog spasticiteta u štakora ozljedom sakralne KM, a bez oštećenja funkcije hoda, mokrenja i defekacije. Ozljeda KM učinjena je u nivou S2 segmenta s posljedičnim oštećenjem samo neurološke funkcije repa. Po ozljedi se potpuno izgubi mogućnost odizanja repa i rep postaje neosjetljiv na dodir. Nakon 14 dana nastupaju spastičke promijene – povišen tonus fleksorne i ekstenzorne muskulature repa, fleksorni spazam, pojačana osjetljivost na lagani dodir i kloničke kretnje pri podražaju dodirom ili pri elektrostimulaciji. Nakon 60 dana hipertonus i klonus repa dostiže maksimum. Nasuprot tome funkcija hoda i kontrola mokrenja i defekacije ostaje neoštećena, pa te životinje mogu biti praćene godinu dana (66). U sljedećem radu istog autora, EMG-om je potvrđen dugotrajni facilitirani odgovor mišića repa na motornu stimulaciju od 14.-og dana nakon presjecanja sakrokokcigealne KM do godinu dana, dok brzina provodljivosti kaudalnog živca u repu ostaje nepromijenjena (67). U istom radu je retrogradnim bojenjem motoneurona malih mišića repa dokazano da je njihov najveći broj u moždinskim

segmentima S3 i S4, a detekcijom senzornih evociranih impulsa iz repa na razini korijenova, da dermatomska inervacija repa odgovara segmentima Co1, S4, S3 i S2. Navedeno potvrđuje da oštećenje sakrokokcigealne moždine štakora oštećuje samo funkciju repa i time omogućuje dugo preživljavanje životinja. Zato smo u ovom istraživanju odlučili koristiti model ozljede sakrokokcigealne KM štakora uz modifikaciju potpune u djelomičnu leziju KM.

1.6.2. Anatomija i funkcija kaudalne kralježnične moždine štakora

Iako strukturno nema veće makroskopske razlike ljudske i štakorske anatomije KM posebnosti je razlika u broju kralježaka i različita funkcija moždinskih segmenata. Tako u štakora postoji 13 prsnih, 6 slabinskih kralježaka, 4 križna i oko 25 kokcigealnih kralježaka u repu koje se naziva kaudalni kralježci. KM u štakora ima po jedan medularni segment više u prsnom i u lumbalnom dijelu, a kraj KM čine sakrokokcigealni segmenti koji dostižu gornji rub L4 kralješka. Funkcionalno najrazličitiji su medularni segmenti S3 i S4 koji sadrže najveći broj motoneurona za kontrolu pokreta malih mišića repa, a nalaze se u razini L2-L3 kralješka (slika 12). Funkcija osjeta ove regije KM je također povezana s repom jer dorzalni korijen Co1 segmenta prima osjet iz vrha repa, S4 i S3 iz ostalog dijela repa, a S2 segment iz baze repa (67).

Citoarhitektonski ovaj dio KM ima jednak omjer sive i bijele tvari. Organizacija sive tvari na bazi Rexedovih lamina jednaka je segmentima ljudske moždine. Različita je organizacija bijele tvari posebno smještaj kortikospinalnog puta na bazi stražnje kolumne, dok je u ljudskoj KM kortikospinalni put smješten bočno i sprijeda (68). Neuronski centri za kontrolu funkcije mokrenja i analnog sfinktera nalaze se kranijalnije u segmentima KM L6 i S1 (66).



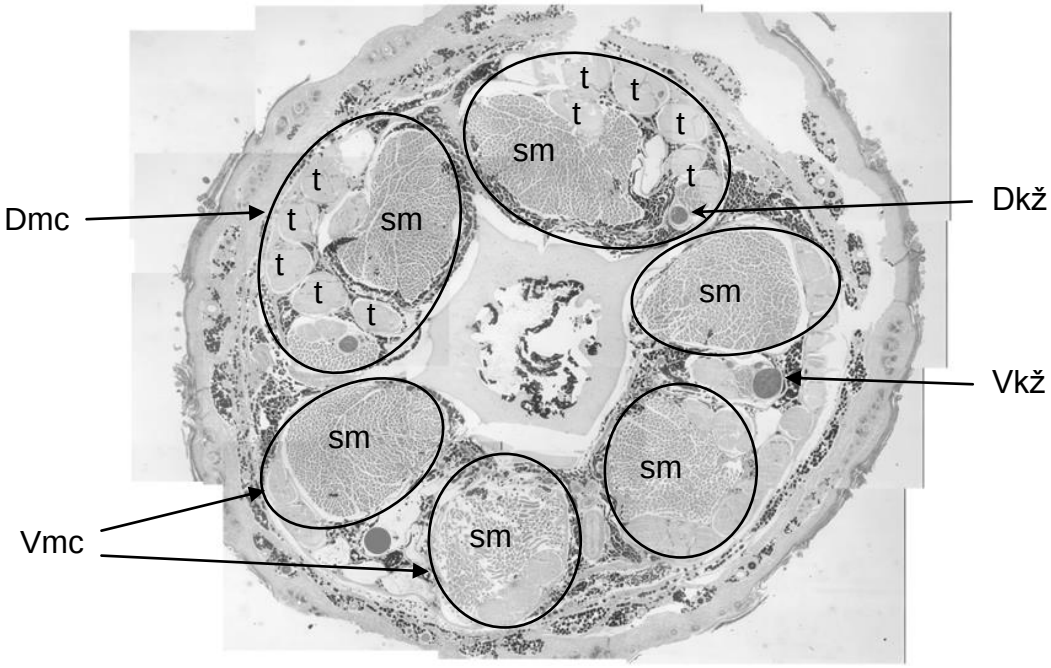
Slika 12. Shematski prikaz kralježničnog kanala štakora od T11 do S3 kralješka. A – kralježnični stup. B - kralježnična moždina (isjenčano). C - moždinski živci – gornji red. Prostor između crnih strelica označava segmente S2 do Co1 sakrokokcigealne regije KM koji su odgovorni za funkciju repa. Na kralježničnom stupu ova regija smještena je od L2 do L3 kralješka.

1.6.3. Anatomija i funkcija repa štakora

Rep je kaudalni produžetak kralježnice koji izlazi na leđima. Ima formu dugog cilindra kojem se na presjeku razabiru tri koncentrična sloja: kralježnični stup, sloj mišića i tetiva, te sloj kože. Sprijeda je smještena arterija koju prate manje vene, par većih vena smješten je bočno, a neparna vena straga. Mišići i tetive grupirani su u šest složenih cilindara tako da se sprijeda nalazi po dva ventralna cilindra mišića po svakoj strani, a straga po jedan dorzalni cilindar mišića po svakoj strani. Strukturu svakog cilindra mišića tvori pet uzdužno orijentiranih tetiva i poprečni segmentni mišići. U ventralnim mišićnim cilindrima tetive su završni dio mišića fleksora kaude longus i fleksora kaude brevis, a na dorzalnim mišićnim cilindrima mišića abduktora kaude dorzalis. U sastavu mišićnih cilindara su i živci, po jedan

veći živac za dva ventralna mišićna cilindra i po jedan manji živac za dorzalni mišićni cilindar (slika 13). Ova četiri živca čine kaudalno živčano stablo koje završava na vrhu repa.

Štakorski rep ima dvostruku funkciju: termoregulacija i balans hoda. Termoregulacija se provodi širenjem bočnih vena repa. U životinja koje rep nemaju tjelesna temperatura odstupa za 0,5 °C od normalne temperature. Funkcija repa pri hodu vidljiva je već u hodu na horinzontalnoj površini kada je rep uvijek odignut od podloge. Posebnu aktivnost čini balans repom pri kretanju na neravnim i uskim podignutim podlogama, te pri penjanju. Životinje koje nemaju rep ili rep ima poremećenu funkciju kreću se sporije i manje su aktivne.



Slika 13. Patohistološki preparat proksimalnog segmenta repa štakora. Vmc – ventralni mišićni cilindar; Dmc – dorzalni mišićni cilindar; sm – segmentni mišić; t – tetiva; Dkž – dorzalni kaudalni živac; Vkž – ventralni kaudalni živac.

1.7. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 je stabilni gastrički polipeptid sa višestrukom pozitivnom učinkovitošću na različite organske sustave ljudskog organizma. Poznat je njegov angiogenetski potencijal, zaštitno djelovanje na endotel kao i antioksidativni učinci. Izoliran je iz humanog želučanog soka, molekularne težine 40000 D s primarno otkrivenim anti-ulkusnim djelovanjem. Dio koji je odgovoran za biološku aktivnost cijele molekule sastoji se od 15 aminokiselina slijedećeg redoslijeda: Gly Glu Pro Pro Gly lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val. Pentadekapeptid BPC 157 je stabilnih fiziklano-kemijskih osobina, ne razgrađuje se u želučanom soku ni kroz 24 sata. Do sada kroz više pokusnih modela nije registrirana toksičnost, a letalna doza nije postignuta ni unatoč primjeni visokih doza peptida BPC 157 do 100 mg/kg u odnosu na doze kojima se ostvarivao pozitivan učinak.

Danas se u pokusima uglavnom koristi sintetizirani pentadekapeptid BPC 157. U normalnim ili in vitro uvjetima sintetizirani pentadekapeptid BPC 157 nema značajniji učinak na normalne fiziološke parametre poput diureze, krvnog tlaka, temperature, gastrointestinalnog motiliteta i sekrecije. Ukoliko dolazi do poremećaja homeostaze, pentadekapeptid BPC 157 pokazuje čitav niz zaštitnih učinaka na navedene parametre i organske sustave.

U oštećenju gastrointestinalne sluznice produljenim stresom, NSAR-om, cisteamino i akutnim pankreatitisom dokazan je citoprotektivni učinak. (69,70,71,72). Uz već spomenute protektivne učinke na gastrointestinalni sustav ovaj agens oporavlja funkciju donjeg ezofagealnog i piloričnog sfinktera u modelu ezofagitisa (73,74). Također potiče cijeljenje intestinalnih anastomoza i ubrzava cijeljenje različitih fistula (13). U modelima jetrene lezije zabilježen je hepatoprotektivni učinak pri čemu dolazi do izražaja antioksidativno svojstvo peptida BPC 157 (75). Kod jetrenog oštećenja paracetamolom i NSAR-om BPC 157 dovodi do sniženja patoloških vrijednosti jetrenih biokemijskih parametara, poboljšava portalnu hipertenziju i histološki nalaz jetre. Uz to, smanjuje akutno i kronično alkoholno oštećenje jetre i alkoholom izazvane želučane lezije (76,77). Uz

spomenuto, dokazan je i nefroprotektivni učinak u modelima tubularne nekroze i neuroprotektivni učinak u modelima neurotoksičnosti (78,79). Kod modela akutne i kronične upale dokazan je protuupalni učinak reduciranjem medijatora upale interakcijom s adrenergičkim i dopaminergičkim sustavom (80,81,82,83). Registriran je i pozitivan učinak na cijeljenje rana s formiranjem kolagena, retikulina i granulacijskog tkiva (84). Pozitivno djeluje na cijeljenje opekline i oštećenja mišića (85,86,87,88). Opisani učinci se povezuju s Robertovim konceptom adaptivne citoprotekcije koji se temelji na postavci da manja tkivna oštećenja primjenom malih doza različitih iritansa ostvaruju zaštitu odnosno citoprotekciju u slučaju izlaganja puno jačim iritansima (89).

