

Učinak pentadekapeptida BPC-157, L - NAME i L - arginina na adjuvantni artritis u štakora posredovan NO - sustavom uz promjene na srcu i bubregu

Rukavina, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:160585>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Iva Rukavina

**Učinak pentadekapeptida BPC -157, L –
NAME i L – arginina na adjuvantni artritis
u štakora posredovan NO – sustavom uz
promjene na srcu i bubregu**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Iva Rukavina

**Učinak pentadekapeptida BPC -157, L –
NAME i L – arginina na adjuvantni artritis
u štakora posredovan NO – sustavom uz
promjene na srcu i bubregu**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Martina Lovrić Benčić

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli prilikom izrade ovog rada, a posebno mojoj mentorici prof. dr sc. Martini Lovrić Benčić kao i prof. dr sc. Predragu Sikiriću na volji, entuzijazmu i podršci koje su mi pružili na ovom putu.

Također veliko hvala tehničaru Ivanu Gržibovskom sa Zavoda za farmakologiju na pomoći oko tehničkog dijela pokusa kao i prof. dr sc. Ivanu Sjekavici i dr Kseniji Štekić na analizi rendgenskih snimki, doc. dr sc. Lovorki Batelji i dr Draženu Jelašiću na analizi histoloških preparata kao i osoblju laboratorija KB Dubrava pod vodstvom prof. dr sc. Željka Romića na analizi laboratorijskih nalaza.

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 Reumatoidni artritis	1
1.1.1 Etiologija bolesti	1
1.1.1.1 Okolišni čimbenici	2
1.1.1.2 Genetika	2
1.1.2 Epidemiološki podaci	3
1.1.3 Životni vijek	3
1.1.4 Autoimunost	3
1.1.5 Liječenje	4
1.1.6 Nuspojave lijekova	7
1.2 Pentadekapeptid BPC 157	7
1.2.1 Protuupalni učinci BPC 157	9
1.2.2 Kardioprotektivni učinci BPC 157	10
1.2.3 Nefroprotektivni učinci BPC 157	12
1.2.4 Mehanizam djelovanja BPC 157	12
1.3 Sustav dušik oksida	13
1.4 Pentadekapeptid BPC 157 i sustav dušik oksida	14
1.5 Ekstraartikularne manifestacije reumatoidnog artritisa	16
1.5.1 Reumatoidni artritis i srce	16
1.5.1.1 Elektrokardiogram u štakora	18
1.5.1.2 Frekvencija srca	19
1.5.1.3 P-val	19
1.5.1.4 P-R interval i T _p val (val repolarizacije	20
1.5.1.5 Izoelektrična crta	20
1.5.1.6 QRS-T kompleks	21
1.5.1.7 Električna os	21
1.5.1.8 U-val	22
1.5.2 Reumatoidni artritis i bubrezi	22
2. HIPOTEZA	24
2.1 Hipoteza	24

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	
3.1 Glavni cilj istraživanja	24
3.2 Specifični ciljevi istraživanja	24
4. MATERIJALI I METODE	26
4.1 Pokusne životinje	26
4.2 Lijekovi	26
4.3 Adjuvantni artritis	27
4.4 Eksperimentalna procedura	27
4.5 Tijek pokusa	28
4.6 Praćenje elektrokardiografskih promjena	32
4.6 Statistička obrada podataka	33
5. REZULTATI	34
5.1 Promjene u EKG – u	34
5.2 Makroskopska analiza promjena na zglobovima	43
5.3 Radiološka analiza	48
5.4 Histološka analiza	52
5.5 Laboratorijska analiza	60
5.6 Opće stanje štakora	70
6. RASPRAVA	74
6.1 Promjene na zglobovima	76
6.2 Promjene na srcu	79
6.3 Promjene na bubrezima	82
6.4 Laboratorijski parametri.....	83
6.5 Tjelesna težina testiranih životinja	86
7. ZAKLJUČCI	87
8. SAŽETAK	89
9. ABSTRACT	91
10. POPIS LITERATURE	92
11. KRATKA BIOGRAFIJA AUTORA	102

OZNAKE I KRATICE

AA – adjuvantni arthritis

AG – aminogvanidin

C5 - komponenta komplementa 5

DMARD – od engl. disease modifying antirheumatic drug

engl. - engleski

HLA – humani leukocitni antigen

IL – interlukin

i.p. – intraperitonealno

L – NAME – dušik – L – arginin – metilester

mg- miligram

ms- milisekunda

mV-milivolt

NO-dušik monoksid

NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi

RA – reumatoidni arthritis

s.c. – subkutano

NO – dušikov – monoksid

LTB₄ – leukotrien B₄

TXB₂ – tromboksan B₂

PTPN22 - gen koji kodira protein tirozin fosfatazu 22

STAT4 - signalni transduktor i aktivator transkripcije 4

TRAF 1 – receptor za TNF alfa

MTX – metotreksat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

AST – aspartat aminotransferaza

ALT – alanin aminotransferaza

EKG – elektrokardiogram

BET 1 – bigendotelin 1

CPK – kreatinin fosfo kinaza

TGF beta 1 – transformirajući faktor rasta beta 1

NF-kB - aktivacije nuklearni faktor kapa B

CRP – C reaktivni protein

HNE - 4 – hidroksinonenal

1. UVOD

1.1 Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je jedna od najčešćih autoimunih bolesti koju karakterizira kronična sistemska upala, a koja može zahvatiti brojna tkiva, posebice sinovijalne ovojnice što dovodi do oštećenja zglobova, funkcionalnih ograničenja bolesnika, a ponekad može pospiješiti i preuranjeni smrtni ishod. Najčešće se radi o poliartritisu simetrične distribucije koji obično napreduje od perifernih zglobova prema proksimalnim te ukoliko se ne liječi dovodi do erozija kosti i zglobne hrskavice što rezultira deformitetima zglobova. Jedna od tipičnih karakteristika ove bolesti jest jutarnja ukočenost koja se definira kao otežano kretanje ujutro nakon buđenja ili nakon dužeg mirovanja, a koja popušta nakon razgibavanja. U većini slučajeva bolest se razvija postupno uz bolove i otok zglobova, međutim, može se razviti i akutno. Bolešću može biti zahvaćen i samo jedan zglob (1).

Artritis ometa bolesnike u svakodnevnim aktivnostima kao što su hodanje, penjanje po stepenicama, oblačenje, žvakanje, tipkanje kao i u obavljanju njihove profesionalne djelatnosti. Može biti praćen i sistemskim simptomima bolesti koji uključuju mialgije, umor, subfebrilne temperature, gubitak težine i depresiju (1).

1.1.1 Etiologija bolesti

Točna etiologija bolesti još uvijek nije sasvim jasna, ali smatra se kako je riječ o autoimunoj bolesti u čijoj etiopatogenezi važnu ulogu imaju okolišni, odnosno genetski čimbenici (1).

1.1.1.1 Okolišni čimbenici

Okolišni čimbenici uključuju zemljopisni položaj, klimu, infekcije s nekim mikroorganizmima (Epstein Barr virus, Humani Herpes Virus 6) te životni stil (primjerice pušenje, prehrana). Naime, pušenje predstavlja jedan od vrlo bitnih čimbenika rizika jer je vjerojatnost obolijevanja od reumatoidnog artritisa tri puta veća kod pušača u odnosu na nepušače (2). Umjereno konzumiranje alkohola može djelovati protektivno (3).

1.1.1.2 Genetika

Što se tiče genetskih čimbenika, dosad je identificirano nekoliko gena koji imaju ulogu u ovoj bolesti. Prvi rizični alel za reumatoidni artritis identificiran je u području ljudskog genoma koji kodira humani leukocitni antigen (HLA), i to u području 36Mb unutar regije MHC (kompleks gena tkivne podudarnosti). Tako je još osamdesetih godina prošlog stoljeća dokazana jasna povezanost između RA i HLA DRB1 gena. Naknadno su rađene brojne genetske studije te je tako jedan od gena koji se nakon HLA gena čvrsto povezuje sa RA gen koji kodira protein tirozin fosfatazu - 22 (PTPN22), a koji je snažan inhibitor aktivacije T limfocita. Tu je još i gen koji kodira signalni transduktor i aktivator transkripcije 4 (STAT4) (posreduje u unutarstaničnom signalnom putu koji sudjeluje u upalnoj reakciji putem citokina IL – 12, IL – 23, IL – 27 i interferona tip I), zatim gen koji kodira protein 4 povezan s citotoksičnim limfocitima - još jedan inhibitor aktivacije T limfocita, kao i gen za tzv. faktor 1 povezan sa receptorom za TNF (TRAF 1) te gen za komponentu komplementa 5 (C5) čiji produkti imaju ulogu u apoptozi stanice, proliferaciji, diferencijaciji, aktivaciji i inhibiciji citokina te remodeliranju kosti. U latino američkoj populaciji opisuje se i polimorfizam gena za TNF alfa - TNF308 - A/G koji stvara prednost za brzu progresiju koštanih erozija kod RA bolesnika (1).

1.1.2 Epidemiološki podaci

Otprilike 1 % bijelaca je zahvaćeno ovom bolešću, međutim prevalencija varira od 0.1 % (ruralna Afrika) pa sve do 5 % (Pima, Blackfeet i Chippewa indijanci). Godišnja incidencija bolesti procjenjuje se na oko 40 oboljelih na 100 000 stanovnika. Neke studije koje su provedene u Sjevernoj Americi, Sjevernoj Europi i među japanskom populacijom pokazale su kako je incidencija bolesti u porastu od 1960 - te godine. Nadalje, zna se kako je učestalost bolesti u Amerikanaca veća u odnosu na azijsku i afričku populaciju. Također, bolest se pojavljuje unutar iste obitelji sa većom učestalošću tako da prevalencija bolesti kod osoba u prvom koljenu u odnosu na oboljelog iznosi 2 do 12 %, kod dvojajčanih blizanaca 5 - 10 % te čak 12 do 30 % među jednojajčanim blizancima. Bolest se može razviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali najčešće se javlja između 50 - te i 75 - te godine života. Kako se češće javlja među ženskom populacijom, prevalencija bolesti kod žena starijih od 65 godina iznosi čak 5 % (1, 4).

1.1.3 Životni vijek

Trajanje života ovih bolesnika skraćeno je za 3 - 5 godina, kako zbog same bolesti (ponajprije zbog kardiovaskularnih odnosno cerebrovaskularnih incidenata uslijed ubrzane ateroskleroze koja je prisutna kod ovih bolesnika) tako i zbog nuspojava lijekova kojima se liječi (5, 6, 7). Tako je primjerice u studiji provedenoj u Švedskoj između 1979 i 1994 g. na 606 bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa pokazano kako je mortalitet ovih bolesnika bio čak 50 % viši u odnosu na kontrolnu skupinu (8).

1.1.4 Autoimunost

Kako je već spomenuto, RA je autoimuna bolest, a glavnu ulogu u patološkom procesu same bolesti imaju auto - reaktivni T limfociti i upalni citokini kao što su TNF alfa, IL - 6 i IL - 17 i to na taj način da dovode do akumuliranja upalnih stanica, proizvodnje matriks -

metaloproteinaza (aktivni medijatori zglobne destrukcije koji mogu razgraditi sve komponente hrskavice, kosti i vezivnog tkiva) te aktiviranja osteoklasta što sve skupa dovodi do oštećenja hrskavice i kosti. Matriks - metaloproteinaze razvijaju se nakon direktnog kontakta T - stanica sa sinovijalnim fibroblastima. Značajno je da je oštećenje kosti prisutno već u ranoj fazi bolesti što znači da je bolesnike potrebno započeti tada i liječiti, a sve kako bi se u što većoj mjeri izbjeglo oštećenje zgloba (9).

1.1.5 Liječenje

U liječenju se koriste nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID), glukokortikoidi, tzv. bolest modificirajući antireumatski lijekovi (eng. DMARD, od disease - modifying antirheumatic drugs) i to oni sintetski ili konvencionalni kao što su metotreksat, sulfasalazin i leflunomid, a u posljednjih dvadesetak godina i tzv. biološki lijekovi. Klinička remisija postala je cilj liječenja, a dokazano je kako rana uporaba DMARD - ova kao i bioloških lijekova, ne samo da poboljšava klinički ishod, već također smanjuje oštećenje zglobova odnosno tzv. radiološku progresiju bolesti te posljedično i invaliditet ovih bolesnika (9).

Jedan od najčešće primjenjivanih lijekova u liječenju upalnih reumatskih bolesti jest metotreksat (MTX). Riječ je o sintetskom bolest modificirajućem antireumatiku (DMARD) koji je zlatni standard u liječenju RA. Kao inhibitor enzima dihidrofolat reduktaze, MTX smanjuje de novo stvaranje purina i pirimidina te na taj način interferira sa sintezom deoksiribonukleinske kiseline (DNA) čime se djelomično može objasniti njegovo protuupalno i imunosupresivno djelovanje. Pored toga, potiče otpuštanje unutarstaničnog adenozina koji je odgovoran za određene protuupalne učinke. Čini se da je parenteralna primjena lijeka učinkovitija u odnosu na oralnu i s manje neželjenih učinaka, posebice od strane probavnog sustava (mučnina, povraćanje, dispepsija). Svakako se preporučuje u bolesnika sa slabijim odgovorom ili intolerancijom na oralno primjenjen lijek.

Prema EULAR - ovim (eng. European League Against Rheumatism) smjernicama iz 2010.g. DMARD - ovi i dalje predstavljaju osnovnu terapiju u liječenju RA, točnije DMARD monoterapija. Kada se kontrola bolesti ne može postići na taj način indicirano je u terapiju dodati neki drugi DMARD, odnosno biološki lijek (9).

Glukokortikoidi su brzodjelujući lijekovi jakog protuupalnog učinka koji se s obzirom da imaju sposobnost da kontroliraju upalni proces te uspore strukturna oštećenja hrskavice i kosti, prema nekim stajalištima danas također mogu ubrajati u bolest modificirajuće lijekove. S obzirom na njihovu brzu učinkovitost, uglavnom se koriste u prvim tjednima liječenja (10).

Biološki lijekovi djeluju tako da inhibiraju ili aktiviraju unutarstanične interakcije na taj način da se vežu za receptor ili kostimulatorne molekule na površini stanice ili direktno za citokine. Prema najnovijim preporukama moguće je liječiti RA bolesnike sa DMARD - om uz biološku terapiju i tijekom najranijeg stadija bolesti kada je još moguće značajno prevenirati ili minimalizirati oštećenje zglobova (9).

Kako je već ranije spomenuto, citokini su jako bitni u razvoju oštećenja zgloba. Jedan od njih je faktor tumorske nekroze alfa (engl. tumor necrosis factor - alpha, skraćeno TNF - α). To je proupalni citokin koji sudjeluje u sistemske upali i jedan je od citokina koji sudjeluje u akutnoj fazi upalne reakcije. Uglavnom ga proizvode aktivirani makrofazi, ali također i CD4 limfociti, NK stanice, neutrofili, mastociti, eozinofili i neuroni (11). Ima dominantnu ulogu u patogenezi reumatoidnog artritisa. Naime, potiče proizvodnju drugih citokina kao što su IL - 1, IL - 6, IL - 8 te GM - CSF tako da blokada ovog citokina ima značajan učinak na smanjenje upalne reakcije u odnosu na blokadu nekih drugih proupalnih citokina kao što je primjerice IL - 1 (12). TNF - α antagonisti kao što je infliksimab, etanercept, adalimumab, golimumab i certolizumab pegol se naveliko upotrebljavaju za liječenje RA (13).

Važnu ulogu u upalnom procesu ima i interleukin 6 (IL - 6) koji dovodi do aktivacije T i B limfocita, sinoviocita, endotela, potiče sazrijevanje osteoklasta i proizvodnju proteina akutne faze upale. Blokator IL - 6 koji se danas uspješno koristi u kliničkoj praksi jest tocilizumab, a u procesu kliničkih istraživanja su i drugi blokatori IL - 6 odnosno njegovog receptora kao što su olokizumab, sarilumab, sirukumab (14).

U liječenju se mogu koristiti i blokatori IL - 17. IL - 17 smatra se ključnim citokinom u širokoj skupini autoimunih bolesti, uključujući RA, psorijazu, multiplu sklerozu, upalne crijevne bolesti i astmu, a proizvode ga Th17 stanice. Naime, CD4+ pomoćnički T limfociti

imaju četiri glavne podvrste - Th1, Th2, Th17 i regulatorne T stanice, od kojih su Th17 stanice uključene u razvoj autoimunih upalnih bolesti. Tako su primjerice studije na eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu (EAE) pokazale kako je za razvoj Th17 podskupine stanica odgovoran IL - 23, a Th17 stanice onda proizvode ne samo IL - 17A i IL - 17F, već i TNF - alfa te IL - 6. Također, pokazano je kako neutralizacija IL - 17A djeluje zaštitno protiv EAE, a eksperimentalni miševi sa nedostatkom IL-17 otporni su prema EAE i kolagen induciranom artritisu (15). U RA, IL - 17 potiče proizvodnju drugih proupalnih citokina kao što su IL - 1 β , IL - 6 i TNF α . Zato se smatra ključnim citokinom koji dovodi do propagacije zglobne upale te destrukcije kosti i hrskavice, a u tijeku su klinička istraživanja o učinkovitosti blokatora IL - 17 (secukinumab, ixekizumab, brodalumab) (14, 16).

Osim ovih gore navedenih supstanci kojima se ciljano djeluje na određene molekule koje sudjeluju u upalnom procesu u sklopu RA, također se mogu koristiti lijekovi koji djeluju na određene podvrste leukocita. Naime, studije su pokazale kako postoje odgovarajuće promjene u B limfocitima kod RA bolesnika. Shodno tomu, RA je indicirano liječiti i rituximabom (himerično monoklonalno protutijelo na anti - CD20 B limfocite) s obzirom da taj lijek djeluje tako da smanjuje sintezu autoreaktivnih protutijela kao što su reumatoidni faktor i anti - citrulinirana peptidna protutijela, modificira prezentiranje antigena T limfocitima kao i proizvodnju citokina. Sličan lijek je i ocrelizumab te ofatumumab koji su još u fazi kliničkih ispitivanja (14).

Tu su i lijekovi koji djeluju na faktor aktivacije B limfocita (skraćenica BAFF, od eng. B – cell activating factor) koji ima važnu ulogu u stvaranju i održavanju B limfocita. Belimumab je humano monoklonsko protutijelo koje se veže za BAFF, međutim studije nisu pokazale njegovu značajniju učinkovitost pri liječenju RA. Za razliku od belimumaba, tabalumab, humano IgG4 monoklonsko protutijelo koje neutralizira BAFF, pokazao se učinkovit u liječenju RA, a također sigurnosni profil ovog lijeka podjednak je drugim biološkim lijekovima koji se koriste u liječenju RA (14).

Daljnja istraživanja u smislu razvoja novih lijekova za liječenje reumatoidnog artritisa idu u smjeru razvoja molekula koje ulaze u citoplazmu stanice gdje reguliraju unutarstanične signale koji dovode do diferencijacije i aktivacije limfocita kao i do otpuštanja proupalnih citokina kao što je TNF - alfa. Tu spadaju lijekovi kojima se djeluje na proteinske kinaze,

enzime koji sudjeluju u razvoju upalnog procesa putem stanične signalizacije, uključujući i onog kod reumatoidnog artritisa (14). Studije su pokazale kako je učinkovitost takvih pripravaka jednaka kao i kod anti-TNF-alfa pripravaka, međutim i dalje ostaje problem nuspojava u vidu povećane učestalosti infekcija, poremećaja hematoloških parametara, jetrene i bubrežne lezije dok je veća učestalost tumorskih bolesti kod ovakvih pacijenata još uvijek diskutabilna (9,14). Posljednje dvije godine rađena su istraživanja kod RA bolesnika kod kojih nije postignuta remisija konvencionalnom terapijom. Postignuti rezultati su obećavajući, a dodatna prednost ovakve terapije jest i činjenica što se ovi lijekovi mogu primjenjivati na usta (14).

1.1.6 Nuspojave lijekova

Važno je naglasiti kako bolesnici s vremenom mogu razviti toleranciju na lijekove koji se koriste u liječenju RA, a isto tako neki moraju prekinuti liječenje zbog nuspojava koje ovakvi lijekovi mogu izazivati. To su primjerice oštećenje gastrointestinalne sluznice, kardiovaskularne komplikacije, hematološka toksičnost, renalno oštećenje, veća osjetljivost prema infekcijama ili čak limfomima. Sve navedeno nameće potrebu za daljnjim traganjem za što učinkovitijim lijekom, sa što manje nuspojava (17).

1.2 Pentadekapeptid BPC 157

BPC 157 („body protection compound“) je organoprotektivni protein molekularne mase 40 000 daltona izoliran iz želučanog soka. Ključnom za aktivnost tog proteina odgovoran je niz od 15 aminokiselina, redoslijeda

-Gly- Glu- Pro- Pro- Pro- Gly- Lys- Pro- Ala- Asp- Asp- Ala- Gly- Leu- Val- ,

koji je nazvan **pentadekapaptid BPC 157**, molekularne težine 1419 daltona, koji je detaljno istraživao (18).

Iako sam mehanizam njegovog djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, dosadašnja istraživanja su pokazala kako BPC 157 povoljno djeluje na brojne organske sustave kod više vrsta i to u vrlo niskim dozama (uglavnom $\mu\text{g/kg}$ ili ng/kg).

Ostvaruje povoljne učinke kao što su cijeljenje jetrenih, crijevnih i gastričnih lezija, ispoljava anti-anksiozni i anti-depresivni učinak, potiče angiogenezu i cijeljenje rana, poništava motoričke abnormalnosti u modelima Parkinsonove bolesti, ima protektivne učinke na sluznice, a valja istaći i njegov antiinflamatorni učinak (19).

Prednosti pentadekapeptida BPC 157 prema drugim peptidima očituju se u tome što je stabilan u uvjetima u kojima inače dolazi do brze razgradnje peptida, nema toksičnih učinaka, letalna doza nije dosegnuta te je stoga vrlo sigurnosnog profila. Za razliku od drugih sličnih peptida kao što su npr. prostaglandini ili somatostatin čije je djelovanje kratkotrajno, BPC 157 je vrlo stabilan. Nakon inkubacije u vodi ili želučanom soku nije se razgradio kroz 24 sata, za razliku od drugih sličnih peptida kao što je h - EGF i h - TGF koji su postojani u vodi, ali u želučanom soku budu razgrađeni već za 15 minuta (20 - 29).

Imunohistokemijski je utvrđeno da se mjesto lučenja BPC 157 nalazi u želucu i u mozgu, dok su njegovi učinci potpomognuti djelovanjem hormona nadbubrežne žlijezde, štitnjače i jajnika. Naime, nakon učinjene vagotomije učinci BPC - a 157 ostali su nepromijenjeni, dok su nakon medulektomije nadbubrežne žlijezde bili potpuno poništeni (18,30).

Kako se luči unutar želuca i ostaje stabilan u želučanom soku, pretpostavljeno je njegovo protektivno djelovanje na sluznicu želuca, odnosno na sluznicu probavnog sustava općenito, što je potvrđeno u više različitih eksperimentalnih studija (31,32). Oštećenje sluznice gastrointestinalnog sustava izazivano je etanolom, cisteaminom, izazivanjem stanja prolongiranog stresa (31,33), zatim trinitrobenzen - sumpornom kiselinom (34), dinitrofluorbenzen - sumpornom kiselinom (35), primjenom nesteroidnih antireumatika (36), deplecijom somatosenzornih neurona (30), stanjem akutnog pankreatitisa (37). U svim provedenim istraživanjima BPC 157 je pokazao značajan citoprotektivni učinak na sluznicu te je značajno ublažio nastale lezije i pospiješio cijeljenje (38).

Osim toga, utvrđen je značajan hepatoprotektivni učinak BPC 157 u modelima lezije jetre s poboljšanjem jetrenih parametara (AST, ALT, bilirubin), poboljšanjem portalne hipertenzije i histološkog nalaza jetre (39, 40).

Protektivni učinci utvrđeni su i kod akutne i kronične izloženosti miševa etanolu (41).

U modelima akutnog pankreatitisa protektivni učinak manifestirao se smanjenjem nekroze i edema tkiva gušterače (37, 42).

Također, u studijama gdje je diabetes mellitus izazvan davanjem aloksana značajno je protektivno djelovanje BPC 157, uz očuvanje Langerhansovih otočića (43).

BPC 157 povoljno djeluje i na koagulacijski sustav jer skraćuje vrijeme krvarenja i ublažava trombocitopeniju nakon amputacije u štakora koji su tretirani antikoagulantnim lijekovima (heparin, varfarin i aspirin) (44).

Dokazano je i njegovo povoljno djelovanje na angiogenezu (45), dok je neuroprotektivni učinak u modelima izazvane neurotoksičnosti rezultirao smanjenjem učestalosti konvulzija, depresije i parkinsonizma (47 - 50). Studije neuroprotekcije uputile su na moguće postojanje interakcije BPC 157 s dopaminom (nigrostrijatum), prostaglandinima, somatostatinom, serotoninom, glicinom i GABA sistemom (51, 52). Učinkovit je i kada se radi o traumatskom oštećenju mozga, odnosno živaca (53, 54).

1.2.1 Protuupalni učinci pentadekapeptida BPC - a 157

BPC 157 je pokazao i značajan antiinflamatorni učinak, smanjujući otpuštanje upalnih medijatora (mijeloperoksidaza, leukotrien B4, tromboksan B2 itd.) in vitro i in vivo, jednako kod akutnih kao i kod kroničnih upalnih procesa. Pri tome je uočeno postojanje složene interakcije s dopaminergičkim i adrenergičkim sustavom (32, 55 - 57). Antiinflamatorni učinak utvrđen je i na modelima adjuvantnog artritisa u štakora, uključujući model akutne, subakutne i kronične upale (karageninski model šape i terpentinski bukalni edem) (31, 58). Također, pokazao se učinkovit prilikom kronične aplikacije na modelu periodontitisa u

štakora, a postoje pozitivni rezultati u smislu tretiranja upalnog procesa na modelu upalne crijevne bolesti (59).

Nakon sistemske primjene BPC - a 157 utvrđen je povoljan učinak na cijeljenje rana, kao npr. nakon transsekcije mišića kvadricepsa (29), tetiva i ligamenata (60, 61) odnosno nakon frakture kosti (20). Štoviše pokazuje i osteogeni efekt značajno unapređujući cijeljenje segmentalnih defekata kosti (59). Nadalje, pospješio je cijeljenje opekline, čak i lokalno primjenjen u obliku kreme (23), kao i cijeljenje nakon ozljeda rožnice oka (62).

1.2.2 Kardioprotektivni učinci pentadekapeptida BPC 157

Da BPC 157 ima kardioprotektivno djelovanje dokazano je u više eksperimentalnih modela. Studija na izoliranom srcu zamoraca dokazala je da kod hipoksije i reperfuzije miokarda BPC 157 ima protektivni učinak. Za vrijeme trajanja hipoksije te reperfuzije BPC 157 je značajno smanjivao učestalost i trajanje ventrikularne fibrilacije i atrijsko - ventrikularne disocijacije. (63).

Studija izazivanja ishemije i akutnog infarkta miokarda u štakora davanjem izoprenalina, te izazivanjem imobilizacijskog stresa, također je potvrdila povoljne učinke BPC-a 157 (48). Preventivnim, intraperitonealnim davanjem jedne doze BPC 157 spriječen je razvoj ishemije koju bi se verificiralo EKG - om, kao i histološke promjene miokarda. Učinak je bio izraženiji u mikrogramskoj dozi. Primjenjen terapijski doveo je do povlačenja već razvijenih znakova ishemije u EKG-u štakora i to unutar 24 sata od njihove mobilizacije. Na učinkovitost BPC 157 u suzbijanju poremećaja srčanog ritma upozorila je studija kardiotoksičnosti barij-klorida. Primjenjen preventivno BPC 157 u potpunosti je sprečavao ili je odgađao pojavu aritmija, a uz to je sprečavao razvoj ili skraćivao trajanje ishemije. Primjenjen terapijski dovodio je do brže konverzije u sinus ritam, te sprečavao ponovnu pojavu aritmija (64).

BPC 157 je bio učinkovit i kad se radilo o primjeni dezipramina, te je u potpunosti sprečavao naglo usporavanje srčane frekvencije i smetnje provođenja (prolongacija PR intervala, širenje QRS kompleksa), razvoj težih oblika AV - bloka, te pojavu ventrikularne tahikardije koje je dezipramin izazivao. Učinak mu je ovisio o primjenjenoj dozi (64).

Kardioprotektivno djelovanje BPC 157 ostvario je i nakon primjene doksorubicina. Doksorubicin inače dovodi do tzv. antraciklinske kardiomiopatije koju karakterizira patomorfološka slika teškog oštećenja miocita i krvnih žila, te vakuolizacija. BPC 157 je znatno ublažio tu patomorfološku sliku, dok su vrijednosti LDH bile značajno niže nego u kontrolnoj skupini, iako su u apsolutnoj vrijednosti bile visoke (65).

Nadalje, taj učinak potvrđen je i u modelu kronične insuficijencije srca izazvane doksorubicinom gdje je ispitivana terapijska učinkovitost amlodipina, losartana i BPC 157 na štakorima i miševima.

Sve tri supstance bile su učinkovite i ublažavale su kliničku sliku, te smanjivale vrijednosti laboratorijskog parametra bigendotelina 1 (BET - 1). Ipak, primjenjen u monoterapiji BPC 157 je bio znatno učinkovitiji od ostalih supstanci i u većoj mjeri ublažavao je pogoršanje kliničkih znakova kronične insuficijencije srca (porast frekvencije srca, porast frekvencije disanja, sniženje arterijskog krvnog tlaka) (66).

Kod životinja s težom kliničkom slikom kod kojih je došlo do dodatnog pogoršanja kliničkih znakova insuficijencije srca uz porast laboratorijskih vrijednosti AST, ALT, CPK i BET - 1, BPC 157 je pokazao najbolji protektivni učinak (66).

BET - 1 je marker sistoličke funkcije lijeve klijetke i njegova proizvodnja direktno ovisi o smanjenju koncentracije dušik - oksida (NO), što je dokazano u nekoliko drugih istraživanja. (66).

