

Učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje medijalnog kolateralnog ligamenta u štakora

Bojanić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2007

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:236223>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Bojanić

**Učinak primjene pentadekapeptida BPC
157 na cijeljenje medijalnog kolateralnog
ligamenta u štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2007.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Bojanić

**Učinak primjene pentadekapeptida BPC
157 na cijeljenje medijalnog kolateralnog
ligamenta u štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2007.

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sven Seiwert

Zahvaljujem:

Prof. dr. sc. Svenu Seiwertu, dr. med. na uputama i svojoj pomoći tijekom
izrade disertacije

Prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, dr. med. na poticaju i svesrdnoj podršci

Tomislavu Cerovečkom, dr. med. na pomoći pri provođenju istraživanja

Mojoj supruzi Ines i kćerima Lani i Tei s ljubavlju

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>Prikaz problema</i>	1
1.2. <i>Građa i funkcija ligamenta</i>	3
1.3. <i>Biomehaničke osobine ligamenta</i>	7
1.4. <i>Cijeljenje ligamenta</i>	12
1.5. <i>Pentadekapeptid BPC 157 i cijeljenje</i>	21
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. <i>Eksperimentalne životinje i kirurški zahvat</i>	26
3.2. <i>Primjenjeno sredstvo i način primjene</i>	28
3.3. <i>Istraživački postupnik i priprema preparata za analize</i>	30
3.4. <i>Kliničko-funkcionalno testiranje</i>	33
3.5. <i>Biomehaničko ispitivanje</i>	35
3.6. <i>Makroskopska procjena izgleda ligamenta</i>	36
3.7. <i>Mikroskopska procjena</i>	38
3.8. <i>Statistička analiza</i>	39
4. REZULTATI	40
4.1. <i>Funkcionalni parametri oporavka</i>	40
4.1.1. <i>Test pritiska ekstenzora</i>	40
4.1.2. <i>Testiranje kontraktura</i>	47
4.2. <i>Biomehaničko testiranje</i>	56
4.2.1. <i>Sila pucanja</i>	59
4.2.2. <i>Elongacija</i>	60
4.2.3. <i>Energija apsorbirana kod pucanja</i>	62
4.2.4. <i>Krutost</i>	63

4.3.	<i>Makroskopska procjena</i>	65
4.4.	<i>Mikroskopska procjena</i>	69
4.4.1.	<i>Bojanje hemalaun-eozinom (HE)</i>	69
4.4.2.	<i>Bojanje po Gomoriju (Gömöry)</i>	70
4.4.3.	<i>Bojanje po Malloryu</i>	75
4.4.4.	<i>Imunohistokemijsko bojanje protutijelom na CD 34</i>	80
5.	RASPRAVA	83
6.	ZAKLJUČAK	104
7.	SAŽETAK	106
8.	SUMMARY	108
9.	LITERATURA	110
10.	ŽIVOTOPIS	123

1. UVOD

1.1. Prikaz problema

Ligamentarne ozljede još uvijek čine veliki zdravstveni problem, i to ne samo poradi svoje učestalosti, već zbog činjenice da kao rezultat cijeljenja ligamenata nastaje reparacijsko tkivo na mjestu ozljede. Osim toga, tim se cijeljenjem ne normaliziraju biomehaničke i biokemijske osobine ligamenta već se kompenzatornim povećanjem volumena i poprečnog presjeka zacijeljenog ligamenta omogućuje funkcija vrlo slična zdravom ligamentu.¹⁻⁴ Stoga ne čudi da su danas predmetom istraživanja načini i/ili tvari koji mogu poboljšati sam proces cijeljenja s ciljem da umjesto reparacijskog tkiva krajnji rezultat bude regeneracija ligamenta.⁵⁻¹⁰

Ligamentarne ozljede osobito često susrećemo prilikom sportskih aktivnosti pa tako analiza Engleskog nacionalnog registra ozljeda pokazuje da one čine, ovisno o sportu, između 36 i 75% svih sportskih ozljeda.¹¹ Rezultati istraživanja «Kaiser Foundation» (SAD) kazuju da godišnja incidencija težih ligamentarnih ozljeda koljena iznosi 98 na 100 000 osoba, a više od 85% tih ozljeda jesu ozljede prednje križne sveze (LCA) i medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM).¹² Prema rezultatima drugog istraživanja u SAD-u oko 40000 ljudi godišnje ima izoliranu ozljedu LCM-a.¹³ Ozljede LCM-a osobito su česte u nekim kontaktnim sportovima, primjerice u nogometu, ragbiju te hokeju na ledu.¹³⁻¹⁵ U skijanju ozljede LCM-a čine čak i do 60% svih ozljeda koljena.¹⁶

Nakon utvrđivanja ligamentarne ozljede od najveće je važnosti provesti adekvatno liječenje.¹⁷ Naime, ako se tim liječenjem ne uspostavi potpuna funkcija ligamenta nastat će nestabilnost zgloba koja će ne samo ograničiti daljnju radnu i sportsku aktivnost ozljeđenika, već će omogućiti i brži razvitak degenerativnih promjena u tom zglobu. Saznanje o mogućnosti zacijeljivanja izolirane ozljede LCM-a i bez kirurškog zahvata razlogom je što je danas neoperacijsko liječenje metoda izbora bez obzira na stupanj ozljede.¹⁷⁻²¹ Ono se zasniva na nošenju ortoze tijekom 6 do 12 tjedana i smanjenju tjelesne aktivnosti, naravno uz provođenje fizikalne terapije.¹⁷⁻²¹

No, usprkos tome čak 13% tako liječenih bolesnika razvija rane znake degenerativnih promjena na standardnim radiološkim snimcima (pozitivan Fairbankov znak) vrlo brzo po završenome liječenju.⁹ Osim toga, rezultati istraživanja su pokazali da se cijeljenjem ne normaliziraju biomehaničke i biokemijske osobine LCM-a te da histomorfološki izgled zacijeljenog LCM-a nije isti kao u zdravog ligamenta.¹⁻⁴ Upravo ti nezadovoljavajući ishodi liječenja ozljeda LCM-a do danas opisanim i primjenjenim metodama kao i nepostojanje nekog farmakološkog ili drugog agensa koji bi poboljšao cijeljenje ligamenta uz odlične rezultate istraživanja primjene pentadekapeptida BPC 157 za cijeljenje različitih rana, potom za cijeljenje kirurški načinjene ozljede tetive i mišića, kao i za cijeljenje tetive za kost potaknuli su ovo istraživanje.²²⁻²⁹ Očekivani znanstveni doprinos ovog istraživanja trebao bi se očitovati u poboljšanju cijeljenja kirurški izazvane ozljede LCM-a u štakora primjenom pentadekapeptida BPC 157. Osim toga, to poboljšanje cijeljenja ligamenta bi se trebalo pokazati i na drugim modelima u daljnjim istraživanjima, što bi u konačnici dovelo i do kliničke primjene pentadekapeptida BPC 157 kod ozljede LCM-a, a i drugih ekstrartikularnih ligamenata u ljudi.

1.2. Građa i funkcija ligamenta

Ligamenti (zglobne sveze) su strukture građene od gusto formiranog vezivnog tkiva čija su vlakna raspoređena u pravilne snopove s obzirom na prisutne mehaničke uvjete.¹⁻⁴ Oni spajaju dvije kosti koje formiraju zglob i zajedno sa zglobnom čahuricom važan su činitelj osiguranja stalnog doticaja među zglobnim tijelima. Ligamenti mogu biti smješteni izvan zgloba pa ih onda nazivamo ekstraartikularnim ili periartikularnim svezama ili su pak smješteni unutar zgloba pa je onda riječ o intraartikularnim svezama, a mogu biti i utkani u zglobnu čahuru pa tada govorimo o kapsularnim svezama.¹⁻⁴

Funkcija ligamenata je u prvome redu mehanička, tj. oni pasivno stabiliziraju zglob i kontroliraju da se kretnje u zglobu odvijaju u fiziološkim granicama distribuirajući pritom opterećenje i na taj način štite i druge zglobne strukture, primjerice hrskavicu, od oštećenja.^{2,30-32} Iako se doima da je ligament jednostruka struktura, ovisno o položaju zgloba i primjenjenoj sili, neka se vlakna ligamenta napinju, a neka ostaju opuštena, što potvrđuje da je ligament mnogo kompleksnija struktura no što se misli.³² U novije se vrijeme sve više spominje i neurosenzorna funkcija ligamenta.³³ Naime, funkcionalni mehanoreceptori koji su pronađeni u ligamentarnome tkivu imaju važnu ulogu u kontroli pokreta. Oni mijenjaju mišićnu aktivnost kao odgovor na pojačano opterećenje zgloba, te na taj način stabiliziraju zglob i štite ga od oštećenja. Taj odgovor valja jasno razlikovati od propriocepcije, pod kojom podrazumijevamo svjesnu percepciju položaja ekstremiteta u prostoru, a koja je uzrokovana odgovorom mišićnih receptora koji su u prvome redu osjetljivi na promjenu duljine mišića.³⁴