Pentadekapepetid BPC 157 ostvaruje interakciju sa sustavom dušičnog oksida (NO sustav) i na taj način stječe angiogenetske osobine i djeluje protektivno na endotel. To se povezuje s prevencijom nastanka i smanjenjem veličine nastalog tromba nakon uspostave aortne anastomoze u štakora, ali i smanjenjem vremena trajanja krvarenja kod terapijom inducirane trombocitopenije (90,91). Dušikov monoksid (NO) sintetizira se iz esencijalne aminokiseline L-arginin i od 1987. godine je otkriven kao čimbenik koji nastaje u endotelnim stanicama i djeluje kao medijator i stanični glasnik (92). Sudjeluje u fiziološkim i patofiziološkim procesima kardiovaskularnog, gastrointestinalnog i živčanog sustava kao i u procesima upale i cijeljenja. Njegova svojstva posljedica su sudjelovanja u procesima mitohondrijskog i tkivnog odgovora na hipoksiju a utvrđeno je da je uloga NO u tim procesima dvojne prirode. U određenim uvjetima aktivacija NO sustava preko procesa mitohondrijske signalizacije potiče citoprotekciju i indukciju staničnih obrambenih mehanizama. Isto tako, aktivacija NO sustava putem energetskih procesa u mitohondrijskoj membrani može dovesti do poremećaja funkcije mitohondrija i oštećenja stanica (93,94). Smatra se da pentadekapeptid BPC 157 sudjeluje u stabiliziranju NO sustava i stanične homeostaze čime ostvaruje zaštitni učinak na stanice (89,95,96,97). U našim istraživanjima je kroz više različitih radova potvrđeno međudjelovanje pentadekapepetida BPC 157 i NO sustava (12,82). U želučanoj sluznici povećana produkcija NO na poticaj pentadekapeptida

BPC 157 je osnova anti-ulkusnog djelovanja. U modelu doksorubicinske toksičnosti djelovanje NO je zaštitno i kod posljedičnog srčanog popuštanja smanjuje se oštećenje miocita i poboljšava funkcija miokarda (98). U modelima s N-dušik-L-arginin-metilesterom (L NAME) uzrokovane arterijske hipertenzije i L-argininom uzrokovane arterijske hipotenzije primjena pentadekapepetida BPC 157 u oba modela dovela je do uspostave normalnih vrijednosti arterijskog tlaka čime je potvrđen protektivni učinak na stanice endotela (82). Na sličan način interakcija NO sustava i pentadekapeptida BPC 157 djeluje na procese oštećenja u različitim drugim modelima citotoksičnosti kao intoksikacija digitalisom, aritmije inducirane ishemijsko reperfuzijskom lezijom ili poremećajem koncentracije kalija (99,100).

Poseban značaj za ovo istraživanje imaju prethodni radovi s utjecajem pentadekapeptida BPC 157 na ozljedu središnjeg živčanog sustava (10) i na cijeljenje ozljede perifernog živčanog sustava (11). Zaštitni učinak pentadekapeptida BPC 157 u kontuziji mišjeg mozga dokazan je smanjenjem posttraumatske hemoragije, smanjenjem edema mozga i smanjenjem intraventrikularne hemoragije. U pokusu s presjecanjem ishiadičnog živca štakora s i bez direktne anastomoze u pentadekapeptidom BPC 157 tretiranih životinja dokazana je bolja remijelinizacija, veći broj velikih živčanih vlakana, smanjen je intrafascikularni edem i povećana neovaskularizacija. Ova saznanja su bila poticaj za ispitivanje djelovanja pentadekapeptida BPC 157 u modelu ozljede KM.

2. Hipoteza

Tvrdimo da će pentadekapeptid BPC 157 pokazati zaštitni učinak na strukturu moždine i na neurološku funkciju mišića repa nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine u modelu na štakorima.

3. Ciljevi rada

3.1. Opći cilj

Utvrđivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na neurološko oštećenje kod ozljede kralježnične moždine.

3.2. Specifični ciljevi

a. ispitivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na neurološko oštećenje kod ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine ovisno o primjenjenoj dozi;
b. ispitivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na funkciju repa kod ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine;
c. ispitivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na histopatološke promijene kralježnične moždine kod ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine;
d. ispitivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na histopatološke promijene živca repa kod ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine;
e. ispitivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na elektromiografske promijene mišića repa kod ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine.

4. Materijali i metode

4.1. Životinje

Istraživanje je obuhvatilo 120 Wistar albino štakora muškog spola, težine 350-450 grama i dobi 16-20 tjedana, koji su bili u uzgoju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su držane u kontroliranim klimatskim uvjetima (temperatura 22-24°C i vlažnost 30-60%). Sa životinjama se postupalo sukladno Zakonu o zaštiti životinja (NN 135/06) te Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili u druge znanstvene svrhe (NN 47/11). Prije početka istraživanja dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2. Lijekovi

1. isofluranum (Forane, Abbott Laboratiories Ltd, Queenborough, Velika Britanija). Primjenjena doza 10 ml/životinji inhalatorno
2. ketamin (Ketamine Parke-Davis GmbH, Berlin, Njemačka). Primjenjena doza: 0,5-4 mg/kg t.t. i.p.
3. diazepam (Normabel, Belupo, Ludbreg, Hrvatska). Primjenjena doza: 0,04-0,2 mg/kg t.t. i.p.
4. ketoprofenum (Ketonal, Lek, Ljubljana, Slovenija). Primjenjena doza 5 mg/kg t.t. s.c.
5. natrijev klorid 0,9% otopina (Natrijev klorid 0,9% otopina za infuziju, B.Braun, Berlin, Njemačka). Primjenjena doza 5 ml/kg t.t. i.p.

4.3. Metode

4.3.1. Kirurški postupak ozljede kralježnične moždine

Svaki eksperiment započet je vaganjem i obilježavanjem životinja nakon čega je slijedila randomizirana podjela u tri skupine sa po šest štakora u svakoj skupini. Prva skupina je bila kontrolna, a druge dvije skupine eksperimentalne. One su se razlikovale prema dozi primjenjenog BPC 157. Za svaku tretiranu skupinu pripremi se otopina za terapijsku primjenu: 1. Natrijev klorid 0,9%; 2. pentadekapeptid 50 µg/ml; 3. pentadekapeptid 0,5 µg/ml.

Eksperimentalne životinje su po uvođenju u opću anesteziju primjenom diazepama 0,04 - 0,2 mg/kg t.t. i.p., ketamina 0,5 - 2 mg/kg t.t.i.p. i inhalacijom isoflurana tehnikom ukapavanja bile podvrgnute operacijskom zahvatu. U pronacijskom položaju životinje, obrije se koža leđa od donjih rebara do zdjelice i primjenom polivalentnog alkohola aseptički pripremi operacijsko polje. Zatim se jednokranim nožićem učini dorzalna medijana incizija lumbalne regije dužine 3 cm, te se brojanjem trnastih nastavaka od sakralnog grebena kranijalno pronađe L2 i L3 kralježak. Uz korištenje mikroskopa, učini se bilateralna interlaminektomija L2-L3 kralješka i prikaže duralna vreća. Ozljeda KM izvodi se bez otvaranja duralne vreće, tako da se raširene nožice neurokiruške vaskularne klipse (gradacije 60-66 g) postave na duralnu vreću bilateralno, zatim otpuste i klipsa ostavi in situ 60 s. Po isteku vremena, klipsa se nakon razmicanja nožica ukloni i započne novo mjerenje vremena. Kontinuitet mišića i kože rekonstruira se kirurškim šavima. Po isteku 10 minuta od uklanjanja klipse jednokratno i.p. primjenjena je odgovarajuća terapijska supstanca prema skupini u koju životinja pripada. Po završenoj operaciji životinje su bile grijane, promatrane i prevrtane sa strane na stranu dok ne uspostave stabilnu sternalnu rekumbenciju, kada su vraćene u vivarij. Hranu i vodu dobivale su ad libitum. U prvih 5 dana nakon operacije provođena je analgezija, jedanput dnevno, upotrebom ketoprofena 5 mg/kg t.t. s.c.

Sve životinje su dobile i datum provođenja kirurškog zahvata prema kome je izračunat termin žrtvovanja. Termini žrtvovanja su bili 7, 15, 30, 90, 180 i 360 dana nakon kirurškog zahvata. Za svaki termin žrtvovanja ponavljan je gore navedeni postupak za tri tretirane skupine. Osim tretiranih skupina, za potrebe istraživanja učinjene su još tri skupine. U skupini slijepe kontrole četiri životinje su podvrgnute kirurškom postupku pod istim uvjetima, ali bez postupka ozljede KM klipsom, a termin žrtvovanja bio je 12 mjeseci nakon kirurškog zahvata. U skupini inicijalne sekundarne ozljede četiri životinje podrvgnute su kirurškom zahvatu i ozljedi KM klipsom, a žrtvovane su 10 minuta nakon ozljede. U zdravoj kontroli četiri životinje, iste dobi i težine, nisu bile podvrgnute nikakvom invazivnom zahvatu i odmah su žrtvovane. Sve životinje su žrtvovane prema utvrđenim standardima sukladno odredbama Etičkog kodeksa o laboratorijskim životinjama, Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06) kao i Pravilnikom o uvjetima držanja pokusnih životinja (NN 176/04). Raspored životinja po skupinama i vremenima žrtvovanja prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Raspored životinja po skupinama i vremenima žrtvovanja

	vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata						
Skupina	10 minuta	7 dana	15 dana	30 dana	90 dana	180 dana	360 dana
zdrava kontrola (bez terapije)							
inicijalna sekundarna ozljeda (bez terapije)	+						
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t. i.p.		+	+	+	+	+	+
Pentadekapeptid BPC 157 200 ug/kg t.t. i.p.		+	+	+	+	+	+
Pentadekapeptid BPC 157 2 ug/kg t.t. i.p.		+	+	+	+	+	+
slijepa kontrola (laminektomija)							+

4.3.2. Ispitivanje motorike repa

Prikupljanje podataka istraživanih parametara provedeno je od strane suradnika kojima su predočene životinje označene samo pripadajućim brojem, bez spoznaje kojoj eksperimentalnoj skupini pripadaju.

Analiza motorne funkcije repa provedena je u sljedećim terminima nakon ozljede : nulti dan (8 sati nakon ozljede), 1. dan, 4. dan, 7. dan, 15. dan, 30. dan, 90. dan, 180. dan i 360. dan. Životinje su postavljene da prolaze hodnu prugu dužine 1 m u tri navrata, uz kliničku opservaciju. Ocjena motorne funkcije provedena je prema sljedećoj ordinalnoj skali: 1 – potpuni gubitak funkcije, bez odizanja repa od podloge; 2 – odizanje manje od ¼ dužine repa; 3 – odizanje ½ dužine repa; 4 – odizanje ¾ dužine repa; 5 – normalna funkcija, odignut cijeli rep. Kod autotomije repa dodiljena je ocjena 0.