NO je kardioprotektivan spoj s izrazitim vazodilatacijskim učinkom, a većinom se sintetizira u endotelu. Kako je BPC 157 smanjivao koncentraciju BET - 1, ovo istraživanje je indirektno upozorilo i na međusobnu povezanost BPC 157 sa NO - sustavom i njegovo direktno djelovanje na sintezu NO - a kao kardioprotektivne tvari (66).

Pozitivno djelovanje BPC 157 ostvario je i u modelu kardiotoksičnosti digitalisa. Ozbiljne poremećaje srčanog ritma (ventrikularne ekstrasistole, ventrikularnu tahikardiju), odnosno značajne smetnje provođenja (AV - blok višeg stupnja) bile su uspješno prevenirane ili prekinute (67).

Nadalje, studije koje su ispitivale djelovanje BPC - a 157 na poremećaje srčanog ritma koji se razvijaju u uvjetima značajnog elektrolitskog disbalansa, također su potvrdile njegovu učinkovitost. Teška hipokalemija, kao i hiperkalemija u štakora izazivala je značajne poremećaje srčanog ritma (ventrikularne ekstrasistole, ventrikularna tahikardija, AV blok višeg stupnja) koji su djelovanjem BPC - a 157 bili spriječeni ili prekidani, uz konverziju u sinus ritam unutar sat vremena. Ti učinci bili su prisutni, bez obzira na način primjene (intraperitonealno, intravenski ili intragastrično) (68).

Također, učinci su bili ostvareni i *in vitro*, na kulturi stanica (HEK 293) gdje je u modelu hiperkalemije postignuto smanjenje oscilacija praga akcijskog potencijala, što je od posebnog značaja jer dokazuje da BPC 157 djeluje na staničnoj membrani (68, 69).

1.2.3 Nefroprotektivni učinci pentadekapeptida BPC 157

U modelima izazvane tubularne nekroze bubrega manifestirao se nefroprotektivni učinak BPC - a 157 održavanjem diureze (44). Također, na eksperimentalnom modelu nefrotskog sindroma u miševa i štakora, BPC 157 pokazao je povoljan učinak na proteinuriju, posljedične edeme i hiperlipidemiju (70).

Svi povoljni učinci ostvaruju se u uvjetima narušene homeostaze, dok u normalnim uvjetima izostaju, a BPC 157 tada ne izaziva promjene mjerljivih parametara - diureze, krvnog tlaka, temperature, motiliteta i sekrecije gastrointestinalnog trakta.

Ono što treba posebno istaći je njegova netoksičnost jer se ni primjenom ekstremno visokih doza BPC 157 do 100 mg/kg nije dostigla letalna doza (30, 31).

1.2.4 Mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157

Točan mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157 još nije sasvim do kraja poznat. Međutim, zna se kako BPC 157 potiče transkripciju *egr - 1* gena u nediferenciranim CaCO - 2 stanicama *in vitro*. Egr-1 ima funkciju transkripcijskog čimbenika brojnih gena koji sudjeluju

u cijeljenju tkiva, uključujući faktore rasta i citokine uz rano stvaranje izvanstaničnog matriksa (kolagena), što je moguće objašnjenje za pozitivni učinak BPC - a 157 na cijeljenje rana. Aktivnost ovog gena regulirana je njegovim kosupresorom te upravo egr - 1 potiče ekspresiju svog kosupresora tzv. NAB2 gena (71). Također je poznato kako BPC 157 smanjuje upalnu reakciju u organizmu i to na taj način da smanjuje koncentraciju leukotriena B4, tromboksana B2 i koncentraciju mijeloperoksidaze u ozlijeđenim tkivima (61). Kako je djelovanje tih medijatora značajno i kod ishemijsko - reperfuzijskog, odnosno hipoksično - reoksigenacijskog oštećenja miokarda, to također može biti objašnjenje za kardioprotektivno djelovanje BPC - a 157 kod infarkta miokarda (63).

Nadalje, postoje pretpostavke kako njegovo djelovanje može biti posredovano hormonima koje luče adrenalne i paratiroidne žlijezde, odnosno štitna žlijezda i ovariji, a kao mogući mehanizam djelovanja predložena je i interakcija sa sustavom prostaglandina i somatosenzornim neuronima kao i interakcija sa dopaminergičkim i adrenergičkim sustavom (57).

S obzirom da neuropeptidi koje luče aferentni senzorni neuroni u blizini krvnih žila utječu na otpuštanje i regulaciju medijatora iz endotela krvne žile, a dokazano je da BPC 157 u procesu cijeljenja stimulira angiogenezu i štiti endotel (46), bilo je logično da se mehanizam djelovanja BPC - a 157 pokuša objasniti i interakcijom s NO - sustavom (72).

1.3 Sustav dušik oksida

Dušični oksid (NO) ima važnu ulogu u regulaciji različitih staničnih funkcija u kardiovaskularnom, živčanom, gastrointestinalnom i imunološkom sustavu, a sintetizira ga enzim NO sintetaza (NOS) iz L - arginina kao supstrata (69). Opisana su tri izoformna oblika ovog enzima. To su dvije konstitutivne NO sintetaze – neuronalna (nNOS) i endotelijalna (eNOS). Neuralna se nalazi u centralnim i perifernim neuronima. Ona je odgovorna za plastičnost neurona unutar centralnog živčanog sustava, centralnu regulaciju krvnog tlaka, relaksaciju glatkih mišića. Endotelnu NOS nalazimo u endotelnim stanicama, a odgovorna je za vazodilataciju krvnih žila, održavanje krvnog tlaka, a ima i brojne druge vazoprotektivne i antisklerotične učinke. Treća je inducibilna NOS (iNOS) koja je primarno identificirana u

makrofazima, premda može biti prisutna u gotovo svim vrstama stanica, a ekspresija enzima stimulirana je bakterijskim lipopolisaharidima, citokinima ili nekim drugim tvarima. Sudjeluje u patogenezi upalnog odgovora u organizmu kao i septičkog šoka. Kada se inducira u makrofazima, proizvodi velike količine NO koji je glavni citotoksični agent tih stanica. Visoke razine NO - a koje proizvodi iNOS ne moraju biti samo toksične za neželjene mikroorganizme, parazite ili tumorske stanice, već kada bude otpušten na krivom mjestu mogu naštetiti i zdravim stanicama što se događa u sklopu upalnih i autoimunih reakcija u organizmu (69). NO sustav također je odgovoran za aktivnost trombocita, ali, kako je prethodno spomenuto, i za održavanje tonusa krvnih žila, što zapravo znači da ima utjecaj i na regulaciju perfuzije, odnosno tkivnog i staničnog metabolizma. Pri tom je jasno dokazano da nedostatak, jednako kao i suvišak NO mogu dovesti do oštećenja tkiva (70). NO također sudjeluje u procesu neurotransmisije u središnjem živčanom sustavu (72).

1.4. Pentadekapeptid BPC 157 i sustav dušik oksida

Studije koje su provedene sa ciljem dokazivanja povezanosti BPC - a 157 i NO sustava su uspoređivale učinke N - nitro - L- arginin metil estera hidroklorida (L - NAME) kao potentnog inhibitora sinteze NO u endotelu krvnih žila, L - arginina kao prekursora NO te BPC - a 157, kao i učinke njihovih međusobnih kombinacija.

Dokazano je da BPC 157 in vitro, ali i in vivo stimulira sintezu i modulira oslobađanje NO, što nije bilo moguće blokirati djelovanjem L - NAME. Stimulaciju sinteze NO ostvaruje i L - arginin, ali kada je primjenjivan u kombinaciji s BPC 157, ti učinci su bili znatno slabiji. Kada je dostupnost NOS - a bila ograničena zbog djelovanja L-NAME, taj učinak je bio još izraženiji. BPC 157 također antagonizira hipertenziju nastalu zbog djelovanja L - NAME, kao i hipotenziju uzrokovanu L-argininom. Također, NO u visokim dozama djeluje ulcerogeno, za razliku od BPC - a 157 koji se suprostavlja tom djelovanju i djeluje citoprotektivno. Sve navedeno upućuje na postojanje interakcije BPC - a 157 sa NO - sustavom kao i na mogućnost modulacije učinaka NO-a na endotel krvne žile, ali i na želučanu sluznicu (72).

Još početkom devedesetih godina prošlog stoljeća na animalnom modelu artritisa prikazana je sposobnost NO - a da potiče oštećenje tkiva koje je potom umanjeno primjenom NOS

inhibitora. Tako je proučavana uloga endogenog NO - a uz primjenu L - arginina i L - NAME, jednog od inhibitora NO sintetaze. Tada je pokazano kako L - arginin dovodi do egzacerbacije bolesti, a L - NAME suprimira taj učinak. Kombinirana primjena L - arginina i L - NAME nije imala utjecaja na sam tijek artritisa (73, 74).

Međutim, do danas su provedena brojna istraživanja u ovom području te se zna da primjena kako L - arginina, a tako i NOS inhibitora ne dovodi jednoznačno do protuupalnog učinka odnosno dosad je pokazan njihov kako pozitivan tako i negativan učinak na tijek adjuvantnog artritisa u štakora (73, 74). Tako primjerice primjena neselektivnog NOS inhibitora NG - methyl - L - arginine ili selektivnog iNOS inhibitora N - iminoethyl - L - lysine (L - NIL) za vrijeme aktivnog adjuvantnog artritisa ne dovodi do protuupalnog učinka kao što je to prethodno zabilježeno u situaciji kada se spomenute supstance primjene profilaktički (74).

Štoviše, drugi iNOS inhibitor, aminoguanidin (AG), nije imao niti profilaktički, niti terapijski učinak. Takvi rezultati dovode do zaključka kako NOS inhibitori ne moraju nužno biti učinkoviti u slučaju aktivnog artritisa. Daljnji rezultati sugeriraju kako primjena selektivnog iNOS inhibitora N - iminoetil - L - lizina (L - NIL) čak može dovesti do egzacerbacije artritisa uzrokovanog antigenima stijenke streptokoka i da NO ima zaštitnu ulogu u akutnoj fazi antigenom izazvanog artritisa kod iNOS nokaut miševa (74).

Važno je napomenuti kako štetni učinci NO - a mogu barem djelomično biti povezani sa reaktivnim metabolitima dušika koji nastaje nakon oslobađanja NO - a (78). Naime, za vrijeme upale stvaraju se velike količine NO - a i superoksidnog aniona što dovodi do stvaranja peroksinitritnog aniona koji djeluje citotoksično. *In vitro* podaci pokazuju kako NO nije štetan niti za osteoblaste niti za hondrocite kada se blokira sinteza peroksinitritnog iona (74).

Zymosan, polisaharid koji je sastavni dio stijenke kvasca, dovodi do razvoja teškog erozivnog sinovitisa. Na ovom modelu artritisa je pokazano kako zymosan primjenjen profilaktički, ali ne i terapijski ima antinociceptivni učinak. Nasuprot tomu, NO donori dovode do analgezije kada se primjene terapijski (74).

Dakle, terapijska primjena NOS inhibitora ne dovodi jednoznačno do protuupalnog učinka na životinjskom modelu artritisa u sklopu kojeg se u većini studija intenzitet artritisa

procjenjivao na temelju indeksa artritisa ili histopatološkog bodovanja preparata, a bodovi su dodjeljivani na temelju promatračeve procjene otoka zgloba ili broja stanica u području sinovijalne membrane (74).

Endotelin - 1 (ET - 1) jest peptid koji djeluje kao vazokonstriktor i promotor stanične proliferacije. Većina kardiovaskularnih bolesti kao što je arterijska hipertenzija, ateroskleroza, restenoza, kongestivno srčano zatajenje, idiopatska kardiomiopatija, plućna hipertenzija kao i bubrežno zatajenje posredovana je aktivacijom upravo endotelin sustava. Mjerenje koncentracije prekursora endotelina - 1, BET - 1 (od eng. big endothelin - 1), biološki manje aktivnog u odnosu na ET - 1, jest postupak na temelju kojeg se može procijeniti intenzitet kardiovaskularne bolesti kao i učinak terapije. Tako je pokazano smanjenje koncentracije BET - 1 u serumu kod kongestivnog zatajenja srca uzrokovanog toksičnim djelovanjem doksorubicina, a upravo zbog djelovanja BPC 157, što je potvrdilo BPC - ov kardioprotektivni učinak. S druge strane porast koncentracije BET-1 u direktnoj je vezi sa smanjenim lučenjem NO, na temelju čega se pretpostavlja kako je BPC 157 u odnosu sa NO - sustavom jer smanjujući koncentraciju BET - 1, smanjuje se i koncentraciju NO. Naime, smanjena proizvodnja NO uključena je u patološki proces prisutan kod kongestivnog srčanog zatajenja (66).

Antiaritmičko djelovanje BPC 157 i interakcija s NO - sustavom dokazana je u studijama toksičnosti digitalisa, hipo- i hiperkalemije, a BPC 157 se svaki put pokazao potentnijom kardioprotektivnom supstancom od L - arginina (57, 68, 69).

1.5 Ekstraartikularne manifestacije reumatoidnog artritisa

1.5.1 Reumatoidni artritis i srce

Kako je već ranije spomenuto, kod reumatoidnog artritisa upala ne mora biti prisutna samo u zglobovima već može zahvatiti i druge organe uključujući srce. Upravo kronična upala igra glavnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti uključujući sistemske bolesti vezivnog tkiva kao što

su RA i sistemski eritemski lupus. Poznato je kako lokalna (u stijenci krvne žile), a tako i sistemska upala organizma pridonosi aterogenezi. Danas se zna da RA predstavlja jedan od zasebnih faktora rizika za kardiovaskularne bolesti što dovodi do ranih smrtnih ishoda ovih bolesnika upravo uslijed pojačane aterogeneze i negativnog remodeliranja lijeve klijetke. Dakle, mortalitet među reumatskim bolesnicima primarno je uzrokovan kardiovaskularnim bolestima odnosno kongestivnim srčanim zatajenjem (75).

Kako su zglobne, tako su i ekstraartikularne promjene kod RA sumirane u modelu animalnog artritisa kod laboratorijskih životinja, uključujući i model induciran tzv. Freundovim adjuvansom koji je jedan od najčešće korištenih modela za proučavanje reumatoidnog artritisa (model je utemeljio i prvi put opisao 1956 godine Paerson) (87). Patološke i kliničke promjene koje se stvaraju tijekom ovakvog pokusa vrlo su slične kao i kod pravih RA bolesnika. U zglobovima i sinovijalnoj ovojnici kod štakora kod kojih je izazvan adjuvantom inducirani artritis može se razviti masivna infiltracija upalnih stanica, otok i adhezija zglobne čahure kao i patološke promjene karakteristične za sinovitis ili vaskulitis. RA vaskulitis može dovesti do oštećenja visceralnih organa, posebice srca koje je bogato krvnim žilama i vezivnim tkivom i koje je najčešće zahvaćen organ kod RA. Tako može doći do razvoja aritmija, miokarditisa, perikarditisa i valvularne lezije (75).

Što se tiče samih mehanizama oštećenja srčanog tkiva kod RA, osim promjena krvnih žila koje nastaju kao posljedica ubrzanog aterosklerotskog procesa, kod ovih bolesnika dolazi i do aktivacije nuklearnog faktor kapta B (NF - kB)/ TNF-alfa i transformirajući faktor rasta beta 1 (TGF - beta 1)/Smad signalnog puta. NF - kB je važan fiziološki medijator TNF-alfa, a kada se aktivira onda inducira stvaranje TNF alfa. Na štakorskom modelu adjuvantnog artritisa, kako se pojačava upala zgloba kod AA štakora tako se i povisuje razina TNF - alfa, uključujući i onu u srčanom tkivu. Genska i proteinska ekspresija NF-kB u srčanom tkivu je konzistentna sa ekspresijom TNF alfa što zapravo sugerira kako su NF - kB i TNF - alfa obadvoje važni za pojavnost i razvoj oštećenja miokarda kod RA. Poremećena ravnoteža u Smad signalnom putu stimulira pojačano stvaranje ekstracelularnog matriksa u srčanom tkivu, dovodeći do proliferacije fibroblasta te diferencijacije i ekscesivnog odlaganja kolagena što dovodi do slabljenja funkcije miokarda. Aktivacija Smad signalnog puta regulirana je sa TGF - beta 1. TGF – beta 1 sa svojim proupalnim značajkama je uključen u upalni proces u RA i sličnim poremećajima. Podjedinica Smad2 kada se odvoji od Smad, može se fosforilirati u P - Smad2 što stimulira TGF beta 1. P - Smad2 ulazi u interakciju sa Smad 4 kako bi postao

polimer i ušao u staničnu jezgru. Navedeno u kombinaciji sa transkripcijskim faktorima kao što su GATA4 i MEF2c dovodi do nakupljanja ekstracelularnog matriksa u srčanom tkivu što dovodi do oštećenja miokarda. Smad7 ima inhibitornu ulogu u Smad obitelji te blokira spajanje P - Smad2 i Smad4. Na taj način zaustavlja aktivaciju Smad signalnog puta inhibirajući formiranje kompleksa između Smad 4, P - Smad2 i transkripcijskog faktora. Tako da Smad 7 može odgoditi nastanak ozljede miokarda u RA (76, 77).

Dosad provedena istraživanja na štakorima sa adjuvantim artritisom dokazala su prisutnost fibroze miokarda i s njom povezanim remodeliranjem ventrikla te posljedičnim srčanim zatajenjem. Naime, smatra se kako srčani fibroblasti aktivirani proupalnim procesima proliferiraju i sintetiziraju kolagen koji se onda odlaže u međustanični prostor. Tako su u jednom istraživanju transgenični miševi koji prekomjerno proizvode TNF alfa razvili prekomjernu fibrozu miokarda, došlo je do remodeliranja srčanog mišića i dijastoličke disfunkcije. Također je dokazano kako je remodeliranje miokarda značajno pojačano kod miševa koji su imali visoke razine humanog C - reaktivnog proteina (CRP), uz porast upalnih citokina (IL - 1 beta i TNF – alfa) i fibroze miokarda (kolagen I i III) što je dovelo do značajnog smanjenja ejekcijske frakcije lijevog ventrikla (78).

Nadalje, zadnjih tridesetak godina vrše se istraživanja kako bi se dokazalo da oksidativni stres ima važnu ulogu u RA i kardiovaskularnim bolestima. Jedan od biomarkera oksidativnog stresa je molekula 4 - hidroksinonenal (HNE). HNE je aldehid, odnosno krajnji produkt razgradnje nezasićenih masnih kiselina. Dokazano je kako visoka razina HNE u srcu štakora ima bitnu ulogu u patogenezi fibroze. U izoliranim kardiomiocitima, proučavan je kapacitet HNE da potiče proizvodnju kolagena. Ti in vitro podaci sugeriraju kako je HNE potentan pro kolageni stimulans u srčanom mišiću (78).

1.5.1.1 Elektrokardiogram u štakora

Elektrokardiogram štakora razlikuje se od ljudskog prvenstveno visokom frekvencijom srca, ali i nekim drugim osobinama. Pri tom njegov izgled ovisi i o spolu, starosti i težini životinje, te o položaju tijela u kojem je sniman. Također, značajno je da li je životinja prilikom

snimanja budna ili anestezirana. Na vjerodostojnost EKG-a može utjecati i osjetljivost aparata koji se koristi za snimanje te način snimanja (79 - 84).

1.5.1.2 Frekvencija srca

Frekvencija zdravog srca štakora iznosi 220 - 500 u minuti, što ovisi o tonusu autonomnog živčanog sustava. Kako je to znatno brže od frekvencije srca u čovjeka i brzina snimanja mora biti veća pa se brzina papira mora povećati sa 25 mm/s što je zadovoljavajuće kod ljudi, na 50 - 100 mm/s (79 - 81).

1.5.1.3 P-val

P-val je pozitivan u I, II, III i avF odvodu, dok je negativan u avR. U avL odvodu je spljošten, a može biti i negativan.

Prosječno traje 12 milisekundi. Normalno je zašiljen, mada ponekad može biti dvogrbog oblika sa dva šiljka. Ako se drugi šiljak pojavi unutar 15 ms P-val je normalan, a ako je taj interval duži nastaje P - P kompleks, što se može smatrati intraatrijskim blokom.

Promjene amplitude, polariteta i trajanja P i T_p valova (repolarizacija atrijske) mogu biti posljedica lutanja centra vodiča (79-81).

Normalan P-val u štakora često nastaje u ishodišnoj crti koja se razlikuje od razine u kojem on završava. Štoviše, često nema zajedničke crte koja pripada P - valu, QRS-u i T - valu i koja bi u isto vrijeme predstavljala mjesto početka i svršetka tih otklona. Stoga je u EKG - u štakora teško odrediti izoelektričnu točku (79 - 81).

1.5.1.4 P - R interval i T_p val (val repolarizacije)

Karakterističan izgled P - R intervala sa sastavnim dijelovima (P - valom, T_p valom i P - R segmentom) u štakorskom EKG - u posljedica je velike frekvencije srca i kratkog trajanja

procesa depolarizacije i repolarizacije u atrijima. U štakorskom EKG - u često je moguće identificirati val Tp koji nastupa odmah iza P - vala i završava prije završetka QRS kompleksa. Repolarizacija atrijskih niti počinje odmah nakon inicijalnog otklona P - vala i nastavlja se kroz cijeli P - R segment koji normalno iznosi 35 milisekundi.

Zbog asinhronne aktivacije atrijskog mišića, prostornog ustrojstva, organizacije atrijske muskulature u odnosu na elektrodu i postupnog oporavljanja svakog atrijskog vlakna, Tp val može biti prekriven QRS - kompleksom.

Ponekad, Tp val može izgledati kao izravan produžetak silazne putanje P - vala do točke ispod bazalne crte. Takva kombinacija P i Tp vala stvara sliku bifazičnog P vala. Val Tp je uvijek znatno manji od pripadnog P vala i može se pojavljivati kao konkavni, konveksni, kutno ili središnje zašiljeni otklon u PR segmentu (85).

1.5.1.5 Izoelektrična crta

Mjesto u kojem započinju i završavaju P i Tp valovi, QRS-kompleks i T val, često je teško odrediti u normalnom, a naročito u patološkom EKG - u štakora. Točka u kojoj nastaje P - val može biti upisana na silazni val T - vala, dok točka na kojoj P-val završava i počinje P-R segment može izgledati snižena zapisom vala Tp.

Mjesto spojne točke J na kojoj završava QRS - kompleks i započinje val T često je pomaknuto gore ili dolje u odnosu na izoelektričnu crtu u jednom ili više odvoda. Taj pomak je posljedica brzog normalnog početka repolarizacije štakorskog srca. Na mjestu QRS - T točke repolarizacija miokarda je već uznapredovala u područjima u kojima je depolarizacija najprije započela. Zbog toga u normalnom štakorskom srcu ST segment ne postoji.

Val Tp je potpuno završio prije kraja PR segmenta što ukazuje da je točka u kojoj završava PR segment i počinje QRS - kompleks najmanje podložna promjenama uslijed električnih zbivanja za vrijeme srčanog ciklusa. Ta točka predstavlja referentno mjesto za određivanje izoelektrične crte, kako u normalnom, tako i u poremećenom EKG - u (79 - 81).

1.5.1.6 QRS - T kompleks

Prva faza u nastanku ovog kompleksa je Q zubac. To je kratki negativni zapis koji traje do 2,5 milisekunde i predstavlja depolarizaciju septuma.

Druga faza je R - zubac. U to vrijeme u većine odvoda se upisuje pozitivni otklon veće amplitude. Zbirni vektor depolarizacije nastaje u slobodnim stijenkama ventrikula.

Treća faza u nastanku QRS - T kompleksa je S - zubac koji predstavlja završni dio depolarizacije ventrikula i odgovara depolarizaciji baze štakorskog srca.

Četvrta faza je T val, repolarizacija ventrikula. Ta faza je najosjetljiviji pokazatelj funkcije miokarda. Uzlazni krak T vala traje kraće i ima strmiji nagib od silaznog kraka.

QRS - kompleks normalno traje od 15 - 17,5 ms. Gornja granica normalnog trajanja je 20 ms, a donja 10 ms. Početak QRS - kompleksa se lako određuje, dok je točku u kojoj završava ponekad teško pronaći zbog spajanja i prekrivanja s početkom T vala.

T-val je često više ili manje spojen s završnim dijelom QRS kompleksa. Spojno mjesto završnog dijela QRS - a i početak T-vala je često za 1 - 2 mm iznad ili ispod izoelektrične crte.

Dakle, spojna točka QRS - a i T-vala se pojavljuje na različitim mjestima u različitim odvodima. Stoga je potrebna pažljiva inspekcija tog područja u svim odvodima.

Normalan T-val je asimetričan i ima zašiljen vrh. Trajanje silaznog kraka T-vala je najosjetljiviji dio QRS - T kompleksa. Stoga, dužina T-vala i QT intervala varira, pa je pri procjeni QT intervala potrebno je pregledati sve odvode, a najduži interval uzeti kao najtočnije mjerenje (86).

1.5.1.7 Električna os

Električna os vektora u EKG-u štakora je gotovo vertikalna. Zbog toga prvi odvod nije pogodan za mjerenje i proučavanje elektrokardiografskih parametara (79 - 81).

1.5.1.8 U - val

Ponekad se u EKG - u štakora viđa U - val koji započinje otklonom konveksnim prema gore. T - val i U - val se razlikuju po usjeku između njih. U - val je ovalnog oblika, ponekad zašiljen ili bifazičan.

Polimorfizam U - valova potrebno je poznavati kako se ne bi zamijenio s T - valom i na taj se način krivo interpretirala repolarizacija štakorskog srca (79 - 81).

Što se tiče dosad provedenih istraživanja u kojima je analiziran EKG kod štakora u kojih je izazvan adjuvantni artritis, dosad je provedeno jedno takvo istraživanje gdje je verificirano kako štakori u akutnoj fazi artritisa nisu imali nikakve promjene EKG - a, za razliku od tih istih životinja u kroničnoj fazi bolesti gdje je zabilježeno produljenje PR i QT intervala. Također, nije bilo značajne razlike u srčanoj akciji između kontrolne skupine i skupine životinja u akutnoj fazi artritisa, međutim, skupina životinja u kroničnoj fazi bolesti imala je statistički značajno više vrijednosti srčane akcije (87).

1.5.2 Reumatoidni artritis i bubrezi

Premda rijetko i bubrezi također mogu biti zahvaćeni upalom, što zapravo pogoršava klinički tijek RA i povećava mortalitet ovih bolesnika. Još uvijek nema jasnog dogovora oko prevalencije ovakvih tegoba u RA, ali histološka analiza bioptata bubrega ovih bolesnika sa zahvaćenim bubrezima pokazala je kako se u 60 - 65 % slučajeva radilo o glomerulonefritisu, 20 - 30 % o amiloidozi, nakon čega je slijedi akutni i kronični nefritis. Takva oštećenja posljedica su sekundarne renalne amiloidoze, nefrotoksičnog učinka reumatskih lijekova odnosno glomerulonefritisa kao ekstraartikularne manifestacije RA. Amiloidoza utječe na preživljenje, povisuje smrtnost i glavni je uzrok posljednjeg stadija renalne bolesti kod bolesnika koji boluju od RA i nefropatije. Zbog toga RA bolesnici zahtijevaju imunosupresivnu terapiju kako bi se prevenirale komplikacije osnovne bolesti i smanjio rizik potrebe za dijalizom bolesnika. Međutim, dugotrajna i kombinirana farmakoterapija RA bolesnika uključuje oštećenje bubrega. To se posebice odnosi na terapiju nesteroidnim protuupalnim lijekovima i DMARD - ovima (posebice MTX). Opisani su i slučajevi IgA nefropatije za vrijeme terapije leflunomidom i etanerceptom (anti - TNF - alfa). Među RA

nefropatijama, najčešća histološka lezija je mezangijalni glomerulonefritis (35 - 60 %), a slijedi je bolest minimalnih promjena (3 - 14 %) te membranski glomerulonefritis, IgA nefropatija i p - ANCA pozitivni nekrotizirajući krešentni glomerulonefritis (88 - 90).

Vrlo su oskudna dosad provedena ovakva istraživanja na štakorima sa adjuvantnim artritisom, a u prvom ovakvom istraživanju zamijećeno je pojačano izlučivanje urina, povišene vrijednosti kreatinina te smanjen klirens kreatinina i to 16 - ti dan nakon injiciranja adjuvansa. Do tridesetog dana ove vrijednosti su se normalizirale te su životinje žrtvovane nakon čega je učinjena histološka analiza preparata gdje su zamijećene brojne histološke abnormalnosti kao što su lezije tubula sa fokalnom bazofilijom, edemom, granularnim depozitima i zadebljanjem bazalne membrane, a promjene glomerula uključuju granularne depozite sa fokalnom glomerulopatijom (30, 31). To su bili prvi dokazi koji su pokazali disfunkciju bubrega i histološke abnormalnosti tijekom ranog stadija adjuvantnog artritisa u štakora. U drugom dosad provedenom istraživanju na štakorima sa adjuvantnim artritisom gdje je proučavana funkcija odnosno morfologija bubrega također su verificirane promjene na bubrezima i to u vidu glomerulonefritisa odnosno nefroze (89, 90).

Na kraju, možemo reći kako su dosad provedena istraživanja u ovom segmentu na štakorima sa adjuvantnim artritisom malobrojna, odnosno, kako ne postoje istraživanja koja međusobno uspoređuju utjecaj pentadekapeptida BPC 157, L - arginina i L - NAME na adjuvantni artritis, srce i bubrege u štakora s čim ćemo se baviti u našem ispitivanju. Također, s obzirom na nuspojave do kojih dovode dosad upotrebljavani lijekovi za liječenje reumatoidnog artritisa, svakako postoji potreba za pronalaženjem nekih drugih, učinkovitih, ali sigurnih alternativa.