Vezivna tkiva, pa tako i ligament, sastoje se od dvije komponente – stanica i međustanične tvari.^{1-4,30-32} Manje od 5% ukupnog volumena ligamenta zaposjednuto je stanicama. Osnovne stanice ligamentarnog tkiva su fibroblasti.^{1-4,30-32} Oni su uloženi u međustaničnu tvar i odgovorni su za sintezu međustanične tvari. Osim toga, odgovorni su i za biološki odgovor ligamenta na mehaničke uvjete, kao i za remodeliranje i cijeljenje ozlijeđenog ligamenta. Fibroblasti su vretenastog oblika i imaju veliku, ovalnu jezgru te obilnu i nepravilno razgranatu citoplazmu. Iako se može činiti da su fibroblasti

funkcionalno i fizički izolirani novija su istraživanja pokazala da oni mogu komunicirati putem izdanaka citoplazme. Naime, ti se citoplazmatski izdanci mogu dosta istegnuti pa se mogu spajati i s citoplazmatskim izdancima susjednih stanica i putem međustaničnih sveza, tzv. «gap junctions».^{32,35} Postojanje tih međustaničnih sveza omogućuje spajanje stanica, električki i kemijski, i prijenos iona i molekula manjih od 1kDa. Fibroblasti imaju dva stadija aktivnosti, aktivno stanje i stanje mirovanja, a ta se dva stadija i morfološki razlikuju, pa pojedini autori nazivaju stanicu u mirovanju fibrocitom.^{4,32} Svaka je stanica integrirana unutar kompleksa trodimenzionalne stanične mreže koja se proteže duž ligamenta putem dugačkih citoplazmatskih izdanaka i međustaničnih sveza. Stanice su gledajući izvan tog trodimenzionalnog kompleksa postavljene u paralelne nizove tako da su susjedni nizovi međusobno povezani citoplazmatskim izdancima i međustaničnim svezama i da čine fascikul (snopić).^{2,32} Skupina fascikula omotana je ovojnicom tankog vezivnog tkiva – endoligamentom.^{1-4,30-33} Endoligament je znatno bogatiji stanicama, a izdanci tih stanica usmjereni su perpendikularno na stanice unutar snopa i na taj način vezuju snop koji okružuju i čine funkcionalnu jedinicu te omogućuju susjednim snopovima da međusobno kližu. Svi snopovi ligamenta omotani su zajedničkim znatno prokrvljenijim ovojem vezivnog tkiva koji nazivamo epiligamentom.^{1-4,30-33} Kao i endoligament i epiligament je bogatiji stanicama, a za razliku od ostalih dijelova ligamenta te su stanice više okruglastog oblika, a izdanci tih stanica usmjereni su perpendikularno na uzdužnu osovinu ligamenta.³⁶

Međustaničnu tvar ligamenta čine osnovna tvar, vlakna te voda.^{1-4,30-33} Biokemijski gledano voda čini između 65 i 70% sveukupne težine ligamenta, dok je glavna kruta komponenta ligamenta kolagen koji čini oko 75% suhe težine ligamenta.^{1-4,30-33} Osnovnu tvar izgrađuju glikozaminoglikani koji čine svega oko 0,5% suhe težine ligamenta ali ih proporcionalno ima više no u tetivama i od osobite su važnosti poradi njihove sposobnosti da vežu vodu, te strukturni glikoproteini među kojima ima najviše aktina fibronektina i laminina.^{1-4,30-33} Osnovna tvar je bezbojna i homogena te ispunjava prostore između fibroblasta i vlakana vezivnog tkiva i povezuje ih međusobno. Zbog

svoje viskoznosti djeluje kao mazivo i kao zapreka ulaženju stranih čestica u tkivo.

Ligament izgrađuju tri vrste vlakana: kolagena, elastična i retikulinska.^{1-4,30-33} Najveći dio kolagenskih vlakana pripada kolagenu tip I, i to između 70 i 80%, a potom slijede tip III (8%) i tip V (12%), dok su ostali tipovi primjerice II, IX, X, XI i XII, znatno rjeđe zastupljeni. Najvažniji odrednik položaja kolagenih vlakana jest smjer sile opterećenja kojoj je tkivo izloženo. Tako su kolagena vlakna tip I u patelarnom ligamentu usmjerena usporedno s osi opterećenja, dok je raspored tih vlakana u LCM-u različit jer je prijenos sile u više smjerova.⁴ Nekolagena bjelančevina elastin, koja čini manje od 1% suhe težine ligamenta, glavni je sastojak elastičnih vlakana koja nemaju pravilnu strukturu i koja se sastoje iz mikrofibrila i amorfne tvari.⁴

Ligamentarno je tkivo hipovaskularno, a rezultati istraživanja su pokazali da je samo do 2% ukupnoga volumena ligamenta zaposjednuto krvnim žilama.^{33,36,37} Najveći dio krvnih žila nalazi se na površini ligamenta, u tzv. epiligamentarnome dijelu ligamenta, nasumce formirajući spletove žilica nepravilnih oblika i usmjerenja koji pokazuju tipično granjanje u male kanaliće.^{33,36,37} Te krvne žilice, prema istome obrascu, prate senzorni i proprioceptivni živčani ogranci kojih najviše ima uz hvatišta ligamenta za kost. Valja naglasiti da epiligamentarni dio postupno prelazi u periost oko hvatišta ligamenta za kost. Unutar ligamenta prokrvljenost je znatno slabija, a žilice su ravnije i postavljene su uz kolagena vlakna usporedno s uzdužnom osi ligamenta pri čemu se vrlo rijetko susreću anastomoze.^{33,36,37} Te krvne žilice prate i živčani ogranci koji pokazuju također longitudinalno usmjerenje.

Inervaciju ligament dobiva od susjednih mišićnih, kožnih ili zglobnih živčanih spletova.^{1-4,30-37} Kao što smo istaknuli, u epiligamentarnom dijelu ligamenta živčani ogranci prate spletove krvnih žilica. Najveći broj tih živčanih vlakana ne ulazi u ligament već kao živčani završeci ostaju na površini.

Hvatište ili insercijsko mjesto jest naziv za područje prijanjanja mekotkivnih struktura za kost, a u tu skupinu uz ligament ubrajamo i tetivu i zglobnu čahuru.⁴ To je mjesto koje pomaže disperziji različitih modula elastičnosti tih struktura i kosti čime se izbjegava koncentracija vršnog opterećenja na jednom mjestu. Razlikujemo dva tipa ligamentarnog hvatišta,

izravni i neizravni.^{4,31,38,39} Izravni tip hvatišta jest onaj gdje se niti ligamenta izravno hvataju na kost. Taj se tip naziva još i vezivno-hrskavični (fibroartilaginozni) poradi postojanja dviju vrsta vezivne hrskavice. Morfološki gledano, izravni tip možemo podijeliti u četiri zone, a to su ligament, neovapnjela vezivna hrskavica (širine do 0,6 mm), ovapnjela vezivna hrskavica (širine do 0,4 mm) te kost. Između područja dviju vezivnih hrskavica je tanka nazubljena crta koja označava granicu ovapnjenja. Ta je granica bogata proteoglikanima, a kolagena vlakna bez prekida prolaze kroz granicu ovapnjenja u trabekularni dio kosti. Primjeri ovakvoga hvatišta su hvatište medijalnog kolateralnog ligamenta koljena za natkoljenu kost, te hvatište Ahilove tetive za petnu kost.^{4,38,39} Kod neizravnog hvatišta površne se niti ligamenta stapaju s periostom, dočim se središnja vlakna hvataju direktno za kost putem Sharpey-evih vlakana, ali pod oštrim kutem, tj. koso. Stoga se neizravno hvatište naziva još i periostalnim. Važno je istaknuti da vlakna koja prolaze kroz periost završavaju u trabekularnome dijelu kosti i ne ulaze u Haversove kanale. Takva hvatišta ligamenata možemo naći na mjestima gdje ligamenti premošćuju epifiznu ploču rasta i ona se produljuju sinkronizirano s koštanim rastom. Primjeri neizravnog hvatišta su hvatište medijalnog kolateralnog ligamenta koljena za goljenu kost, te hvatište tetive supraspinatusa za greben lopatične kosti.^{4,38,39}

1.3. Biomehaničke osobine ligamenta

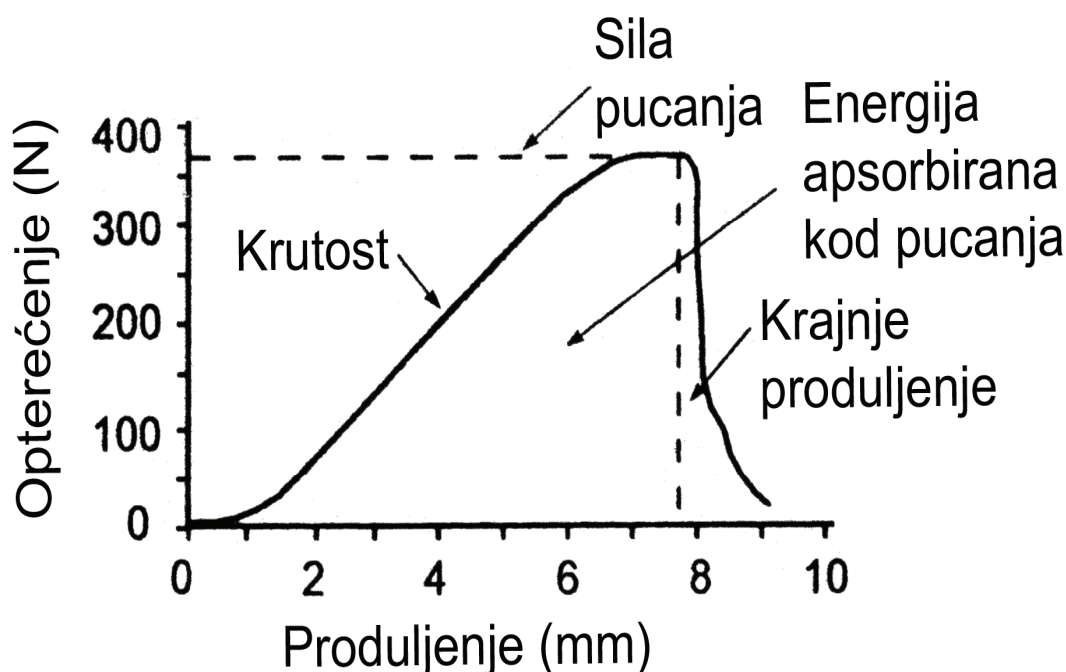
Jedna od osnovnih funkcija ligamenta jest da pruža otpor sili rastezanja i da na taj način održava kretanje zgloba u njegovim fiziološkim granicama. Jasno je da je vrlo teško čvrsto prihvatiti meko tkivo u stezaljke što je potrebno prilikom biomehaničkog ispitivanja, pa je to uz relativnu kratkoću ligamenta razlogom što se za testiranje rabi kompleks kost-ligament-kost kao funkcionalna jedinica.⁴⁰ S obzirom na strukturalne osobine tog kompleksa prilikom testiranja rastezljivosti dobiva se karakteristična krivulja odnosa opterećenja i produljenja.^{1-4,39,41,42} Naime, ta krivulja ima tri jasna segmenta i ponaša se znatno drugačije od gotovo linearnog odnosa elastičnih tijela (Slika 1.).