Analiza spasticiteta repa provedena je postupcima i ocjenjena na ordinalnoj skali koje predlaže Bennett: 1 – povremeno savijanje repa, blagi tonus, bez spazma na fini dodir; 2 – fleksijski spazam repa na grubi podražaj u trajanju 3-10 sekundi, brzi pomaci repa na fini dodir; 3 – klonički fleksijski spazmi trajanja više minuta na grubi podražaj, brzi pomaci repa na fini dodir; 4 – izmjenjujući fleksijski i ekstenzijski spazam na grubi podržaj, mlaćenje repom na fini dodir; 5 – fleksijski i ekstenzijski spazam s formiranjem repa u obliku slova S, mlaćenje repom na fini dodir (67,66). Kod autotomije repa dodijeljena je ocjena izmjerena u prethodnom vremenu.

4.3.3. Elektromiografija

Elektromiografkska mjerenja provedena su u specijalno opremljenom laboratoriju s klimatizacijom i kontroliranom temperaturom sobe na 25°C korištenjem univerzalnog elektromiografskog uređaja - TECA T 15 primjenjujući standardne principe elektromiografije (101). Sva mjerenja provedena su neposredno prije žrtvovanja u skupinama 30, 90, 180 i 360 dana nakon kirurškog zahvata. Za

provođenje mjerenja životinje su stavljene u standardizirani drveni kavez namijenjen za neinvazivno mjerenje krvnog tlaka na repu štakora, te je iz kaveza prominirao samo rep životnije. Na najkranijalniji dio baze repa postavljen je prvi par monopolarnih igala s međusobnim kraniokaudalnim razmakom 5 mm, potom drugi par monopolarnih igala 50 i 55 mm kaudalno mjereći od kaudalne elektrode prvog para elektroda, a treći par monopolarnih elektroda 100 i 105 mm kaudalno mjereći od kaudalne elektrode prvog para elektroda.

Najprije je bila provedena voljna elektromiografija tako da se za detekciju koristio treći par monopolarnih elektroda koji se poveže s pojačalom uz donji filter signala 50 Hz i gornji filter signala 5 kHz uz slobodan tok oscilograma pri 100 ms po ekranu. Laganim dodirom se podraži vrh repa te se po pojavi motornih potencijala pohrani 400 ms najgušćeg inervacijskog uzorka. Izmjeren je broj potencijala na 100 ms i prosječna amplituda potencijala.

Zatim je bila provedena stimulacijska elektromiografija uz detekciju motornog akcijskog potencijala (MAP) koristeći treći par monopolarnih elektroda povezanih s pojačalom uz donji filter signala 50 Hz i gornji filter signala 10 kHz. Stimulacija, frekvencije 1 Hz i trajanje impulsa 0,05 ms provede se preko prvog para monopolarnih elektroda postavljenih na bazi repa. Kada se slijedom više stimulusa dobije isti odgovor, uzorak se pohrani, te očita proksimalna amplituda i latencija MAP-a. Zatim se provede stimulacija preko drugog para monopolarnih elektroda. Kada se slijedom više stimulusa dobije isti odgovor, uzorak se pohrani, te očita distalna amplituda i latencija MAP-a. Razmak između stimulacijskih elektroda potreban za izračun brzine provođenja, standardiziran je na 50 mm opisanim postupkom postavljanja elektroda.

4.3.4. Patohistološka analiza

Prilikom žrtvovanja životinja uzet je 30 mm dugi isječak slabinske kralježnice u području postoperacijskog ožiljka i proksimalni cilinidar repa dužine 10 mm.

Navedeni dijelovi uloženi su u puferiranu otopinu formalina (pH 7.4) odmah po uzimanju iz netom žrtvovane životinje. Nakon završene fiksacije, navedeni dijelovi podvrgnuti su postupku dekalcinacije primjenom otopine klorne i mravlje kiseline. Po završenom postupku dekalcinacije iz uzoraka slabinske kralježnice izrezan je segment u području laminektomije, te dehidriran kroz niz alkohola. Potom je uklopljen u paraffin standardnom procedurom. Uzorci su narezivani na 5 µm debljine, fiksirani na predmetna stakalca, deparafinizirani, rehidrirani i bojani hemalaun-eozin i toluidine-blue tehnikom.

Uzorci repa su se nakon dekalcinacije impregnirali 1% otopinom osmij-tetraoksida kroz nekoliko dana, a po završetku ovog postupka stavljeni su u isti postupak dehidracije kroz niz alkohola i uklopljeni u parafin. Nakon toga su uzorci narezivani na 5 µm debljine, fiksirani na predmetna stakalca i deparafinizirani bez dodatnog bojanja. Mikroskopiranje su provela dva nepristrana patologa, kojima su predočena stakalca označena brojem bez spoznaje kojoj eksperimentalnoj skupini pripadaju.

Kralježnična moždina. Na malom povećanju 25x potvrđeno je pravilno uzimanje uzorka postojanjem ekstraspinalnog postlaminektomijskog vezivnog tkiva na mjestu gdje se očekuje koštana pločica kralješka (lamina vertebrae). Nakon potvrde kvalitetnog uzorka uz korištenje povećanja 312,5x kvantificirane su sljedeće histopatološke promijene: A. u području prednjih rogova i intermedijarne zone sive tvari: a. zone hemoragije; b. zone edema; c. gubitak motoneurona, B. u bočnoj i stražnjoj kolumni bijele tvari: a. zone hemoragije; b. vakuolizacija; c. gubitak aksona. Za semikvantitativnu ocjenu korištena je sljedeća ordinalna skala: 0 – nema specifične patološke promjene; 1 – sporadične patološke promjene u polju od interesa; 2 – patološka promjena prisutna u gotovo polovici polja od interesa; 3 – patološka promjena zauzima veći dio polja od interesa.

Kaudalni živac repa. Na malom povećanju 25x određena je pozicija svakog od četiri kaudalna živca, a zatim je na povećanju 500x pripremljen prikaz sredine svakog živca. Upotrebom CCD (engl. charge-coupled device) kamere koja je

postavljena na svjetlosni mikroskop digitalizirana je patohistološka slika. Zatim je učinjena histomorfometrijska analiza na PC računalu korištenjem programa ISSA (Vamstec, Zagreb, Hrvatska). Mjerenje je provedeno na svakom od četiri kaudalna živca u reprezentativnom kvadratnom polju interesa površine 5.000 μm^2. Nepristrani patolog je izmjerio okomiti promjer svakog mijeliniziranog živčanog vlakna u polju od interesa. Prijenosom podataka iz ISSA programa u program tabličnog kalkulatora (Microsoft® Office Excel® 2007, USA) i korištenjem matematičkih formula izračunat je ukupan broj mijeliniziranih živčanih vlakana na 10.000 μm^2 živca, broj mijeliniranih živčanih vlakana promjera manjeg od 7 μm na 10.000 μm^2 živca i prosječan promjer mijeliniziranih živčanih vlakana izražen u μm.

4.4. Statističke metode

Za analizu podataka s ordinalnim vrijednostima napravljena je deskriptivna statistika s prikazom medijana, minimalne i maksimalne vrijednosti. Za analizu razlike između svih grupa korišten je Kruskal-Wallis ANOVA test, a vrijednosti $p<0.05$ smatrane su statistički značajnima. Analiza razlike pentadekapeptidom tretiranih skupina prema tretiranoj kontroli provedena je Mann-Whitney U testom uz Bonfferoni korekciju tako da su vrijednosti $p<0.025$ smatrane značajnima.

Za analizu podataka s omjernim vrijednostima napravljena je deskriptivna statistika s prikazom aritmetičke sredine i standardne devijacije. Za analizu razlike između svih skupina korišten je jednosmjerni ANOVA test. Analiza razlike pojedinih skupina prema tretiranoj kontroli provedena je LSD testom. Vrijednosti $p<0.05$ smatrane su značajnima.

U analizi je korišteno PC računalo s programom Statistica for Windows verzija 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa OK, USA). Podaci su prikazani tablično i grafički.

5. Rezultati

5.1. Rezultati ispitivanja motorike repa

Tablica 2. Motorna funkcija repa izražena ordinalnom skalom brojevima od 0 do 5 (vidi pogl. 4.3.2.) prema danima nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine. min – minimalna vrijednost; med – medijan; max – maksimalna vrijednost; d – dana nakon ozljede; * statistički značajna razlika usporedbom pojedine pentadekapeptid skupine s kontrolnom skupinom.

		vrijeme nakon kirurškog zahvata								
skupina		0 d	1 d	4 d	7 d	15 d	30 d	90 d	180 d	360 d
Natrij klorid	min	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0,9%	med	1	1	1	1	1	2	2	2	2
5 ml/kg t.t. i.p.	max	2	2	2	2	3	3	3	3	4
Pentadekapeptid	min	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**	**3**	**3**	**3**	**3**
BPC 157	med	**2***	**2***	**2***	**2***	**3***	**3***	**4***	**4***	**4***
200 ug/kg t.t. i.p.	max	**2**	**3**	**3**	**3**	**4**	**4**	**5**	**4**	**5**
Pentadekapeptid	min	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**	**3**	**3**	**3**	**3**
BPC 157	med	**2***	**2***	**2***	**2***	**3***	**3***	**3***	**4***	**4***
2 ug/kg t.t. i.p.	max	**2**	**3**	**3**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**5**

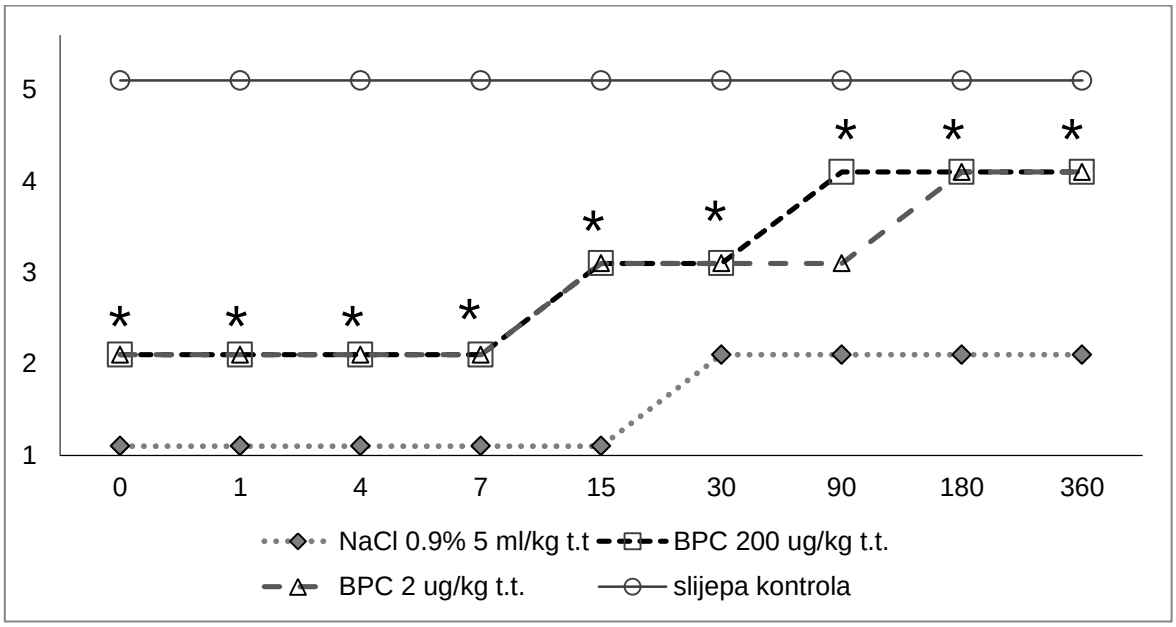
Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđena je statistički značajna razlika u motornoj funkciji repa između svih skupina u vremenima 0, 1, 4, 7, 15, 30, 90, 180 i 360 dana. Mann-Whitney U testom potvrđena je razlika pri usporedbi svake pentadekapeptide BPC 157 grupe s kontrolnom skupinom u vremenima 0, 1, 4, 7, 15, 30, 90, 180 i 360 dana.