2. HIPOTEZA

S obzirom na velik broj bolesnika koji boluju od RA i značajne tegobe koje proživljavaju odlučili smo napraviti istraživanje u svrhu utvrđivanja proupalnog djelovanja nekih novih supstanci koje bi se mogle koristiti u svrhu liječenja navedenog. Stoga smo pristupili istraživanju na štakorima kojima smo izazvali adjuvantni artritis, postavili glavnu hipotezu te definirali glavni i specifične ciljeve istraživanja.

2.1 Hipoteza

- Pentadekapeptid BPC 157, L - arginin i L - NAME pokazuju profilaktički i terapijski učinak u štakora kod adjuvantnog artritisa, lezija na bubrezima i srcu, te postoji specifični međuođnos kod njihove zajedničke primjene.

3. CILJEVI RADA

3.1 Glavni cilj istraživanja

- reducirati simptome artritisa te očuvati funkciju zglobova štakora s adjuvantnim artritismom primjenom BPC 157 - a, L – arginina i L - NAME i njihovih kombinacija, te također djelovati na lezije na srcu i bubrezima koje ovakve životinje mogu razviti u sklopu osnovne bolesti, baš kao i bolesnici koji boluju od RA.

3.2 Specifični ciljevi istraživanja

- Istražiti protuupalni učinak BPC 157 - a, L - arginina i L - NAME i njihovih kombinacija na otok gležnjeva, indeks artritisa i tjelesnu težinu u štakora s adjuvantnim artritismom
- Verificirati histološke i EKG promjene miokarda te laboratorijske parametre oštećenja miokarda (CK, LDH, AST) u štakora s adjuvantnim artritismom primjenom BPC 157 - a, L - arginina i L - NAME te njihovih kombinacija
- Verificirati histološke promjene bubrega te laboratorijske parametre oštećenja bubrega (urea, kreatinin, Na, K) u štakora s adjuvantnim artritismom primjenom BPC-a 157, L – arginina i L - NAME te njihovih kombinacija

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1 Pokusne životinje

Pokus je proveden na šest do osam tjedana starim ženka Wistar štakora, ukupno 180 životinja, težine 200 - 220 gr. Štakori su bili iz vlastitog uzgoja (nastamba za lab. životinje Zavoda za farmakologiju MEF - a Sveučilišta u Zagrebu, broj reg. HR - POK - 007), a do izvođenja pokusa boravili su u kavezima na ujednačenoj kontroliranoj sobnoj temperaturi i uz normalnu vlažnost zraka te u uvjetima prirodnih 12 - satnih ciklusa svjetla i tame. Hranjene su standardnom hranom, a do izvođenja kao i tijekom pokusa obadvije skupine životinja hranu i vodu su dobivale „ad libitum“.

4.2 Lijekovi

Svi lijekovi koji su primjenjeni davani su intraperitonealno u donju desnu regiju abdomena, a iznad mokraćne cijevi kako bi izbjegli leziju mokraćnog mjehura.

Primjenjivan je sintetski pentadecapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W.1419, Diagen, d.o.o. Ljubljana, Slovenia). Riječ je o dijelu sekvence proteina BPC izoliranog iz gastričnog soka čovjeka koji je topiv u vodi na pH 7.0 i u fiziološkoj otopini. Pripremljen je kako je opisano u prethodnim radovima. U eksperimentu je korišten peptid 99% (HPLC) čistoće (1 - des - Gly peptid kao onečišćenje) otopljen u fiziološkoj otopini u dvije doze (10 µg/kg, 10 ng/kg) (91).

Osim BPC - a, u istraživanju su korištene još dvije supstance, L - NAME (5 mg/kg) i L - arginin (100 mg/kg), (Sigma, St. Louis, MO, USA), također pripremljeni kako je već opisano u prethodnim radovima (92).

Životinje u kontrolnim skupinama dobivale su fiziološku otopinu u dozi 5 ml/kg.

4.3 Adjuvantni arthritis

U istraživanju smo koristili opće prihvaćeni model adjuvantnog artritisa (93 - 96). Naime, životinje su imunizirane Freundovim kompletnim adjuvansom (Sigma, SAD) koji sadrži 1 mg topline umrtvljenih *Mycobacteria tuberculosis* otopljenih u 1 ml tekućeg parafina. Sve životinje su nulti dan pokusa primile intradermalnu injekciju adjuvansa u količini od 0,2 ml emulzije u bazu repa (78, 98).

4.4 Eksperimentalna procedura

Slučajnim odabirom životinje su podijeljene u 18 skupina, tako da je u svakoj bilo po 10 životinja. Eksperimentalne skupine bile su tretirane pentadekapeptidom BPC 157 i.p. u dozama 10 µg/kg i 10 ng/kg, L - argininom u dozi 100 mg/kg te L - NAME - om u dozi 5 mg/kg, dok su životinje iz kontrolne skupine dobivale fiziološku otopinu 5 ml/kg i.p., a sve u kombinacijama kako je prikazano u Tablici 1.

Pokus je izveden općenito u slijepim uvjetima na način da istraživač nije znao da li daje neku od navedenih aktivnih supstanci ili fiziološku otopinu, naime, to je znao mentor.

Imali smo dva protokola, preventivni i terapijski. Nakon aplikacije Freundovog adjuvansa nulti dan pokusa, u preventivnom protokolu supstance su primjenjivane kroz četrnaest dana počevši od prvog dana pokusa, dakle paralelno sa razvojem adjuvantnog artritisa, dok su u terapijskom protokolu davane kroz isti vremenski period, ali počevši od petnaestog dana pokusa, tj. nakon što je postignut maksimalan intenzitet bolesti, a završno sa 28 - im danom.

Tablica 1. Dizajn istraživanja, preventivni i terapijski protokol

Skupine	1-14 dan – preventivni protokol	15-28 dan – terapijski protokol
Sintetski BPC 157 (10 µg/kg) i.p. + FA	10	10
Sintetski BPC 157 (10 ng/kg) i.p. + FA	10	10
L – arginin (100 mg/kg) i.p + FA	10	10
L – NAME (5 mg/kg) i.p. + FA	10	10
Sintetski BPC 157 (10 µg/kg) + L – NAME (5 mg/kg i.p.) + FA	10	10
L – NAME (5 mg/kg) + L – arginin (100 mg/kg) i.p. + FA	10	10
L – arginin (100 mg/kg) i.p. + sintetski BPC 157 (10 µg/kg) i.p. + FA	10	10
L – arginin (100 mg/kg) i.p + L – NAME (5 mg/kg) + sintetski BPC 157 (10 µg/kg) i.p. + FA	10	10
Kontrola (0,9 % NaCl, 5 ml/kg) i.p. + FA	10	10

4.5 Tijek pokusa

I dio pokusa:

U prvom dijelu istraživanja životinje su randomizacijom podijeljene u 9 skupina (10 životinja po skupini, ukupno 90 životinja). Osam eksperimentalnih skupina činile su tretirane životinje, a jednu skupinu kontrolne životinje.

A) Preventivni protokol:

1. vaganje i obilježavanje životinja
2. aplikacija Freundovog adjuvansa intradermalno u bazu repa nulti dan pokusa
3. svakodnevna primjena BPC - a 157 i.p., L - arginina i L - NAME te njihovih međusobnih kombinacija u eksperimentalnim skupinama, u dozama i kombinacijama koje su navedene u Tablici 1 (istraživač ne zna što daje, zna mentor) u periodu od 1 - og do 14 - og dana pokusa. Kontrolna skupina životinja primala je ekvivalentnu količinu 0.9 % otopine NaCl - a u dozi 5 ml/kg, također intraperitonealno.
4. praćenje životinja uz svakodnevno fotografiranje stopala i gležnjeva nožica u vrijeme promatranja od 1 - og do 14 - og dana pokusa (fotoaparat Olympus mju 300) kada se očekuje i maksimalan intenzitet bolesti. Intenzitet artritisa na šapama ocijenjivan je svakodnevno od strane nepristranog promatrača i bodovan prema skali modificiranoj prema radu Sikirić i suradnici (23) gdje je 0 = nema crvenila niti otoka, 1 = blage promjene, 2 = umjerene promjene, 3 = teške promjene, a 4 = izrazito teške promjene (23).
5. vaganje životinja 14 - ti dan pokusa

B) Terapijski protokol :

1. vaganje i obilježavanje životinja
2. aplikacija Freundovog adjuvansa intradermalno u bazu repa nulti dan pokusa
3. praćenje razvoja adjuvantnog artritisa kroz sljedećih 14 dana uz svakodnevno fotografiranje od 1 - og do 14 - og dana pokusa
3. svakodnevna primjena BPC 157, L - arginina i L- NAME u eksperimentalnim skupinama, u dozama i kombinacijama koje su navedene u Tablici 1, odnosno 0.9% NaCl - a u kontrolnoj skupini (istraživač ne zna što daje, zna mentor) u periodu od 15-og do 28 - og dana pokusa. Sve supstance primjenjene su intraperitonealno
4. praćenje životinja uz svakodnevno fotografiranje stopala i gležnjeva nožica (fotoaparat Olympus mju 300) od 1 - og do 28 - og dana pokusa. Intenzitet artritisa na šapama ocijenjivan je svakodnevno od strane nepristranog promatrača i bodovan prema skali kako je opisano u preventivnom protokolu
5. vaganje životinja 14 – ti i 28 – mi dan pokusa

II dio pokusa:

A) Preventivni protokol:

1. po provođenju i završetku terapije 14 - ti dan pokusa, izvršena je anestezija životinja kombinacijom anestetika Ketamine – HCl 50 – 60 mg/kg + Xylazine - HCl 5 - 10 mg/kg i.p.
2. snimanje EKG-a u položaju na leđima, pomoću elektroda koje smo metalnim iglicama pričvrstili za kožu na sva 4 ekstremiteta životinje
3. uzimanje uzoraka krvi za biokemijsku analizu venepunkcijom iz gornje šuplje vene radi određivanja razine enzimskih markera oštećenja miokarda (AST, CK, LDH) te parametara bubrežne lezije (urea, kreatinin, Na, K). Svi uzorci analizirani su na isti način, s pomoću postupaka uobičajenih u Kliničkom Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava.
5. žrtvovanje životinja predoziranjem istom, gore navedenom kombinacijom anestetika
6. otvaranje prsišta i abdomena radi odstranjivanja srca i bubrega za patohistološku analizu
7. odstranjivanje ekstremiteta radi patohistološke i radiološke analize (RTG).

Materijal koji je korišten (tkivo srca, bubrega i zglobova), obrađen je standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu od 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun - eozin (HE). Tkivo kosti prethodno je obrađeno u otopini 4 % kloridne i 5 % mravlje kiseline. Sve procjene oštećenja provodio je isti ispitivač, liječnik patolog u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a koji nema podatke o ispitanicima. Na koštanim histološkim preparatima gledano je zadebljanje sinovije, proliferacija površinskih stanica, postojanje viloznih struktura, postojanje kroničnog upalnog infiltrata i postojanje erozija kosti unutar zgloba. Ovi elementi analizirani su semikvantitativno prema sljedećim kriterijima: zadebljanje sinovije (0 - nema, 1 - blago, 2 - umjereno, 3 - jako), proliferacija površinskih stanica (0 - nema, 1 - blaga, 2 - umjerena, 3 - izražena), postojanje viloznih struktura (0 - ne, 1 postojanje pokoje vilozne strukture, 2 - postojanje umjerenog broja viloznih struktura, 3 - postojanje velikog broja viloznih struktura), kronični upalni infiltrat (0 - ne nalazi se, 1 - oskudan, 2 - umjeren, 3 - obilan), erozija kosti (0 - ne, 1 - da).

Na histološkim preparatima miokarda srca gledana je prisutnost upalnog infiltrata s obzirom na njegovu kvalitetu i kvantitetu te eventualno formiranje mikroapscesa. Promjene miokarda ocjenjene su prema sljedećim kriterijima: 0 - nema promjena, 1 - osudan upalni infiltrat, 2 - srednje obilan upalni infiltrat, 3 - obilan upalni infiltrat, 4 - mikroapscesi.

Na histološkim preparatima bubrežnog parenhima analiziran je upalni infiltrat te postojanje „celularnih polumjeseca“. Ovi elementi analizirani su s obzirom na njihovu kvalitetu i kvantitetu prema sljedećim kriterijima: 0 – nema upalnog infiltrata, 1 – oskudan upalni infiltrat, 2 – umjereno obilan upalni infiltrat, 3 – obilan upalni infiltrat, 4 – formirani polumjeseci.

U svih životinja učinjena je i rendgenska analiza gležnjeva i stopala šapa. Koštano oštećenje ocijenjeno je od strane radiologa vrijednostima od 0 - 3, gdje 0 = nema otoka niti destrukcije kosti, 1 = edem i blago koštano oštećenje, 2 = umjerene erozije kosti, 3 = teške koštane erozije (98). Sve procjene oštećenja ocijenio je isti ispitivač u Zavodu za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju KBC-a Zagreb koji nije imao podatke o testiranim životinjama.

B) Terapijski protokol:

1. po provođenju i završetku terapije 28 - mi dan pokusa, životinje su anestetizirane kombinacijom anestetika Ketamine - HCl 50 - 60 mg/kg + Xylazine - HCl 5 - 10 mg/kg i.p.
2. snimanje EKG-a u položaju na leđima, pomoću elektroda koje smo metalnim iglicama pričvrstili za kožu na sva 4 ekstremiteta životinje
3. uzimanje uzorka krvi za biokemijsku analizu venepunkcijom gornje šuplje vene
5. žrtvovanje životinja predoziranjem istom, gore navedenom kombinacijom anestetika
6. otvaranje prsišta i abdomena radi odstranjivanja srca i bubrega za patohistološku analizu
7. odstranjivanje ekstremiteta radi patohistološke i radiološke analize (RTG).

Uzeta krv i tkiva obrađena su i analizirana kako je već prethodno navedeno u preventivnom protokolu.

4.6 Praćenje elektrokardiografskih promjena

Sukladno prihvaćenim normama i zahtjevima Etičkog povjerenstva, životinje smo prije snimanja EKG-a anestetizirali kako je prethodno objašnjeno. EKG je sniman u anestetiziranih životinja koje su tijekom snimanja stavljene u leđni položaj, a elektrode EKG-a su im metalnim iglama bile pričvršćene za kožu sva četiri ekstremiteta.

Elektrokardiografske promjene praćene su prije žrtvovanja, EKG se snimao tijekom 2 minute u tri standardna odvoda na monitoru Medtronic Analyser programera, kao i Sony kamerom. EKG u štakora iz kontrolne skupine služio je kao kontrolni patološki nalaz.

Promatrani parametri su:

1. trajanje P - R intervala
2. amplitude R valova
3. srčana frekvencija

EKG je pri tom bio baždaren na visinu amplitude 0.5 mV/cm, a brzina snimanja bila je 100 mm/sekundi.

4.7 Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci obrađeni su u programskom paketu STATISTICA 10.0 (www.statsoft.com).

Analiza distribucije podataka testirana je Kolmogorov - Smirnov testom. Za normalno distribuirane podatke korišten je ANOVA test i prikladni post - hoc testovi.

Korištenje sinergičnog soja Wistar štakora, postupka randomizacije, navedenog načina usporedbe, te jednakog broja životinja u svim skupinama omogućilo je primjenu analize varijance, ANOVA testa.

Pri obradi, nul - hipoteza je bila da skupine pripadaju istoj populaciji. Razlike su pripisane slučaju, što je testirano parametrijskim metodama i odgovarajućim post - hoc testovima.

Elektrokardiografski parametri testirani su parametrijskom metodom analize varijance (ANOVA), a kod odbacivanja nul - hipoteze je korišten najkonzervativniji posthoc test, Scheffeov test, zbog najmanje lažno pozitivnih rezultata. Granična vrijednost uteza je bila $\alpha =$

0.05. Ako bi test pokazao $p > 0.05$ nul - hipoteza je bila prihvaćena, a u slučajevima kada je $p < 0.05$ nul - hipoteza je bila odbačena.

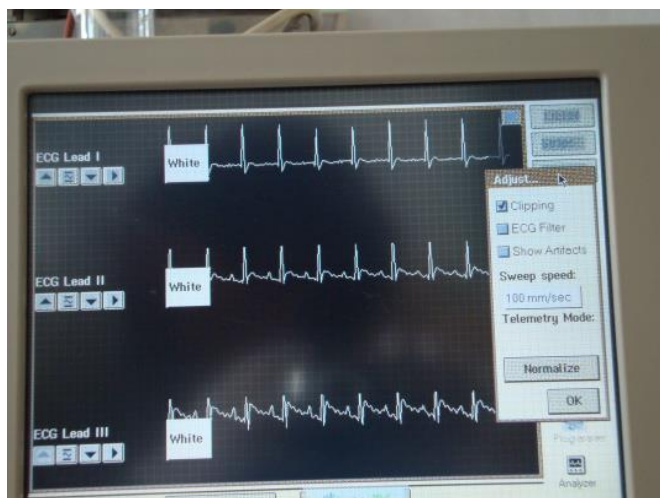
5. REZULTATI

5.1.1 Promjene u EKG - u

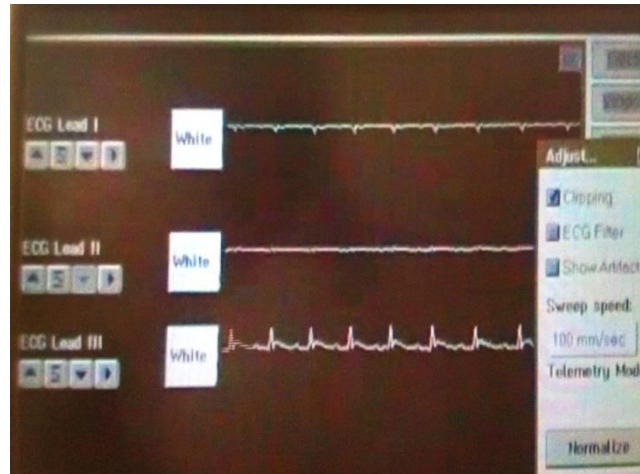
Kod životinja kod kojih je izazvan adjuvantni artritis verificirane su promjene u EKG - u koje odgovaraju kriterijima EKG - a u miokarditisu. Tipična EKG promjena za miokarditis jest prolongacija PR intervala, smanjenje voltaže QRS kompleksa i porast srčane frekvencije (99).

U odnosu na kontrolnu skupinu životinja, sve ove navedene promjene su značajno umanjene primjenom BPC - a 157 u obadvije doze ($10 \mu\text{gr/kg}$, 10 ng/kg i.p.) i u obadva tretmana (profilaktičkom i terapijskom). Modulacija aktivnosti NO sustava djelovanjem L - NAME i L - arginina također dovodi do promjena EKG - a kod miokarditisa. L - NAME je djelovao sinergistički sa BPC - om 157 i pri tome umanjio znakove miokarditisa u EKG - u, dok je L - arginin djelovao antagonistički te pogoršano navedene tegobe. Istovremena primjena L - NAME i L - arginina nije značajno utjecala na EKG oboljelih životinja. Također, istovremena primjena L - NAME i L - arginina nije utjecala na pozitivne učinke BPC 157 na EKG.

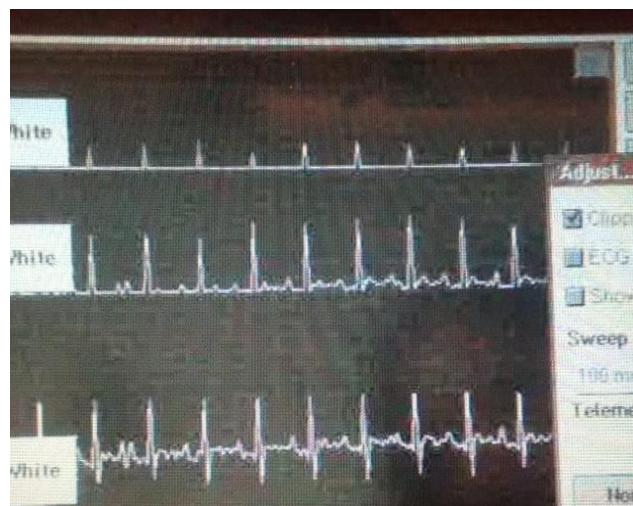
Slike 1 - 4 prikazuju bazalni EKG štakora te EKG sa vidljivim patološkim promjenama.



Slika 1. bazalni EKG štakora



Slika 2. Produljenje P – R interval verificirano kod životinja oboljelih od miokarditisa



Slika 3. Ubrzana srčana frekvencija uz PQ prolongaciju kod životinja oboljelih od miokarditisa



Slika 4. Snižena visina R vala u pacijenata oboljelih od miokarditisa

Učinak BPC - a 157 na trajanje P - R intervala, visinu R valova te srčanu frekvenciju u profilaktičkom i terapijskom protokolu prikazan je tablično (tablica 2 - 7) i grafički na slikama 5 - 10.

A) PROFILAKTIČKI PROTOKOL

Tablica 2. PR interval (msec) tretiranih životinja prema skupinama 14 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a nakon toga su svakodnevno tretirane supstancama kako je u tablici navedeno, a prema skupinama)

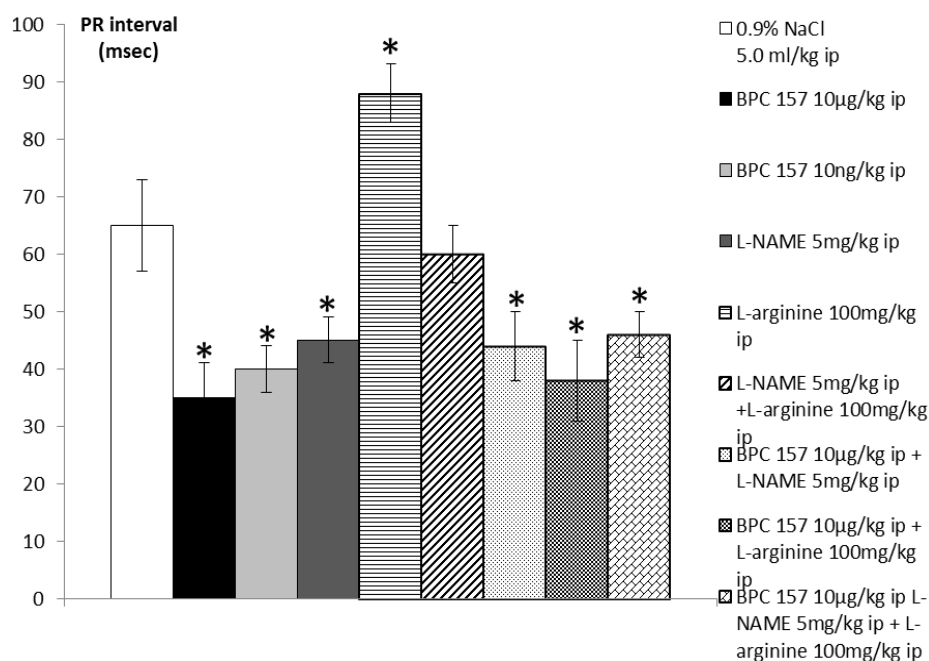
0.9% NaCl 5.0 ml/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip	BPC 157 10ng/kg ip	L- NAME 5mg/kg ip	L- arginine 100mg/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip +L- arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L- NAME 5mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L- arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip L- NAME 5mg/kg ip + L- arginine 100mg/kg ip
65 ± 8	35 ± 6	40 ± 4	45 ± 4	88 ± 5	60 ± 5	44 ± 6	38 ± 7	46 ± 4

Tablica 3. Amplitude R valova (mV) tretiranih životinja prema skupinama 14 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a nakon toga su svakodnevno tretirane supstancama kako je u tablici navedeno, a prema skupinama)

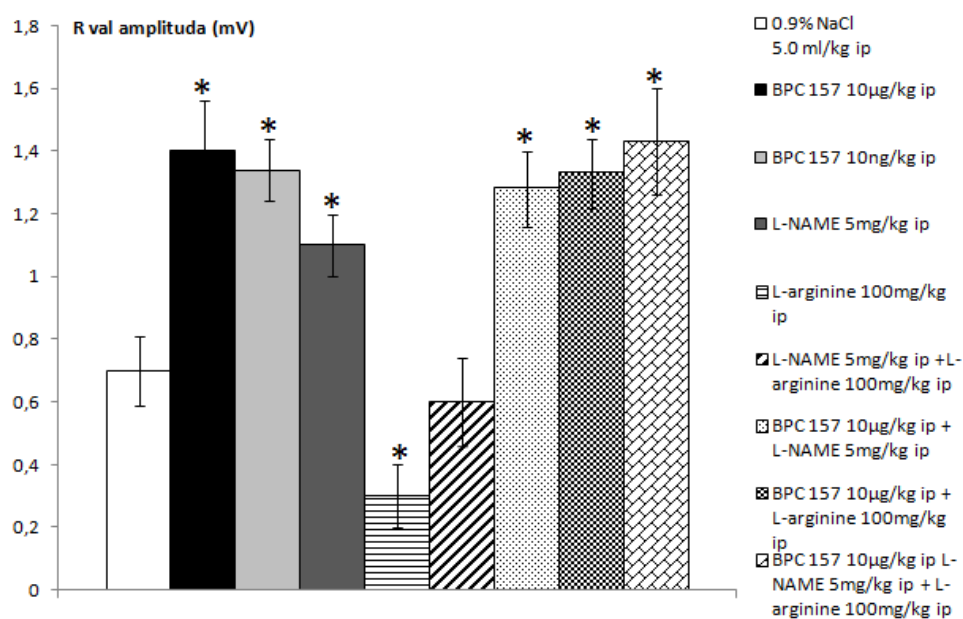
0.9% NaCl 5.0 ml/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip	BPC 157 10ng/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip	L-arginine 100mg/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip +L- arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L-NAME 5mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L- arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip L-NAME 5mg/kg ip + L-arginine 100mg/kg ip
0,7 ± 0,11	1,4 ± 0,16	1,34 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,14	1,28 ± 0,12	1,33 ± 0,11	1,43 ± 0,17

Tablica 4. Srčana akcija (broj otkucaja/min) tretiranih životinja prema skupinama životinja 14-ti dan pokusa (0-ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a nakon toga su svakodnevno tretirane supstancama kako je u tablici navedeno, a prema skupinama)

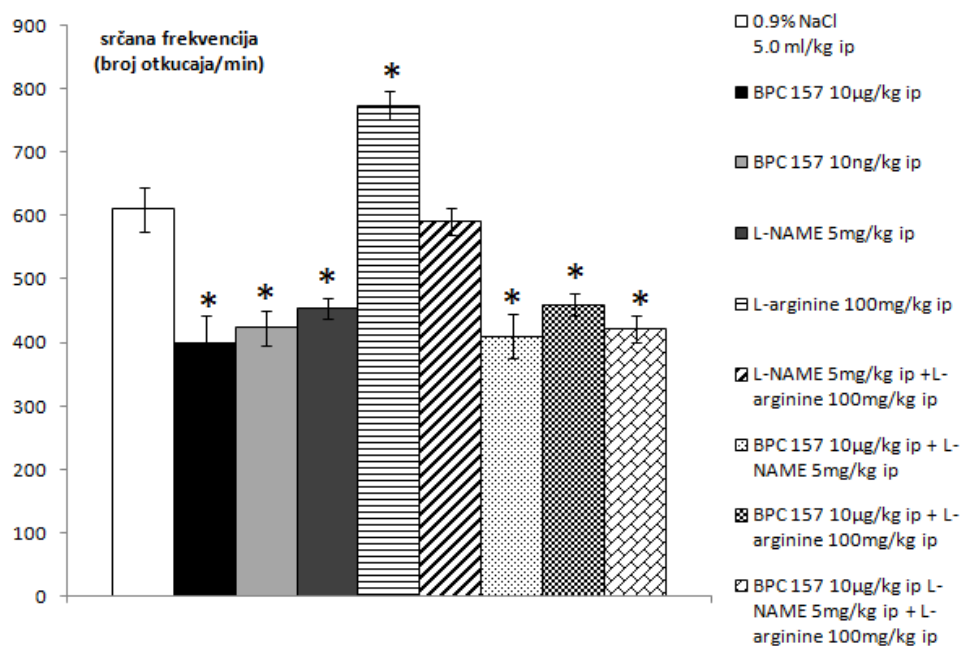
0.9% NaCl 5.0 ml/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg .i.p	BPC 157 10ng/kg i.p.	L- NAME 5mg/kg i.p.	L-arginine 100mg/kg i.p.	L-NAME 5mg/kg ip +L- arginine 100mg/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg ip + L- NAME 5mg/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg ip + L- arginine 100mg/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg ip L- NAME 5mg/kg ip + L- arginine 100mg/kg i.p.
610± 34	398 ± 44	424 ± 27	454 ± 16	775 ± 22	592 ± 21	411 ± 35	461 ± 17	422 ± 22



Slika 5. Vrijednosti PR intervala među tretiranim skupinama životinja 14 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a nakon toga su svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$



Slika 6. Vrijednosti R vala među tretiranim skupinama životinja 14 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a nakon toga su svakodnevno tretirane supstancama kako je u grafu navedeno, a prema skupinama). * $p < 0,05$



Slika 7. Vrijednosti srčane frekvencije među tretiranim skupinama životinja 14 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a nakon toga su svakodnevno tretirane gore supstancama kako je u grafu navedeno, a prema skupinama). * $p < 0,05$

B) TERAPIJSKI PROTOKOL

Tablica 5. Vrijednosti PR intervala (msec) prema skupinama životinja 28 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a a nakon toga od 15 - 28 dana svakodnevno su prema skupinama tretirane supstancama kako je navedeno u tablici)