U prvome segmentu te krivulje uz povećanje deformacije dolazi do eksponencijalnog povećanja naprezanja, i stoga je taj dio krivulje s konkavitom prema gore (engl. toe region).^{1-4,39,41,42} Taj nelinearni odgovor najvjerojatnije je rezultat progresivnog izravnjanja, kao i istezanja pojedinih kolagenih vlakna (taj se proces naziva regrutiranje).⁴ Smatra se kako je unutar tog dijela krivulje fiziološki raspon istezanja pri normalnoj funkciji strukture. Drugi segment krivulje ima linearni odnos naprezanja i vlačne deformacije (produljenja) i odgovara reverzibilnom, elastičnom istezanju kolagenih vlakana.^{1-4,39,41,42} Naime, s povećanjem opterećenja povećava se i krutost tkiva pa je nagib krivulje stalan. Na taj način ligamenti onemogućuju prekomjerni pomak zglobnih tijela i time održavaju položaj i usmjerenje zgloba prilikom snažne mišićne kontrakcije. Treći segment odgovara opet nelinearnome dijelu krivulje, samo sada s konkavitom prema dolje.^{1-4,39,41,42} To je područje plastične deformacije i popuštanja strukture sve do točke pucanja. Strukturalne se osobine ligamenata prikazuju slijedećim parametrima: sila pucanja, krajnje produljenje, krutost te energija apsorbirana do trenutka pucanja.

Sila pucanja (engl. ultimate load) se izražava u njutnima (N), a ona jest najveće opterećenje koje je tijekom ispitivanja opaženo, ono opterećenje tik prije pucanja ligamenta.

Krajnje produljenje ili elongacija (engl. ultimate elongation) se izražava u milimetrima (mm), a pokazuje koliko se ligament može istegnuti od svoje normalne duljine prije započetog opterećenja do trenutka pucanja ligamenta. Krutost (engl. stiffness) se izražava u njutnima po milimetru (N/mm), a pokazuje odnos između opterećenja i produljenja mjerena ispod nagiba linearnog dijela krivulje.

Energija apsorbirana kod pucanja (engl. energy absorbed at failure) se izražava u N-mm, a označuje čitavo područje ispod dobivene krivulje.



Slika 1. Krivulja odnosa opterećenja i produljenja koja prikazuje strukturalne osobine ligamenta, a koja se dobiva prilikom testiranja rastezljivosti kada se na numeričkoj kidalici rasteže preparat kost-ligament-kost.

Mehaničke osobine ligamenata ovise o više čimbenika, o građi i strukturi osnovnih vlakana kolagena, o njihovom rasporedu unutar tkiva, o uzajamnome djelovanju kolagenih vlakana i osnovne tvari, kao i o sadržaju i rasporedu elastičnih vlakana u tkivu.^{1-4,39,41,42} Te osobine dakle

karakteriziraju ponašanje ligamentarnog tkiva i predstavljaju se krivuljom stresa i istezanja (Slika 2.).

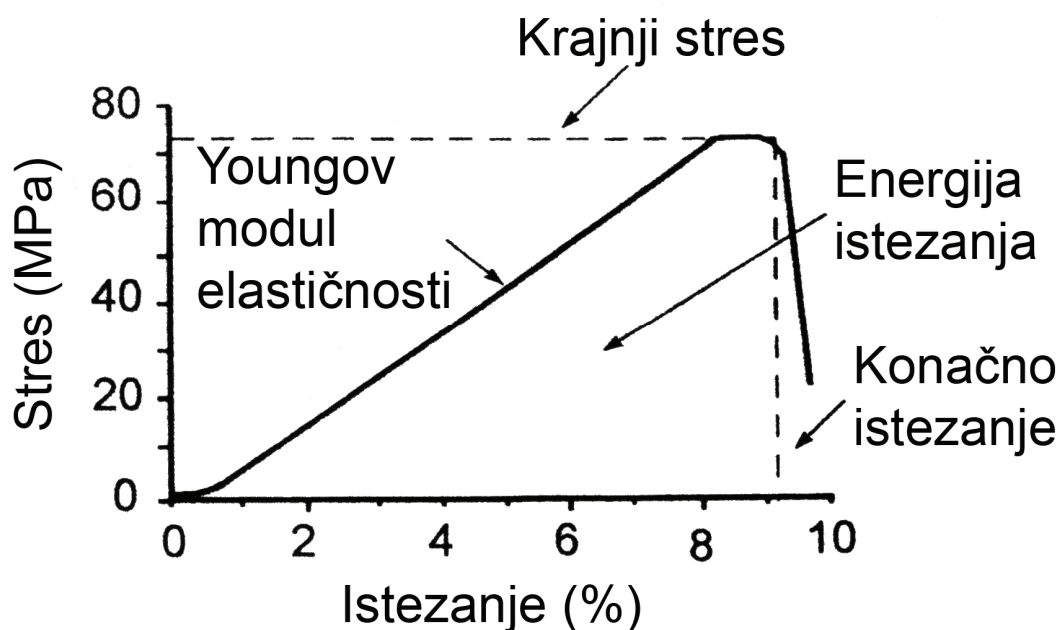
Istezanje (ϵ) se definira kao promjena duljine ligamenta prilikom opterećenja koja se dijeli s početnom, originalnom duljinom ligamenta. Pritom se rabi formula $\epsilon = (l - l_0) / l_0$; pri čemu je l_0 izmjerena duljina ligamenta u mm prije opterećenja, a l je duljina izmjerena nakon opterećenja u mm. Istezanje (ϵ) se izražava u postocima (%).⁴ Stres (σ) se definira kao opterećenje na jedinicu poprečnog presjeka ligamenta. Mjerna jedinica je njutn po kvadratnome milimetru (N/mm²), a izračunava se prema formuli $\sigma = F/A$; pri čemu je F sila, a A površina poprečnog presjeka ligamenta.⁴ Budući da se stres definira kao opterećenje na jedinicu poprečnog presjeka od osobite je važnosti točno izmjeriti poprečni presjek ligamenta. Dok su se isprva rabile gravimetrijske metode za mjerenje poprečnog presjeka ligamenta jer su se druge metode, primjerice mjerenje mehaničkim šestarima, pokazale vrlo netočnim, danas se za to koristi laserski mikrometar.⁴³ No, i ta metoda vrlo često može dovesti do većih pogrešaka poradi vrlo složene geometrije ligamenata. Dobivena krivulja stres-istezanje također je nelinearna i ima tri jasno odijeljena segmenta, kao i krivulja opterećenja-produljenja.⁴ Iz krivulje stres-istezanje mogu se izračunati neki parametri, a to su krajnji stres (vlačna čvrstoća), konačno istezanje, Youngov modul elastičnosti te energija istezanja.

Krajnji stres (engl. ultimate stress, ili ranije tensile strength) se izražava u njutnima po milimetru kvadratnome (N/mm²), a to jest maksimalni stres koji podnosi tkivo prije pucanja.

Konačno istezanje (engl. ultimate strain) se izražava u postocima (%), a to je veličina istezanja prilikom pucanja.

Youngov modul elastičnosti (engl. Young's modulus, ili ranije tangent modulus) izražava se u njutnima po milimetru kvadratnome (N/mm²), a to je odnos između stresa i istezanja koji se mjeri kao nagib linearnog dijela krivulje stres-istezanje.