Tablica 3. Spasticitet repa izražen ordinalnom skalom brojevima od 1 do 5 modificiranom skalom po Bennettu (vidi pogl. 4.3.2.) prema danima nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine. min – minimalna vrijednost; med – medijan; max – maksimalna vrijednost; d – dana nakon ozljede; * statistički značajna razlika usporedbom pojedine pentadekapeptid skupine s kontrolnom skupinom.

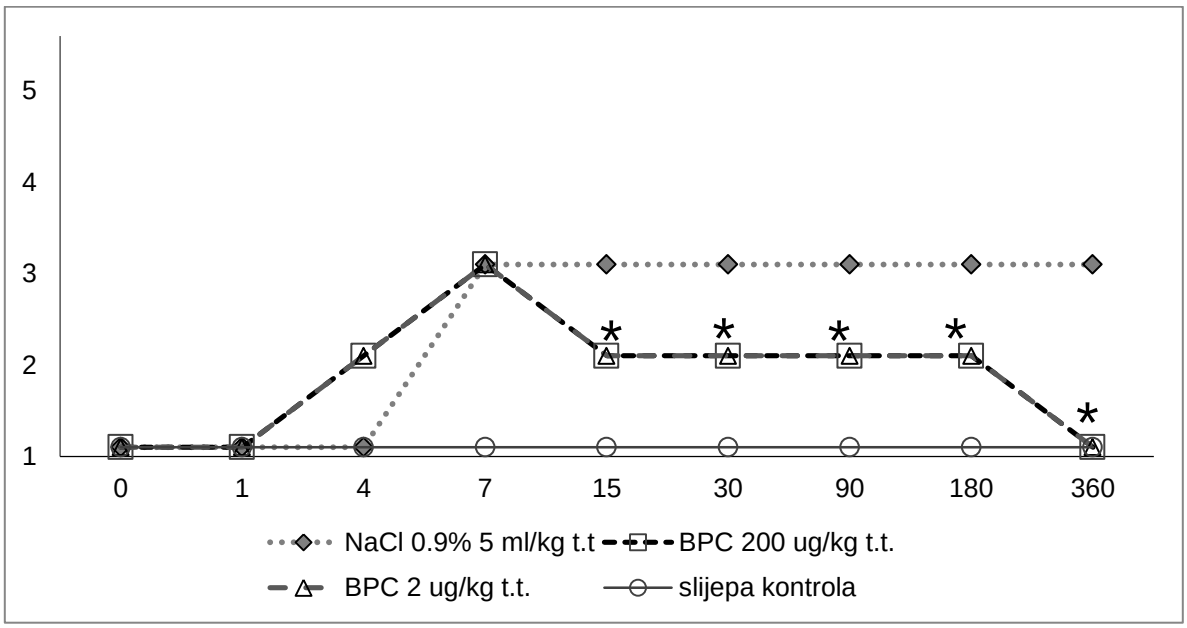
		vrijeme nakon kirurškog zahvata								
		0 d	1 d	4 d	7 d	15 d	30 d	90 d	180 d	360 d
Natrij klorid	min	1	1	1	2	3	2	2	2	1
0,9%	med	1	1	1	3	3	3	3	3	3
5 ml/kg t.t. i.p.	max	1	1	2	3	3	3	3	3	3
Pentadekapeptid	min	1	1	1	2	**2**	**1**	**1**	**1**	**1**
BPC 157	med	1	1	2	3	**2***	**2***	**2***	**2***	**1***
200 ug/kg t.t. i.p.	max	1	1	2	3	**3**	**2**	**2**	**2**	**2**
Pentadekapeptid	min	1	1	1	2	**2**	**1**	**1**	**1**	**1**
BPC 157	med	1	1	2	3	**2***	**2***	**2***	**2***	**1***
2 ug/kg t.t. i.p.	max	1	1	2	3	**3**	**3**	**2**	**2**	**2**

Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđena je statistički značajna razlika u spasticitetu repa između svih skupina u vremenima 15, 30, 90, 180 i 360 dana. Mann-Whitney U testom potvrđena je razlika pri usporedbi svake pentadekapeptide BPC 157 grupe s kontrolnom skupinom u vremenima 15, 30, 90, 180 i 360 dana.

Slika 14. Grafički prikaz medijana motorne funkcije repa prema danima nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine. Vrijednosti na ordinati predstavljaju ordinalnu skalu motorike repa (vidi pogl. 4.3.2.). Vrijednosti na apscisi predstavljaju dane od ozljede kralježnične moždine. * statistički značajna razlika komparacijom pojedine pentadekapeptide BPC 157 skupine s kontrolnom skupinom.



Slika 15. Grafički prikaz medijana spasticiteta repa izražena ordinalnom skalom brojevima od 1 do 5 modificirane skale prema Bennettu (vidi pogl. 4.3.2.) prema danima nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine. Vrijednosti na ordinati predstavljaju ordinalnu skalu modificirane skale prema Bennettu (vidi pogl. 4.3.2.). Vrijednosti na apscisi predstavljaju dane nakon ozljede kralježnične moždine. * statistički značajna razlika komparacijom obje pentadekapeptide BPC 157 skupine s NaCl skupinom.



5.2. Rezultati elektromiografije

Tablica 5. Amplituda mišićnog potencijala u mikrovoltima (μV) kod voljne elektromiografije prikazana po vremenima žrtvovanja nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine; ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija; * statistički značajna razlika usporedbom pojedine pentadekapeptid BPC 157 skupine s kontrolnom skupinom; + statistički značajna razlika usporedbom pojedine pentadekapeptid BPC 157 skupine ili kontrolne skupine s kirurškom kontrolom.

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana			
Skupina		0	30	90	180	360
zdrava kontrola (bez terapije)	ars sd	100 36				
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t. i.p.	ars sd		367 52	387 61	525 337	**457 +** **174**
Pentadekapeptid BPC 157 200 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		350 205	**242 *** **49**	333 207	**300 * +** **65**
Pentadekapeptid BPC 157 2 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		**167 *** **26**	**250 *** **71**	308 204	**279 * +** **70**
slijepa kontrola (laminektomija)	ars sd					125 29

Sve tretirane skupine pokazuju povišenu amplitudu mišićnog potencijala voljne elektromiografije u svim vremenima mjerenja. Kontrolna NaCl skupina pokazuje najviše vrijednosti mišićnog potencijala u svim vremenima mjerenja. Analizom varijance potvrđena je razlika među skupinama u vremenima 30, 90 i 360 dana. Analiza korištenjem LSD testa potvrdila je značajno manju amplitudu mišićnih potencijala pri usporedbi skupine pentadekapeptide BPC 157 200 μg/kg s

kontrolnom skupinom tretiranom s NaCl 0,9% u vremenima 90 i 360 dana, te pri usporedbi skupine pentadekapeptide BPC 157 grupe 2 µg/kg s kontrolnom skupinom tretiranom s NaCl 0,9% u vremenima 30, 90 i 360 dana. Analiza korištenjem LSD testa potvrdila je i značajno više vrijednosti amplitude mišićnih potencijala u svih tretiranih skupina prema slijepoj kontroli 360 dana nakon ozljede.

Tablica 6. Gustoća mišićnih potencijala izražena kao broj potencijala u 100 ms kod voljne elektromiografije prikazan po vremenima žrtvovanja nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine; ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija.

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana			
Skupina		0	30	90	180	360
zdrava kontrola (bez terapije)	ars sd	5,0 0				
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t. i.p.	ars sd		7,3 1,9	6,4 2,0	5,0 2,3	5,9 2,9
Pentadekapeptid BPC 157 200 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		10,7 3,4	6,0 1,9	8,3 2,7	8,1 3,0
Pentadekapeptid BPC 157 2 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		12,7 4,8	5,0 1,8	7,5 2,7	7,3 2,4
slijepa kontrola (laminektomija)	ars sd					5,0 0

Sve tretirane skupine pokazuju blago povišenje gustoće mišićnih potencijala u 100 ms prikaza u komparaciji sa zdravom i slijepom kontrolom. Analizom varijance u svim vremenima mjerenja nije potvrđena statistički značajna razlika među skupinama u svim vremenima mjerenja.

Tablica 7. Amplituda MAP-a u milivoltima (mV) kod stimulacijske elektromiografije kaudalnog živca repa proksimalnim parom igala po vremenima žrtvovanja nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine; ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija.

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana			
Skupina		0	30	90	180	360
zdrava kontrola (bez terapije)	ars sd	3,0 0,8				
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t. i.p.	ars sd		3,8 1,2	3,0 1,0	3,0 1,8	2,9 1,2
Pentadekapeptid BPC 157 200 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		3,3 1,3	4,3 3,0	2,8 2,2	2,6 1,5
Pentadekapeptid BPC 157 2 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		2,9 0,9	1,9 0,8	3,2 2,1	2,4 1,0
slijepa kontrola (laminektomija)	ars sd					3,3 1,3

Sve tretirane skupine imaju slične vrijednosti amplitude MAP-a kao i zdrava i slijepa kontrola. Analizom varijance nije potvrđena razlika u amplitudi MAP-a u svim vremenima mjerenja.

Tablica 8. Brzina provođenja živčanog signala u m/s kod stimulacijske elektromiografije prema vremenima žrtvovanja nakon ozljede sakrokokcigealne kralježnične moždine; ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana			
Skupina		0	30	90	180	360
zdrava kontrola (bez terapije)	ars sd	37,0 6,2				
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t. i.p.	ars sd		38,3 13,5	35,5 11,8	34,8 10,5	36,0 10,4
Pentadekapeptid BPC 157 200 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		32,7 3,6	36,3 5,5	31,0 10,2	31,0 9,0
Pentadekapeptid BPC 157 2 ug/kg t.t. i.p.	ars sd		37,3 7,5	37,0 7,2	30,3 9,1	31,4 8,4
slijepa kontrola (laminektomija)	ars sd					40,8 11,2

Sve tretirane skupine imaju slične vrijednosti brzine provođenja kao i zdrava i slijepa kontrola. Analizom varijance nije potvrđena razlika brzine provođenja živčanog signala između skupina u svim vremenima mjerenja.