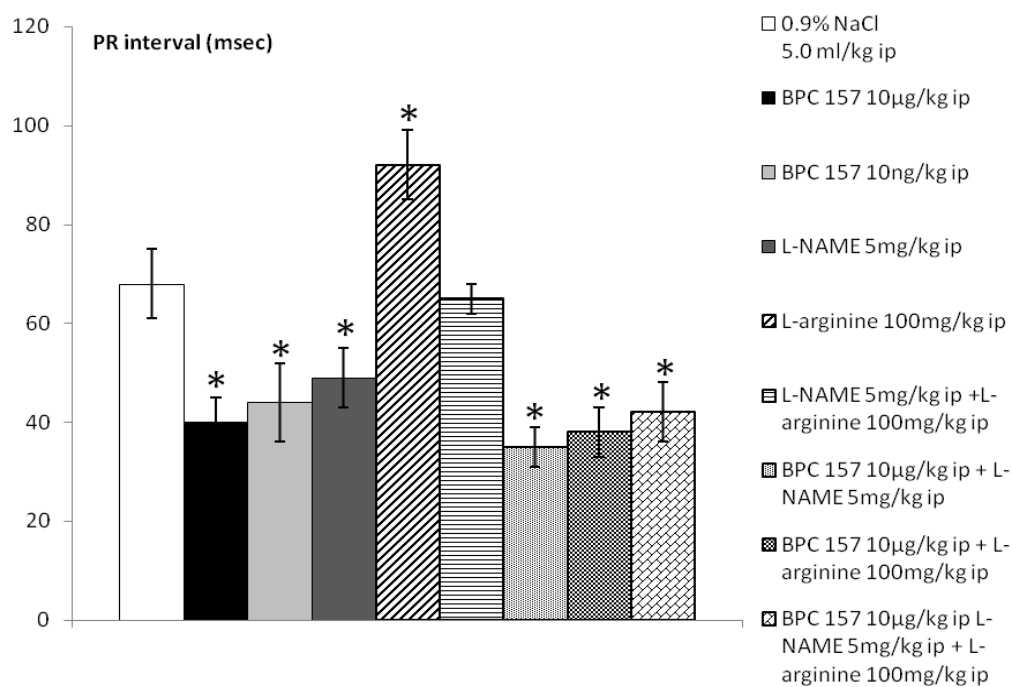
0.9% NaCl 5.0 ml/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip	BPC 157 10ng/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip	L-arginine 100mg/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip + L-arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L-NAME 5mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L-arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip L-NAME 5mg/kg ip + L-arginine 100mg/kg ip
68 ± 7	40 ± 5	44 ± 8	49 ± 6	92 ± 7	65 ± 3	35 ± 4	38 ± 5	42 ± 6

Tablica 6. Vrijednosti R val amplituda (mV) prema skupinama životinja 28 - ti dan pokusa pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a a nakon toga od 15 - 28 dana svakodnevno su prema skupinama tretirane supstancama kako je navedeno u tablici)

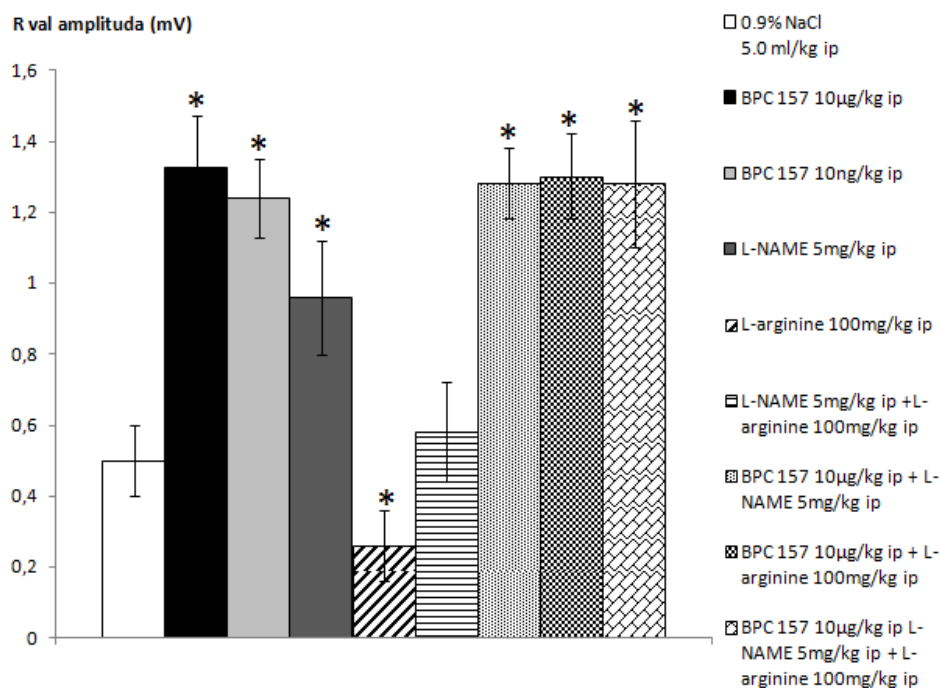
0.9% NaCl 5.0 ml/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip	BPC 157 10ng/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip	L-arginine 100mg/kg ip	L-NAME 5mg/kg ip +L- arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L-NAME 5mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip + L- arginine 100mg/kg ip	BPC 157 10µg/kg ip L-NAME 5mg/kg ip + L-arginine 100mg/kg ip
0,5 ± 0,1	1,33 ± 0,14	1,24 ± 0,11	0,96 ± 0,16	0,26 ± 0,1	0,58 ± 0,14	1,28 ± 0,1	1,3 ± 0,12	1,28 ± 0,18

Tablica 7. Vrijednosti srčane akcije (broj otkucaja/min) prema skupinama životinja 28 - mi dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a nakon toga od 15 - 28 dana svakodnevno su prema skupinama tretirane supstancama kako je navedeno u tablici).

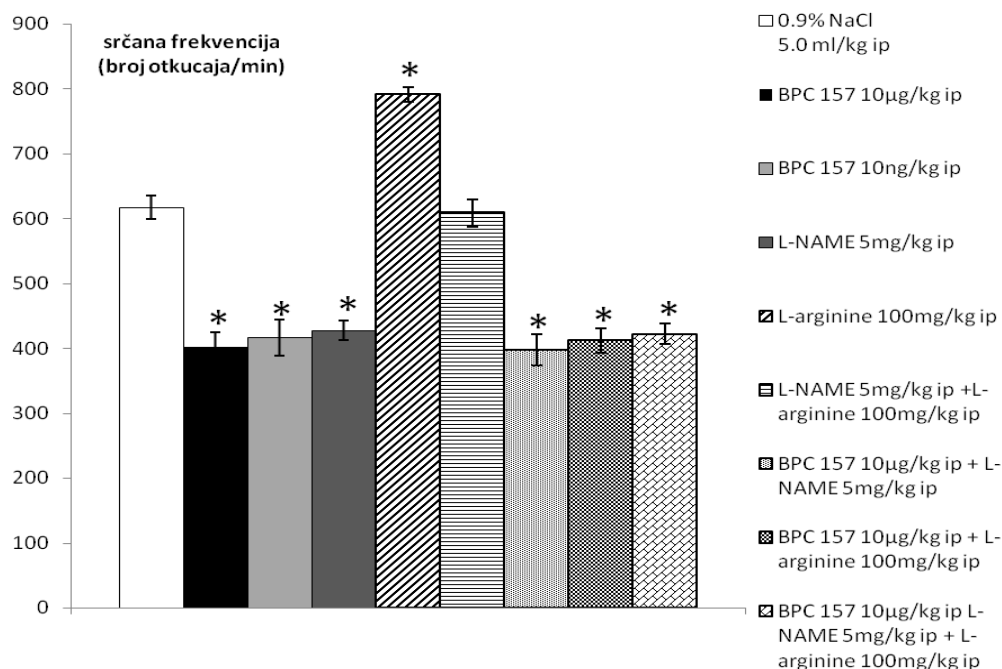
0.9% NaCl 5.0 ml/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg i.p.	BPC 157 10ng/kg i.p.	L- NAME 5mg/kg i.p.	L-arginine 100mg/kg i.p.	L-NAME 5mg/kg ip +L- arginine 100mg/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg ip + L- NAME 5mg/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg ip + L- arginine 100mg/kg i.p.	BPC 157 10µg/kg ip L-NAME 5mg/kg ip + L- arginine 100mg/kg i.p.
617 ± 18	402 ± 22	417 ± 28	428 ± 15	791 ± 11	609 ± 21	398 ± 24	412 ± 19	422 ± 16



Slika 8. Vrijednosti PR intervala među tretiranim skupinama životinja 28 - mi dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a nakon toga od 15 - 28 dan svakodnevno su prema skupinama tretirane gore navedenim supstancama). * $p < 0,05$



Slika 9. Vrijednosti amplituda R vala među tretiranim skupinama životinja 28 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a nakon toga od 15-28 dan svakodnevno su prema skupinama tretirane gore navedenim supstancama). * $p < 0,05$



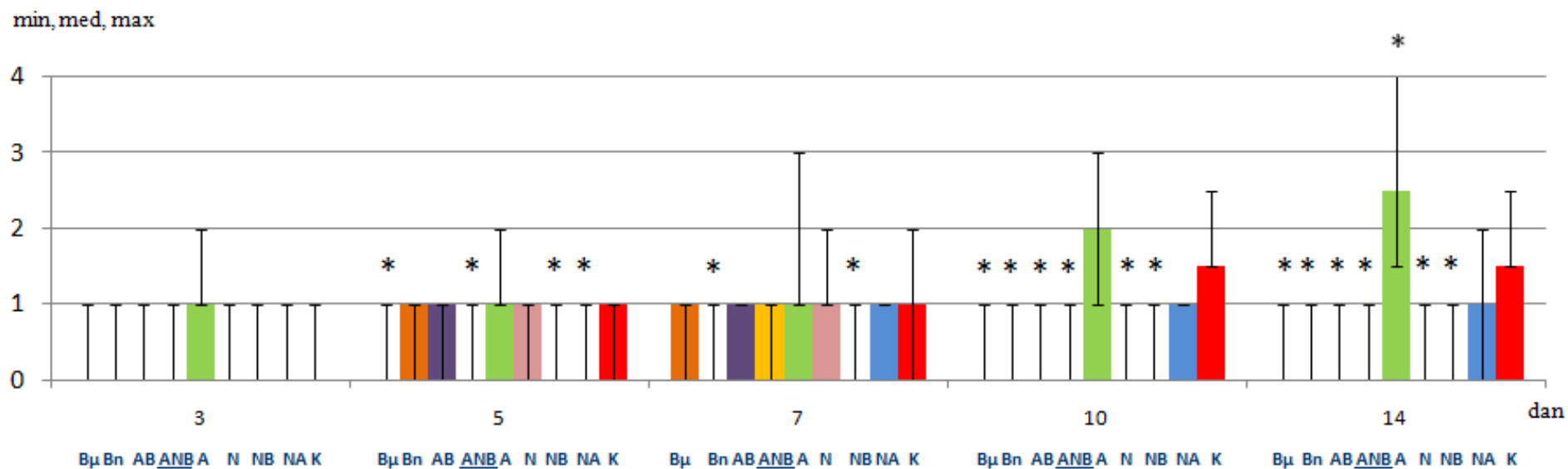
Slika 10. Vrijednosti srčane frekvencije među tretiranim skupinama životinja 28 - ti dan pokusa (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a nakon toga od 15 - 28 dan svakodnevno su prema skupinama tretirane gore navedenim supstancama). * $p < 0,05$

5.1.2 Makroskopska analiza otoka zglobova

Sedam do devet dana nakon aplikacije Freundovog adjuvansa životinje su razvile simptome artritisa u vidu eritema i otoka prstiju, stopala i gležnjeva, uz ukočenost i bolnost što je dovodilo do otežanog kretanja posebice onih životinja koje su razvile težu kliničku sliku artritisa. Nije zabilježen otok u ostalim, proksimalnim zglobovima. Maksimalnu kliničku ekspresiju bolesti životinje su razvile između 12 - og i 14 - og dana pokusa nakon čega se prati stagnacija do blaga regresija opisanih simptoma. Oko 5 % životinja nije razvilo makroskopski vidljive simptome artritisa. Te su životinje zamijenjene novima, a pokus je ponovljen.

BPC 157 primjenjen u dozi od 10 ng/kg kao i u dozi od 10 µg/kg kako profilaktički, tako i terapijski djelovao je na smanjenje simptoma artritisa (otok, eritem zglobova) te je proupalni učinak klinički jače izražen kod veće primijenjene doze, međutim ta razlika nije statistički značajna.

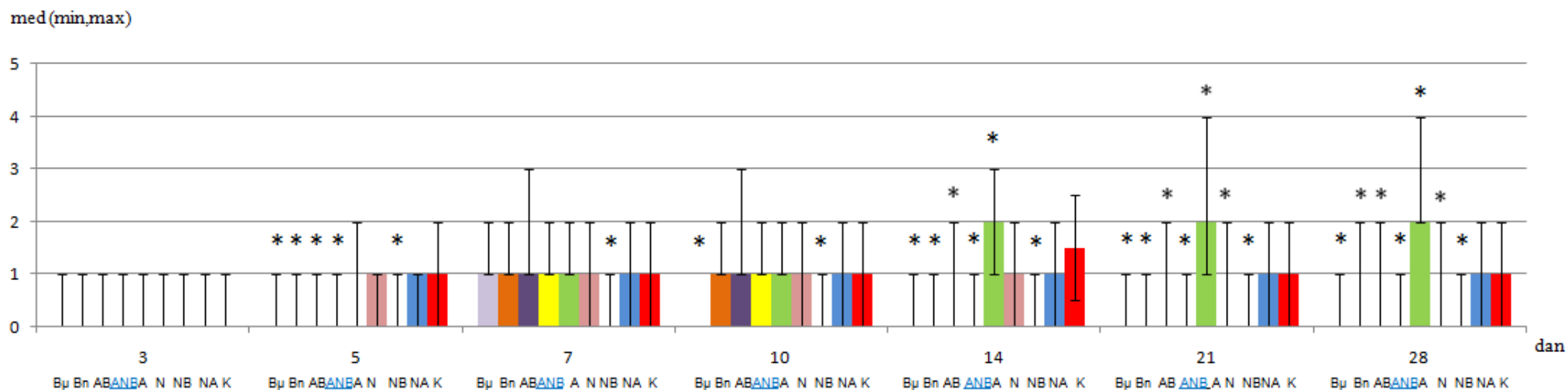
Modulacija aktivnosti NO sustava djelovanjem L - NAME i L - arginina u oba protokola također dovodi do klinički i statistički vidljivih promjena. L - NAME smanjuje simptome artritisa oboljelim životinjama u odnosu na kontrolnu skupinu, a najsnažniji klinički izražen protuupalni učinak u odnosu na kontrolnu skupinu ispoljila je skupina životinja koja je primala BPC - 157 + L - NAME u kombinaciji. Upravo suprotan učinak pokazao je L - arginin koji je doveo do pogoršanja simptoma artritisa. Zanimljivo je da je BPC-157 primjenjen u kombinaciji sa L - argininom doveo do gotovo potpune neutralizacije patološkog odnosno proupalnog djelovanja L-arginina. Istovremena primjena L - NAME i L - arginina nije imala utjecaja na tijek artritisa kao što i istovremena primjena L - NAME i L - arginina nije značajno utjecala na pozitivne učinke BPC 157 na makroskopski vidljive simptome bolesti. Opisani rezultati grafički su prikazani na slici 11.



Slika 11. Rezultati makroskopske analize promjena na zglobovima prema skupinama životinja tijekom profilaktičkog protokola (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, 14 dana se promatrao razvoj adjuvantnog artritisa, a životinje su svakodnevno primale na slici navedene supstance). Promjene zglobova izražene su bodovima od 0 - 4, a rezultati su prikazani za treći, peti, sedmi, deseti i četrnaesti dan pokusa. * $p < 0,05$

***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **Bn**-BPC 157 u dozi 10 ng/kg , **N** - L – NAME, **ANB** - L - arginin + L - NAME + BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **A** – L - arginin, **AB** - L - arginin + BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **NB** - BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$ + L - NAME, **NA** - L – NAME + L – arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl

Što se tiče terapijskog dijela pokusa, BPC - 157 primjenjen u dozi od 10 ng/kg kao i u dozi od 10 µg/kg također je djelovao na smanjenje simptoma artritisa s tim da je njegovo djelovanje u mikrogramskoj dozi klinički bilo jače izraženo, odnosno, smanjenje simptoma artritisa kod skupine koja je primila mikrogramsku dozu BPC 157 nastupilo je 2 dana ranije u odnosu na skupinu životinja koja je tretirana dozom u nanogramima. L - NAME je u ovom terapijskom protokolu bio klinički podjednako učinkovit kao i BPC 157, a njegova učinkovitost se može usporediti sa skupinom koja je primala BPC 157 u nanogramskoj dozi. Statistički nije dokazana značajna razlika između ove tri skupine životinja. Skupina koja je bila tretirana BPC 157 uz L - NAME postigla je jako protuupalno djelovanje i to 3 dana ranije u odnosu na skupinu koja je tretirana samo BPC - om 157 u mikrogramskoj dozi. I ovdje su životinje tretirane L - argininom imale najjače izražene simptome osnovne bolesti, a BPC 157 u kombinaciji sa L-argininom je reducirao simptome artritisa. Istovremena primjena L - NAME i L - arginina niti u ovom terapijskom protokolu nije imala utjecaja na tijek artritisa kao što i istovremena primjena L - NAME i L-arginina nije značajno utjecala na pozitivne učinke BPC – a 157. Grafički su rezultati prikazani na slici 12, a reprezentativne fotografije šapa životinja na slici 13.



Slika 12. Rezultati makroskopske analize promjena na zglobovima prema skupinama životinja tijekom terapijskog protokola kroz 28 dana (0 - ti dan životinje su primile Freundov adjuvans, a od 15 - 28 dana životinje su svakodnevno tretirane supstancama odnosno skupinama supstanci kako je navedeno na slici.)

***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **Bn**-BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **N** - L – NAME, **ANB** - L – arginin + L – NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **A** - L - arginin, **AB** - L – arginin + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **NB**-BPC 157 u dozi 10 μg/kg + L – NAME, **NA** - L – NAME + L – arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl



A)



B)



C)



D)



E)



F)



G)



H)

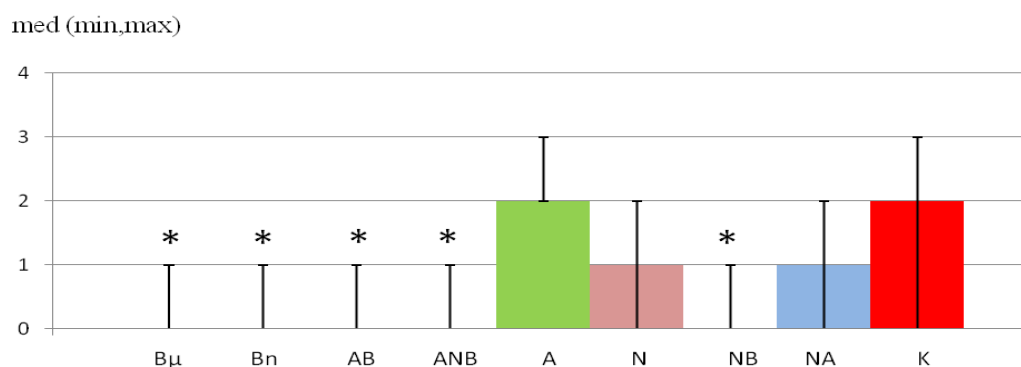


I)

Slika 13. Fotografije A - I prikazuju šape tretiranih pokusnih životinja gdje fotografije A, D i G prikazuju životinju sa maksimalno eksprimiranim simptomima bolesti u vidu otoka zglobova i eritema odnosno lividiteta nadležne kože 14 – ti dan pokusa (životinje su nulti dan pokusa imunizirane Freundovim adjuvansom), slike B, E i H prikazuju tu istu životinju nakon tretmana sa BPC 157 od 14 - 28 dana pokusa, ovdje 28 - mi dan pokusa. Slike C, F i I prikazuju kontrolnu životinju 28 dan pokusa (kontrolna skupina životinja je nulti dan imunizirana Freundovim adjuvansom nakon čega se 28 dana pratio razvoj artritisa).

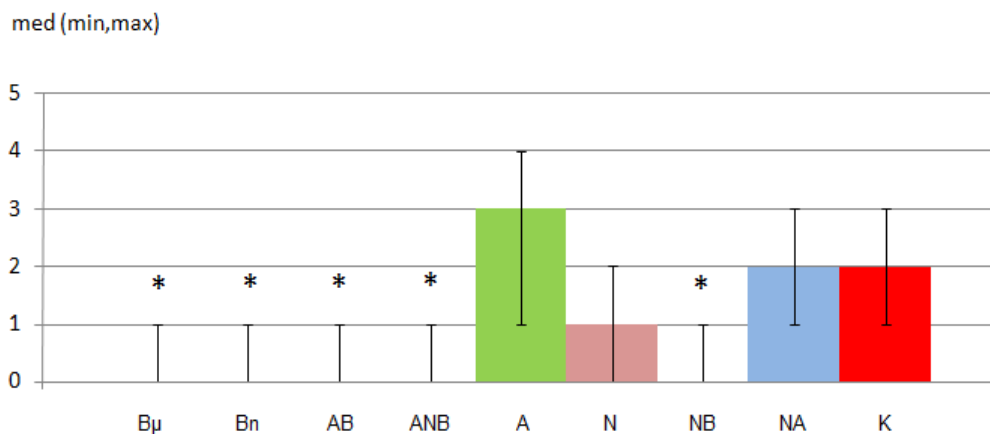
5.1.3 Radiološka analiza

Prve promjene koje se verificiraju radiološki jest otok mekih tkiva u području bolešću zahvaćenih zglobova. Kasnije se uočava osteopenija, suženja zglobnih prostora, razvoj koštanih erozija i skleroza kosti. U profilaktičkom protokolu erozije kosti bile su rijetko izražene vjerojatno zbog još uvijek akutne faze upalnog procesa, dok je ekspresija ovakvih lezija bila češća u terapijskom dijelu pokusa. Slika 14 i 15 grafički prikazuje rezultate radiološkog testiranja 14 - ti odnosno 28 - mi dan pokusa.



Slika 14. Rezultati radiološke analize rendgenskih slika kostiju tretiranih životinja 14 - ti dan pokusa izraženi su bodovima 0-3 (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su svakodnevno od 1 - 14 - og dana primale terapiju prema skupinama kako je na slici navedeno). * $p < 0,05$

***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **Bn** - BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **N** - L – NAME, **ANB** - L – arginin + L – NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **A** – L - arginin, **AB** - L – arginin + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **NB** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg + L – NAME, **NA**-L – NAME + L – arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl



Slika 15. Rezultati radiološke analize rendgenskih slika kostiju tretiranih životinja 28 - mi dan pokusa izražene bodovima 0 - 3 (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, potom se pratio razvoj kroz 14 dana nakon čega su svakodnevno od 15 – 28 - og dana primale terapiju prema skupinama kako je na slici navedeno). * $p < 0,05$

***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **Bn** - BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **N** - L – NAME, **ANB** - L – arginin + L – NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **A** – L - arginin, **AB** - L – arginin + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **NB** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg + L – NAME, **NA** - L – NAME + L – arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl

I ovdje možemo vidjeti pozitivne učinke BPC - a 157 na upalne promjene. Bodovanje radioloških promjena pokazalo je statistički značajne razlike između pojedinih promatranih skupina i kontrolne skupine u oba protokola. BPC 157 u dozi od 10 ng/kg, a tako i u dozi od 10 μg/kg primjenjen kako profilaktički, tako i terapijski djelovao je na smanjenje radiološki verificiranih znakova artritisa. Ispitivanje aktivnosti NO sustava djelovanjem L - NAME i L - arginina u oba tretmana također dovodi do radiološki vidljivih promjena koje su bile jače izražene u terapijskom protokolu. L - NAME je djelovao tako da smanjuje znakove upalnih promjena, međutim ta razlika nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. BPC + L - NAME u kombinaciji ispoljili su protuupalni učinak koji je bio podjednak učinku BPC - a 157 primjenjenog samostalno. Upravo suprotan učinak ispoljio je L - arginin kod kojeg su u profilaktičkom protokolu radiološki znakovi artritisa podjednako izraženi kao i u kontrolnoj skupini životinja, odnosno, klinički jače izraženi u terapijskom protokolu, međutim razlika u izraženosti radioloških znakova artritisa u odnosu na kontrolnu skupinu nije statistički značajna. BPC - 157 primjenjen u kombinaciji sa L - argininom doveo

je do djelomične neutralizacije proupalnog djelovanja L - arginina, a istodobna primjena L - NAME i L - arginina nije imala utjecaja na protuupalni učinak BPC - a 157. L - NAME i L - arginin primijenjeni zajedno ne dovode do promjena radioloških znakova artritisa u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Slike 16 - 20 prikazuju reprezentativne primjerke rendgenograma šapa testiranih životinja.



Slika 16. RTG snimka šapa životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa koje su tretirane BPC - om 157 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su svakodnevno od 1 – 14 - og dana primale BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$). Snimka pokazuje urednu strukturu kosti.



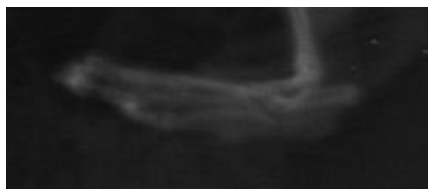
Slika 17. RTG snimka šapa životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa koje su tretirane BPC - om 157, 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa; terapijsko djelovanje započeto je 15 – ti dan kada su životinje svakodnevno od 15 – 28 - og dana primale BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$). Snimka pokazuje urednu strukturu kosti.



Slika 18. RTG snimka šapa kontrolne životinje oboljele od adjuvantnog artritisa 14 – ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa). Rendgenogram pokazuje suženje zglobnih prostora, mjestimice koštane erozije.



Slika 19. RTG snimka šapa životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa kontrolnih životinja 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 28 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa). Snimka pokazuje suženje zglobnih prostora, sklerozu kosti i koštane erozije.

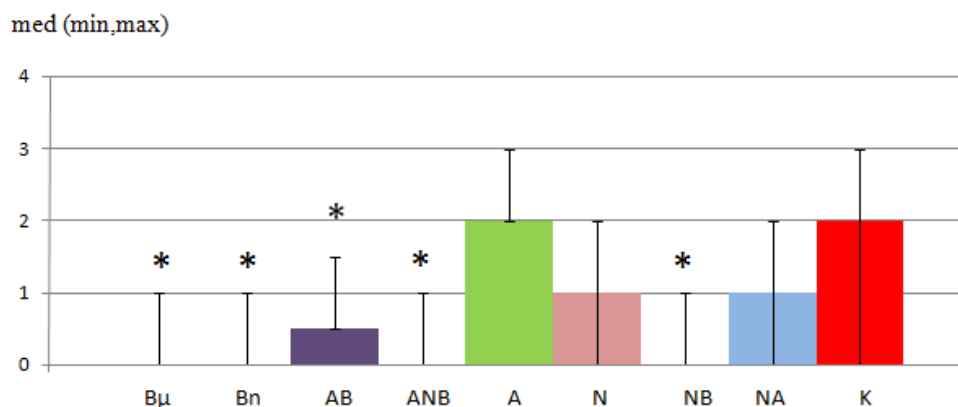


Slika 20. RTG snimka šape životinje oboljele od adjuvantnog artritisa koja je tretirana L - argininom 28 – mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa; terapijsko djelovanje započeto je 15 – ti dan kada su životinje svakodnevno od 15-28-og dana primale L - arginin u dozi 100 mg/kg). Snimka pokazuje otok mekih tkiva uz suženje zglobnih prostora, koštane erozije te demineralizaciju kosti.

5.1.4 Histološka analiza

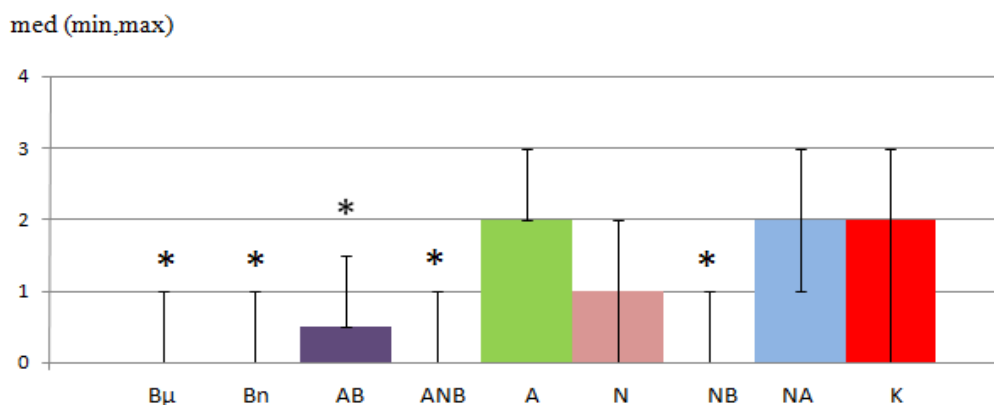
Analizom histoloških preparata šapa životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa, bojanih hematomilin - eozinom, uočene su razlike u odnosu na kontrolnu skupinu životinja.

Verificirane su upalne promjene u vidu hipertrofije sinovije odnosno obilnog upalnog infiltrata tkiva kod kontrolne skupine životinja, kako u profilaktičkom, tako i u terapijskom protokolu. Histološki preparati životinja tretiranih BPC - om 157 pokazali su značajno manje izražene znakove upalnog procesa u odnosu na kontrolnu skupinu. Slike 21 i 22 prikazuju rezultate histološke analize grafički, a slike 23 - 27 prikazuju reprezentativne primjerke histoloških preparata (profilaktički i terapijski protokol).