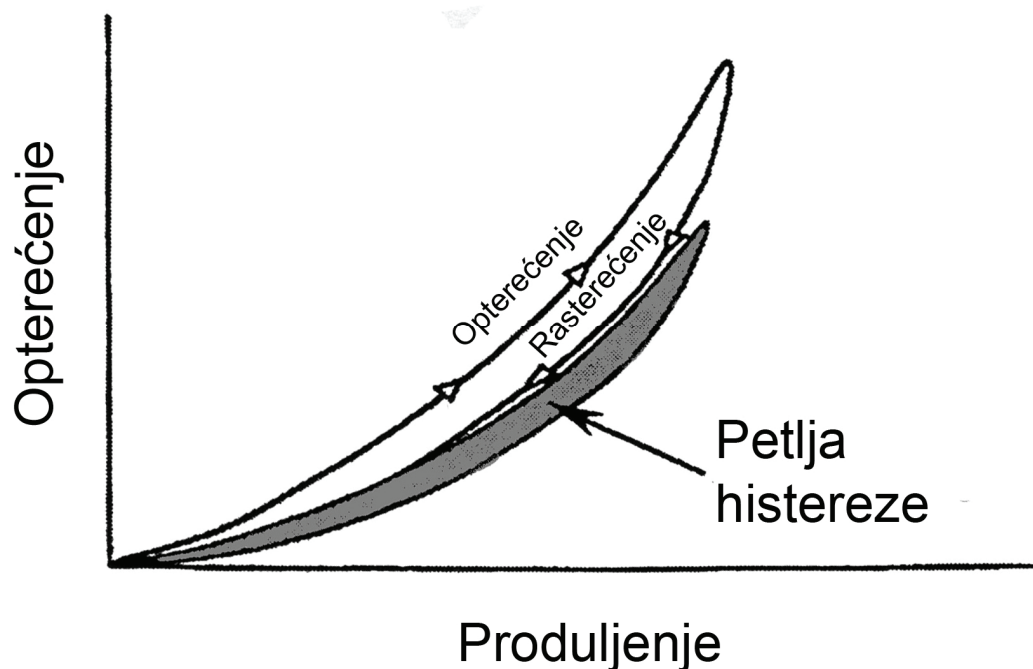
Energija istezanja (engl. strain energy density) se izražava u megapaskalima (MPa), a to je područje ispod krivulje stres-istezanje.



Slika 2. Krivulja stresa i istezanja koja prikazuje mehaničke osobine ligamenta.

Ligamenti također imaju i viskoelastične osobine koje su rezultat međusobnog djelovanja kolagena, molekula proteoglikana i vode s osnovnom tvari i elastinom.^{1,3,4,39,44} Naizmjenično opterećenje i rasterećenje ligamenta prikazano krivuljom odnosa opterećenje-produljenje pokazuje da krivulja rasterećenja nije identična krivulji opterećenja (Slika 3.). Naime, ona ide ispod krivulje opterećenja, pa je i površina ispod krivulje manja. Iz toga se jasno vidi da je energija utrošena u produljenje pri opterećenju veća nego energija oslobođena pri rasterećenju i povratu u prvobitne dimenzije. Osim toga, smjerovi tih opterećenja su različiti, pa čine tzv. petlju histereze (engl. hysteresis loop).^{1,3,4,39,44} To područje histereze prikazuje rasipanje energije. Valja istaći da se pri ponavljanoj cikličkoj opterećenju – rasterećenju prvih nekoliko ciklusa međusobno bitno razlikuju, a da kasnije postaju međusobno sve bliži dok se ne izjednače. Razlog tome se nalazi u drugome viskoelastičnome svojstvu ligamenta koji se naziva stres relaksacija (engl. stress relaxation) i koje je osnovni zaštitni mehanizam ligamenta da ne dođe

do puknuća uslijed zamora materijala.^{1,3,4,39,44} Osim te dvije viskoelastične osobine valja spomenuti i treću, tzv. efekt ježenja (engl. creep).^{1,3,4,39,44} Naime, ligament se produljuje kada je dulje vrijeme podvrgnut kontinuiranom opterećenju, no nakon prestanka opterećenja, te razdoblja odmora, on se vraća na svoju normalnu duljinu i vraća svu svoju krutost.



Slika 3. Naizmjenično opterećenje i rasterećenje ligamenta prikazano krivuljom odnosa opterećenje-produljenje pokazuje da krivulja rasterećenja nije identična krivulji opterećenja, a petlja histereze prikazuje područje rasipanja energije.

1.4. Cijeljenje ligamenta

Na staničnoj je razini biološki odgovor na puknuće ligamenta izrazito složen proces s jasno određenim slijedom biokemijskih i morfoloških promjena.^{3-10,41,45,46} Taj se proces može podijeliti na četiri stadija koja se međusobno preklapaju. Prvi stadij jest stadij krvarenja, jer nakon prekida krvnih žila dolazi do krvarenja i istjecanja krvi u pukotine nastale među rastrgnutim krajevima ligamenta.^{3-10,41,45,46} Stvara se krvni ugrušak koji sprečava daljnje krvarenje i služi kao privremen matriks za migrirajuće stanice. Osim toga, on otpušta i tzv. «pro-upalne» stanice koje oslobađaju različite citokine i faktore rasta, kao što su PDGF, TGF β i IGF I i IGF II. Tada započinje drugi stadij koji nazivamo upalnim.^{3-10,41,45,46} Neki od tih oslobođenih faktora su kemotaktični za druge stanice kao što su polimorfonuklearni leukociti (neutrofili) i monociti koji migriraju na mjesto ozljede i čiste nekrotični debris fagocitozom, a u suradnji s intrinzičkim stanicama (stanice endoligamenta i epiligamenta) oslobađaju drugu bateriju citokina i faktora rasta i tada započinje stvaranje granulacijskog tkiva umjesto krvnog ugruška što je praćeno i povećanom vaskularizacijom toga područja. Upravo to stvaranje granulacijskog tkiva uz neovaskularizaciju te migracija fibroblasta na mjesto ozljede i početak proliferacije fibroblasta vodi k trećem stadiju cijeljenja koji se naziva proliferacijskim.^{3-10,41,45,46} U tom stadiju fibroblasti sintetiziraju novu međustaničnu tvar, koja se sastoji u prvome redu od kolagena i glikozaminoglikana, pa se stvara rahlo vaskularno granulacijsko tkivo između rastrganih krajeva ligamenta. To je tkivo, koje se još i naziva ožiljnim (engl. scar tissue), isprva poprilično dezorganizirano s brojnim nedostacima.⁴⁷ Tako se primjerice uočava veći broj krvnih žila i masnih stanica no u tkivu zdravog ligamenta, a uz to je prisutna i znatno veća celularnost toga tkiva uz potpunu dezorganiziranost međustanične tvari i bez adekvatnog usmjerenja kolagenih vlakana. Način na koji će ligamentarno tkivo odgovoriti na cijeljenje (engl. healing response) reguliran je lokalnom sekrecijom faktora rasta koje izlučuju upalne stanice.^{3-10,41,45,46} Četvrti stadij nazivamo stadijem remodeliranja, a započinje približno šest ili više tjedana od ozljede kada je mjesto ozljede ispunjeno neorganiziranim

granulacijskim tkivom.^{3-10,41,45,46} To je vrlo spor proces, pa taj stadij cijeljenja može trajati mjesecima, ili čak godinama, a tijekom nje fibroblasti mijenjaju svoju primarnu funkciju sinteze međustanične tvari u njegovu stabilizaciju i reorganizaciju. Ovi procesi većinom ovise o sazrijevanju vlakana kolagena koji su odgovorni za obnavljanje krutosti i čvrstoće ligamenta. Valja istaknuti i da tijekom stadija remodeliranja dolazi i do smanjenja vaskularizacije i celularnosti ožiljnoga tkiva, a međustanična tvar postaje s vremenom sve više nalik normalnom ligamentarnom tkivu, no neke razlike u sastavu, izgledu i funkciji između ožiljnog tkiva i normalnog ligamentarnog tkiva ostaju trajno.^{3-10,41,45,46}

Dobro je poznata činjenica da svi ligamenti ne cijele do istog funkcionalnog stupnja. Na taj konačni rezultat utječu brojni čimbenici među kojima je jedan od najvažnijih lokalizacija ligamenta, tj. da li je riječ o ekstraartikularnom ligamentu (primjer LCM) koji ima veliku sklonost cijeljenju i time omogućava povrat funkcije tog ligamenta, ili je pak riječ o intraartikularnom ligamentu (primjer prednja križna sveza - ACL) koji ima malu sklonost cijeljenju i cijeli ožiljnim tkivom prijanjajući uz stražnju križnu svezu ali je u konačnici to cijeljenje potpuno funkcionalno nedjelotvorno.^{4,41} Od drugih do danas poznatih i utvrđenih čimbenika valja istaknuti intrinzičke čimbenike – dob, spol, hormonalni status, nasljeđe; mehaničko okruženje – stabilnost vs. nestabilnost zgloba kojega je taj ligament dio; stanje samog ligamentarnog tkiva – prethodne ozljede; te eventualna prisutnost komorbiditeta – dijabetes melitus.^{4,41}

Unatoč velikoj sklonosti cijeljenju, zacijeljeni LCM ima značajno različit biološki sastav, biomehaničke osobine, kao i organizaciju međustanične tvari čak dvije godine nakon ozljede.¹⁻⁴ Do danas su promjene u količini kolagena, njegovim poprečnim vezama i organizaciji prepoznati kao uzroci što zacijeljeni LCM ima manje vrijedne biomehaničke osobine od zdravog LCM-a, dok je manje poznat učinak proteoglikana i elastina.^{3,4,9,39} U ranoj etapi cijeljenja opažen je porast količine kolagena tipa III i tipa V, a u to vrijeme nastaje i tzv. «turnover» kolagena jer se mijenja odnos tipa I naspram tipovima III, V i VI.^{48,49} Nakon šest tjedana cijeljenja ukupna količina kolagena

je niža no u zdravih ligamenata, kao i razina poprečnih intramolekularnih i intermolekularnih veza koja ostaje tako snižena i godinu dana nakon ozljede. Osim tih razlika valja istaknuti još neke koje perzistiraju i koje su odgovorne za lošija fizička obilježja zacijeljenoga LCM-a, a to su promijenjeni sastavni dijelovi međustanične tvari, povećana vaskularnost, povećana celularnost, nepravilna inervacija te loše usmjerenje kolagenih vlakana.^{3,4,9,39} Osobito je važno još naglasiti da je promjer kolagenog vlakna zacijeljenog LCM-a manji u odnosu na zdrav LCM i veličine je između 60 i 70 nm, a nema niti karakterističnu bimodalnu (dvofaznu) raspodjelu veličine kolagenih vlakana zdravog LCM-a.⁵⁰ Istraživanja su pokazala da LCM ostaje takav tijekom dvije godine nakon ozljede. Iako mehaničke osobine zacijeljenog LCM ostaju manje vrijedne u odnosu na one zdravog LCM-a, tako je primjerice istraživanje Woo-a i suradnika pokazalo da to zacijeljeno tkivo ima između 50 i 70% čvrstoće zdravog LCM-a, ipak kompenzatorno povećanje volumena i poprečnog presjeka zacijeljenog ligamenta omogućuje funkciju vrlo sličnu zdravom LCM-u.^{3,4,7,39,41} Iz svega navedenog može se zaključiti da je cijeljenje ligamenta dinamičan proces kojemu se nemože točno odrediti završetak te da je rezultat cijeljenja reparacijsko tkivo na mjestu ozljede a ne regeneracija ligamenta.