5.3. Rezultati histopatologije

5.3.1. Rezultati histopatologije kralježnične moždine

Tablica 9. Histopatološke promijene kralježnične moždine u sivoj tvari na mjestu ozljede: H – polja hemoragije; E – polja edema; N – gubitak motoneurona, semikvantitativno izražene brojevima od 1 do 3 (vidi pogl. 4.3.4.). min – minimalna vrijednost; med – medijan; max – maksimalna vrijednost; * statistički značajna razlika usporedbom obje pentadekapeptid skupine s kontrolnom NaCl skupinom.

		vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana																	
skupina		7			15			30			90			180			360		
		H	E	N	H	E	N	H	E	N	H	E	N	H	E	N	H	E	N
Natrij klorid	min	0	1	1	0	1	1	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3
0,9%	med	0	1,5	1,5	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3
5 ml/kg t.t. i.p.	max	0	2	2	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3
Pentadekapeptid	min	0	0	0	0	**0**	1	0	**0**	**0**	0	**1**	**0**	0	**1**	3	0	**2**	3
BPC 157	med	0	1	1	0	**1***	1	0	**1***	**1***	0	**1***	**0***	0	**1***	3	0	**2***	3
200 ug/kg t.t. i.p.	max	0	1	1	0	**1**	1	0	**3**	**3**	0	**1**	**2**	0	**1**	3	0	**2**	3
Pentadekapeptid	min	0	0	1	0	**0**	0	0	**1**	**1**	0	**1**	**0**	0	**1**	3	0	**2**	3
BPC 157	med	0	1	1	0	**0***	0	0	**2***	**2***	0	**1***	**0***	0	**1***	3	0	**2***	3
2 ug/kg t.t. i.p.	max	0	1	1	0	**2**	3	0	**2**	**2**	0	**1**	**2**	0	**3**	3	0	**2**	3

vrijeme nakon ozljede						vrijeme nakon ozljede				
skupina		10 minuta				Skupina		360 dana		
		H	E	N				H	E	N
incijalna	min	0	0	0		slijepa kontrola (laminektomija)	min	0	0	0
sekundarna	med	0	0	0			med	0	0	0
ozljeda	max	0	0	0			max	0	0	0

Kruskal-Wallis ANOVA testom NIJE potvrđena statistički značajna razlika polja hemoragije u sivoj tvari u svim vremenima. Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđena je statistički značajna razlika polja edema u sivoj tvari u vremenima 15,

30, 90, 180 i 360 dana nakon ozljede. Mann-Whitney U testom potvrđena je razlika pri usporedbi obje pentadekapeptide BPC 157 grupe s kontrolnom skupinom u vremenima 15, 30, 90 i 180 dana nakon ozljede. Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđena je statistički značajna razlika gubitka motoneurona u vremenima 30 i 90 dana. Mann-Whitney U testom potvrđena je razlika obje pentadekapeptide BPC 157 grupe s kontrolnom skupinom u vremenima 30 i 90 dana.

Tablica 10. Histopatološke promijene u bočnoj i stražnjoj kolumni bijele tvari kralježnične moždine na mjestu ozljede: H – polja hemoragije; C – vakuolizacija; N – gubitak aksona, semikvantitativno izražene brojevima od 1 do 3 (vidi pogl. 4.3.4.). min – minimalna vrijednost; med – medijan; max – maksimalna vrijednost;; * statistički značajna razlika usporedbom obje pentadekapeptid skupine s kontrolnom NaCl skupinom.

		vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana																	
Skupina		7			15			30			90			180			360		
		H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N
Natrij klorid	min	0	2	1	0	1	2	0	2	2	0	2	2	0	2	1	0	2	1
0,9%	med	0	2,5	2,5	0	3	3	0	2	3	0	2	3	0	2,5	3	0	2,5	3
5 ml/kg t.t. i.p.	max	0	3	3	0	3	3	0	2	3	0	2	3	0	3	3	0	3	3
Pentadekapeptid	min	0	**1**	0	0	**1**	**0**	0	**0**	**1**	0	**1**	**0**	0	**1**	**1**	0	1	**0**
BPC 157	med	0	**1***	2	0	**1***	**0***	0	**1***	**1***	0	**1***	**0***	0	**1***	**1***	0	2	**0***
200 ug/kg t.t. i.p.	max	0	**1**	2	0	**1**	**2**	0	**2**	**2**	0	**1**	**1**	0	**2**	**1**	0	2	**1**
Pentadekapeptid	min	0	**1**	0	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**	0	**1**	**0**	0	**1**	**1**	0	1	**0**
BPC 157	med	0	**1***	2	0	**1***	**0***	0	**1***	**1***	0	**1***	**0***	0	**1***	**1***	0	2	**0***
2 ug/kg t.t. i.p.	max	0	**1**	2	0	**1**	**2**	0	**2**	**2**	0	**1**	**1**	0	**2**	**1**	0	2	**1**

vrijeme nakon ozljede						vrijeme nakon ozljede				
skupina		10 minuta				Skupina		360 dana		
		H	C	N				H	C	N
incijalna	min	2	0	0		slijepa kontrola (laminektomija)	min	0	0	0
sekundarna	med	2,5	0	0			med	0	0	0
ozljeda	max	3	0	0			max	0	0	0

Kruskal-Wallis ANOVA testom NIJE potvrđena statistički značajna razlika polja hemoragije u bijeloj tvari u svim vremenima. Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđena je statistički značajna razlika vakuolizacije u bijeloj tvari u vremenima 7, 15, 30, 90 i 180 dana. Mann-Whitney U testom potvrđena je razlika pri usporedbi obje pentadekapeptide BPC 157 grupe s kontrolnom NaCl skupinom u vremenima 7, 15, 30, 90 i 180 dana. Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđena je statistički značajna razlika u gubitku aksona u vremenima 15, 30, 90, 180 i 360 dana. Mann-Whitney U testom potvrđena je razlika obje pentadekapeptide BPC 157 grupe s kontrolnom NaCl skupinom u vremenima 15, 30, 90, 180 i 360 dana.

5.3.2. Rezultati histopatologije kaudalnog živca repa

Tablica 11. Broj mijeliniziranih živčanih vlakana na 10.000 μm^2 površine kaudalnog živca proksimalnog dijela repa nakon ozljede sakrokokcigealne moždine. ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija; * statistički značajna razlika usporedbom obje pentadekapeptid BPC 157 skupine s kontrolnom NaCl skupinom;

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana					
Skupina		0 dana	7	15	30	90	180	360
zdrava kontrola	ars	129						
(bez terapije)	sd	23						
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t.	ars		126	138	179	163	112	131
i.p.	sd		12	10	20	22	9	54
Pentadekapeptid BPC 157	ars		128	143	166	158	**152 ***	151
200 ug/kg t.t. i.p.	sd		9	10	19	31	**33**	25
Pentadekapeptid BPC 157	ars		137	138	**149 ***	154	**144 ***	142
2 ug/kg t.t. i.p.	sd		21	13	**15**	31	**23**	23
slijepa kontrola	ars							135
(laminektomija)	sd							15

Analizom varijance potvrđena je razlika u broju mijeliniziranih živčanih vlakana na 10.000 μm^2 površine kaudalnog živca proksimalnog dijela repa u vremenima 30 i

180 dana nakon ozljede. Analiza korištenjem LSD testa potvrdila je značajnu razliku u broju mijeliniziranih živčanih vlakana pri usporedbi skupine pentadekapeptid BPC 157 200 µg/kg s kontrolnom NaCl skupinom u vremenu 180 dana. Analiza korištenjem LSD testa potvrdila je značajnu razliku u broju mijeliniziranih živčanih vlakana pri usporedbi skupine pentadekapeptid BPC 157 2 µg/kg s kontrolnom NaCl skupinom u vremenima 30 i 180 dana.

Tablica 12. Broj mijeliniziranih živčanih vlakana promjera manjeg od 7 µm na 10.000 μm^2 površine kaudalnog živca proksimalnog dijela repa nakon ozljede sakrokokcigealne moždine. ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija; + statistički značajna razlika usporedbom svih skupina s slijepom kontrolom;

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana					
Skupina		0 dana	7	15	30	90	180	360
zdrava kontrola	ars	57						
(bez terapije)	sd	17						
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t.	ars		82	124	160	144	92	98
i.p.	sd		16	18	20	15	14	66
Pentadekapeptid BPC 157	ars		85	124	127	139	121	**129 +**
200 ug/kg t.t. i.p.	sd		21	22	42	42	33	**21**
Pentadekapeptid BPC 157	ars		95	111	136	131	123	**124 +**
2 ug/kg t.t. i.p.	sd		43	29	17	35	27	**23**
slijepa kontrola	ars							**53**
(laminektomija)	sd							**18**

Analizom varijance potvrđena je razlika u broju mijeliniziranih živčanih vlakana promjera manjeg od 7 µm na 10.000 μm^2 površine kaudalnog živca proksimalnog dijela repa samo u vremenu 360 dana nakon ozljede. Analiza korištenjem LSD testa potvrdila je značajnu razliku u broju mijeliniziranih živčanih vlakana manjih od 7 µm pri usporedbi obje pentadekapeptid BPC 157 skupine s kirurškom kontrolom, ali ne pri usporedbi s NaCl kontrolom.

Tablica 13. Prosječan promjer mijeliniziranih živčanih vlakana kaudalnog živca proksimalnog dijela repa nakon ozljede sakrokokcigealne moždine. ars – aritmetička sredina; sd – standardna devijacija; * statistički značajna razlika usporedbom obje pentadekapeptid BPC 157 skupine s kontrolnom NaCl skupinom;

			vrijeme žrtvovanja nakon kirurškog zahvata / dana					
Skupina		0 dana	7	15	30	90	180	360
zdrava kontrola	ars	7,03						
(bez terapije)	sd	0,43						
Natrij klorid 0,9% 5 ml/kg t.t.	ars		6,21	4,80	5,15	5,18	5,39	6,00
i.p.	sd		0,32	0,64	0,27	0,24	0,29	1,06
Pentadekapeptid BPC 157	ars		6,16	5,52	5,57	5,17	5,45	**5,17 ***
200 ug/kg t.t. i.p.	sd		0,77	0,52	0,85	0,21	0,40	**0,25**
Pentadekapeptid BPC 157	ars		6,12	5,42	4,87	5,27	5,14	**5,06 ***
2 ug/kg t.t. i.p.	sd		0,91	0,43	0,29	0,38	0,45	**0,33**
slijepa kontrola	ars							7,55
(laminektomija)	sd							0,40

Analizom varijance potvrđena je razlika u prosječnom promjeru mijeliniziranih živčanih vlakana površine kaudalnog živca proksimalnog dijela repa samo u vremenu 360 dana nakon ozljede. Analiza korištenjem LSD testa potvrdila je razliku u prosječnom promjeru mijeliniziranih živčanih vlakana proksimalnog dijela repa pri usporedbi obje pentadekapeptid BPC 157 skupine s NaCl kontrolom u vremenima 360 dana.