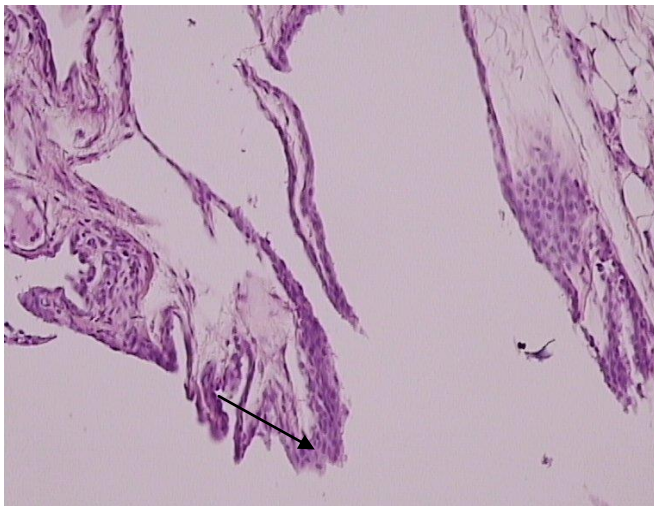
Slika 21. Rezultati histološke analize gležnjeva tretiranih životinja 14 - ti dan (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su svakodnevno od 1 - 14 - og dana primale terapiju prema skupinama kako je na slici navedeno). * $p < 0,05$

***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **Bn** - BPC 157 u dozi 10 ng/kg , **N** - L - NAME, **ANB** - L - arginin + L - NAME + BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **A** - L - arginin, **AB** - L - arginin + BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **NB** - BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$ + L - NAME, **NA** - L - NAME + L - arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl

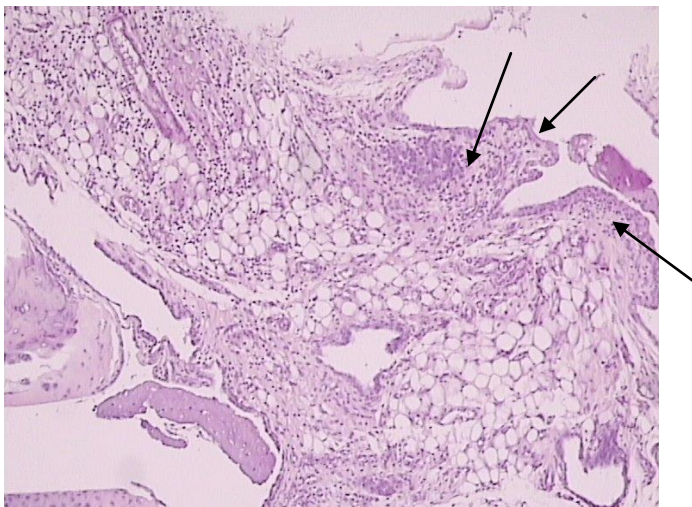


Slika 22. Rezultati histološke analize gležnjeva tretiranih životinja 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, potom se pratio razvoj artritisa kroz 14 dana; od 15 – 28 - og dana životinje su primale terapiju prema skupinama kako je u grafu navedeno). * $p < 0,05$

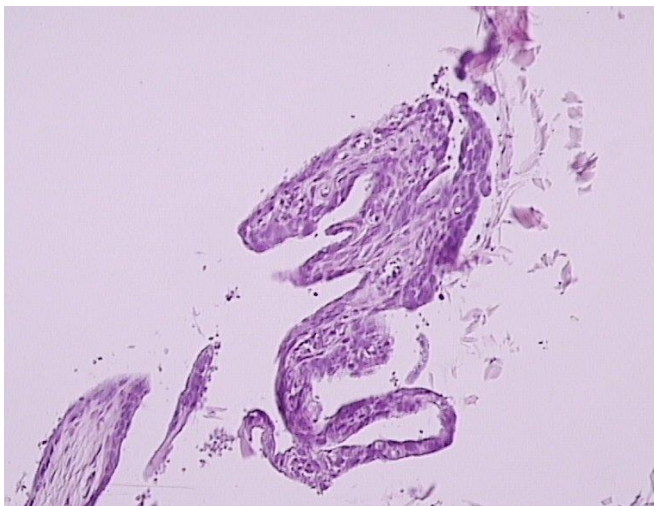
***Bμ**-BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **Bn**-BPC 157 u dozi 10 ng/kg , **N** - L - NAME, **ANB** - L - arginin + L - NAME + BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **A** - L - arginin, **AB**- L - arginin + BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$, **NB**-BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$ + L - NAME, **NA**-L - NAME + L - arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl



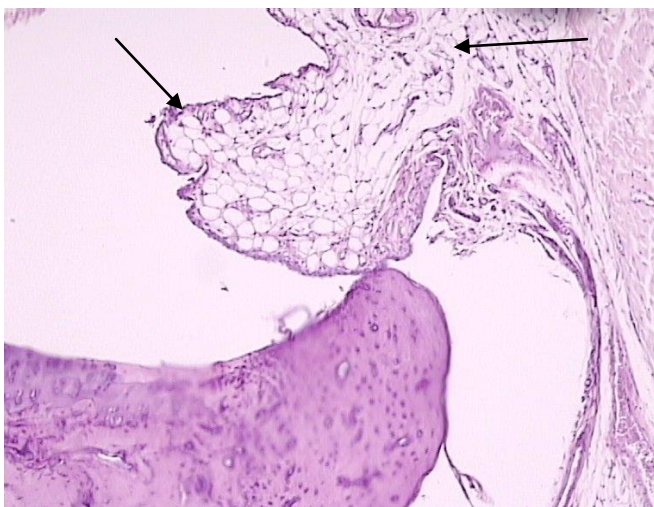
Slika 23. Histološki preparat tkiva gležnja štakora prikazuje blago zadebljanje sinovije i blagu proliferaciju površinskih stanica (kontrolna skupina 14 - ti dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa), hemalaun - eozin, Olympus BX50, povećanje 40x



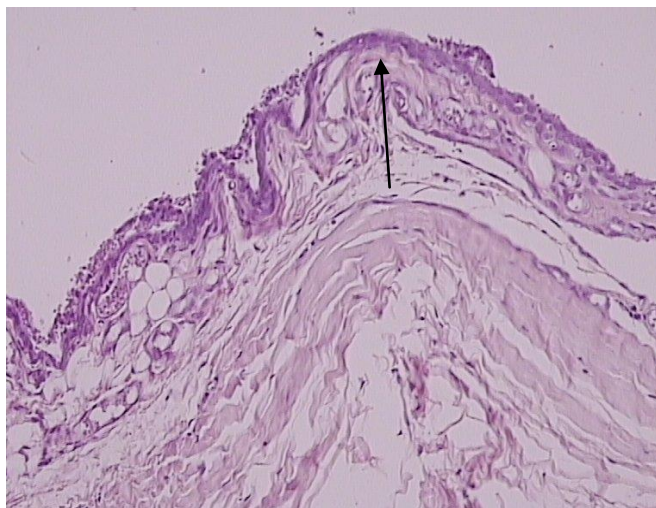
Slika 24. Histološki preparat tkiva gležnja štakora prikazuje obilan upalni infiltrat, formirane vilozne strukture (kontrolna skupina 14 – ti dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa), hemalaun - eozin, Olympus BX50, povećanje 20x



Slika 25. Histološki preparat tkiva gležnja štakora prikazuje veći broj viloznih struktura s prisutnim upalnim infiltratom u stromi (kontrolna skupina 28 – ti dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 28 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa), hemalaun-eozin, Olympus BX50, povećanje 20x

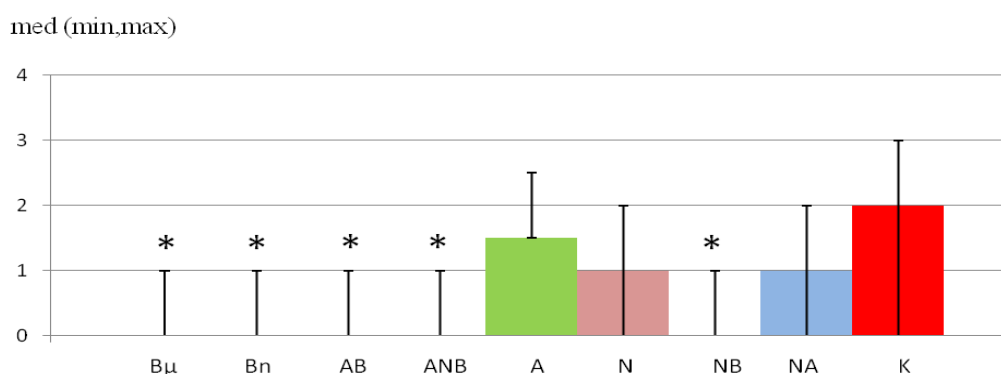


Slika 26. Histološki preparat tkiva gležnja štakora prikazuje sinoviju koja nije zadebljana, bez značajnije proliferacije površinskih stanica, s vrlo oskudnim mononuklearnim upalnim infiltratom te kost koja je bez erozije (tretirana skupina 14 – ti dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su od 1 – 14 - og dana svakodnevno primale BPC 157 u dozi 10µg/kg), hemalaun - eozin, Olympus BX50, povećanje 20x



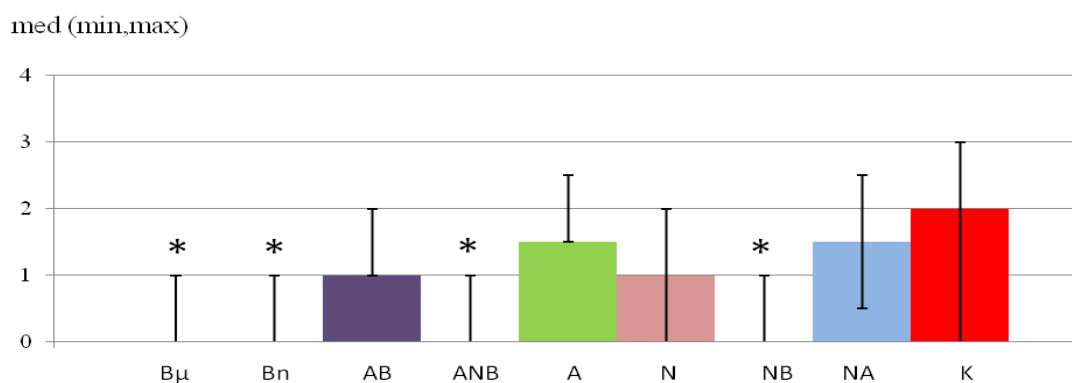
Slika 27. Histološki preparat tkiva gležnja štakora prikazuje sinoviju koja nije zadebljana, a proliferacija površinskih stanica je blaga (tretirana skupina 28 – mi dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa; od 15 – 28 - og dana pokusa životinje su svakodnevno primale BPC 157 u dozi 10 μ g/kg), hemalaun - eozin, Olympus BX50, povećanje 40x

Također su analizirani i histološki hemalaun - eozinski preparati miokarda srca te bubrežnog parenhima na povećanju 20 i 40x te se gledala prisutnost upalnih infiltrata s obzirom na njihovu kvalitetu i kvantitetu te eventualno formiranje mikroapscesa. Radila se kvalitativna histološka analiza kojom su nađene blaže upalne promjene na miokardu u kontrolnoj skupini životinja.



Slika 28. Rezultati histološke analize miokarda tretiranih životinja 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su svakodnevno od 1 – 14 - og dana primale terapiju prema skupinama kako je u grafu navedeno) * $p < 0,05$

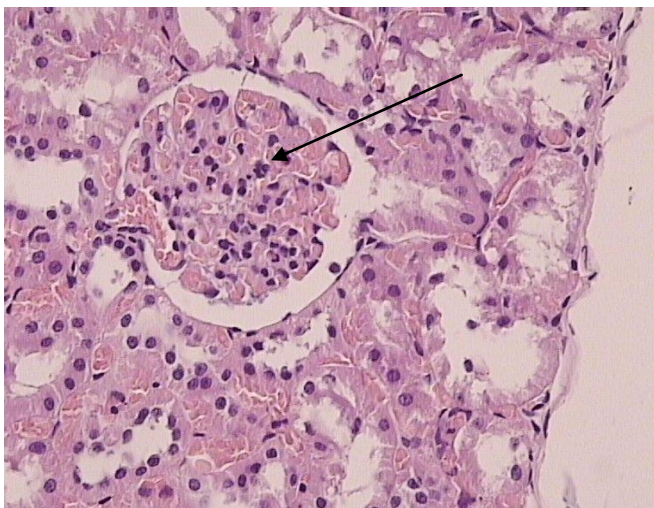
***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **Bn** - BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **N** - L - NAME, **ANB** - L - arginin + L - NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **A** - L - arginin, **AB** - L - arginin + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **NB**-BPC 157 u dozi 10 μg/kg + L - NAME, **NA**-L - NAME + L - arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl



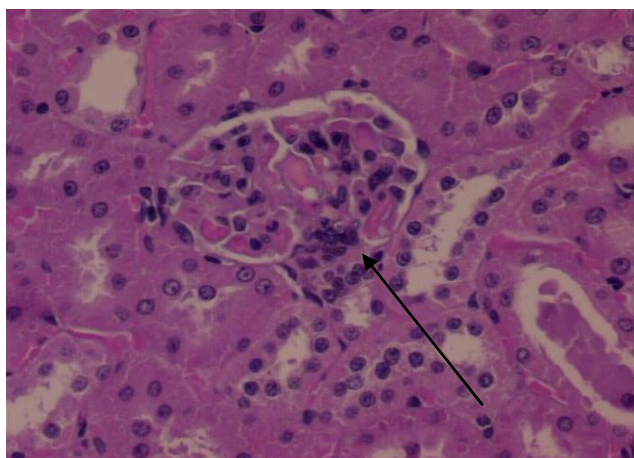
Slika 29. Rezultati histološke analize miokarda tretiranih životinja 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, potom se pratio razvoj kroz 14 dana nakon čega su svakodnevno od 15 - 28 - og dana primale terapiju prema skupinama kako je u grafu navedeno) * p < 0,05

***Bμ** - BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **Bn** - BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **N** - L - NAME, **ANB** - L - arginin + L - NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **A** - L - arginin, **AB** - L - arginin + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **NB**-BPC 157 u dozi 10 μg/kg + L - NAME, **NA** - L - NAME + L - arginin, **K** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl

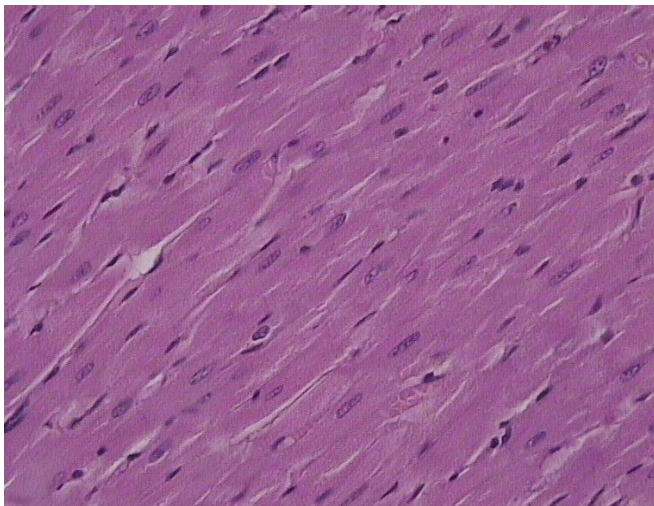
Na preparatima tkiva bubrega kontrolne skupine životinja verificirana je nešto pojačana celularnost mezangija u području glomerula što može biti znak početka glomerulonefritisa. Međutim, na temelju ove izolirane odrednice ne možemo sa sigurnošću tvrditi kako je riječ o glomerulonefritisu, odnosno, to je samo znak kako se pojavio odgovor na određeni podražaj. Histološke preparate tkiva bubrega i srca prikazuju slike 28 - 31.



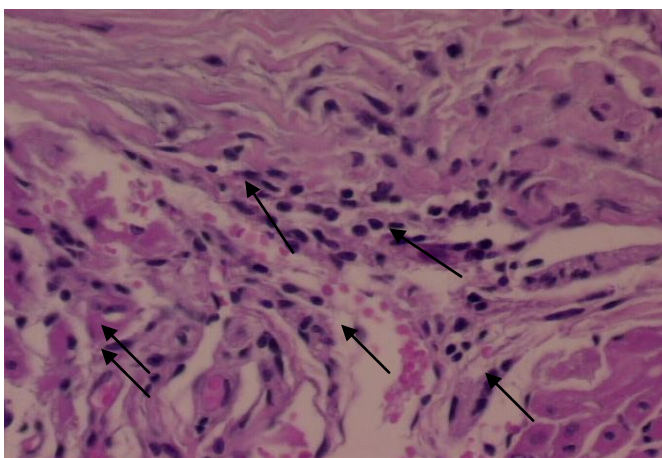
Slika 28. Histološki preparat tkiva bubrežnog parenhima životinje tretirane BPC - om 157 prikazuje urednu strukturu glomerula (tretirana skupina 14 – ti dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su svakodnevno primale BPC 157 u dozi 10 $\mu\text{g/kg}$); hemalaun - eozin, Olympus BX50, povećanje 40x



Slika 29. Histološki preparat tkiva bubrežnog parenhima kontrolne skupine životinja prikazuje pojačanu celularnost mezangija (kontrolna skupina 14 – ti dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa), hemalaun - eozin, Olympus BX50, povećanje 40x



Slika 30. Histološki preparat miokarda štakora prikazuje urednu strukturu mišićnih vlakana skupine tretirane BPC - om 157 (tretirana skupina 28 – mi dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa; od 15 - 28 - og dana pokusa životinje su svakodnevno primale BPC 157 u dozi 10 μ g/kg), hemalaun - eozin, 40x povećanje, Olympus BX50, povećanje 40x

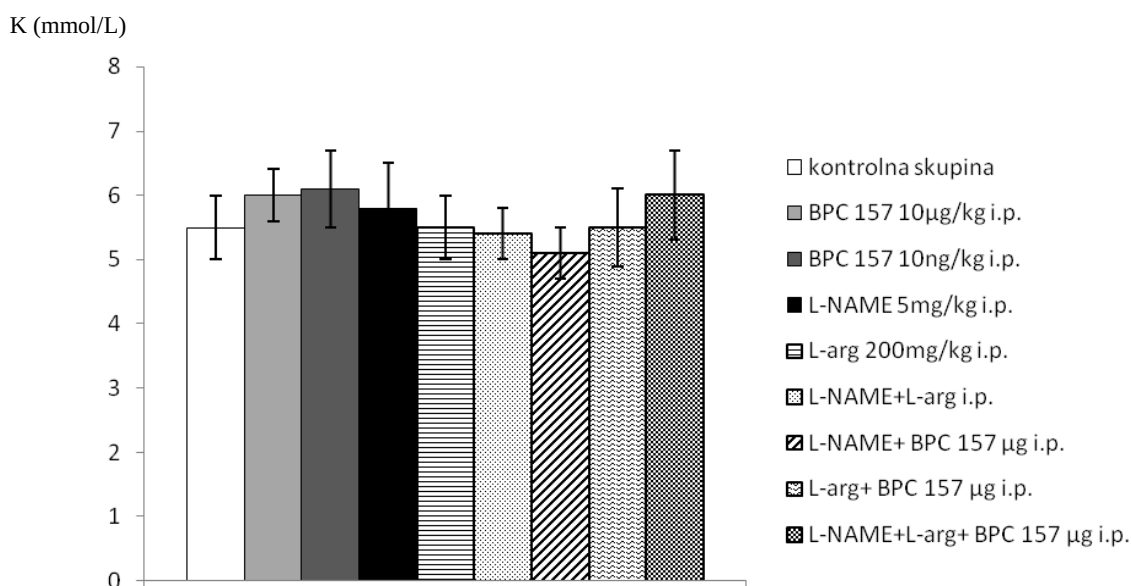


Slika 31. Histološki preparat miokarda životinje pokazuje oskudan upalni infiltrat (kontrolna skupina 28 – mi dan pokusa, životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 28 dana pratio razvoj adjuvantnog artritisa), hemalaun - eozin, 40x povećanje, Olympus BX50, povećanje 40x

5.1.5 Laboratorijski nalazi

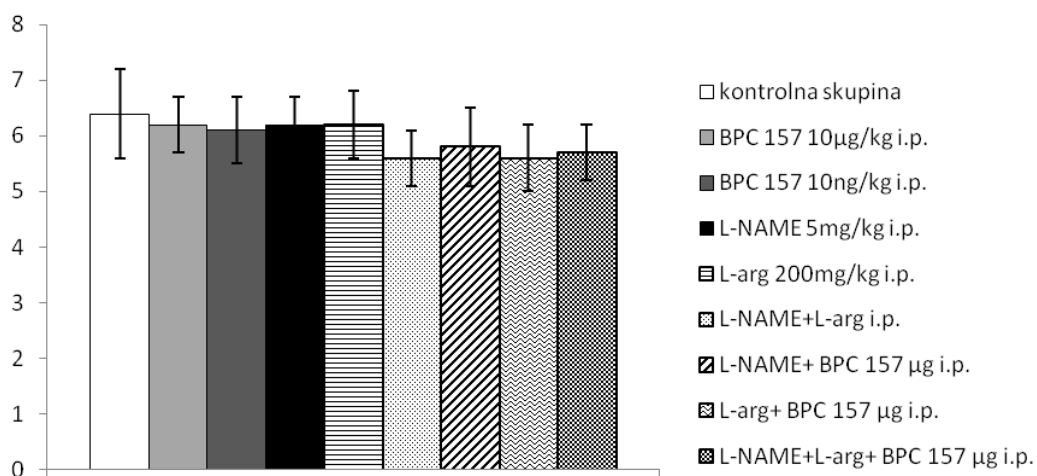
Što se tiče analize laboratorijskih parametara, kao mogući pokazatelji oštećenja srca i bubrega analizirane su koncentracije K, Na, AST, CK, LDH, uree i kreatinina. Kao referentne vrijednosti navedenih parametara uzete su referentne vrijednosti biokemijskog laboratorija u KB Dubrava gdje je analiza i izvršena.

Analizom vrijednosti kalija (K), uočava se da su vrijednosti K više u odnosu na referentne vrijednosti (max do 6.5 mmol/L u profilaktičkom, odnosno do 6.9 mmol/L u terapijskom protokolu, normala max do 5.1 mmol/L) u gotovo svim promatranim skupinama u profilaktičkom i terapijskom protokolu (osim skupine koja je tretirana BPC - om 157 + L - NAME u profilaktičkom protokolu gdje je vrijednost K bila unutar referentnih vrijednosti). Vidljivo je kako primjenjena terapija (izuzev skupine koja je primala L - NAME i BPC 157 u kombinaciji u profilaktičkom protokolu) nije imala značajnog utjecaja na sniženje povišene vrijednosti K, kako u profilaktičkom, tako ni u terapijskom protokolu. Slike 32 i 33 grafički prikazuju vrijednosti K prema skupinama tretiranih životinja u oba protokola.



Slika 32. Vrijednosti kalija životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno na slici, a prema skupinama. * $p < 0,05$

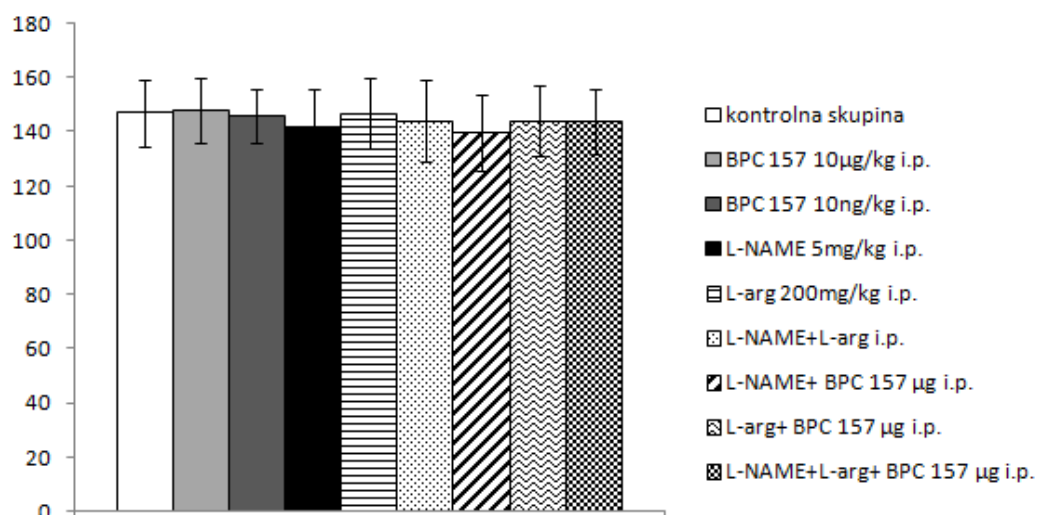
K (mmol/L)



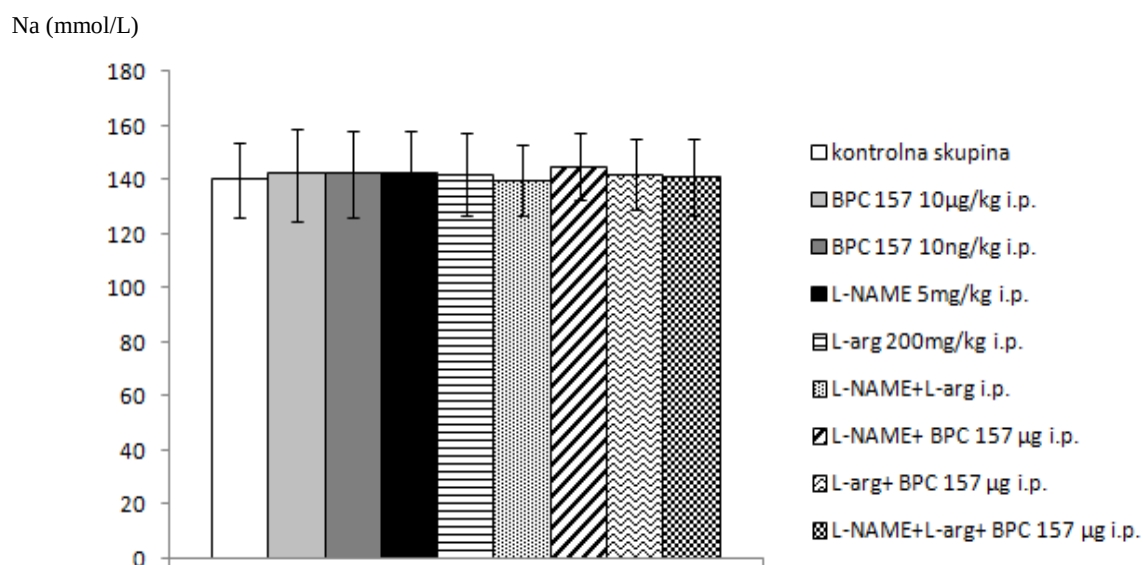
Slika 33. Vrijednosti kalija životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno na slici, a prema skupinama. * $p < 0,05$

Vrijednosti natrija (Na) bile su unutar referentnih vrijednosti u svim skupinama i u oba protokola, a također nije bilo značajne razlike u vrijednostima Na u odnosu na kontrolnu skupinu. Slike 34 i 35 grafički prikazuju vrijednosti Na prema skupinama tretiranih životinja u oba protokola.

Na (mmol/L)



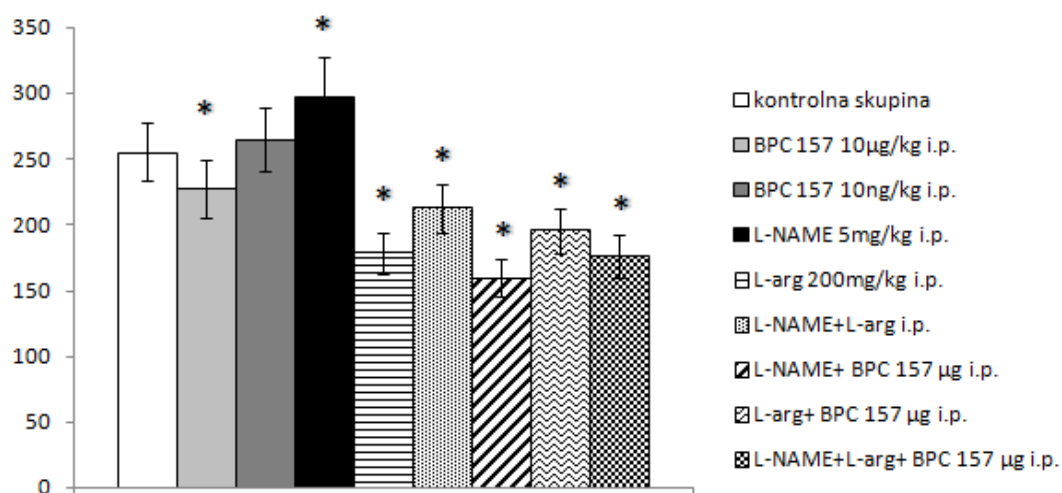
Slika 34. Vrijednosti natrija životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$



Slika 35. Vrijednosti natrija životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno na slici, a prema skupinama). * $p < 0,05$

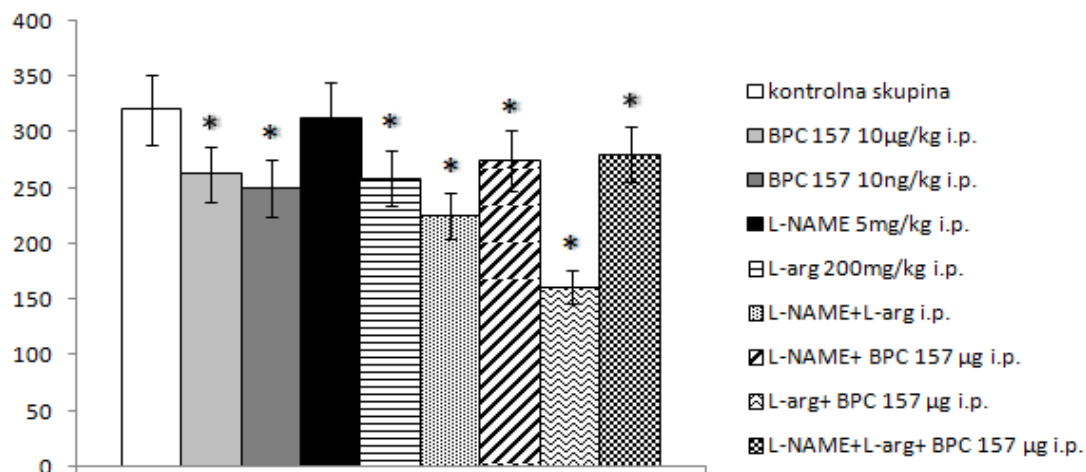
Vrijednosti aspartat aminotransferaze (AST) su povišene (160 do 320 U/L) u oba protokola u svim promatranim skupinama s tim da su njezine vrijednosti niže u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu, izuzev skupine koja je primala L - NAME koja povisuje AST u odnosu na kontrolnu skupinu u profilaktičkom protokolu, odnosno nije bilo razlike u odnosu na kontrolnu skupinu u terapijskom protokolu te skupine koja je primala BPC 157 u nanogramskoj dozi u profilaktičkom protokolu gdje također nema razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Slike 36 i 37 grafički prikazuju vrijednosti AST prema skupinama tretiranih životinja u oba protokola.