Budući da se cijeljenjem ne normaliziraju biomehaničke i biokemijske osobine medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM-a), a nedostatak se nadoknađuje povećanjem količine ožiljnoga tkiva, danas su predmetom istraživanja načini/tvari koji mogu poboljšati kvalitetu ožiljnoga tkiva, ili pak ubrzati proces cijeljenja, kao što su faktori rasta, stanična terapija i tehnologija prijenosa gena (genska terapija).^{1,3-10,39,41,45,46,51-54} Ranija su istraživanja koristila različite metode i lijekove u cilju poboljšanja cijeljenja ligamenta. U tablici 1. prikazani su rezultati dobiveni na eksperimentalnim životinjama (štakor ili kunić) nakon kirurški načinjene ozljede LCM-a s obzirom na korištene metode liječenja: kirurško liječenje i/ili imobilizacija, primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova, hiperbarična oksigenacija te primjena ultrazvuka i lasera.⁵⁵⁻⁶⁹

Tablica 1. *Prikaz najznačajnijih rezultata dobivenih u istraživanjima u kojima je procijenjivano cijeljenje LCM-a,⁵⁵⁻⁶⁹ a u kojima su korištene različite metode liječenja (kirurško liječenje i/ili imobilizacija, primjena nesteroidnih lijekova, hiperbarična oksigenacija te primjena ultrazvuka i lasera) nakon njegovog kirurškog presijecanja.*

Metoda liječenja (eksperimentalne životinje)	Autor, godina istraživanja	Rezultat
<i>Imobilizacija / operacija</i>		
imobilizacija (kunići)	Amiel, 1983. ⁵⁵	povećana degradacija kolagena
imobilizacija (štakori)	Binkley, 1986. ⁵⁶	povećana degradacija kolagena
šivanje i/ili kontrolirano gibanje (štakori)	Hart, 1987. ⁵⁷	kontrolirano gibanje poboljšava cijeljenje
kontrolirano gibanje ili šivanje uz imobilizaciju (štakori)	Inoue, 1990. ⁵⁸	kontrolirano rano gibanje poboljšava biomehaničke parametre
šivanje ili bez liječenja (štakori)	Weiss, 1991. ⁵⁹	šivanje ne unapređuje cijeljenje
<i>Nesteroidni protuupalni lijekovi</i>		
piroksikam (štakori)	Dahners, 1988. ⁶⁰	povećana vlačna čvrstoća u usporedbi s kontrolnom skupinom
ibuprofen (kunići)	Moorman, 1991. ⁶¹	bez razlike u usporedbi s kontrolnom skupinom
celecoxib (štakori)	Elder, 2001. ⁶²	32% manja sila pucanja u usporedbi s kontrolnom skupinom
piroksikam, naproksen, rofecoxib, acetaminofen, opijati (štakori)	Hanson, 2005. ⁶³	samo skupina koja je dobivala piroksikam ima statistički značajno veću silu pucanja
<i>Hiperbarična oksigenacija</i>		
hiperbarična oksigenacija (štakori)	Horn, 1999. ⁶⁴	statistički značajno povećava silu pucanja nakon 4 tjedna
hiperbarična oksigenacija (štakori)	Mashitori, 2004. ⁶⁵	promiče oblikovanje ožiljnog tkiva i povećava ekspresiju prokolagena tip I
<i>Primjena energije</i>		
pulsni UZV niskog intenziteta (štakori)	Takakura, 2002. ⁶⁶	statistički značajno povećava silu pucanja nakon 12 dana
Ga-Al-As laser (štakori)	Ng, 2004. ⁶⁷	povećana sila pucanja i krutost u onih koje su višekratno tretirane laserom
He-Ne laser (štakori)	Bayat, 2005. ⁶⁸	povećana sila pucanja u skupini kojoj je laser davan u dozi od 1,2 J/cm ²
pulsni UZV niskog intenziteta (štakori)	Warden, 2006. ⁶⁹	ubrzava ali ne poboljšava cijeljenje ligamenta

Faktori rasta su mali polipeptidi koje sintetiziraju različite stanice imunog i koštanozglobnog sustava, tako primjerice trombociti otpuštaju PDGF, TGF- β i EGF, dok makrofagi stvaraju bFGF, TGF- α , TGF- β i PDGF.^{3,4,6,8,10} Vežući se na specifične receptore na površini stanica faktori rasta aktiviraju putove za složeno intracelularno prenošenje signala koji pak stimuliraju stvaranje proteina koji su potrebni za cijeljenje rana. Faktori rasta imaju različite učinke na različitim ciljnim stanicama i uključeni su u mnoštvo interakcija tijekom različitih etapa cijeljenja, a pokazano je da te interakcije imaju veliki utjecaj kako na ekspresiju i aktivnost pojedinoga faktora rasta tako i na ekspresiju i aktivnost drugih faktora rasta.^{3,4,6,8,10} Istraživanja su pokazala da oni imaju sposobnost da utječu na proliferaciju i migraciju stanica, sintezu i produkciju matriksa, kao i na sekreciju dodatnih faktora rasta.^{3,4,6,8,10} Budući da je tijekom procesa cijeljenja dokazana ekspresija različitih faktora rasta i njihovih receptora od velike je važnosti razumijeti njihovu ulogu.

Tako su in vitro istraživanja pokazala da transformirajući faktor rasta beta (engl. «transforming growth factor- β » - TGF- β) potiče stvaranje matriksa te da ima kemotaktični i proliferativni učinak na upalne stanice i fibroblaste.^{6,70-72} Stoga, iako je aktivan u gotovo svim stadijima cijeljenja, TGF- β ima vrlo važnu ulogu u početku procesa cijeljenja. Faktor rasta sličan inzulinu (engl. «insulin-like growth factor-I» – IGF-I) važan je u svim etapama cijeljenja, osobito tijekom upalne i proliferativne etape, a dokazano je da potiče stvaranje matriksa te da promiče proliferaciju i migraciju stanica.^{6,73} In vitro istraživanje uloge faktora rasta iz trombocita (engl. «platelet-derived growth factor-BB» - PDGF-BB) u cijeljenju pokazala su njegovu značajnu ulogu u početku cijeljenja kada inducira sintezu i regulira ekspresiju drugih faktora rasta i na kraju procesa cijeljenja u stadiju remodeliranja.^{6,74,75} Bazični faktor rasta fibroblasta (engl. «basic fibroblast growth factor» - bFGF), kao i PDGF-BB, pokazuje značajan poticaj za migraciju i proliferaciju fibroblasta.⁶ Osim toga, on je i vrlo snažan stimulator angiogeneze pa ima važnu funkciju tijekom stadija remodeliranja. Epidermalni faktor rasta (engl. «epidermal growth factor» - EGF) osim što ima kemotaktični i proliferativni učinak na fibroblaste značajno potiče i sintezu glikozaminoglikana i nekolagenih

proteina.⁶ Iako ima ulogu i u migraciji i proliferaciji stanica tijekom faze cijeljenja, faktor rasta endotela krvnih žila (engl. «vascular endothelial growth factor» - VEGF) je najaktivniji tijekom proliferacijske i remodelirajuće etape, jer je vrlo snažan stimulator angiogeneze.⁶

In vitro je istraživao i učinak tih faktora rasta na stanice LCM-a i uspoređivan je s učinkom istih na stanice ACL-a. Tako je pronađeno da PDGF-BB, EGF i bFGF značajno povećavaju proliferaciju fibroblasta, no i da je taj porast u stanicama LCM-a i do dva puta veći nego u stanicama ACL-a.⁷² Osim toga, pokazano je da je učinak tih faktora rasta ovisan o dobi, pa tako skeletna zrelost smanjuje mogućnost faktora rasta da potiču proliferaciju fibroblasta.⁷² Valja istaknuti kako je dokazano da je učinak TGF- β na proliferaciju fibroblasta ovisan i o dozi primjenjenog faktora, tako primjerice manje doze djeluju sinergistički s PDGF-BB, dok veće doze inhibiraju taj poticajni učinak.⁷¹ Već je istaknuto kako faktori rasta imaju ulogu i u sintezi kolagenih i nekolagenih proteina, pa je tako TGF- β 1 za 160% povećao sintezu kolagena i u stanicama LCM-a i ACL-a u usporedbi s kontrolnom skupinom, a najveći postotak tog povećanja odnosio se na kolagen tip I.⁷¹