6. Rasprava

Ozljeda KM je teška tjelesna ozljeda s dugotrajnim razvojem konačnog stanja. Pokretač je primarna ozljeda u kojoj neposredna fizička sila oštećuje tkivo KM nagnječenjem, razdorom, istezanjem ili presjecanjem, većinom bez potpunog prekida kontinuiteta moždine. No i manja primarna ozljeda izaziva lančanu rekaciju humoralnih i staničnih reakcija koje nazivamo sekundarna ozljeda. To je proces u kojem oštećena perfuzija moždine dovodi do ishemije tkiva, a poremećaj propusnosti krvno moždane barijere do edema i lokalnom elektrolitskog disbalansa. Proces se nastavlja stvaranjem slobodnih radikala i oštećenjem staničnih membrana procesom lipidne peroksidacije. Istovremeno se aktivira lokalni humoralni inflamatorni odgovor s produkcijom prostangladina i leukotriena te aktivacijom staničnog inflamatornog odgovora privlačenjem i aktivacijom makrofaga. Tako pokrenuti procesi u relativno malom volumenu dovode do oštećenja aksona i neurona primarno neoštećenih dijelova KM, a zatim demijelinizacije i formiranja cisti (2,3,8,22,23). Neurološka posljedica ovih zbivanja je oštećenje osjetne, motorne i autonomne funkcije živaca ispod nivoa ozljede. Neurološki poremećaj u početku može imati karakteristike potpune ozljede moždine zbog stanja spinalnog šoka, te se nakon 24-72 sata može odrediti razina i stupanj neurološkog oštećenja, a time i prognoza oporavka (18,19).

Proces sekundarne ozljede vremenski je podijeljen u perakutnu, akutnu, intermedijarnu i kroničnu fazu. U akutnoj fazi događa se najviše citotoksičnih zbivanja živčanog tkiva, a najbitniji procesi su povećanje koncentracije slobodnih radikala, izazivanje lipidne peroksidacije, zatim proteinske oksidacije, produkcija peroksinitrita, poremećaj ionske ravnoteže, disfunkcija mitohondrija, glutamatna citotoksičnost i poremećaj moždinske perfuzije. U tom periodu postoji mogućnost brojnih zaštitnih djelovanja koje u širom smislu nazivamo citoprotekcijom (5,8,21,36,38,39,42,46,89,92,93,94). U kliničkoj praksi za sada se primjenjuje samo glukokortikoid metilprednisolon u visokim dozama koje imaju dominantni

učinak na stabilizaciji membrana s inhibicijom lipidne peroksidacije, dok je antiinflamatorni učinak glukokortikoida manje bitan. Metilprednisolon ima najveću efikasnost ako se primjeni rano (do 3 sata od ozljede) i ako se terapija produži kontinuirano kroz 24 sata. Zbog brojnih komplikacija kod primjene glukokortikoida u visokim dozama, a relativno malog učinka na funkcionalno poboljšanje oštećenih živaca danas postoje brojne kontroverze oko primjene ovog lijeka kod ozljede KM. Tirilazad je sintetski derivat metilprednisolona koji djeluje istim mehanizmom i nema nuspojava glukokortikoida, ali za sada nije uveden u kliničku primjenu.

Slijedom navedenog, u ovom radu istraživan je učinak pentadekapeptida BPC 157 na ozljedu sakrokokcigealne KM mjerenjem funkcije repa, histopatologijom KM, histopatologijom kaudalnog živca repa i elektromiografskim promijenama u malim mišićima repa. Pentadekapeptid BPC 157 je primjenjen u dvije različite doze, jednokratno intraperitonealno, u perakutnoj fazi sekundarne ozljede.

Našim istraživanjem pokazali smo da pentadekapeptid BPC 157 značajno poboljšava motornu funkciju repa već od prvog dana nakon ozljede KM i da se taj učinak prati do godinu dana, što je i zadnji termin praćenja u ovom istraživanju. Progresija neurološkog oporavka u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine posebno se ističe od 15. dana nakon ozljede, a maksimum dostiže 180. dana nakon ozljede KM. U kontrolnoj NaCl skupini oporavak motorne funkcije repa počinje tek 30. dana uz manji dostignuti maksimum na kraju perioda praćenja.

U svim skupinama spasticitet srednjeg stupnja na modicifiranoj Bennettovoj skali (3 od maksimalnih 5 bodova) pojavljuje se 7. dana nakon ozljede KM. Već u 15. danu spasticitet se statistički značajno smanji u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine i ostaje smanjen do kraja perioda praćenja. U pokusima Bennetta i suradnika spasticitet visokog stupnja postiže se tek 15. dana nakon sekcije sakrokokcigealne moždine što objašnjavamo činjenicom da kod potpunog prekida kontinuiteta KM i stanja spinalnog šoka potrebno više vremena da se funkcija stanica ispod mjesta ozljede oporavi. U istom istraživanju spasticitet repa se ne mijenja ni nakon godinu dana praćenja dok je u ovoj studiji neurološki oporavak pratilo i smanjenje spasticiteta (66,67).

Mjerenje elektromiografije provedeno je u vremenima 30., 90., 180. i 360. dana nakon ozljede sukladno spoznaji da se prve elektromiografske promijene manifestiraju 3-4 tjedna nakon ozljede živčanog sustava (101). U voljnoj elektromiografiji pronađen je statistički značajan porast amplitude malih segmentnih mišića repa u svim vremenima tretiranih skupina u usporedbi sa zdravom i kirurškom kontrolom. Ovaj podatak potvrđuje proces prostorne kompenzacije sa stvaranjem gigantskih potencijala koji je zabilježen kod ozljede DMN, a što se može povezati s gubitkom motoneurona u ozlijeđenom dijelu KM. Obje skupine pentadekapeptida BPC 157 pri usporedbi s kontrolnom skupinom pokazuju manju prostornu kompenzaciju u 30., 90. i 360. danu, što govori u prilog manjeg gubitka motoneurona u ozlijeđenom dijelu KM. Treba napomenuti da je u istraživanju Bennetta i suradnika retrogradnim bojenjem dokazano da se motoneuroni malih segmetnih mišića repa nalaze u segmentima moždine S3 i S4. U istom radu je zabilježeno da se njihov broj nakon ozljede nije promijenio, što pokazuje da ozljeda sekcijom u S2 segmentu nije izazvala patološke promijene sive tvari susjednih segmenata (67). Nasuprot tome u kompresivnoj ozljedi S2 segmenta, kakva je primjenjena u ovom istraživanju, očekuje se oštećenje motoneurona susjednih segmenata.

Rezultati stimulacijske elektromiografije se ne razlikuju pri usporedbi tretiranih skupina sa zdravom i kirurškom kontrolom. Taj podatak isključuje proces demijelinizacije motornih aksona kaudalnog živca repa kao posljedicu oštećenja motoneurona u KM. Spominjemo da su brzine provođenja u svim su skupinama sporije (31-41 m/s) nego što se očekuje u A-alfa i A-beta motornim aksonima (50-70 m/s). Usporenu brzinu provođenja nalazi i Bennett sa suradnicima, a razlog je hladnija temperatura repa nego tijela, što usporava perifernu brzinu provođenja (67). Sukladno svemu navedenom parametri stimulacijske elektromiografije nisu dali puno novih informacija vezano uz ozljedu KM, te se ne planiraju koristiti u budućim istraživanjima. U budućim istraživanjima treba razmotriti moguću upotrebu elektromiografskog mjerenja refleksa segmentnih mišića repa nakon kaudalne

ponavljane submaksimalne stimulacije i kondicionirani refleks segmentnih mišića repa po preporuci Bennetta i suradnika (67).

Histopatološke promijene u preparatima KM promatrane su u području prednjeg roga i intermedijarne zone sive tvari te u području bočne i stražnje kolumne bijele tvari. Incijalna histopatološka promijena nakon ozljede KM vidljiva je u skupini incijalne sekundarne ozljede koja je žrtvovana 10 minuta po ozljedi KM. U ovoj skupini nalazimo u bočnoj i stražnjoj kolumni bijele tvari brojna polja mikrohemoragija, dok drugih promijena bijele i sive tvari nije nađeno. Hemoragijske promjene karakteristične su za perakutnu fazu sekundarne ozljede. U literaturi se spominje da u ovoj fazi sekundarne ozljede postoje zone hemoragije sive tvari što u ovom istraživanju nije bilo vidljivo (3,20).

Zone hemoragije bočne i stražnje kolumne bijele tvari od 7. dana nisu više uočene, ali se istim mjestima u svim praćenim vremenima pojavljuju vakuolizacije i gubitak aksona koje progresivno rastu do kraja perioda praćenja. Statistički je potvrđeno manje vakuolizacije u vremenima 7, 15, 30, 90 i 180 dana u obje pentadekapeptide BPC 157 skupine, kao i statistički značajno manji gubitak aksona u vremenima 15, 30, 90, 180 i 360 dana u obje pentadekapeptide BPC 157 skupine. Hemoragijske promijene sive tvari nisu nađene do kraja perioda praćenja. Nasuprot tome edem sive tvari i gubitak motoroneurona nastupa već od 7. dana, a progresija je vidljiva do kraja perioda praćenja. Statistički je potvrđeno značajno manje edema sive tvari u vremenima 15, 30, 90 i 180 dana u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine, te statistički značajno manje gubitka motoneurona u 30 i 90 dana u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine.

Histopatologijom kaudalnog živca repa uočeno je konzistentno povećanje ukupnog broja mijeliniziranih vlakana u 30., 90., i 180. danu u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine, dok je povećanje ukupnog broja mijeliniziranih vlakana u kontrolnoj NaCl grupi uočeno 30. i 90. dana. Značajno veći ukupni broj mijeliniziranih vlakana potvrđen je statistički u 30. i 180. danu u pentadekapeptid BPC 157 skupine. Mjerenjem broja mijeliniziranih vlakana promjera < 7μm uočeno je povećanje broja manjih mijeliniziranih aksona u svim tretiranim skupinama, a povećanje je značajno

veće u pentadekapeptid BPC 157 skupini u 360. danu. Mjerenjem prosječnog promjera mijeliniziranih vlakana pokazano je blago smanjenje prosječnog promjera u svim tretiranim skupinama uz statistički značajno manji promjer u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine u 360. danu.

U ovom su istraživanju uočene, u dostupnoj literaturi dosada neopisane, promijene broja aksona u perifernom živcu nakon ozljede KM. U svim tretiranim skupinama nalazimo malo, ali konzistentno povećanje ukupnog broja aksona u kaudalnom živcu repa (16%) u komparaciji sa zdravom kontrolom. Još je izraženije povećanje broja manjih mijeliniziranih vlakana promjera < 7μm (210%). Elektrofiziološke promjene mišićnog potencijala pokazuju smanjeni broj motoneurona (prostorna kompenzacija mišićnog potencijala), a nepromijenjenu brzinu provođenja mišićnog potencijala (što se očekuje uz povećan broj manjih aksona). Stoga se može zaključiti da povećani broj manjih aksona pripada aferentnim vlaknima, a po veličini promjera < 7μm vlakna tipa A-gama i A-delta. To mogu biti aferenta vlakna mišićnih vretena, grubog dodira ili boli, a što svakako utječe na promijenu spasticiteta. Ovo otvara nova pitanja o mogućim kompenzatornim zbivanjima u dorzalnim ganglijima kao posljedica ozljede neuronskih krugova na nivou KM, što postavlja potrebu za daljim istraživanjima.