AST (U/L)



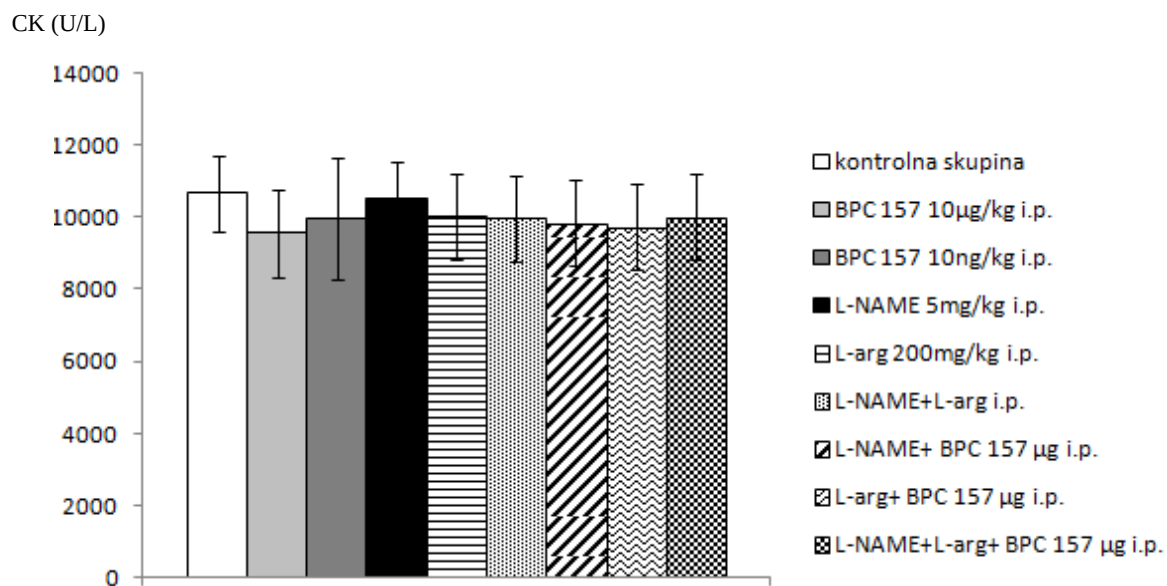
Slika 36. Vrijednosti AST - a životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

AST (U/L)

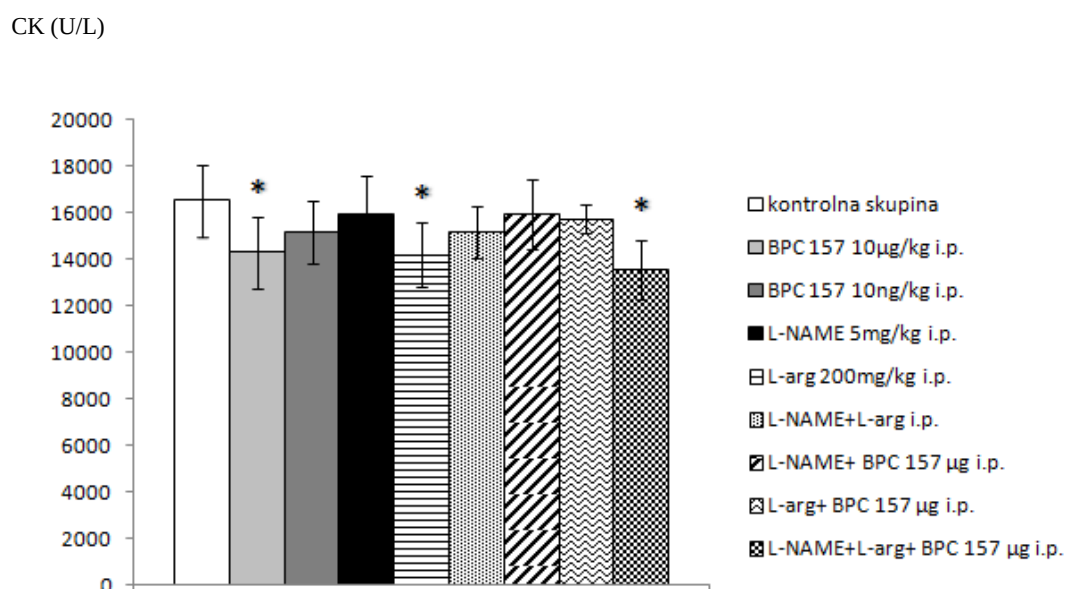


Slika 37. Vrijednosti AST-a životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

Kreatinin kinaza (CK) je očekivano povišena u svim promatranim skupinama i u oba protokola (1000 do 16 000 U/L). Niti jedna od primijenjenih supstanci nije dovela do značajnog sniženja vrijednosti CK u profilaktičkom protokolu. U terapijskom protokolu L - arginin snižava vrijednost CK, kao i BPC 157 u mikrogramskoj dozi. L - NAME i L - arginin primijenjeni zajedno sa BPC 157 nisu utjecali na učinak BPC - a 157. Ostale supstance odnosno njihove kombinacije nisu imale utjecaja na vrijednost CK u odnosu na kontrolnu skupinu. Slike 38 i 39 grafički prikazuju vrijednosti CK prema skupinama tretiranih životinja u oba protokola.



Slika 38. Vrijednosti CK životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

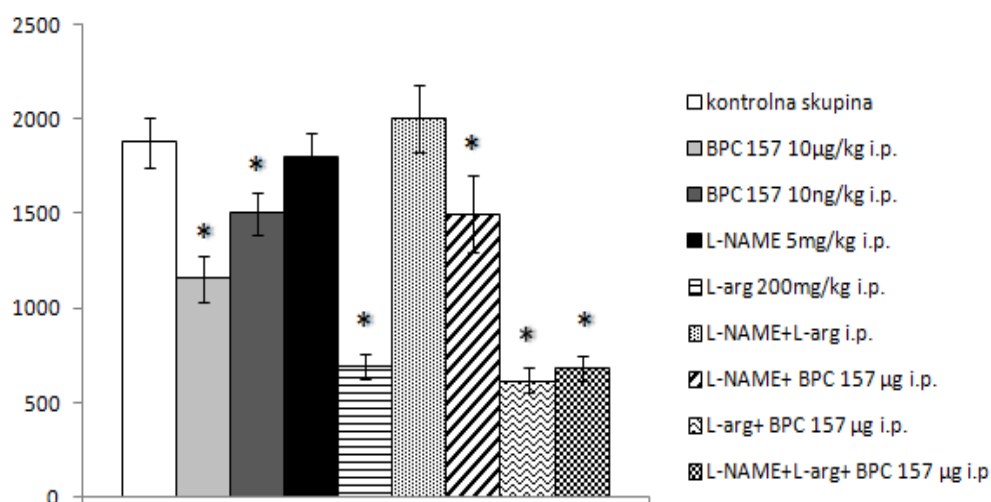


Slika 39. Vrijednosti CK životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

Vrijednosti LDH su povišene u svim promatranim skupinama i u oba protokola (normala do 241 U/L) i kreću se od 300 U/L do 1800 U/L.

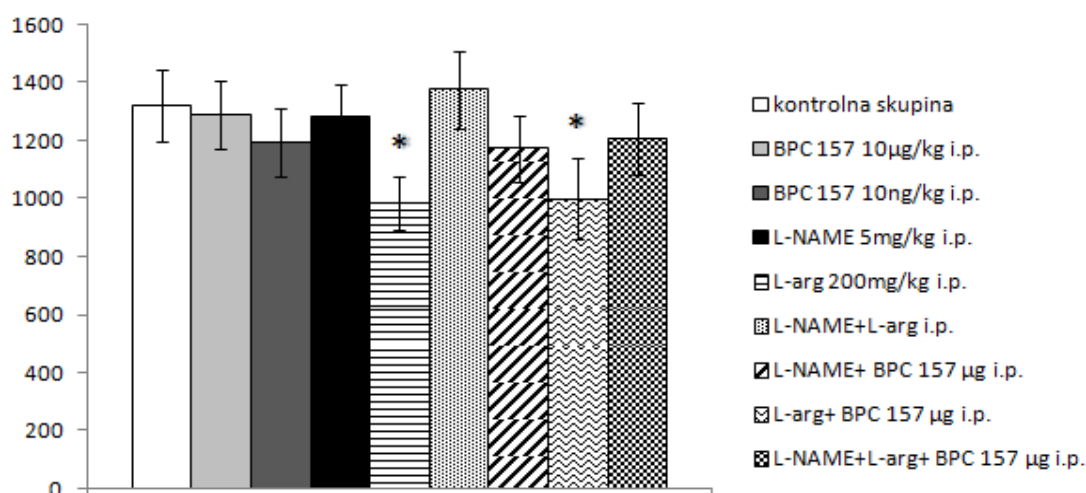
BPC 157 je doveo do značajnog sniženja vrijednosti LDH u profilaktičkom protokolu za razliku od terapijskog gdje nije djelovao na njegovu vrijednost. Djelovanje L - NAME se ne razlikuje u odnosu na kontrolnu skupinu, a L - arginin snižava vrijednost LDH u oba protokola, kako samostalno tako i u kombinaciji sa BPC - om 157. L - NAME i L - arginin u kombinaciji nisu imali utjecaja na vrijednosti LDH, a L - NAME i L -arginin primjenjeni zajedno sa BPC 157 također nisu utjecali na pozitivan učinak BPC 157 na vrijednost LDH u profilaktičkom protokolu. Slike 40 i 41 grafički prikazuju vrijednosti LDH prema skupinama tretiranih životinja u oba protokola.

LDH (U/L)



Slika 40. Vrijednosti LDH životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

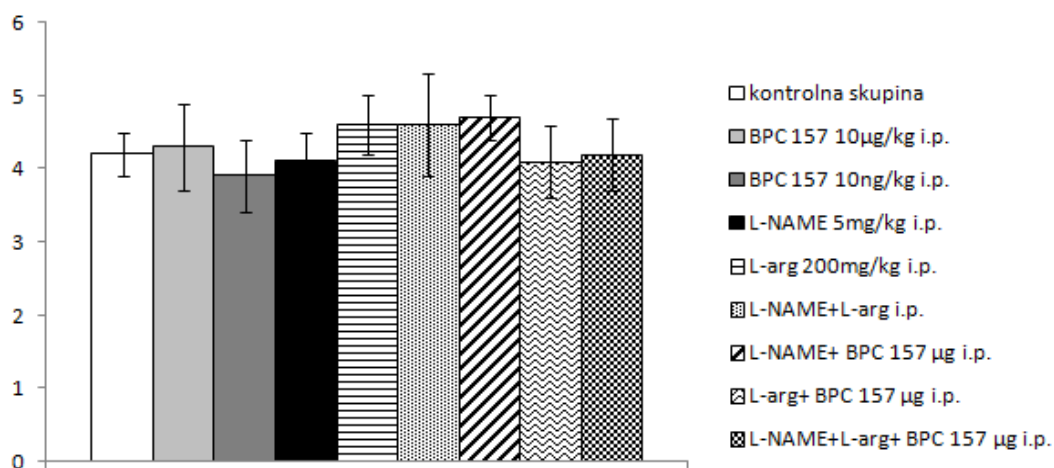
LDH (U/L)



Slika 41. Vrijednosti LDH životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama. * $p < 0,05$

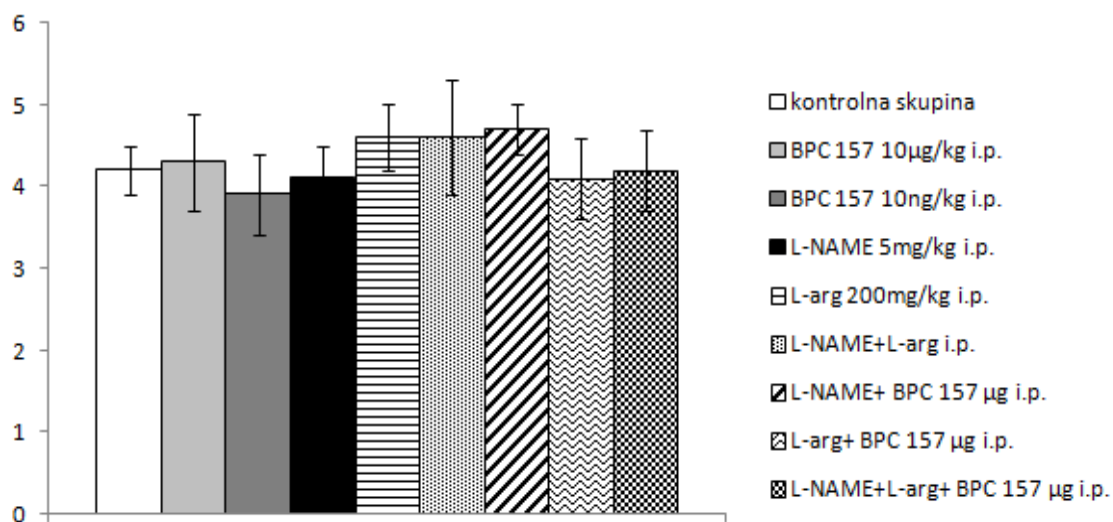
Vrijednosti uree i kreatinina u obadva protokola su bile unutar referentnih vrijednosti, a BPC 157 i L - NAME nisu imali značajnog utjecaja na vrijednost uree i kreatinina kod ovih životinja u oba protokola, kao i L - arginin u profilaktičkom protokolu. Iznimka je L- arginin koji je u terapijskom protokolu doveo do povišenja vrijednosti kreatinina u odnosu na kontrolnu skupinu, dok na ureu nije bilo utjecaja. Modulacija aktivnosti NO sustava djelovanjem L- arginina i L-NAME također ne vode do značajnih promjena u vrijednostima ovih laboratorijskih parametara. Slike 42 - 45 grafički prikazuju vrijednosti uree i kreatinina prema skupinama tretiranih životinja u oba protokola.

Urea (mmol/L)



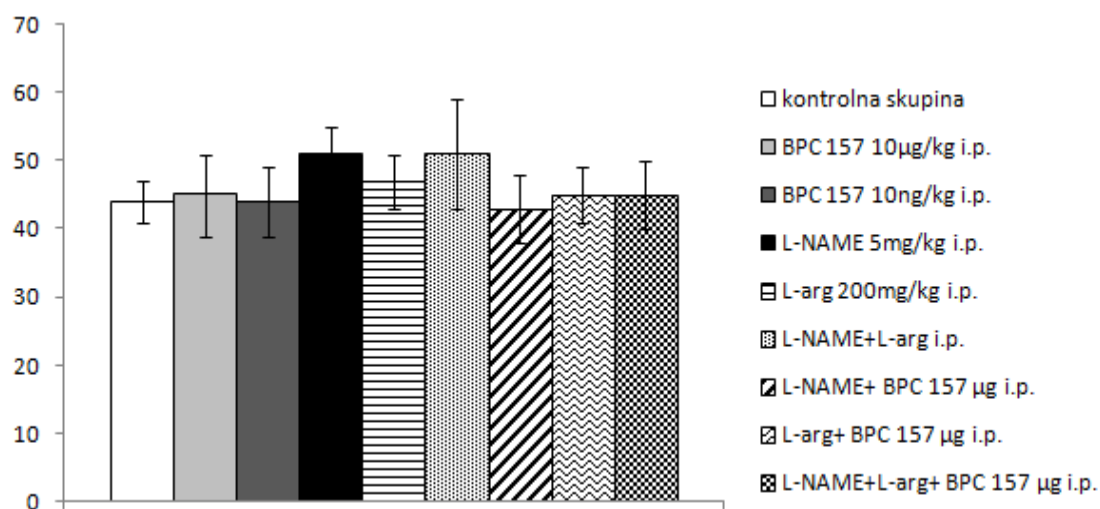
Slika 42. Vrijednosti uree životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

Urea (mmol/L)

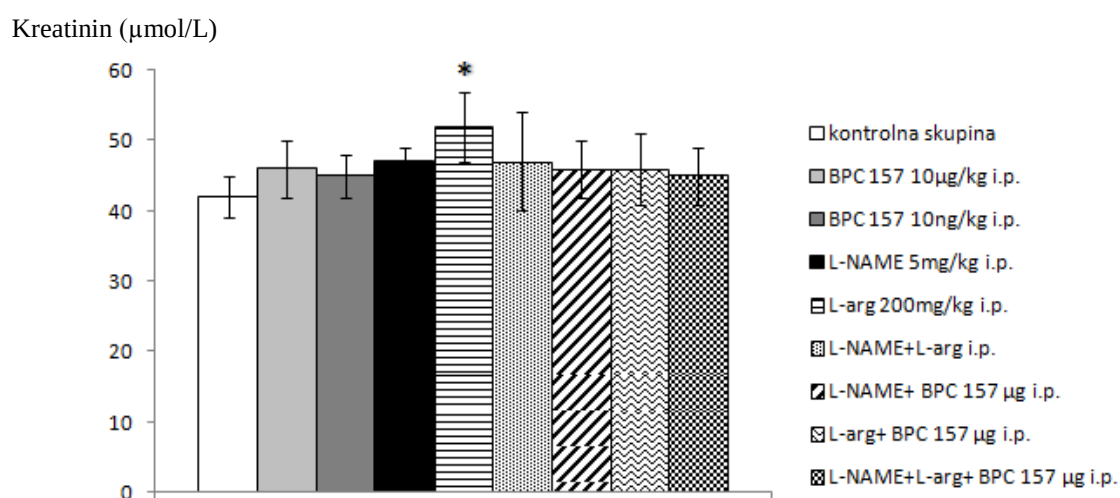


Slika 43. Vrijednosti uree životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama.) * $p < 0,05$

Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)



Slika 44. Vrijednosti kreatinina životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 14 - ti dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama). * $p < 0,05$

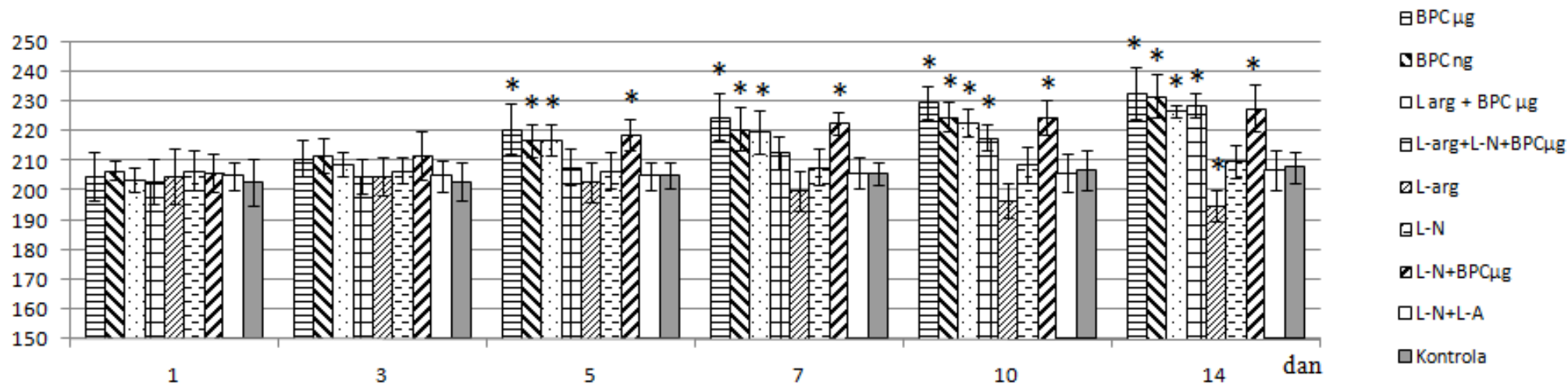


Slika 45. Vrijednosti kreatinina životinja oboljelih od adjuvantnog artritisa 28 - mi dan pokusa (životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15 - og do 28 - og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno na slici, a prema skupinama). * $p < 0,05$

5.1.6 Opće stanje štakora

Utjecaj terapije na opće stanje štakora, a prema uzoru na prethodne radove, procijenjivali smo na temelju procjene tjelesne težine. Tijekom profilaktičkog protokola uočava se kako postupno dolazi do značajne razlike između povećanja tjelesne težine životinja koje su primale BPC 157, bilo u mikrogramskoj bilo u nanogramskoj dozi, odnosno, do povećanja tjelesne težine skupina životinja koje su primale BPC 157 u kombinaciji bilo sa L - NAME - om, L - argininom odnosno sa L - NAME - om i L - argininom u kombinaciji istovremeno (208 gr kontrolna skupina spram 228 do 234 gr tretirane skupine životinja, 14 - ti dan pokusa). Kod životinja koje su primale L - arginin došlo je do značajnog pada tjelesne težine u odnosu na kontrolnu skupinu 14 - ti dan pokusa (194 spram 230 gr) dok kod su životinje koje su primale L - NAME i L - NAME i L arginin zajedno završile profilaktički protokol (14 – ti dan pokusa) sa približno jednakom težinom u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Slika 46 prikazuje tjelesnu težinu životinja prema skupinama tijekom profilaktičkog protokola istraživanja.

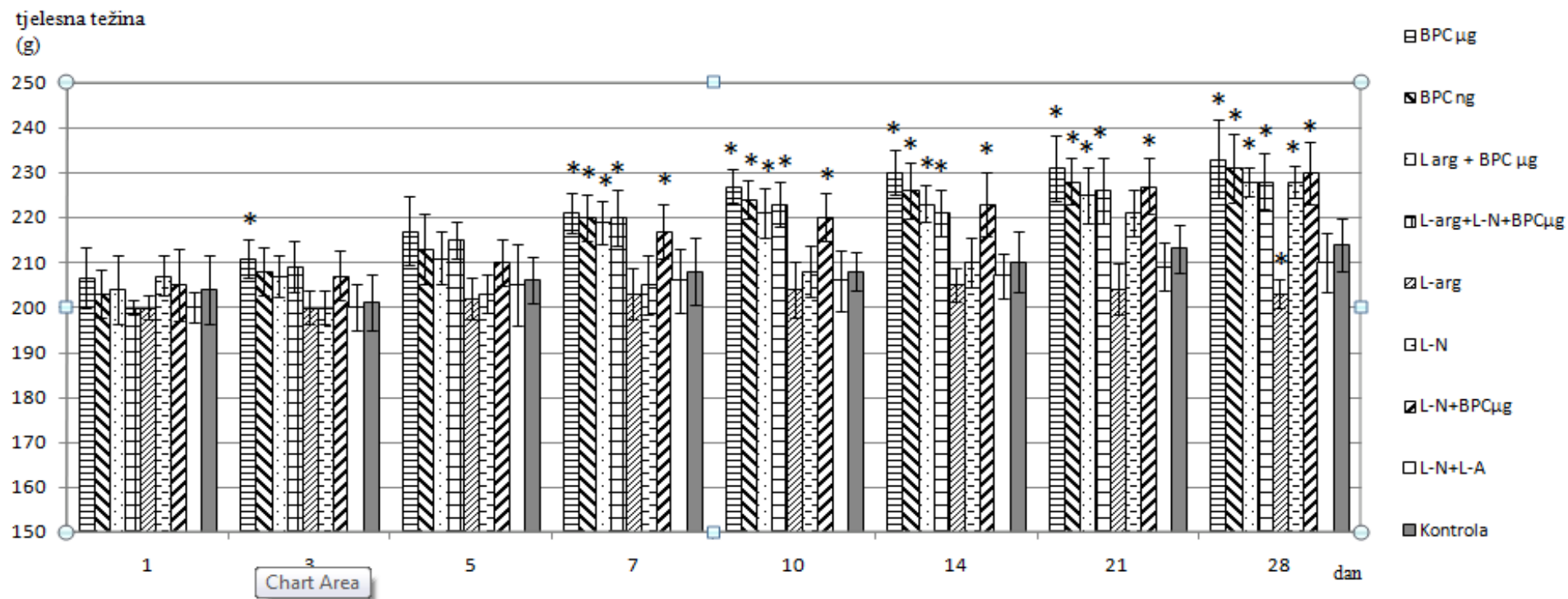
tjelesna težina (g)



Slika 46. Tjelesna težina svih tretiranih životinja 1, 3, 5, 7, 10 i 14 - ti dan pokusa. Životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom su kroz 14 dana tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama. * $p < 0,05$

***BPC μ g** - BPC 157 u dozi 10 μ g/kg, **BPC ng** - BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **L arg + BPC μ g** - L – arginin + BPC 157 u dozi 10 μ g/kg, **L arg + L - NAME + BPC μ g** - L – arginin L - NAME + BPC 157 u dozi 10 μ g/kg, **L - arg** – L – arginin, **L - N** - L – NAME, **L- N + BPC μ g** – L – NAME + BPC 157 u dozi 10 μ g/kg, **L-N + L-A** - L – NAME + L – arginin, **kontrola** - kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl

Slične promjene uočavamo i tijekom terapijskog protokola. S vremenom, prema kraju pokusa (28 dan) dolazi do postupnog povećanja tjelesne težine životinja koje se primale BPC 157 bilo u mikrogramskoj bilo u nanogramskoj dozi, odnosno do povećanja tjelesne težine skupina životinja koje su primale BPC 157 u kombinaciji bilo sa L – NAME-om, L - argininom odnosno sa L – NAME - om i L – argininom u kombinaciji istovremeno (214 gr kontrolna skupina spram 228 do 232 gr tretirane skupine životinja, 28 - ti dan pokusa). Kod životinja koje su primale L - arginin došlo je do značajnog pada tjelesne težine u odnosu na kontrolnu skupinu 28 – mi dan pokusa (220 spram 345 gr) dok kod su životinje koje su primale L – NAME i L arginin zajedno završile terapijski protokol (28 dan pokusa) sa približno jednakom težinom u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Skupina koja je primala L – NAME u ovom protokolu ipak završava promatrani period sa većom težinom u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, sada možemo zaključiti kako su životinje zapravo najveći prirast težine doživjele tijekom prvih 14 dana pokusa, dok su tijekom sljedećih 14 dana ostvarile tek blaži prirast mase. Slika 47 prikazuje tjelesnu težinu životinja prema skupinama tijekom terapijskog protokola istraživanja.



Slika 47. Tjelesna težina tretiranih životinja 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 i 28-mi dan pokusa. Životinje su nulti dan primile Freundov adjuvans, a potom se kroz 14 dana pratio razvoj artritisa; terapijsko djelovanje provedeno je od 15-og do 28-og dana pokusa kad su životinje svakodnevno tretirane supstancama kako je navedeno u grafu, a prema skupinama

***BPC μg**-BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **BPC ng**-BPC 157 u dozi 10 ng/kg, **L arg + BPC μg** -L – arginin + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **L arg + L-NAME + BPC μg** - L – arginin L-NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **L - arg** – L – arginin, **L – N** – L – NAME, **L - N + BPC μg** – L – NAME + BPC 157 u dozi 10 μg/kg, **L - N + L-A** - L – NAME + L – arginin, **kontrola**-kontrolna skupina koja je primala 0.9 % otopine NaCl. * p < 0,05

6. RASPRAVA

Terapija reumatoidnog artritisa predstavlja veliki izazov i liječenje ovih bolesnika na način da postignu remisiju, odnosno nisku aktivnost bolesti omogućuje bolesnicima bolji konačni ishod, odnosno bolju kvalitetu i dulje trajanje života. U liječenju RA preporuča se što ranije započeti sa imunomodulatornom terapijom, a pronalazak učinkovitih lijekova sa što manje nuspojava u današnje vrijeme apsolutni je imperativ. U odnosu na neka prethodna vremena, lijekovi koji se koriste u liječenju reumatoidnog artritisa vrlo su učinkoviti, međutim i dalje perzistira opasnost od nuspojava kao što su veća osjetljivost prema infekcijama, oštećenje jetre, bubrega, koštane srži, alergijske reakcije i drugo. Sve navedeno potaklo nas je da se upustimo u istraživanje na laboratorijskim životinjama kako bismo ispitali protuupalni učinak supstance s potencijalom za daljnja istraživanja njegove moguće primjene u preveniranju i suzbijanju upalnih promjena kod reumatoidnog artritisa, a istovremeno supstance kod koje na temelju dosadašnjih istraživanja nisu zabilježeni štetni učinci, štoviše, utvrđena su brojna povoljna djelovanja. Naravno, riječ je o pentadekapeptidu BPC 157.

Adjuvantni artritis (AA) je sistemska bolest koja ima dosta sličnosti sa RA. Adjuvanti su komponente koje kada se daju zajedno sa antigenom značajno pojačavaju imunološki odgovor organizma prema tom antigenu. Najvažnija karakteristika dobrog adjuvansa jest da brzo aktivira imunološki sustav, odnosno da aktivira antigen prezentirajuće stanice da preuzmu antigen, prezentiraju ga stečenom imunološkom sustavu te inducira proizvodnju proupalnih citokina (100 - 102).

Točan slijed događaja koji dovodi do razvoja adjuvantnog artritisa još uvijek nije sasvim jasan. Prije se smatralo kako se model adjuvantnog artritisa zasniva na infekciji, međutim, o tomu zasigurno nije riječ. Naime, mikobakterije koje se primjenjuju za njegovu indukciju daju se umrtvljene, a kulture koje su uzimane iz zglobova oboljelih životinja opetovano su bile negativne. Također, masivna primjena antibiotika nije dovela do smanjenja simptoma bolesti. Danas se smatra kako je vjerojatno riječ o križnoj reaktivnosti, odnosno protutijela koja organizam stvori prema antigenima mikobakterije križno reagiraju sa autoantigenima. Također, postoje dokazi kako dolazi do stvaranja tzv. deponija antigena na mjestu injiciranja adjuvansa gdje postupno otpuštanje antigena s mjesta injiciranja osigurava dugotrajnu stimulaciju imunološkog sustava. Nadalje, zna se da Freundov adjuvans dovodi do povećanja

broja receptora za citokine, pojačane prezentacije antigena antigen prezentirajućim stanicama odnosno, da potiče njihovo sazrijevanje, aktivira inflamosome te zapravo na sve te načine potiče stečenu imunost. Također, dolazi do stvaranja specifičnih T limfocita u oboljelih životinja, a prisutna je i masivna koncentracija plazma stanica u limfnim čvorovima kao i hipergamaglobulinemija (97, 98, 100, 101).