In vivo istraživanje Letsona i Dahnersa iz 1994. godine u kojemu su uspoređivali učinak PDGF, FGF i IGF-I na cijeljenje LCM-a u štakora pokazalo je da jedino PDGF primjenjen samostalno poboljšava vlačnu čvrstoću i krutost ligamenta.⁷⁶ Valja istaknuti i da je primjena PDGF-a unutar 24 sata od kirurški izazvane ozljede dala bolje rezultate od kasnije primjene tog faktora rasta.⁷⁶ Visoke doze PDGF-BB primjenjene s fibrinskim ljepilom imale su pozitivan učinak na cijeljenje LCM-a kunića uzrokujući statistički značajan porast strukturalnih osobina testiranog kompleksa kost-ligament-kost.⁷⁷ No, u tome istraživanju nisu nađene nikakve očite histološke razlike između skupine koja je dobivala PDGF-BB i kontrolne skupine. Osim toga, valja istaknuti da je dodatna primjena TGF- β 1 bila bez ikakvog učinka. To je potvrdilo i drugo istraživanje Hildebranda i sur. iz 2002. godine u kojem je korišten TGF- β 1.⁷⁸ Istraživanje je pokazalo kako taj faktor rasta primjenjen samostalno nema nikakvog utjecaja na zacijeljivanje LCM-a u kunića. Spindler i sur. su u svom istraživanju 2002. godine pokazali da kontinuirana primjena TGF- β 2 povećava udio kolagena tip I u LCM-u kunića, no da su

dobiveni biomehanički parametri lošiji u usporedbi s kontrolnom skupinom.⁷⁹ U nastavku tog istraživanja najbolji rezultati dobiveni su u skupini kunića koja je dobivala najmanju dozu TGF- β 2 od 0,1 μ g umješanu u fibrinski ugrušak i primjenjenu lokalno odmah nakon kirurški načinjene ozljede LCM-a.⁸⁰ Ta je skupina ispitivanih životinja imala statistički značajno povećanje krutosti ožiljka LCM-a. Osim toga, autori su izvijestili da je dodavanje PDGF-BB uz primjenjeni TGF- β 2 bilo bez ikakvog učinka na ispitivane biomehaničke parametre.^{79,80}

Istraživanja na modelima drugih životinja, s različitim dozama i metodama i vremenom primjene faktora rasta, također su pokazala kontradiktorne rezultate. Sveukupno, rezultati tih istraživanja pokazuju varijacije koje mogu biti specifične kako za vrstu i dozu primjenjenoga faktora rasta, tako i za primjenu u tijeku liječenja, što sve ukazuje na složenu prirodu procesa cijeljenja ligamenata.^{3,4,6,8,10} Važno je naglasiti da osnovno ograničenje u primjeni faktora rasta, bez obzira na njihovu djelotvornost in vitro, proističe iz njihove nestabilnosti in vivo, tj. njihove vrlo brze enzimske razgradnje u organizmu nakon primjene. Stoga se za održanje učinkovitosti faktora rasta tijekom liječenja oni moraju opetovano primjenjivati, ili pak primjenjivati vrlo blizu mjesta ozljede.^{3,4,6,8,10} Tako se primjerice uspjelo izravnim injiciranjem faktora rasta ili pak kirurškim postavljanjem na mjesto ozljede dobiti unapređivanje cijeljenja, no taj trenutni porast jednog «signala cijeljenja» vrlo brzo je oslabio i imao je samo ograničeni učinak na ishod cijeljenja. Zbog toga se naglasak stavlja na iznalaženje nosača koji mogu dopremiti faktore rasta do ciljnog mjesta u adekvatnome vremenu i djelotvornoj dozi.^{3,4,6,8,10} No, to otvara cijeli niz vrlo teško rješivih metodoloških i praktičnih pitanja. Naime, nužnost primjene kompleksa (peptid +nosač) uz veliku različitost primjenjenih nosača ostavlja nedefiniranu aktivnu supstanciju (peptid, nosač, ili pak peptid+nosač), i na taj način onemogućuje točnu procjenu mehanizma djelovanja.

Stanična terapija je metoda koja također može pomoći pri cijeljenju LCM-a. Osnovni princip jest implantacija genetski manipuliranih stanica koje mogu poboljšati cijeljenje ligamenta budući da se inkorporiraju u ožiljno tkivo.^{3,4,7,41,46} Brojna istraživanja usmjerena su na primjenu mezenhimalnih

matičnih stanica ili stanica koštane srži na mjesto cijeljenja.^{81,82} In vitro, kao i in vivo istraživanja, pokazala su da aplicirane mezenhimalne matične stanice imaju sposobnost diferencijacije u različite vrste stanica koje sudjeluju u svim stadijima cijeljenja ligamenta. U svom istraživanju, Watanabe i sur.⁸³, transplantirali su stanice koštane srži, među kojima su bile i mezenhimalne matične stanice, u prostor oko presječenog LCM-a štakora. Već nakon 7 dana davateljeve su se stanice mogle identificirati u središnjem dijelu ligamenta što upućuje da transplantirane stanice imaju i sposobnost migracije. Druga mogućnost stanične terapije jest primjena fibroblasta, mioblasta i stanica koštane srži kao biološkog nosača.⁸³⁻⁸⁶ Tim stanicama se in vitro induciraju geni, koji se očituju in vivo nakon njihove transplantacije u ligament. Stoga stanična terapija može predstavljati alternativni pristup poboljšanju cijeljenja ligamenta uz veliku prednost duljeg održavanja učinka.

Genskom se terapijom unosi strana nukleinska kiselina u stanicu s ciljem da promjeni endogenu sintezu proteina ili pak da indicira ekspresiju terapijskih proteina.⁵¹⁻⁵⁴ Hildebrand i sur.⁸⁵ su dokazali in vivo prisustvo lacZ markera gena u LCM i LCA eksperimentalnih životinja i tri tjedna nakon injiciranja. U tom su istraživanju mioblasti i fibroblasti ligamenta eksperimentalnih životinja bili prenešeni indirektnom metodom prijenosa gena retrovirusnim vektorom. I istraživanja koja su se koristila metodom direktnoga prijenosa gena pomoću HVJ-liposoma virusa i adenovirusnih vektora pokazala su in vivo učinak na ciljno tkivo.⁸⁷⁻⁸⁹ Tako su primjerice Nakamura i sur.⁸⁸ koristeći se direktnom metodom prijenosa gena prenijeli PDGF u ozlijeđeni patelarni ligament štakora i izvijestili o povećanoj sintezi kolagena i angiogenezi četiri tjedna po injiciranju. Osim toga, dobili su i pozitivan učinak na promjer i distribuciju kolagenih vlakana, kao i statistički značajno ($p < 0,05$) poboljšanje biomehaničkih osobina ligamenta. No, svakako valja istaknuti i neke uočene nedostatke genske terapije.⁵¹⁻⁵⁴ U prvome redu to je gubitak ili smanjenje ekspresije transferiranoga gena nekoliko tjedana nakon aplikacije što je osobito uočeno kod adenovirusnih vektora. Ipak, nesigurnost čini najveći problem pri primjeni genske terapije, jer s obzirom na nepredvidivost integracije virusnih vektora u genom ciljnoga tkiva postoji rizik od neželjenih učinaka. Abnormalna regulacija staničnog

rasta, toksičnost poradi kronične prekomjerne ekspresije nekih faktora rasta, mogućnost razvitka bilo kakvoga maligniteta pa sve do najteže moguće neželjene posljedice – mutageneze, razlozi su potrebe daljnjeg istraživanja i povećanja sigurnosti primjene genske terapije.⁵¹⁻⁵⁴

1.5. Pentadekapeptid BPC 157 i cijeljenje

Pentadekapeptid BPC 157 je dobiven sintezom (Patent Sikirić P i sur, EP0 572688) i sastoji se od 15 aminokiselina (Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val), molekularne težine 40 000 D. Prednosti pentadekapeptida BPC 157 prema drugim peptidima očituju se u tome što je stabilan i u uvjetima koji inače dovode do brze razgradnje peptida, te što se može redovito primjenjivati bez nosača i što je netoksičan.^{22-29,90-96} Naime, pentadekapeptid BPC 157 nije se razgradio niti nakon 24 sata tijekom kojih je bio inkubiran u želučanome soku za razliku od drugih peptida, primjerice h-EGF i h-TGH koji su se raspali već nakon petnaestak minuta inkubacije u želučanome soku.⁹⁷ Njegova interakcija s ključnim homeostatskim sistemima u organizmu poput primjerice NO (dušičnog monoksida), inhibicijskim sustavom perifernih osjetilnih neurona čiji neurotransmiter nije ni acetilkolin ni noradrenalin, kao i s centralnim sustavima dopaminskih i GABA neurona gdje umanjuje smetnje vezane za te sustave uz odsutnost toksičnosti (negativan test ograničenja) omogućuje mu da ostvaruje korisni učinak na različitim tkivima i organima.^{98,99}

Inicijalna su istraživanja pokazala su da primjena pentadekapeptida BPC 157 pomaže u cijeljenju dubokih kožnih opeklin a te posljedične stresne želučane lezije.^{22,24,25,27,100-105} Ukazano je da i lokalna i sistemna primjena dovode do ubrzanog cijeljenja tih lezija.^{24,27} Od osobite je važnosti ovdje naglasiti i sposobnost blokiranja negativnih učinaka sistemne primjene kortikosteroida na cijeljenje opeklinske kožne rane lokalnom primjenom pentadekapeptida BPC 157.²⁵ Jasno su pokazani i njegovi učinci na strukturu granulacijskog tkiva prilikom cijeljenja rane. Poznato je da granulacijsko tkivo, koje se sastoji od fibroblasta koji stvaraju kolagen, kolagenih vlakana te novostvorenih krvnih žila čini bazičnu strukturu u procesu cijeljenja. Pozitivan se učinak pentadekapeptida BPC 157 u prvome redu pripisuje snažnom angiogenom djelovanju.^{106,107} Naime, poznato je da je stvaranje novih krvnih žila u ranom razdoblju cijeljenja od najveće važnosti za adekvatnu dopremu kisika i hranidbenih tvari na mjesto oštećenja. Osim toga, valja istaći kako je

uočeno da njegova primjena dovodi i do kasnije, obilnije produkcije retikulina i kolagena koji daju rani njezin konačan oblik i čvrstoću.