Uzimajući u obzir sve navedene činjenice možemo potvrditi hipotezu da je pentadekapeptid BPC 157, primjenjen intraperitonealno 10 minuta nakon ozljede KM, pokazao bolji i brži neurološki oporavak motoričke funkcije repa. Provjera specifičnih ciljeva:

a. potvrđen je učinak pentadekapeptida BPC 157 u obje primjenjene doze 2 μg/kg ili 200 μg/kg;
b. potvrđen je bolji i brži oporavak motorike repa i manji spasticitet mišića repa;
c. neuroprotektivan učinak je potvrđen s manje vakuolizacije bijele tvari moždine i manje gubitaka aksona bijele tvari moždine, a u sivoj tvari smanjenjem edema;

d. povećanje ukupnog broja aksona u kaudalnom živcu repa veće je u pentadekapeptid BPC 157 skupinama, ali uz neočekivano povećanje broja mijeliniziranih aksona promjera < 7μm u svim tretiranim skupinama, ova promijena zahtjeva dalja istraživanja
e. prostorna kompenzacija motoneurona manja je u obje pentadekapeptid BPC 157 skupine, a znakova demijelinizacije motornih vlakana nema.

Potencijalni mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157 spominjan je već u radu Tudora i suradnika s utjecajem na traumatsku ozljedu mozga miša gdje, kao i u ozljedi KM, primarnu ozljedu prati sekundarna ozljeda. U tom radu potvrđeno je smanjenje edema, broja i veličine hemoragijskih laceracija u primjeni pentadekapeptida BPC 157 30 minuta prije ozljede mozga ili neposredno prije ozljede mozga (10). Potencijalni mehanizam djelovanja je: propusnost krvno-moždane barijere, kemotaksija leukocita, inflamatorni citokini, putem NO sustava - signalne vazoaktivne molekule, te utjecaj na stvaranje slobodnih radikala kisika (12,13,82,85,86). Obzirom na ranije istaknutu važnost NOS i posljedično formiranje slobodnih radikala te pokretanje procesa LP u procesu sekundarne ozljede KM, najvjerojatniji mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157 je putem smanjenja stvaranja slobodnih radikala kisika i/ili blokiranja procesa LP, a manje očekivan je antiinflamatorni učinak. Pretpostavljeno djelovanje je slično opisanom efektu visokih doza metilprednisolona. Za temeljiti dokaz mehanizma djelovanja potrebna su dalja istraživanja.

Napominjeno da su svi neuroprotektivni učinci nastupili nakon samo jedne intraperitonealne primjene pentadekapeptida BPC 157, ali u perakutnoj fazi. Postavlja se potreba za daljnjim istraživanjima primjenom pentadekapeptida BPC 157 u kasnijoj fazi sekundarne ozljede, ali i s produženom primjenom.

7. Zaključak

Pentadekapeptid BPC 157, primjenjen intraperitonealno samo jednom - 10 minuta nakon ozljede sakrokokcigealne KM, u dozi 2 μg/kg ili 200 μg/kg, pokazao je bolji i brži neurološki oporavak motorne funkcije repa i manji spasticitet repa nego kontrolna skupina. Neuroprotektivan učinak potvrđen je histopatološki manjim brojem cističnih promijena bijele tvari moždine, manjim brojem nekroza aksona u bijeloj tvari moždine i manjim edemom sive tvari moždine od 15. dana nakon ozljede KM do kraja praćenja. Zbog toga vjerujemo da bi ovakav zaštitni učinak bio prisutan i kod primjene u drugim nivoima ozljede KM.

Potencijalni mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157 u ovom istraživanju nije potvrđen, ali se prema pokazanim histopatološkim promijenama moždine pretpostavlja da djeluje na endogene procese sekundarne ozljede što uključuje smanjenje propusnosti krvno moždane barijere, učinak na stvaranje slobodnih radikala kisika i LP putem NO sustava, kemotaksija leukocita, smanjenje količine inflamatornih citokina...

U ovom istraživanju uočene su, dosada neopisane, histopatološke promijene perifernog živca. Kao posljedica ozljede KM u kaudalnom živcu repa povećan je ukupan broja mijeliniziranih aksona nakon ozljede KM za 16% i mijeliniziranih vlakana promjera < 7μm za 210%. Na temelju uredne brzine provodljivosti mišićnih aksona istog živca pretpostavljamo da je povećan broj aferentnih aksona tipa A-gama ili A-delta. Na temelju tih spoznaja postavlja se potreba za novim istraživanjima o promjenama u dorzalnim ganglijima nakon ozljede KM.

Zbog jednokratne primjene pentadekapeptida BPC 157 u perakutnoj fazi sekundarne ozljede KM, postavlja se potreba za daljnjim istraživanjima primjenom pentadekapeptida BPC 157 u kasnijoj akutnoj fazi sekundarne ozljede s produženom primjenom.

8. Sažetak

Uvod. Ozljeda kralježnične moždine je teška tjelena ozljeda s trajnim invaliditetom. Dosadašnja istraživanja potvrdila su pozitivan učinak pentadekapeptida BPC 157 na traumatsku ozljedu mozga.

Cilj. Utvrđivanje učinka pentadekapeptida BPC 157 na neurološko oštećenje kod ozljede kralježnične moždine.

Materijali i metode. U duboko anesteziranih muških Wistar Albino štakora nakon laminektomije L2-L3 tehnikom kompresije neurovaskularnom klipsom 60-66 g trajanja 60 s učinjena je ozljeda sakrokokcigealne kralježnične moždine. BPC 157 je primjenjen samo jednom - 10 minuta nakon ozljede sakrokokcigealne KM, u dozi 2 μg/kg ili 200 μg/kg, a NaCl 5 ml/kg. Životinje su žrtvovane 7, 15, 30, 90, 180 i 360 dana nakon ozljede. Praćena je motorika i spasticitet repa, histopatologija moždine i repa i elektromiografija repa.

Rezultati. BPC 157 je pokazao bolji i brži neurološki oporavak motorne funkcije repa i manji spasticitet repa. Histopatologijom moždine nalazi se manje edema u sivoj tvari moždine, te manje cističnih promijena i manje gubitaka aksona u bijeloj tvari moždine od 15. dana do kraja praćenja. Histopatologijom repa potvrđen je povećan broj malih aksona u svim skupinama, što je neočekivani rezultat.

Zaključak. BPC 157 primjenjen u perakutnoj fazi sekundarne ozljede kralježnične moždine pokazuje značajan neuroprotektivni učinak. Planiran je nastavak istraživanja s primjenom BPC 157 u kasnijoj fazi sekundarne ozljede.

Ključne riječi: ozljeda kralježnične moždine, sekundarna ozljeda, BPC 157

9. Abstract

Sacrococcygeal Spinal Cord Injury in Rat – therapeutic effect of pentadecapeptide BPC 157

Darko Perović

Zagreb 2014.

Background. Spinal cord injury is devastating lesion with life time disability. Previously pentadecapeptide BPC 157 exhibited a healing effect on brain traumas.
Aim. To verify influence of pentadecapeptide BPC 157 on rat spinal cord injury.
Material and methods. Deeply anaesthetized Wistar Albino male rats were subjected to surgery with injury: after laminectomy L2-L3 60 second compression with neurosurgical piston (60-66 g) on exposed dural sac. One single medication (IP) (saline 5ml/kg; pentadekapeptide BPC 157 200ug/kg; 2 ug/kg) was 10 min post-injury and sacrifice was at 7, 15, 30, 90, 180 and 360 days. Spinal cord injury was followed with tail motor function, histology of spinal cord and tail and electromyography.
Results. BPC 157 rats have significantly higher motor score and in all followed time and less spasticity from 4 weeks till the end. From 2 weeks BPC 157 rats have less grey matter edema and less cyst and axonal necrosis in white matter of spinal cord. All treatment groups show increased number of small axons starting from 2 weeks witch is unexpected finding.
Conclusion. Given only once immediately after spinal cord injury, pentadecapeptide BPC 157 show strong neuroprotective effect. Further studies with markedly postponed administration of BPC 157 are required.

Keywords: spinal cord injury, secondary injury, pentadecapeptide BPC 157

10. Popis citirane literature

1. Schnurrer-Luke-Vrbanić T, Moslavac S, Džidić I. Rehabilitacija bolesnika s ozljedom kralježnične moždine. Med flumin 2012; 48:366-79.
2. Sekhon L, Fehlings MG. Epidemiology, Demographics and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. Spine 2001; 26Suppl 24:2-12.
3. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg 1991;75:15–26.
4. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. N engl J Med 1990;322:1405-11.
5. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA 1997;277:1597–604.
6. Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury: a systematic review from a clinical perspective. Spinal Cord 2000; 38:273–86.
7. Del Rosario Molano M, Broton JG, Bean JA, Calancie B. Complications associated with th prophylactic use of methylprednisokone during surgical stabilisation after spinal cord injury. J Neurosurg 2002;96Suppl 3:267-72.
8. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and Acute Spinal Cord Injury: A Reappraisal. NeuroRx 2004; 1: 80-100.
9. Sikirić P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, Turković B, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M, et al. 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.

10. Tudor M, Jandric I, Marovic A, Gjurasin M, Perovic D, Radic B, Boban Blagaic A, Kolenc D, Brcic L, Zarkovic K, Seiwerth S, Sikiric P. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. Reg Peptides 2010; 160:26-32.
11. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, Kolenc D, Radic B, Seiwerth S, Sikiric P. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. Reg Peptides 2010; 160:33-41.
12. Grabarević Z, Tišljar M, Artuković B, i sur. The influence of BPC-157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. J Physiol Paris 1997; 91:139-49.
13. Klicek R, Sever M, Radic B, i sur. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in healing of colocutaneous fistulas in rats:role of nitric oxide-system. J Pharmacol Sci 2008;108:7-17.
14. Marinković S, Ilić A, Milisavljević M, ur. Funkcionalna i topografska neuroanatomija. Beograd: Savremena administracija; 1988, str. 51-65.
15. Fizgerald MJT. Neuroanatomy: Bacis and clinical. 2. izd. London: Bailliere Tindall; 1992, str. 77-109.
16. Ditunno JF, Little JW, Tessler A. Spinal shock revisited: a four–phase model. Spinal Cord 2004;42:383-95.
17. Zurak N, Brinar V, Božićević D, ur. Neurologijska propedeutika. Zagreb: MTT-ZAGREB; 1992, str. 19-64.
18. American Spinal Injury association. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury. Chicago: ASIA; 2002.
19. Bryce TN, Ragnarsson T, Stein AB. Spinal Cord Injury. U: Braddom RL, ur. Physical medicine and rehabilitation. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007; str. 1285-349.

20. Salewski R. Emrani H, Fehlings M. Neural stem / progenitor cells for spinals cord regeneration. U: Wislet-Gendebien S, ur. Trends in cell signaling pathways in neuronal fate decision. InTech; 2013. str. 271-304.
21. Yang L, Jones NR, Blumbergs PC, i sur. Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. J Clin Neurosci. 2005;12:276-84.
22. Bareyre FM, Schwab M. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. Trends Neurosci 2003;26:555-63.
23. Hall ED. Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. Neurotherapeutics 2011;8:152-67.
24. Ek CJ, Habgood MD, Dennis R, i sur. Pathological changes in the white matter after spinal contusion injury in the rat. PLOS One 2012;7:e43484.
25. Allen AR. Surgery for experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report. JAMA 1911;57:878–80.
26. Fehlings MG, Perrin RG. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence. Spine (Phila Pa 1976) 2006;31Suppl 11:28-35.
27. Cadotte DW, Singh A, Fehlings MG. The timing of surgical decompression for spinal cord injury. Med Rep. 2010;2:67.
28. Hall ED, Braughler JM. Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the in vitro peroxidation of cat spinal cord tissue. Exp Neurol 1981;73:321–4.
29. Hall ED, Braughler JM. Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surg Neurol* 18:320–327, 1982.
30. Holtz A, Nystrom B, Gerdin B. Effect of methylprednisolone on motor function and spinal cord blood flow after spinal cord compression in rats. Acta Neurol Scand 1990;82:68–73.