Dakle, AA jest kao i RA imunološki posredovana bolest, a također postoje razmišljanja kako se radi o reakciji kasne preosjetljivosti u prilog čega govore činjenice kako se artritis razvije s odmakom od nekoliko dana nakon aplikacije. Histološki, obadvije bolesti dijele mnogo sličnosti. Patološki proces jest upalna reakcija sa nakupinama fibrina koja započinje u mekim tkivima, obično sinovijalnoj ovojnici te peritendinoznim i intermuskularnim prostorima. U oba slučaja dolazi do oštećenja hrskavice zbog tzv. invazivnog panusa koji se započinje stvarati u rubnom području sinovijalne ovojnice odakle se proteže preko zglobnih ploha. Zbog stvaranja panusa stvaraju se koštane erozije. Entiteti su i klinički slični, karakteriziraju ih periodi egzacerbacije i remisije bolesti, a sinovitis može u potpunosti regredirati ili progredirati i razoriti zglob. Također mogu razviti i neke sistemske manifestacije kao što je gubitak apetita ili povišena tjelesna temperatura (99, 100, 101, 102, 103).

Upravo na modelu AA temelji se ovo naše istraživanje, a podaci koje smo dobili predstavljaju dokaze kako BPC 157 pozitivno djeluje kod lezija štakora kod kojih je izazvan adjuvantni artritis te da postoji specifični međuođnos između BPC - a 157, L - NAME i L- arginina čime se potvrđuje postavljena hipoteza.

6.1 Promjene na zglobovima

BPC 157 je ostvario protuupalni učinak na otok i eritem zglobova kod adjuvantnog artritisa. Taj učinak prisutan je u oba protokola, preventivnom i terapijskom, u obje primjenjene doze, kako klinički tako i na rendgenskim snimkama te histološkim preparatima šapa štakora. Protuupalno djeluje i L - NAME, međutim, u odnosu na kontrolnu skupinu njegova aktivnost je klinički nešto slabije izražena u odnosu na BPC 157. L - arginin je doveo do pogoršanja simptoma artritisa.

Sam mehanizam djelovanja BPC – a 157 nije u potpunosti razjašnjen. Već postoje dokazi kako BPC 157 ima protuupalno djelovanje. Što se tiče djelovanja na upalni proces, bio je djelotvoran u modelima akutne/subakutne/kronične upale te upalne/neupalne boli (pr. terpentinski i karagininski modeli). Tako je uočeno da primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje eksudaciju upalnih medijatora (leukotriena B4 - LTB₄, te tromboksana B2 - TxB₂) u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze (MPO) (lizosomalni enzim sa baktericidnim djelovanjem) (20, 21). Nadalje, već je spomenuto kako djeluje pozitivno na aktivaciju gena egr - 1 i na taj način pospješuje cijeljenje (71), a svakako je važno naglasiti kako je u odnosu na lijekove koji se koriste u liječenju RA (NSAID, DMARD...) BPC 157 djelotvoran u značajno manjim dozama (μgr/ngr/kg naspram mg/kg). Također, verificirano je i njegovo antipiretsko djelovanje (35).

Kako je već prethodno raspravljano, adjuvantni artritis jest vrlo vjerojatno imunološka reakcija organizma spram antigena koji je prisutan u kapsuli mikobakterije, a učvršćen adjuvantnom (parafinsko ulje), tj. moguće je da se radi o alergijskoj reakciji kasne preosjetljivosti. Stoga, osim već navedenih potencijalnih mehanizama djelovanja, sada se može pretpostaviti kako BPC 157 može djelovati u smislu suprimiranja alergijske reakcije kasne preosjetljivosti. Nažalost, adekvatnih studija koje bi potkrijepile ovu pretpostavku nažalost još uvijek manjka (89).

Dosad je provedeno jedno istraživanje (Sikirić i sur.) gdje je BPC 157 primjenjivan na modelu adjuvantnog artritisa u štakora, a gdje je također pokazao protuupalno djelovanje primjenjen kako profilaktički, tako i nakon što su se već razvili simptomi artritisa. Ovo naše istraživanje je nastavak spomenutog istraživanja gdje smo sada pokušali vidjeti da li BPC 157 ostvaruje svoje protuupalne učinke i putem modulacije NO sustava s obzirom da je dosad brojnim pokusima dokazana njihova međusobna povezanost (101).

NO sustav ima važnu ulogu u održavanju homeostaze organizma. Sudjeluje u funkciji kardiovaskularnog, imunološkog sustava odnosno upali, funkcioniranju centralnog i perifernog živčanog sustava kao što ima ulogu i u mitohondrijskoj signalizaciji te sudjeluje u reakciji organizma prema hipoksiji.

Polazeći od pretpostavke da postoji molekula koja sudjeluje u homeostazi organizma na taj način da ulazi u interakciju sa NO sustavom, dosad su na različitim modelima provedena

brojna istraživanja koja su proučavala utjecaj BPC - a 157 na NO sustav, odnosno pokušaj modulacije djelovanja NO sustava putem BPC - a 157, L - NAME i L - arginina. Tako se danas, između ostalog, zna kako NO proizvode stanice endotela, a na modelima citoprotekcije dokazano je kako BPC 157 upravo štiti stanice endotela i potiče njihovu regeneraciju. Čak istovremena primjena BPC - a 157 i L - NAME koji je snažan inhibitor NOS – a nije uspjela dovesti do poništavanja citoprotektivnog učinka BPC - a 157. Nadalje, BPC 157 djeluje tako da se suprostavlja hipertenziji potaknutoj djelovanjem L - NAME odnosno hipotenziji uzrokovanoj L - argininom. Stoga, s obzirom da ostvaruje učinak bez obzira na blokadu NOS-a L-NAME-om, s jedne strane moguće je da BPC 157 ostvaruje učinak nezvezano za NO sintezu, a s druge strane možda je BPC 157 supstrat za NO sintezu i stoga na taj način može modulirati aktivnost NO sustava. Tako primjerice BPC 157 ima antiulkusni učinak na sluznicu želuca kao i L - arginin, dok L - NAME primijenjen samostalno nije pokazao takav efekt. L - NAME i L - arginin u kombinaciji nisu dali očekivani učinak, dok je L – NAME samo djelomično poništio pozitivan učinak BPC - a 157. Međutim, L - NAME i L - arginin u kombinaciji sa BPC - om 157 su dodatno smanjili BPC-ovo pozitivno djelovanje. Drugim riječima, interakcija BPC - a 157 sa NO sustavom je kompleksna, a brojni su primjeri koji dokazuju kako je zaista i prisutna. U svakom slučaju, kakvo točno kliničko značenje ima međusobna interakcija ovih supstanci još mora biti utvrđeno u dodatnim istraživanjima, no prema brojnim drugim pokusima i radovima kolega čini se da je BPC 157 kao takav važan za funkcioniranje NO sustava (72).

Ovo naše istraživanje je prvo istraživanje u kojem se proučavao utjecaj modulacije NO sustava putem BPC - a 157, a na modelu adjuvantnog artritisa. Naime, pokazali smo kako BPC 157 na ovom modelu u većini slučajeva djeluje sinergistički sa blokatorom NO sustava, L – NAME - om, a suprotno djelovanju L - arginina, NO supstrata.

Prema dosad provedenim istraživanjima NO u organizmu može djelovati kako protektivno na upalom zahvaćeno tkivo, tako i proupalno, odnosno, istraživanja u kojima se proučavao utjecaj L - arginina i različitih selektivnih i neselektivnih inhibitora NOS - a na različitim modelima artritisa (adjuvantni artritis, kolagenom inducirani artritis, artritis uzrokovan antigenima streptokoknog zida i dr.), pokazala su dvosmislene rezultate. L - arginin kao i NOS inhibitori su prema nekim studijama doveli do poboljšanja, a u drugima do pogoršanja simptoma artritisa. Tako su još početkom devedesetih godina istraživači Ialenti, 1993 te Stefanović-Račić, 1994 pokazali na modelu artritisa kako NOS inhibitori imaju protuupalno

djelovanje, a McCartney - Francis i suradnici iste godine utvrdili su kako je povišena razina NO - a dovela do pogoršanja artritisa uzrokovanih antigenima streptokoknog zida, simptomi kojeg su bili ublaženi primjenom neselektivnih NOS inhibitora. Međutim, isti istraživači (Stefanović - Račić) su već nekoliko godina kasnije pokazali kako kod antigen induciranog artritisa bilo selektivni iNOS inhibitori (N - iminoetil – L - lizin), bilo neselektivni (NG - metil - L - arginin) ne djeluju protuupalno kada su primjenjeni profilaktički, štoviše, iNOS inhibitor aminogvanidin (AG) nije djelovao protuupalno niti u profilaktičkom, niti u terapijskom protokolu. Takvi rezultati su zapravo sugerirali da NOS inhibitori ne djeluju protuupalno kada se primjene profilaktički. Nadalje, McCartney - Francis sa suradnicima pokazao je kako je selektivni iNOS inhibitor L - NIL primjenjen terapijski čak doveo do egzacerbacije artritisa uzrokovanih antigenima streptokoknog zida dok je NO djelovao protektivno u akutnoj fazi AA kod iNOS knockout miševa (Veihelmann). McCartney – Francis je pokušao objasniti egzacerbaciju simptoma nemogućnošću L – NIL - a da blokira stvaranje NO od strane cNOS. Diskutira se da za štetno djelovanje NO - a barem djelomično mogu biti odgovorni aktivni oblici dušika koji se stvaraju tijekom upalnog procesa kao što je to peroksinitritni anion. Naime, dokazano je kako NO nije štetan za osteoblaste i hondroците *in vitro* u situacijama kada je stvaranje peroksinitritnog aniona inhibirano. Bezzera i suradnici također su pokazali kako su NOS inhibitori (neselektivni i selektivni) doveli do protuupalnog djelovanja na sinovijalnu ovojnicu kod zymosanom uzrokovanih artritisa, međutim, doveli su do pogoršanja oštećenja zglobne hrskavice. Zaključili su kako NOS inhibicija iako dovodi do smanjenja upalnog infiltrata u sinoviji štakora koji boluju od AA, ne štiti od oštećenja hrskavice koje se vidi u kroničnoj fazi artritisa. To je dovelo do pretpostavke da NO mora ispoljavati i protektivno djelovanje na hrskavicu tijekom upalnog procesa. Autori diskutiraju da je moguće da endogeni NO koji nastaje aktivacijom iNOS - a ima protektivnu ulogu za vrijeme aktivne upale i da je taj učinak jači od protuupalnog učinka iNOS inhibitora. (74).

Ialenti i suradnici su pokazali kako L - arginin pogoršava simptome adjuvantnog artritisa u štakora koji su onda suprimirani primjenom L - NAME, obadvoje u profilaktičkom tretmanu. Kombinacija ove dvije supstance dovela je do artritisa sličnog kao kod kontrolne skupine (73, 74).

Naši rezultati su u skladu sa većinom dosadašnjih rezultata, što znači da su potvrdili protuupalno djelovanje L - NAME i proupalno djelovanje L - arginina u profilaktičkom i terapijskom protokolu te je također potvrđeno međusobno neutralizirajuće djelovanje L -

arginina i L - NAME. U odnosu na djelovanje ovih već poznatih supstanci (L - NAME i L - arginina), na temelju rezultata našeg istraživanja, može se povući paralela i zaključiti kako BPC 157 uistinu ima značajno protuupalno djelovanje.

6.2 Promjene na srcu

U sklopu reumatoidnog artritisa, između ostalog, bolešću može biti zahvaćeno i srce kao organ gdje su verificirani perikarditis, miokarditis, endokarditis (sa zahvaćanjem zalistaka) kao i pankarditis (75).

BPC 157 ne samo da je pozitivno djelovao na upalne promjene koje su ove životinje razvile u području zglobova, već je pozitivno djelovao i na promjene u smislu miokarditisa koje su verificirane EKG - om i to u obadva protokola, profilaktičkom i terapijskom. To je razvidno kako iz rezultata analize histoloških preparata tako i iz EKG testiranja te analize laboratorijskih parametara. Vrijednosti mišićnih enzima koje smo promatrali kao parametre srčane patnje (CK, LDH, AST) povišeni su u gotovo svim promatranim skupinama, a BPC 157 djelomično je ostvario povoljan učinak. Naime, doveo je do sniženja vrijednosti AST - a i LDH u profilaktičkom protokolu te AST - a u terapijskom protokolu, međutim nije djelovao na sniženje vrijednosti CK u oba te LDH u terapijskom protokolu. Moguće je da je uzrok ovakvog rezultata leži u činjenici što nismo određivali frakcije CK (mišićni, srčani i moždani) odnosno izoenzime LDH te zapravo ne znamo cjelokupno podrijetlo ovih povišenih vrijednosti. Znači, moguće je da BPC 157 djeluje na određene frakcije enzima te je to razlog izostanka djelovanja BPC - a 157.

Na EKG - u oboljelih životinja koje smo testirali u profilaktičkom i terapijskom protokolu verificirane su promjene u vidu miokarditisa. Tipična EKG promjena za miokarditis jest prolongacija PR intervala, smanjenje voltaže QRS kompleksa i porast srčane frekvencije (99). Sve ove promjene zabilježene su na životinjama na kojima smo proveli istraživanje, kako u profilaktičkom tako i u terapijskom protokolu. Pokazali smo da je BPC 157 povoljno djelovao na sve elemente miokarditisa primjenjen u obje doze (ng, µg) s tim da je mikrogramska doza bila klinički nešto učinkovitija u odnosu na nanogramsku međutim ta razlika nije bila značajna. U istom smislu djelovao je i L - NAME premda je njegova učinkovitost bila klinički

nešto slabije izražena. L - arginin je pogoršao sve navedene promjene, dok istovremena primjena L - arginina i L - NAME nije pokazala nikakvu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. L - argininom primjenjen u kombinaciji s BPC - a 157 nije značajno je utjecao na njegov protuupalni učinak, dok istovremena primjena L - arginina i L - NAME nije imala utjecaja na pozitivan efekt BPC - a 157 na elemente miokarditisa u štakora.

Poremećaji srčanog ritma svakodnevna su problematika u suvremenoj kliničkoj praksi, a povezani su sa nizom patoloških stanja i bolesti. Unatoč otkriću i uporabi mnogobrojnih izvrsnih suvremenih antiaritmika, nerijetko se susrećemo sa stanjima kada nije jednostavno odabrati optimalan lijek. Problemi su vezani uz pojavu neželjenih pojava, tzv. nuspojava lijeka, njegova mogućeg proaritmijskog djelovanja ili uz izostanak terapijskog učinka u pojedinaca (104).

Srčane aritmije u animalnim modelima su patofiziološki i elektrokardiografski slične humanima. Mogu biti izazvane primjenom raznih supstanci i postupaka što su pokazala brojna istraživanja u životinjskim modelima in vivo i in vitro korištenjem barij - klorida, kateholamina (izoprenalina i adrenalina), tricikličkih antidepresiva (desipramina), citostatika (doksirubicina), imobilizacijskog stresa, etanola, digitalisa, furosemida, kalij - klorida (67 - 69, 105).

Aritmije u štakora možemo utvrditi i pratiti putem elektrokardiografskog zapisa. Pri snimanju zapisa se uvijek koriste bipolarni odvodi udova (I, II, III) što u humanom elektrokardiogramu odgovara glavnim standardnim odvodima (D1, D2, D3) (105). U našem pokusu smo koristili iste metode snimanja štakorskog EKG - a, pri čemu je brzina papira bila 50 mm/sec radi mogućnosti preciznije analize detalja, a kalibracijski signal je bio 0,05 mV/mm.

Na temelju svih dosadašnjih istraživanja i učinkovitosti BPC - a 157 u zaštiti više organskih sustava može se govoriti o njegovoj cirkulaciji i mogućoj sveprisutnosti u organizmu odnosno pretpostavci da je njegovo djelovanje sistemsko. Pentadekapeptid BPC 157 je pokazao visoku stabilnost i nema degradacije u ljudskom želučanom soku tijekom 24 sata. Može biti korišten bez nosača i primijenjen intragastričkim putem ili peroralnom aplikacijom u pitkoj vodi (18 - 54).

Povoljni učinci pentadekapeptida BPC - a 157 na poremećaje srčanog ritma dokazani su u prethodnim eksperimentalnim modelima toksičnosti digitalisa, zatim barij - klorida, odnosno

orciprenalina kao i u uvjetima hiper - i hipokalemije, ishemijsko - reperfuzijskih poremećaja te u slučaju kad se radilo o toksičnom djelovanju na miokard djelovanjem doksorubicina. Snažan antiaritmički kapacitet temelji se na angiogenim učincima i modulaciji NO - sinteze, no moguće je prilagođen putem ekspresije «gap junctions» - GJ (67 - 69, 106).

Ovim putem pokazali smo pozitivno djelovanje BPC - a 157 u oba protokola na promjene u EKG - u uzrokovane miokarditisom te time dokazali kako je BPC 157 učinkovit i u ovom segmentu upalne bolesti.

Što se tiče histoloških promjena koje se mogu verificirati na miokardu kod štakora oboljelih od adjuvantnog artritisa na temelju dosad provedenih studija verificirano je fokalno nakupljanje upalnih stanica u intersticiju blizu krvnih žila, valvulitis te pojačana fibroza miokarda. Naime, smatra se kako srčani fibroblasti aktivirani proupalnim procesima proliferiraju i sintetiziraju kolagen koji se onda odlaže u međustanični prostor (78). Miokarditis u sklopu reumatoidnog artritisa je imunološki uzrokovan. Životinje sa blagom upalom obično ne pokazuju simptome srčanog zatajenja uključujući gubitak težine, letargiju te oslabljenu oksigenaciju (primarno se vidi kod albino štakora kod kojih uobičajeno roskasto kolorirane oči postaju cijanotične). Na obdukciji štakora može se vidjeti perikardijalni i pleuralni izljev kao i ascites kod životinja koje se prezentiraju histološki teško izraženom bolesti. Mortalitet je manji od 1 % 21 dan nakon imunizacije (107).

Analizom hemalaun eozinskih preparata srca testiranih životinja u oba protokola verificirali smo blage upalne promjene (blagi mononuklearni upalni infiltrat u miokardu štakora). Moguće je naravno da bi promjene bile značajno izraženije da smo koristili drugu vrstu štakora kao npr. Lewis štakore koji su najpogodniji model za eksperimente vezane za autoimune bolesti. Međutim, uočljiva je razlika u odnosu na preparate životinja tretiranih BPC - om 157, gdje taj upalni infiltrat nije vidljiv. Dakle, ovim putem dodatno je potvrđeno protuupalno djelovanje BPC - a 157 na srčanu komponentu bolesti.

6.3 Promjene na bubrezima

U RA upalom mogu biti zahvaćeni i bubrezi što se klinički manifestira proteinurijom i mikrohematurijom. Histološki je najčešće riječ o glomerulonefritisu kao posljedici imunološke upale odnosno o oštećenju bubrega uzrokovanom primjenom lijekova kojima se liječi RA (NSAID, metotreksat i dr). Kod štakora koji boluju od adjuvantnog artritisa zabilježene su fokalna bazofilija, edem, granularni depoziti i zadebljanje bazalne membrane. Promjene u glomerulima uključuju granularne depozite i fokalnu glomerulopatiju. Moguć je i pojačan infiltrat upalnih stanica u intersticiju bez promjena glomerula (88, 89).

U našem istraživanju učinjena je analiza histoloških preparata tkiva bubrega bojanih hemalaun eozinom te je verificirana nešto veća celularnost mezangija u preparatima bubrega kod kontrolne skupine životinja, međutim spomenute razlike nisu statistički značajne. Ta promjena može govoriti u prilog glomerulonefritisa, premda na temelju tog nalaza ne možemo sa sigurnošću potvrditi navedenu dijagnozu. Kako je već spomenuto kod miokarditisa, moguće je da je neuspjeh izazivanja upalnih promjena također posljedica činjenice što smo koristili Wistar štakore koji su inače otporniji prema autoimunim bolestima u odnosu na primjerice Lewis štakore koji bi zapravo bili podobniji za ovakovo istraživanje. Naime, na toj vrsti životinja dosad su dokazane upalne promjene na bubrezima u sklopu adjuvantnog artritisa (108).

6.4 Laboratorijski parametri

Učinjenom laboratorijskom dijagnostikom verificirali smo povišene vrijednosti kalija u gotovo svim promatranim skupinama osim skupine koja je istovremeno primala BPC 157 + L – NAME u profilaktičkom protokolu. Stoga zaključujemo kako primijenjena terapija generalno nije imala značajnog utjecaja na vrijednosti kalija, kako u profilaktičkom, tako ni u terapijskom protokolu. Dosad je objavljeno jedno istraživanje gdje je određivana razina kalija kod životinja koje boluju od AA gdje nije verificirano značajno povišenje vrijednosti kalija, međutim zabilježili su povišenje proteina N-acetil-beta-D-glukozaminidaze kao markera renalnog oštećenja iz čega zaključuju kako u ovom modelu ipak može doći do oštećanja

bubrega (109). Rezultate koji govore u prilog bubrežne lezije kod životinja koje boluju od adjuvantnog artritisa ostvarila je i jedna druga skupina autora (Dijoseph i sur.), a na temelju prolazno povišenih vrijednosti kreatinina kod oboljelih životinja (89).

Prema dosadašnjim istraživanjima BPC 157 djelovao je tako da neutralizira hiperkalemiju kao i L - arginin, dok je L - NAME djelovao u smislu izazivanja hiperkalemije tako da je moguće kako je u skupini koja je primala BPC 157 + L - NAME BPC 157 ipak pokazao benefitni terapijski učinak te nadvladao negativni utjecaj L - NAME (72). Ove povišene vrijednosti kalija nisu dovele do promjena EKG-a koje se mogu očekivati u sklopu ovakvog stanja (visok T val, aritmije).

Vrijednosti natrija bile su unutar referentnih vrijednosti, a također nije bilo značajne razlike u vrijednostima natrija između pojedinih skupina životinja. Uvidom u dostupnu literaturu, na životinjama koje boluju od adjuvantnog artritisa dosad nisu određivane vrijednosti natrija.

Nadalje, verificirane su povišene vrijednosti AST - a kod svih promatranih skupina (toksično djelovanje Freundovog adjuvansa/upalni miozitis) s tim da su sve supstance odnosno skupine supstanci djelovale tako da smanjuju njezine vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu osim skupine koja je primala L - NAME te skupine koja je primala BPC 157 u nanogramskoj dozi u profilaktičkom protokolu. Inače, kod životinja koje boluju od adjuvantnog artritisa očekuju se povišene vrijednosti ovog enzima primarno u sklopu jetrene lezije, ali svakako i u sklopu upalne miopatije. Povišenje vrijednosti AST - a djelovanjem L - NAME i sniženje djelovanjem L - arginina također je u skladu s većinom dosadašnjih istraživanja. BPC 157 prema dosad provedenim istraživanjima djeluje tako da smanjuje vrijednosti ovog enzima, što potvrđuju i naši rezultati izuzev djelovanja nanogramske doze u profilaktičkom protokolu gdje ta razlika nije bila statistički značajna (66, 110, 111). Moguće je da je ovaj učinak na ovom modelu ovisan o primjenjenoj dozi BPC - a 157 te je radi toga izostalo djelovanje u manjoj dozi.

Kreatinin kinaza (CK) je s obzirom na upalni miozitis odnosno miokarditis u sklopu adjuvantnog artritisa također očekivano povišena u svim promatranim skupinama i u oba protokola. U profilaktičkom protokolu BPC 157 i L - NAME primjenjeni samostalno nisu doveli do značajnih promjena ovih vrijednosti kao niti L - arginin. Prema dosad provedenim

istraživanjima BPC 157 je djelovao tako da je ubrzavao cijeljenje mišića nakon ozljede, a u istom smislu sniženja vrijednosti mišićnih enzima djelovao je i L - arginin (66, 112). L - NAME je imao suprotan učinak te je zabilježeno povišenje vrijednosti CK kod tretiranih štakora. Moguće je da je izostanak dodatnog patološkog učinka L – NAME u oba protokola na vrijednost CK u štakora povezan sa dozom. U našem istraživanju koristili smo dozu 5 mg/kg/dan dok je u spomenutom istraživanju u kojem je došlo do značajnih povišenja vrijednosti CK korištena doza od 40 mg/kg/dan L - NAME (113). U terapijskom protokolu BPC 157 primjenjen u mikrogramskoj dozi i L - arginin ipak snižavaju vrijednost CK, kako samostalno primijenjeni tako i u kombinaciji sa L - NAME - om i BPC 157. Vrlo vjerojatno je u ovoj kombiniranoj varijanti došlo do međusobno poništavajućeg učinka L - NAME i L - arginina te je zapravo došlo do ispoljenja djelovanja BPC-a 157. L - NAME i L - arginin primijenjeni zajedno nisu utjecali na vrijednosti CK što je u također u skladu sa prethodno navedenim objašnjenjem.

Dakle, izostanak smanjenja vrijednosti CK kod životinja tretiranih BPC 157 u profilaktičkom protokolu sugerira kako on ne pogoršava upalnu mioopatiju kod ovih životinja, ali također niti ne djeluje na normalizaciju vrijednosti ovog parametra u slučaju modela ove upalne reumatske bolesti kada se primjenjuje paralelno sa razvojem bolesti za razliku od terapijskog protokola gdje primijenjen u mikrogramskoj dozi uspješno snižava vrijednosti CK. Naravno, moguće je da bi veće primjenjene doze ipak djelovale protuupalno i u profilaktičkom protokolu što može biti predmet nekih budućih istraživanja.

Nadalje, ovdje smo pokazali kako BPC 157 snižava vrijednost LDH kada se primjenjuje profilaktički prije nego što su se razvili jasni znakovi artritisa, međutim nema takav učinak na razvijeni artritis gdje se njegov učinak ne razlikuje u odnosu na kontrolnu skupinu. Dakle, u ovoj komponenti mišićne bolesti BPC 157 učinkovit je jedino u profilaktičkoj varijanti pokusa što zapravo sugerira kako je moguće da je njegovo djelovanje ipak nedovoljno jako da normalizira vrijednosti mišićnih enzima u već utvrđenoj bolesti, odnosno nakon dugotrajnijeg upalnog procesa.

L - arginin je ovdje djelovao u istom smislu kao i BPC 157 te snižava vrijednost LDH u oba protokola. L - NAME nema utjecaja na vrijednost LDH u odnosu na kontrolnu skupinu. Sva ova djelovanja su zapravo u skladu sa dosad provedenim istraživanjima, odnosno BPC 157 i L

- arginin djeluju sinergistički na sniženje LDH, dok L - NAME nema utjecaja na vrijednost LDH (66, 111, 114).

Također, kako je već spomenuto, moguće je da je uzrok ovakvih rezultata leži u činjenici što nismo određivali frakcije CK (mišićni, srčani i moždani) odnosno izoenzime LDH te zapravo ne znamo cjelokupno podrijetlo ovih povišenih vrijednosti. Znači, moguće je da BPC 157 djeluje na određene frakcije enzima te je to razlog izostanka djelovanja BPC - a 157 na sniženje vrijednosti CK u profilaktičkom, odnosno LDH u terapijskom protokolu.

Vrijednosti uree i kreatinina u obadva protokola su bile unutar referentnih vrijednosti, a istraživanja na životinjama koje boluju od adjuvantnog artritisa kod kojih je mjerena vrijednost kreatinina su oskudna, a utvrđene su prolazno povišene vrijednosti kreatinina. Zasad nije objavljeno radova koji su proučavali utjecaj BPC - a 157 na njihovu vrijednost, a u slučaju primjene L - arginina u dosad provedenim istraživanjima zabilježene su snižene vrijednosti i uree i kreatinina, odnosno povišene u slučaju L - NAME. Diskutira se kako je moguće da L - arginin smanjuje apsorpciju toksičnih tvari u bubrezima, odnosno da putem pojačane proizvodnje NO dovodi do vazodilatacije krvnih žila te posljedično ubrzane hemodinamike. Upravo suprotno je djelovanje L - NAME zbog djelovanja na smanjenje proizvodnje NO. S obzirom da su histološke promjene u smislu glomerulonefritisa na našim preparatima vrlo oskudne, nije niti za očekivati povišene vrijednosti ovih markera bubrežne lezije. (115, 116).

6.5 Tjelesna težina ispitivanih životinja

Prema uzoru na dosadašnje radove procijenjivali smo utjecaj terapije na opće stanje štakora na temelju procjene tjelesne težine životinja (96).

Tako smo zaključili kako se tijekom oba protokola uočava postupni prirast tjelesne težine životinja koje se primale BPC 157 bilo u mikrogramskoj bilo u nanogramskoj dozi, odnosno uočava se prirast tjelesne težine onih skupina životinja koje su primale BPC 157 u kombinaciji bilo sa L - NAME-om, L - argininom odnosno sa L - NAME-om i L - argininom u kombinaciji istovremeno. Kod životinja koje su primale L - arginin došlo je do značajnog

pada tjelesne težine do kraja promatranih razdoblja (14 - ti i 28 - mi dan) dok su životinje koje su primale L - NAME i L - arginin zajedno završile protokole sa približno jednakom težinom u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Životinje koje su primale samo L - NAME profilaktički protokol su završile sa težinom podjednaku kontrolnoj skupini životinja za razliku od terapijske skupine koja je ipak na kraju promatranog perioda bila značajno teža u odnosu na kontrolnu skupinu. Vrlo vjerojatno je razlika u težini odnosno pad tjelesne težine kod životinja koje su primale L - arginin posljedica jače izraženih simptoma upale odnosno otoka zglobova kod ovih životinja zbog čega su životinje trpile jaču bol, bile lošijeg općeg stanja i posljedično slabije jele. Analogno tomu, životinje koje su tretirane BPC - om 157 i L - NAME - om s obzirom na manje izražene upalne promjene nisu ostvarile gubitak, odnosno došlo je do porasta tjelesne težine. Također, postoje podaci kako su radjena istraživanja na životinjama gdje su više koncentracije TNF - alfa povezane sa manjom tjelesnom težinom životinja (73).