Uz već spomenuti angiogeni učinak valja istaći i antiinflamatorni učinak te tvari. 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) u području ozljede.^{22,108} Na taj način dolazi do značajno manje eksudacije polimorfonukleara (PMN), ali veće eksudacije mononukleara u područje ozljede. Poznato je da polimorfonukleari izlučuju medijatore koji djeluju kao kolagenaze čime se razgrađuje okolni neozlijeđeni kolagen i odgađa se sinteza novog kolagena, dok mononukleari imaju značajnu fagocitnu sposobnost. Pentadekapeptid BPC 157 pokazao je i sposobnost poticanja sinteze dušik oksida (NO) blokiranjem N-nitro-L-arginin metil-estera (L-NAME) inhibitora enzima NO sintaze (NOS) što djeluje stimulativno na proces cijeljenja, i to u ranom razdoblju svojim snažnim vazodilatacijskim učinkom, dok kasnije aktivacija NO sustava potiče i sintezu kolagena.^{98,99} Pored svega navedenog valja svakako naglasiti i da primjena pentadekapeptida BPC 157 ne izaziva osifikaciju i metaplaziju okolnih tkiva kao što je uočeno pri primjeni nekih faktora rasta.⁶

Istraživan je i učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje prijeloma kostiju pri čemu je korišten model pseudartroze radijusa u kunića.²³ U tome je radu kombinacijom radiološke procjene, mikrofotodenzitometrije i kvantitativne histomorfometrije, jasno dokazano da 6 tjedana po intramuskularnoj i lokalnoj primjeni pentadekapeptida BPC 157 dolazi do značajnog ubrzanja premoštenja segmentalnog koštanog defekta radijusa u kunića u usporedbi sa skupinama kunića koje su liječene uobičajenim postupcima, kao što su primjena autolognog presađka ili primjena koštane srži.

Vodeći se za tim korisnim učincima primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje u drugim tkivima provedeno je istraživanje njegova utjecaja na cijeljenje prerezane Ahilove tetive u štakora.²⁶ Naime, dobro je poznato da Ahilova tetiva kao hipocelularno, hipovaskularno i hiponeuralno tkivo vrlo slabo i dugotrajno cijeli te da je u takvom tkivu obično znatno smanjena

terapijska djelotvornost bilo kojeg primjenjivanog agensa. Međutim, rezultati istraživanja pokazali su da pentadekapeptid BPC 157 primjenjen sistemski (intraperitonealno), i to u dozi od 10 µg/kg i 10 ng/kg tjelesne težine, posjeduje snažan i koristan učinak na cijeljenje prerezane tetive. Naime, biomehanički parametri jasno pokazuju povećanu čvrstoću i krutost tetive u tako tretiranih životinja, a histološka analiza prerezanih tetiva pokazala je veću eksudaciju mononukleara i manju eksudaciju polimorfonukleara, statistički značajno povećan broj fibroblasta sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana te statistički značajno povećanu količinu kolagena desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana.

Nakon što je utvrđen jasan poticaj cijeljenja pentadekapeptidom BPC 157 u spomenutim modelima istovrsnog tkiva - transekcije tetive i segmentnog defekta kosti, provedeno je i istraživanje njegovog utjecaja na cijeljenje tetivno-koštanog hvatišta Ahilove tetive pri čemu nije korišten niti jedan oblik mehaničke fiksacije (primjerice kirurška rekonstrukcija u koštanom tunelu ili pak fiksacija šavima bataljka Ahilove tetive za petnu kost).²⁸ Rezultati toga istraživanja pokazali su da pentadekapeptid BPC 157 pozitivno utječe na cijeljenje tetivno-koštanoga prijelaza ako se primjenjuje sistemski (intraperitonealno) u dozama od 10 µg/kg i 10 ng/kg tjelesne težine. Skupine tako tretiranih životinja pokazale su brži funkcionalni oporavak poglavito u najranijem razdoblju prije uspostave kontinuiteta tkiva (prva četiri dana cijeljenja). Vrijednosti biomehaničkih parametara (sila pucanja, krutost te modul elastičnosti) statistički su značajno bolje u odnosu na ostale testirane skupine. Histološka analiza verificirala je formiranje direktnog tetivno-koštanoga spoja bez okoštavanja okolnog vezivnog tkiva, dočim je imunohistokemijska analiza pokazala značajan porast gustoće kolagenih vlakana tipa I za koje se zna da su glavni nositelji čvrstoće područja direktnog tetivno-koštanoga hvatišta.

Istražen je i utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje potpune transekcije mišića kvadricepsa u štakora.²⁹ Rezultati ovog istraživanja pokazali su poboljšanja i u biomehaničkim parametrima, funkcionalnom ishodu, kao i histološkim te imunohistokemijskim pokazateljima u skupinama koje su tretirane sistemskom (intraperitonealnom) primjenom

pentadekapeptida BPC 157 u dozama od 10 µg/kg, 10 ng/kg i 10 pg/kg tjelesne težine u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je dobivala fiziološku otopinu.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja jest da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški načinjene ozljede medijalnog kolateralnog ligamenta koljena u štakora.

Glavni cilj ovog rada jest analizirati učinke pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje kirurški načinjene ozljede LCM-a u štakora, i to na razini kliničko-funkcionalnog ishoda, potom na razini morfoloških promjena (analiza makroskopskih i histoloških preparata), kao i procjenom biomehaničkih svojstava. Osim toga, specifično će se tražiti odgovor na pitanja:

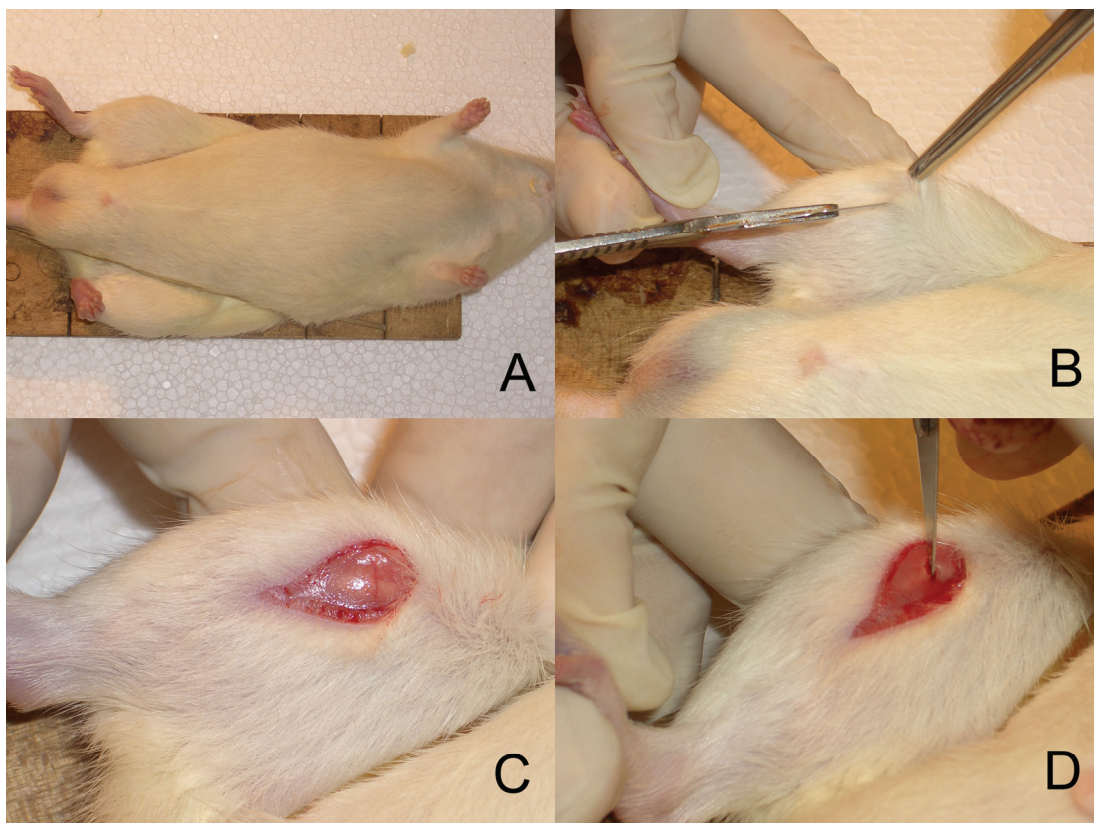
- a) da li na razini morfološke analize primjena pentadekapeptida BPC 157 dovodi do promjene dinamike cijeljenja te u konačnici do regeneracije umjesto reparacije;
- b) da li primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje kontrakturu zgloba nakon kirurškog zahvata;
- c) da li postoje razlike u konačnome ishodu liječenja s obzirom na način primjene pentadekapeptida BPC 157?