31. Fehlings MG. Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. 2001;26Suppl 24:55.
32. Fehlings MG. Editorial: recommendations regarding the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury: making sense out of the controversy. Spine 2001;26Suppl 24:56–7.
33. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. Exp Neurol 1994;126:61–75.
34. Holaday JW, Faden AI. Naloxone treatment in shock. Lancet 1981;2:201.
35. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal cord injury - a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. N Engl J Med 1991;324:1829–38.
36. Bardakci H, Kaplan S, Karadeniz U, i sur. Methylene blue decreases ischemia-reperfusion (I/R) - induced spinal cord injury: an in vivo study in an I/R rabbit model. Eur Surg Res 2006;38:482-8.
37. Kaptanoglu E, Caner HH, Surucu HS, Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. J Neurosurg 1999;91:200-4.
38. Kaptanoglu E, Sen S, Beskonakli E, i sur. Antioxidant actions and early ultrastructural findings of thiopental and propofol in experimental spinal cord injury. J Neurosurg Anesthesiol 2002;14:114-22.
39. Kayali H, Ozdag MF, Kahraman S, i sur. The antioxidant effect of beta-Glucan on oxidative stress status in experimental spinal cord injury in rats. Neurosurg Rev 2005;28:298-302.
40. KaynarMY, Erdincler P, Tadayyon E, Belce A, Gumustas K, Ciplak N. Effect of nimodipine and N-acetylcysteine on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. Neurosurg Rev 1998;21:260-4.
41. Luo J, Borgens R, Shi R. Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. J Neurochem 2002;83:471-480.

42. Diaz-Ruiz A, Rios C, Duarte I, i sur. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett 1999;266:61-4.
43. McEwen ML, Sullivan PG, Springer JE. Pretreatment with the cyclosporin derivative, NIM811, improves the function of synaptic mitochondria following spinal cord contusion in rats. J Neurotrauma 2007;24:613-24.
44. Ravikumar R, McEwen ML, Springer JE. Post-treatment with the cyclosporin derivative, NIM811, reduced indices of cel death and increased the volume of spared tissue in the acute period following spinal cord contusion. J Neurotrauma 2007;24:1618-30.
45. Yazihan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. Injury 2008;39:1408-13.
46. Toklu HZ, Hakan T, Celik H, i sur. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. J Spinal Cord Med;33:401-9.
47. Tonai T, Taketani Y, Ohmoto Y, Ueda N, Nishisho T, Yamamoto S. Cyclooxygenase-2 induction in rat spinal cord injury mediated by proinflammatory tumor necrosis factor-alpha and interleukin. Adv Exp Med Biol 2002;507:397–401.
48. Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. Brain Res Rev 2003;42:169–85.
49. Faden AI, Sacksen I, Noble LJ. Structure-activity relationships of TRH analogs in rat spinal cord injury. Brain Res 1998;448:287–93.
50. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Rew of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. J Neurotrauma 2000;17: 915–25.
51. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD- specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. EMBO J 1998;17:37–49.

52. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrialprotein that promotes cytochrome c - dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000;102:33–42.
53. Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. Exp Neurol 2002;177:306–13.
54. Spiegel AM. The stem cell wars: a dispatch from the front. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2013;124:94-110.
55. Kadota R, Koda M, Kawabe J, i sur. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. PLoS One. 2012;7:e50391.
56. Kruse F, Bosse F, Vogelaar CF, i sur. Cortical gene expression in spinal cord injury and repair: insight into the functional complexity of the neural regeneration program. Front Mol Neurosci. 2011;4:1-16.
57. Wang H, Fang H, Dai J, Liu G, Xu ZJ. Induced pluripotent stem cells for spinal cord injury therapy: current status and perspective. Neurol Sci. 2013;34:11-7.
58. Lu P, Blesch A, Graham L i sur. Motor Axonal Regeneration after Partial and Complete Spinal Cord Transection. The Journal of Neuroscience, 2012;32:8208–18.
59. Eidelberg E, Staten E, Watkins JC. A model of spinal cord injury. Surg Neurol 1976;6:35-38.
60. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. Surg Neurol 1978;10:39-43.
61. Iizuka H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Konno H, Kadoya S. Experimental spinal cord injury: quantitaion of axonal damage by automated image analysis. J Neurosurg. 1986;64:304-8.
62. Colak A, Soy O, Uzun H, i sur. Neuroprotective effect of GYKI 52466 on experimental spinal cord injury in rats. J Neurosurg 2003;98:275-81.

63. Fehlings MG, Tator CH, Linden RD, Piper IR. Motor Evoked Potentials Recorded from Normal and Spinal Cord-injured Rats. Neurosurgery 1987;20:125-9.
64. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. J Neurosurg 1977;47:577-81.
65. Fehling MG, Tator CH, Linden D, Piper IR. Motor and somatosensory evoked potentials recorded from the rat. Electroenc and clin Neurophysiol 1988;69:65-78.
66. Bennett DJ, Gorassini M, Fouad K, Sanelli L, Han Y, Cheng J. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. J Neurotrauma 1999;16:69-84.
67. Bennett DJ, Sanelli L, Cooke CL, Harvey PJ, Gorassini MA. Spastic Long-Lasting Reflexes in the Awake Rat After sacral Spinal Cord Injury. J Neurophysiol 2004;91:2247-58.
68. Molander C, Grant G. The Cytoarchitectonic Organization of the Spinal Cord in the Rat. I. The Lower Thoracic and Lumbosacral Cord. J of comp Neurol 1984; 230:133-141.
69. Sikirić P, Petek M, Ručman R, I sur. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effect of BPC. J Physiol 1993;87:313-27.
70. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. The beneficial effect of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. Life Sci 1994;54:63–8.
71. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, i sur. Beneficial effect of novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin,and capsaicin neurotoxicity. Dig Dis Sci 1996;41:1604–14.
72. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, i sur. Salutary and prophylactic effect of pentadekapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant

gastroduodenal lesions in rats. Dig Dis Sci 1996;41:1518-26.

73. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, i sur. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC-157. J Pharmacol Sci 2006;102:269-77.
74. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, i sur. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC-157. J Pharmacol Sci 2007;104:7-18.
75. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. Hepato-protective effect of BPC 157, a 15-aminoacid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl_4 administra-tion. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. Life Sci 1993;53:291-6.
76. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, i sur. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC-157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. J Physiol Paris 2001;95:295-301.
77. Boban Blagaic A, 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.
78. Sikirić P, Petek M, Ručman R, i sur. Influence of BPC on experimental kidney lesions models. Exp Clin Gastroent 1991;1:25-7.
79. Sikirić P, Gyires K, Seiwerth S, i sur. The effect of pentadecapeptide BPC 157 on inflammatory, non-inflammatory, direct and indirect pain and capsaicin neurotoxicity. Inflammopharmacology 1993;2:121-7.
80. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. Dig Dis Sci 1997;42:661-71.
81. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Ž, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-anflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. J Physiol (Paris)

1997;91:113-22.

82. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Ž, i sur. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N^G-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol 1997;332:23-33.
83. Kalogjera L, Ries M, Baudoin T, Ferencic Z, Trotic R, Pegan B. Dose-dependent protective effect of BPC 157 on capsaicin induced rhinitis in rats. Eur Arch Otorhinolaryngol 1997;254:9-11.
84. Sikiric P, Separovic J, Anic T, i sur. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H_2-blockers, omeprazole and sucralfate on now vessels and new granulation tissue formation. J Physiol (Paris) 1999;93:479-85.
85. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. Burns. 2001;27:817-27.
86. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, i sur. Corticosteroid-impairment and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. Burns 2003;29:323-34.
87. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC-157. J Orthop Res 2006;24:1109-17.
88. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC-157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. Surg Today 2008;38:716-25.
89. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. Curr Pharm Des. 2010;16:1224-34.
90. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, i sur. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. J Physiol Pharmacol. 200;60Suppl 7:161-5.
91. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 reduces

bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. Thromb Res. 2012;129:652-9.

92. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987;327:524-6.

93. Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;12:2524-31.

94. Taylor CT, Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;4:643-7.

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

96. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem. 2012;19:126-32.

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

98. Lovric Bencic M, Sikiric P, Separovic J, i sur. Doxorubicine congestive heart failure-increased big-endothelin 1 plasma concentration. Reversal by amlodipine, losartan and gastric pentadecapeptide BPC-157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci 2004;95:19-26.

99. Balenovic D, Lovric Bencic M, Udovicic M, i sur. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: A relation with NO-system. Regul Pept. 2009;156:83-9.

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

101. Vrebalov-Cindrov V. Klinička elektromiografija i neuromuskularne bolesti. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu: Omiš, Typo-Omiš 2004.

11. Kratka biografija

Diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilšta u Zagrebu 1995. god. Stručni rad započinje u Klinici za traumatologiju Zagreb, gdje 2002. god. završava specijalizaciju opće kirurgije te se na Odjelu za ozljede i bolesti kralježnice 15 godina osposobljavao za dijagnostiku i kirurško liječenje ozljeda, tumora, upala i degenerativnih bolesti kralježnice pod mentorstvom prof. dr. sc. Gojka Buljata i prim. Zvonka Kejle. Od 2011. god. radi u Specijalnoj bolnici Sveta Katarina na mjestu voditelja Dnevne bolnice za vertebralne intervencije.

Dodatnu edukaciju iz područja kirurgije kralježnice stječe tijekom boravaka u Center for Spinal Disease Robert Jones and Agnes Hunt Orthopedic Distrinct Hospital, Oswestry, (lipanj 2004. god.), Klinik fűr Unfall- und Wiederherstelungchirurgie, Katarinenhospital, Stuttgart, (veljača 2006. god.) Pohađao je tečajeve stručnog usavršavanja mikrokirurgije vratne i slabinske kralježnice u Spine Center, Schön Klinik Munich Harlaching, 2004; 2008; 2010. god. Od 2011. god. radi dijagnostičke i terapijske intervencije na kralježnici.

Uključen je u znanstveno istraživački rad u području ozljeda muskuloskeletnog i živčanog sustava, te je koautor u više radova objavljenih u međunarodno indeksiranim časopisima. Autor je poglavlja: Križobolja uzrokovana traumom, osteoporotskim frakturama ili tumorima. u knjizi Križobolja. Ur.: Grazio S, Buljan D. Naklada Slap 2009.

Član je međunarodne organizacije spinalnih kirurga - AOSpine, te udruga Hrvatskog liječničkog zbora - Hrvatsko vertebrološko društvo (HVD), Hrvatsko udruženje ortopeda i traumatologa (HUOT), Hrvatsko kirurško društvo (HKD) i Hrvatsko društvo za neuroznanost (HDNZ).

Dodatno se zanima za informatiku i medicinske baze podataka te je u Klinici za traumatologiju bio voditelj bolničkog informacijskog sustava od 2009. - 2011. god. Osim informatike, hobi mu je audio i video tehnika, a u slobodno vrijeme planinari s članovima obitelji. Oženjen je i otac troje djece.