Prema dosadašnjim istraživanjima već je opisan veći prirast težine u odnosu na kontrolne životinje kod životinja koje su tretirane BPC - om 157 i L - NAME - om na modelu adjuvantnog artritisa (96, 118). Približno jednaka težina životinja kontrolne skupine i skupine koja je istovremeno primala L - arginin i L - NAME vrlo je vjerojatno posljedica međusobnog neutralizirajućeg djelovanja između ove dvije supstance.

7. ZAKLJUČCI

1. Pentadekapeptid BPC 157 ostvaruje protuupalni učinak na otok i eritem zglobova kod adjuvantnog artritisa izazvanog primjenom kompletnog Freundovog adjuvansa. Taj učinak prisutan je u oba protokola, preventivnom i terapijskom, u obje primjenjene doze, kako klinički tako i na rendgenskim snimkama te histološkim preparatima šapa štakora. Na temelju makroskopske analize, protuupalno djeluje i L - NAME dok radiološki i histološki razlika u odnosu na kontrolnu skupinu nije bila značajna. L - arginin dovodi do pogoršanja simptoma artritisa. BPC 157 antagonizira proupalni učinak L-arginina, a primjenjen zajedno sa L-argininom i L-NAME-om djeluje kao kada je primjenjen samostalno.

2. U elektrokardiogramu štakora Freundov adjuvans uzrokuje znakove miokarditisa (tahikardija, produljenje PR intervala, niske voltaže R valova). BPC 157 dovodi do značajnog umanjenja ovih promjena primjenjen u obje doze (10 µgr/kg, 10 ng/kg i.p.) i u oba tretmana (profilaktičkom i terapijskom). Modulacija aktivnosti NO sustava djelovanjem L - NAME i L - arginina također dovodi do promjena u EKG - u kod miokarditisa. L - NAME djeluje sinergistički sa BPC - om 157, a istovremena primjena L - NAME i L - arginina nema utjecaja na EKG životinja oboljelih od miokarditisa. Također, istovremena primjena L - NAME i L - arginina nije značajno utjecala na pozitivne učinke BPC - a 157 na EKG. L - arginin dovodi do pogoršanja spomenutih simptoma. Na histološkim preparatima miokarda tretiranih životinja također je dodatno potvrđeno protuupalno djelovanje BPC - a 157.

3. Na modelu adjuvantnog artritisa BPC 157, L - NAME i L - arginin nemaju utjecaja na vrijednost kalija i natrija u promatranim skupinama životinja izuzev skupine koja je primala BPC 157 i L - NAME u profilaktičkom protokolu što sugerira da BPC 157 uz pomoć L - NAME ipak može sniziti razinu kalija u krvi ovih životinja. BPC 157 i L - arginin djeluju tako da snižavaju vrijednosti AST -a, a L - NAME ju povisuje.

4. BPC 157 i L - NAME nemaju utjecaja na povišene vrijednosti CK u odnosu na kontrolnu skupinu životinja u profilaktičkom protokolu. Primjenjen terapijski BPC 157 snižava vrijednost CK, kao i L - arginin. L - NAME primijenjen terapijski također nema utjecaja na vrijednost CK.

5. BPC 157 snižava vrijednost LDH tijekom profilaktičkog protokola, dakle kada se primjenjuje prije nego što su se razvili jasni znakovi artritisa, međutim nema takav učinak na razvijeni artritis za razliku od L - arginina koji ima jednak učinak u oba protokola gdje djeluje tako da snižava vrijednosti LDH. L - NAME nema utjecaja na vrijednost ovog parametra u odnosu prema kontrolnoj skupini životinja.

6. BPC 157 i L - NAME nisu imali značajnog utjecaja na vrijednost koncentracije uree i kreatinina kod ovih životinja u oba protokola, kao niti L - arginin u profilaktičkom protokolu. L - arginin primjenjen u terapijskom protokolu dovodi do pogoršanja vrijednosti koncentracije kreatinina.

7. BPC 157 djeluje tako da dovodi do prirasta tjelesne težine štakora u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, kako primjenjen samostalno tako i u kombinaciji bilo sa L - NAME - om ili sa L - argininom. L - arginin dovodi do pada tjelesne težine do kraja promatranih razdoblja (14 - ti i 28 - mi dan) dok L - NAME primjenjen profilaktički te L - NAME i L arginin primjenjeni u kombinaciji zajedno nemaju utjecaj na tjelesnu težinu životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Životinje koje su primale L - NAME primjenjen terapijski također ostvaruju porast tjelesne težine.

8. Rezultati istraživanja predstavljaju značajan doprinos kako razumijevanju patofiziologije adjuvantnog artritisa i njegovog djelovanja na organske sustave, tako i kao osnova za daljnja istraživanja mehanizma djelovanja BPC - a 157 i modela reumatoidnog artritisa te njihove povezanosti sa NO sustavom.

9. Učinak BPC - a 157 na opisanom modelu predstavlja i dobru osnovu za daljnja istraživanja njegove moguće primjene u preveniranju i suzbijanju upalnih promjena kod reumatoidnog artritisa, uključujući i oštećenja ekstraartikulacijskih sustava (srce).

8. SAŽETAK

Uvod: Reumatoidni artritis je kronična upalna bolest karakterizirana oštećenjem zglobne hrskavice, a može zahvatiti i unutarnje organe, uključujući srce i bubrege.

Cilj: utvrditi protuupalni učinak pentadekapeptida BPC 157 na modelu adjuvantnog artritisa u štakora te vidjeti da li se taj učinak ostvaruje putem NO -sustava.

Materijal i metode: istraživanje je provedeno na ženkama Wistar albino štakora koje su imunizirane Freundovim kompletnim adjuvansom. Podijeljeno je na dva protokola, profilaktički i terapijski, 9 skupina, 10 životinja po skupini.

U profilaktičkom protokolu istraživanja životinje su svakodnevno kroz 14 dana primale sljedeće supstance: BPC 157 u dozama 10 µg/kg i 10 ng/kg, L arginin, L - NAME, BPC 157 u dozi 10 µg/kg + L - NAME, L - NAME + L - arginin, L - arginin + BPC 157 u dozi 10 µg/kg te posljednja skupina L - arginin + L - NAME + BPC 157 u dozi 10 µg/kg.

U terapijskom protokolu, nakon imuniziranja Freundovim adjuvansom, kroz 2 tjedna je praćen razvoj artritisa. Terapijsko djelovanje započeto je 14 - ti dan. Tada su sve skupine u vremenskom intervalu od naredna 2 tjedna svakodnevno primale iste supstance kao i u prvom dijelu istraživanja.

Po završetku oba protokola životinjama je snimljen EKG te je uzeta krv za lab analizu (AST, CK, LDH, urea, kreatinin, Na, K). Svim životinjama učinjena je makroskopska procjena indeksa artritisa, histološka i radiološka analiza zglobova.

Rezultati: Freundov adjuvans je 7 - 9 - ti dan doveo je do razvoja artritisa u štakora koji je ispoljio svoj maksimalan učinak između 12 - og i 14 - og dana. Tretirane životinje su razvile i miokarditis. Simptomi artiritisa smanjili su se primjenom BPC 157 u obje ispitivane doze i u oba protokola, a protuupalno je djelovao i L- NAME, kako sam, tako i u kombinaciji s BPC 157. L - arginin je pogoršao simptome artiritisa i miokarditisa u oba potokola.

Zaključak: BPC 157 je pokazao značajno protuupalno djelovanje kako u području zglobova, tako je povoljno djelovao i na znakove miokarditisa. L - NAME je pokazao sinergistički učinak sa BPC 157, dok je L - arginin pogoršao navedene simptome.

Ključne riječi: pentadekapeptid BPC 157, reumatoidni artritis, Freund adjuvans

9. ABSTRACT

Iva Rukavina. Effect of pentadecapeptide BPC – 157, L – NAME and L – arginin on adjuvant arthritis in rats mediated by NO – system along with kidney and heart lesions. 2016.

Introduction: Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease characterized by cartilage and bone destruction. It may affect internal organs as well, included heart and kidneys.

The aim of the study is to establish BPC 157 antiinflammatory effect in adjuvant arthritis and to explore whether this effect related with NO - system.

Materials and methods: The study was conducted on female Wistar rats, that were immunised with complete Freund's adjuvat. We had two protocols (prophylactic and therapeutic) with 9 experimental groups each, treated with BPC 157 i.p. (10 µg/kg, 10 ng/kg) BPC 157, 10 µg/kg i 10 ng/kg, L arginin, L - NAME, BPC 157 10 µg/kg + L - NAME, L - NAME + L - arginin, L - arginin + BPC 157 10 µg/kg, L - arginin + L - NAME + BPC 157, 10 µg/kg and the control group treated with saline (5ml/kg i.p.).

In prophylactic protocol animals were treated with above mentioned substances through 14 days. In therapeutic protocol we were initially waiting adjuvant arthritis symptoms to develop for 14 days and then started with treatment with above mentioned substances through the following 14 days (15 - 28 day). ECG was recorded after protocol ending and blood were taken for laboratory tests (AST, CK, LDH, urea, creatinin, sodium, potassium). Macroscopic and radiological analysis of joints, histological analysis of heart, kidneys and joints were done afterwards.

Results: animals developed arthritis as well as myocarditis. BPC 157 abolished or completely counteracted all of these symptoms in both protocols and in all of the applied doses. L - NAME acted in the same way while L - Arginine aggravated the symptoms.

Conclusion: BPC 157 has an anti inflammatory effect on adjuvanr arthritis and it is in relation with NO system.

Keywords: pentadecapeptide BPC 157, rheumatoid arthritis, Freund's adjuvant

10. POPIS LITERATURE

1. Korczowska I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. *World J Orthop* 2014; 5: 544 - 9.
2. Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S i sur. Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1357 - 9.
3. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr OpinRheumatol* 2000; 21: 279 - 83.
4. Crowson CS, Matteson EL, Myasoedova E i sur. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 633.
5. Hannawi S, Haluska B, Marwick TH, Thomas R. Atherosclerotic disease is increased in recent - onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9: 116.
6. Nurmohamed MT. The increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: when does it start? *Nurmohamed Arthritis Research & Therapy* 2010; 12: 140.
7. Besada E. Potential patient benefit of a subcutaneous formulation of tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis: a critical review. *Patient Prefer Adherence* 2014; 8: 1051 - 9.
8. Salmon JE, Roman MJ. Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus 2008; *Am J Med*; 121: 3 - 8.
9. Tanaka Y. Current concepts in the managment of rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med* 2016; 31: 210 - 8.
10. Bijlsma JW, Hoes JN, Van Everdingen AA, Verstappen SM, Jacobs JW. Are glucocorticoids DMARD – s? *Ann NY Acad Sci* 2006; 1069: 268 - 74.
11. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010; 68: 930 - 941.
12. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *Int J Rheum Dis*. 2007; 4: 270 - 274.
13. Xixi M, Shengquian X. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Biomed Rep* 2013; 1: 177 - 184.
14. Calabrò A, Caterino AL, Elefante E i sur. One year in review 2016: novelties in

- the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34: 357 - 72.
15. Azadegan-Dehkordi F, Bagheri N, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. The role of Th1 i Th17 cells in glomerulonephritis. *J Nephropathol* 2015; 4: 32 - 7.
 16. Lee SY, Jung YO, Kim DJ i sur. IL-12p40 Homodimer Ameliorates Experimental Autoimmune Arthritis. *J Immunol* 2015; 195: 3001 - 10.
 17. Zhang XX, Ito Y, Liang JR, Liu JL, He J, Sun WJ. Therapeutic effects of total steroid saponin extracts from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in Freund's complete adjuvant induced arthritis in rats. *Int Immunopharmacol* 2014; 23: 407 - 16.
 18. Sikiric P, Petek M, Rucman R i sur. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris* 1993; 87: 313 - 27.
 19. Xue XC, Wu YJ, Gao MT i sur. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Protective+effects+of+pentadecapeptide+BPC+157+on+gastric+ulcer+in+rats.+Xiao+%E2%80%93+Chang+Xue...-#> 2004; 10: 1032 - 6.
 20. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z i sur. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris* 1997; 91: 173 - 8.
 21. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC - 157 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 272: 417 - 22.
 22. Sebecic B, Nikolic V, Sikiric P i sur. Osteogenic effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on the healing of segmental bone defect in rabbits. A comparison with the bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone* 1999; 24: 195 - 202.
 23. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S i sur. Pentadecapeptid BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001; 27: 817 - 27.
 24. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S i sur. Pentadecapeptid BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001; 27: 817 - 27.
 25. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S i sur. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC 157 creams in burned mice. *Burns* 2003; 29: 323 - 34.
 26. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 acclerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthop Res* 2003; 21: 976 - 83.

27. Bilic M, Bumber Z, Blagaic AB, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P. The stable gastric pentadecapeptide BPC, given locally, improves CO₂ laser healing in mice. *Burns* 2005; 31: 310 - 5.
28. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendonto - bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J Orthop Res* 2006; 24: 982 - 9.
29. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptid BPC 157. *J Orthop Res* 2006; 24: 1109 - 17.
30. Sikiric P. The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). *Inflammopharmacology* 1999; 7: 1 - 14.
31. 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.
32. Sikiric P. From gut inflammation to gastrointestinal disorders current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 1039 - 40.
33. Sikiric P. From gut inflammation to gastrointestinal disorders current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. *Curr Pharm Des*, 2014; 20: 1039 - 40.
34. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 417 - 22.
35. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non - steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris*. 1997; 91: 113 - 22.
36. 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.
37. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1518 - 26.
38. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z i sur. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris* 1997; 91: 173 - 8.
39. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. Hepatoprotective effect of BPC 157, a 15-amino acid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl₄ administration. A comparative study with dopamine

- agonists and somatostatin. *Life Sci* 1993; 53: 291 - 6.
41. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G i sur. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *J Physiol Paris* 2001; 95: 315 - 24.
 42. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 285 - 90.
 43. Petrovic I, Dobric I, Drmic D i sur. BPC 157 therapy to detriment sphincters failure-esophagitis-pancreatitis in rat and acute pancreatitis patients low sphincters pressure. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 527 - 34.
 44. Sikiric P, Petek M, Rucman R i sur. BPC reduced alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *Exp Clin Gastroent* 1991; 1: 22 - 24.
 45. 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; 12: 652 - 9.
 46. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB i sur. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des*, 2014; 20: 1121 - 5.
 47. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic i sur. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1604 - 14.
 48. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K i sur. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 241 - 50.
 49. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A i sur. Anxiolytic effect of BPC-157, a gastric pentadecapeptide: shock probe/burying test and light/dark test. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 225 - 30.
 50. Sikiric P, Marovic A, Matoz W i sur. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 - tetrahydrophyridine. *J Physiol Paris* 1999; 93: 505 - 12.

51. Sikiric P, Separovic J, Buljat G i sur. Gastric mucosal lesions induced by complete dopamine system failure in rats. The effects of dopamine agents, ranitidine, atropine, omeprazole and pentadecapeptide BPC 157. *J Physiol Paris* 2000; 94: 105 - 110.
52. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M, Anic T i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 512: 173 - 9.
53. Tudor M, Jandric I, Marovic A i sur. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul Pept* 2010; 160: 26 - 32.
54. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B i sur. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept* 2010; 160: 33 - 41.
55. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology* 2006; 14: 214 - 21.
56. Keremi B, Lohinai Z, Komora P i sur. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 115 - 22.
57. 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.
58. 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.
59. Keremi B, Lohinai Z, Komora P i sur. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60 Suppl 7: 115 - 22.
60. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L i sur. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res* 2010; 28: 1155 - 61.
61. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwerth S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J Physiol Pharmacol*, 2009; 60 Suppl 7: 191 - 6.
62. Lazić R, Gabrić N, Dekaris I, Bosnar D, Boban-Blagaić A, Sikirić P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. *Coll Antropol* 2005; 29: 321 - 5.
63. Marijic J, Stowe DF, Turner LA, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Protective effects of newly isolated gastric peptide following hypoxia and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *Anesthesiology* 1990; 1994: 129 - 130.

64. Šeparović J. Učinak novog peptida BPC na različite modele kardiotoksičnosti (disertacija). Medicinski fakultet, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 1996, str. 133.
65. Šeparović J, Sikirić P, Lovrić-Bencić M, Seiwert S, Čikes I. Pentadecapeptide BPC-157 reduces doxorubicine cardiac toxicity in rats. *Fund Clin Pharmacol* 1999; Suppl 1: 231.
66. Lovrić-Bencić M, Sikirić P, Hanzevacki JS i sur. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 19 - 26.
67. Balenović D, Bencić ML, Udovičić M i sur. Inhibition of methyl digoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept*, 2009; 156: 83 - 9.
68. Balenović D, Barišić I, Prkacin I i sur. Mortal furosemide-hypokalemia disturbances in rats NO-system related shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 peptide more than with L-Arginine. *J Clin Exp Cardiol* 2012; 3: 7.
69. Barišić I, Balenović 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.
70. Ćorić-Martinović Valentina. Učinak pentadecapeptida BPC 157 i losartana na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnih životinja (disertacija). Medicinski fakultet, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu 2012, str. 68.
71. Tkalcević VI, Čuzić S, Brajsa K i sur. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 212 - 21.
72. Sikirić P, Seiwert S, Rucman R i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Des.* 2014; 20: 1126 - 35.
73. Ialenti A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 701 - 6.
74. Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S, Jerônimo SM, de Melo LB, Keeble J, da Rocha FA. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 172 - 82.

75. Wright K, Crowson CS, Gabriel SE. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases: a focus on heart failure. *Hearth Fail Clin* 2014; 10: 339 - 52.
76. Huang C, Wan L, Liu J. Effect of Xinfeng capsule on nuclear factor Kappa B/tumor necrosis factor alpha and transforming growthfactor beta 1/Smads pathways in rats with cardiac injuries induced by adjuvant arthritis. *J Tradit Chin Med* 2016; 36: 92 - 100.
77. Prasad SK, Vassiliou VS. Rheumatoid arthritis: mapping the future. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015; 8: 537 - 9.
78. Shi Q, Abusarah J, Baroudi G, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M. Ramipril attenuates lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis. *Rthritis Res Ther* 2012; 14: R223.
79. Fraser RS, Harley C, Wiley T. Electrocardiogram in the normal rat. *J Appl Physiol* 1967; 23: 401 - 402.
80. Normann SJ, Priest RE, Benditt EP. Electrocardiogram in the normal rat and its alteration with experimental coronary occlusion. *Circ Res* 1961; 9: 282 - 287.
81. Sambhi MP, White FN. The electrocardiogram of the normal and hypertensive rat. *Circ Res* 1960; 8: 129 – 34.
82. Bacova I, Svorc P Jr, Bracokova I. Chronophysiologic aspects of ECG changes during a systemic asphyxic episode and subsequent reoxygenation in an experimental rat model. *Bratisl Lek Listy* 2010; 111: 121 - 125.
83. Beinfield WH, Lehr D. Advantages of ventral position in recording electrocardiogram of the rat. *J Appl Physiol* 1956; 9: 153 - 6.
84. Farmer JB, Levy GP. A simple method for recording the electrocardiogram and heart rate from conscious animals. *Br J Pharmacol Chemother* 1968; 32: 193 - 200.
85. Beinfield WH, Lehr D. P-R interval of the rat electrocardiogram. *Am J Physiol* 1968; 214: 205 - 11.
86. Beinfield WH, Lehr D. QRS-T variations in the rat electrocardiogram. *Am J Physiol* 1968; 214: 197 - 204.
87. Kulmatycki KM, Abouchehade K, Sattari S, Jamali F. Drug-disease interactions: reduced beta adrenergic and potassium channel antagonist activities of sotalol in the presence of acute and chronic inflammatory conditions in the rat. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 286 - 94.

88. Icardi A, Araghi P, Ciabattini M, Romano U, Lazzarini P, Bianchi G. Kidney involvement in rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2003; 55: 76 - 85.
89. Dijoseph JF, Walter TL, Hartman DA, Carlson RP. Kidney dysfunction in the arthritic rat. *Int J Immunopharmacol* 1993; 15: 933 - 41.
90. Vengerovski AI, Saratikov AS, Tikhonova NM. Structural and metabolic disorders in the heart, liver and kidneys in adjuvant disease. *Arkh Patol* 1977; 39: 72 - 7.
91. Skorjanec S, Kokot A, Drmic D i sur. Duodenocutaneous fistula in rats as a model for „wound healing- therapy“ in ulcer healing: the effect of pentadecapeptide BPC 157, L – nitro-arginine methyl ester and L-arginine. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66: 581 - 90.
92. Stupnisek M, Kokot A, Drmic D, Hrelec Patrlj M, Zenko Sever A. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin, L-NAME and L-arginine. *PloS One* 2015; 10: e012354.
93. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris* 1997; 91: 113 - 22.
94. Shi XL, Wang LP, Feng X, Fan DD, Zang WJ, Wang B, Zhou J. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by nasal administration of novel synthetic peptides from heat shock protein 65. *BMC Musculoskelet Disord* 2014; 25;15: 253.
95. Wei ZF, Jiao XL, Wang T i sur. Norisoboldine alleviates joint destruction in rats with adjuvant-induced arthritis by reducing RANKL, IL-6, PGE₂, and MMP-13 expression. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 403 - 13.
96. Zhang RX, Fan AY, Zhou AN i sur. Extract of the Chinese herbal formula Huo Luo Xiao Ling Dan inhibited adjuvant arthritis in rats. *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 366 - 71.
97. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013; 4: 114.
98. Hsu YH, Chang MS. Interleukin-20 antibody is a potential therapeutic agent for experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 3311 - 21.
99. Kishimoto C, Matsumouri A, Kawai C. Electrocardiographic findings in experimental murine myocarditis-arrhythmias in the chronic stage. *Jpn Circ J* 1983; 47: 1317 - 21.
100. Knight B, Katz DR, Isenberg DA i sur. Induction of adjuvant arthritis in m. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 459 - 65.

101. Zahiri H, Gagnon J, Ayotte R, Laurin CA. Adjuvant experimental polyarthritis. *Can Med Assoc J* 1969 ; 101: 269 - 78.
102. Zollner T, Renz H, Asadullah K. Animal models of T-Cell Mediated Skin Diseases. U: Williams RO. *Models of rheumatoid arthritis*. Springer, 2005. str. 89 – 92.
103. Drolet B, Simard C, Gailis L. Ischemic, genetic and pharmacological origins of cardiac arrhythmias: the contribution of the Quebec Heart Institute. *Can J Cardiol* 2001; 23 Suppl B: 15 B - 22B.
104. Milan DJ, MacRae CA. Animal models for arrhythmias. *Cardiovascular Res* 2005; 67: 426 – 37.
105. Shiroshita-Takeshita A, Sakabe M, Haugan K, Hennen JK, Nattel S. Model – dependent effects of the gap junction conduction-enhancing antiarrhythmic peptide rotigaptide (ZP123) on experimental atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2007; 115: 310 - 8.
106. Shimada K, Uzui H, Ueda T, Lee JD, Kishimoto C. N-Acetylcysteine Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats via Nitric Oxide. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2015; 20: 203 - 10.
107. Kim Ey, Moudgil KD. The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 239.
108. Franch MA, Moreno JJ, Castell M, Queralt J. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as a marker of renal injury in adjuvant arthritis. *Res Exp Med (Berl)* 1990; 190: 213 - 8.
109. Xia Y, Zuo J, Li X, Chen JW. Anti-arthritic and anti-oxidative effect of ethyl acetate fraction of *Blumea balsamifera* residues in rat adjuvant-induced arthritis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2014; 39: 3819 - 23.
110. Lucas ML, Rhoden CR, Rhoden EL, Zettler CG, Mattos AA. Effects of L-arginine and L - NAME on ischemia-reperfusion in rat – liver. *Acta Cir Bras* 2015; 30: 35 – 52.
111. Hung DY, Siebert GA, Chang P i sur. Hepatic pharmacokinetics of propranolol in rats with adjuvant – induced systemic inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G343-51.
112. Adaramoya OA, Nwosu IO, Farombi EO. Sub-acute effect of N(G)-nitro-l-arginine methyl-ester (L-NAME) on biochemical indices in rats: protective effects of Kolaviron and extract of *Curcuma longa* L. *Pharmacognosy Res* 2012; 4: 127 – 33.

113. Adaramoya Nwosu IO, Farombi EO. Sub-acute effect of N(G)-nitro-L- arginine methyl-ester (L-NAME) on biochemical indices in rats: protective effects of Kolaviron and extract of *Curcuma longa* L. *Pharmacognosy Res* 2012; 4: 127 – 33.
114. Sakaguchi S, Furusawa S, Takanayagi M, Takayanagi Y. Effects of N(G) – nitro – L – arginine – methyl ester on endotoxin induced leakage of lactate dehydrogenase and cytotoxicity in J774A. 1 cells. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 196: 39 – 43.
115. Başhan İ, Başhan P, Seçilmiş MA, Şingirik E. Protective effect of L-arginine on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indijan J Pharmacol* 2014; 46: 608 - 12.
116. Ghasemi M, Nematbakhsh M, Daneshmand F, Moeini M, Talebi A. Role of nitric oxide in kidney and liver (as distance organ) function in bilateral renal ischemia-reperfusion: Effect of L-Arginine and NG-nitro-L-Arginine methyl ester. *Adv Biomed Res* 2015; 4: 233.
117. Sever M, Klicek R, Radic B i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2070 - 83.
118. Jones AM, Wilkerson DP, Campbell IT. Nitric oxide synthase inhibition with L-NAME reduces maximal oxygen uptake but not gas exchange threshold during incremental cycle exercise in man. *J Physiol.* 2004; 560: 329 - 338.

11. KRATKA BIOGRAFIJA AUTORA

Iva Rukavina rođena je u Gospiću. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1999.g. i završava 2005.g. Pripravnički liječnički staž u trajanju od dvanaest mjeseci obavlja u KBC Zagreb (2005 – 2006 g.), a u veljači 2008. godine započinje specijalizaciju iz pedijatrije u istoj ustanovi. 2009.g. upisuje specijalistički postdiplomski studij Klinička pedijatrija i završava ga 2010.g, a 2012. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo. U veljači 2012. postaje specijalist pedijatar. Član je Hrvatske liječničke komore i Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za pedijatriju, Hrvatskog društva za pedijatrijsku kardiologiju i reumatologiju te Europskog društva pedijatrijskih reumatologa.

Od 2013.g. suradnica je Medicinskog fakulteta u Zagrebu kao edukator u predmetu Temelji liječničkog umijeća, kao i u sklopu kolegija iz pedijatrije na engleskom jeziku. Aktivno sudjeluje na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima i kongresima, te je objavljuje više radova u domaćim i međunarodnim časopisima kao što je i autor odnosno koautor više poglavlja u knjizi Pedijatrijska reumatologija.

Objavljeni radovi:

1. Ilijić Krpan M, Juretić E, Juras J, Vukelić V, Anzulović D, Kuliš I, Rukavina I, Čima K. Neonatal outcomes in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Gynaecologia et perinatologia* 2011; 20:187-191.
2. Rukavina I: SAPHO syndrome: a review. *J Child Orthoped* 2015; 9(1):19-27.
3. Rukavina I, Mortier G, Van Laer L, Frković M, Đapić T, Jelušić M. Mutation in the type II collagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with mild spondyloepiphyseal involvement. *Semin Arthritis Rheum* 2014; 44: 101 – 4.
4. Rukavina I, Čaleta D. Giant-cell tumour of the tendon sheath: A review. *OA Orthopaedics* 2014;2:11
5. Bobek D, Vuković J, Malenica B, Bojanić K, Rukavina I, Jelušić M.: Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibody Positivity in Five Children with Systemic Lupus Erythematosus - What is the Importance of this Finding? *Acta Dermatovenerol Croat.* 2014;22:164-270.
6. Sakan S, Bandić Pavlovic D, Baronica R, Rukavina I, Štern Padovan R, Dobric I. Spinal cord injury without radiological abnormality (SCIWORA) in a young female and pharmacological treatment option: a case report with review of literature. *Int J Res Med Sci.* 2015; 3(6) 1538-1542.
7. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Kolenc D, Batelja Vuletic L, Drmic D, Grgic T, Strbe S, Zukanovic G, Crvenkovic D, Madzarac G, Rukavina I, Sucic M, Baric M, Starcevic N, Krstonijevic Z, Lovric Bencic M, Filipcic I, Stancic Rokotov D, Vlainic J. Brain-gut axis and pentadecapeptide BPC 157. Theoretical and practical implications. *Curr Neuropharmacol.* 2016 May 2 (Epub ahead of print).

Poglavlja u knjizi

1. Marija Jelušić, Iva Rukavina: Sindromi preklapanja. U Marija Jelušić, Ivan Malčić i sur. *Pedijatrijska reumatologija*. Medicinska naklada Zagreb, 2013, str. 234 - 239.
2. Marija Jelušić, Iva Rukavina: Sistemski vaskulitisi. U Marija Jelušić, Ivan Malčić i sur. *Pedijatrijska reumatologija*. Medicinska naklada Zagreb, 2013, str. 245 - 275.
3. Iva Rukavina: Reaktivni artritis. U Marija Jelušić, Ivan Malčić i sur. *Pedijatrijska reumatologija*. Medicinska naklada Zagreb, 2013, str. 289-290.
4. Marija Jelušić, Iva Rukavina: Sindrom aktivacije makrofaga. U Marija Jelušić, Ivan

- Malčić i sur. Pedijatrijska reumatologija. Medicinska naklada Zagreb, 2013, str. 312 - 315.
5. Marija Jelušić, Iva Rukavina: Sindromi amplifikacije boli. U Marija Jelušić, Ivan Malčić i sur. Pedijatrijska reumatologija. Medicinska naklada Zagreb, 2013, str. 355 - 357.