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje i kirurški zahvat

Za ovo su istraživanje korišteni Albino Wistar štakori muškoga spola tjelesne težine oko 400 g iz uzgojne stanice Zavoda za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje se provodilo pod laboratorijskim uvjetima i pravilima Zavoda, a u skladu s dobrom laboratorijskom praksom. Eksperimentalne životinje su do pokusa boravile na ujednačenoj sobnoj temperaturi, u uvjetima prirodnih ciklusa svjetla i mraka, uz slobodan pristup paletiranoj hrani i vodi, a njihova aktivnost bila je ad libitum. Životinje su bile smještene po tri u standardnim kavezima. Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/99), a odobreno je od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur. broj: 04-76/2006-503).

Za postizanje ligamentarne ozljede u štakora upotrebljen je model koji su opisali Tipton i sur.¹⁰⁹ 1967 godine, a koji su kasnije koristili i drugi istraživači ispitujući cijeljenje medijalnog kolateralnog ligamenta koljena(LCM-a) u štakora.^{57,60,62-64,67,69,74,110-116} Eksperimentalne životinje su anestetizirane intraperitonealnom primjenom ketamina HCl u dozi od 20 mg/kg tjelesne težine – (Ketantest, Parke-Davis GmbH, Berlin, Njemačka) i diazepama u dozi od 6 mg/kg tjelesne težine – (Normabel, Belupo, Ludbreg, Hrvatska). Anesteziranu eksperimentalnu životinju potom se postavljalo na operacijski stolić u položaj na leđa, fiksirajući ju pritom elastičnim gumicama. Operirana je samo stražnja desna noga eksperimentalne životinje korištenjem maksimalno moguće aseptične tehnike. Uzdužnom incizijom, u dužini od oko 2 cm s medijalne strane koljena, kroz kožu i potkožno tkivo pristupa se na dobro vidljiv medijalni kolateralni ligament štakora. Potom se sterilnim skalpelom (oštrica broj 11) poprečno presječe medijalni kolateralni ligament (LCM) odmah ispod zglobove pukotine. Nakon toga se uz pomoć kirurške lupe i malog kirurškog peana provjerava da li je ligament u potpunosti poprečno presječen i ako je bio takav se i ostavljao. Koža i potkožno tkivo šivani su u jednom sloju neresorptivnim kirurškim koncem 3-0



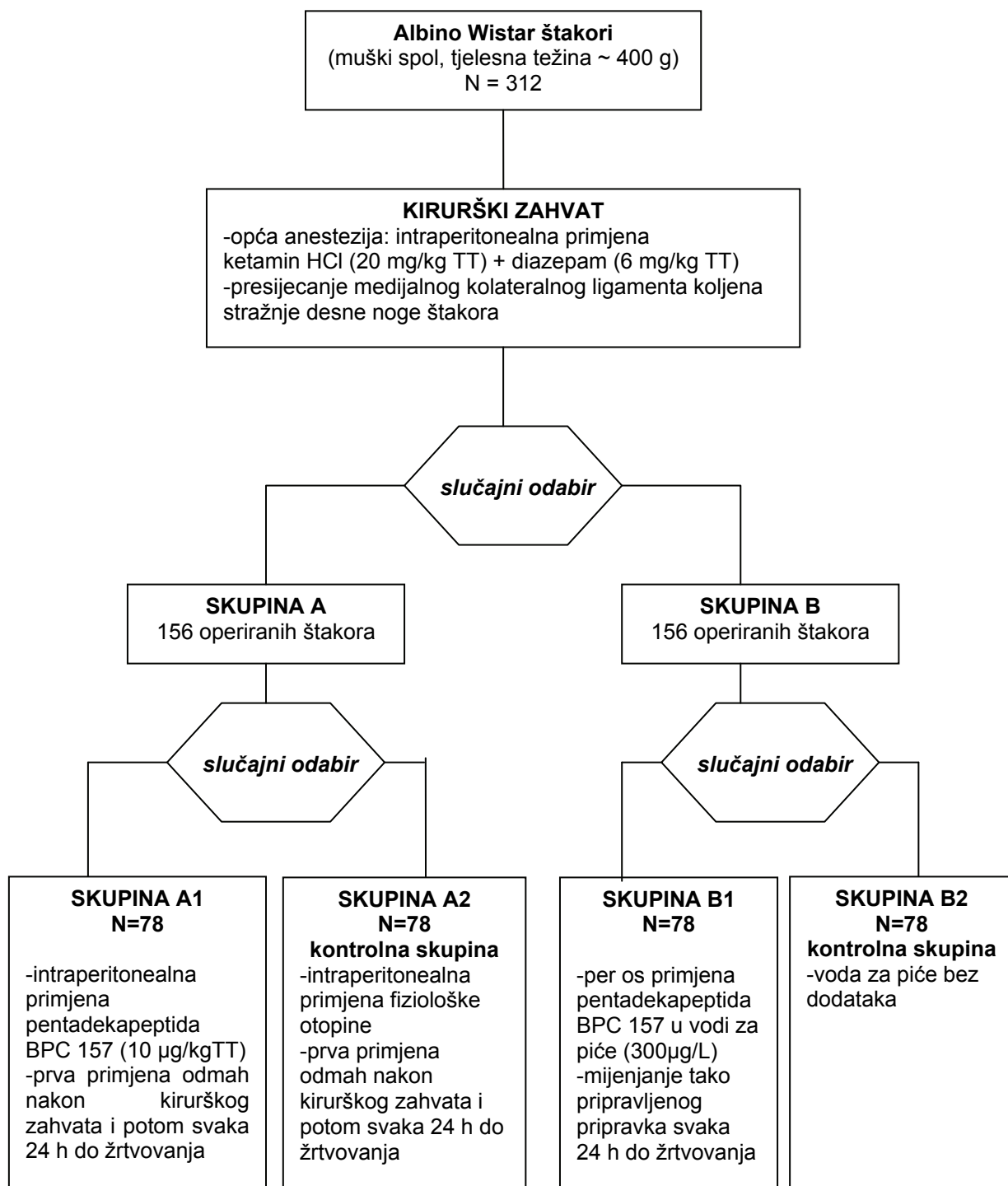
Slika 4. Slikovni prikaz izvođenja kirurškog zahvata za postizanje ligamentarne ozljede u štakora kojeg su prvi opisali Tipton i sur.¹⁰⁹ A) Nakon anestezije intraperitonealnom primjenom ketamina HCl u dozi od 20 mg/kg TT i diazepama u dozi od 6 mg/kg TT eksperimentalnu se životinju postavljalo na operacijski stolić u položaj na leđa. B) Na medijalni kolateralni ligament (LCM) pristupano je uzdužnom incizijom s medijalne strane koljena. Operirana je samo stražnja desna noga eksperimentalne životinje. C) Izgled operacijskog polja s jasnim prikazom LCM-a nakon presijecanja kože i potkožnoga tkiva. D) Poprečno presijecanje LCM-a oštricom broj 11 odmah ispod razine zglobne pukotine. Sve su fotografije snimljene pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.

(Ethicon Inc., Johnson and Johnson, Somerville, SAD) (Slika 4.). Odmah po završetku kirurškog zahvata slijedila je i prva primjena sredstva, a nakon toga su se eksperimentalne životinje vraćale u standardne kaveze, gdje su ponovno bile smještene po tri, i to tako da su u kavezu mogle biti samo životinje iz iste skupine. Životinje su i nadalje bile smještene na ujednačenoj sobnoj temperaturi, u uvjetima prirodnih svjetlo-mrak ciklusa, uz slobodan pristup hrani i vodi za piće, a njihova je aktivnost i nadalje bila ad libitum.

3.2. Primjenjeno sredstvo i način primjene

Kao ispitivano sredstvo korišten je pentadekapeptid BPC 157 koji je dobiven sintezom i koji se sastoji od 15 aminokiselina (Gly-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val, Mw je 1419; Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija).^{22-29,90-93} U istraživanju je korišten peptid čistoće 99%, kako je određeno visokotlačnom kromatografijom – HPLC (1-des-Gly peptid kao onečišćenje), otopljen u fiziološkoj otopini (Pliva, Zagreb, Hrvatska).

Po učinjenom kirurškom zahvatu eksperimentalne su životinje metodom slučajnog izbora podijeljene u dvije skupine obzirom na način primjene pentadekapeptida BPC 157 – intraperitonealna primjena (SKUPINA A) ili peroralna primjena (SKUPINA B), kao što je to shematski prikazano na slici 5. Skupine su potom metodom slučajnoga izbora podijeljene u tretirane (SKUPINE A1 i B1) i kontrolne skupine (SKUPINE A2 i B2). Na osnovi podataka iz literature izračunali smo da je uz snagu od 80% i razinu pogreške alfa od 0,05 potrebno 6 životinja po skupini da bismo testirali povećanje sile pucanja od 33% u skupinama liječenim pentadekapeptidom BPC 157 u odnosu na kontrolne skupine, s očekivanom standardnom devijacijom od 8N u svim skupinama.⁶³ Zbog toga je za čitavo istraživanje operirano 312 eksperimentalnih životinja koje su potom praćene podijeljenjem s obzirom na primjenjeno sredstvo i na način njegove primjene u četiri skupine (A1, A2, B1 i B2) od 78 životinja.

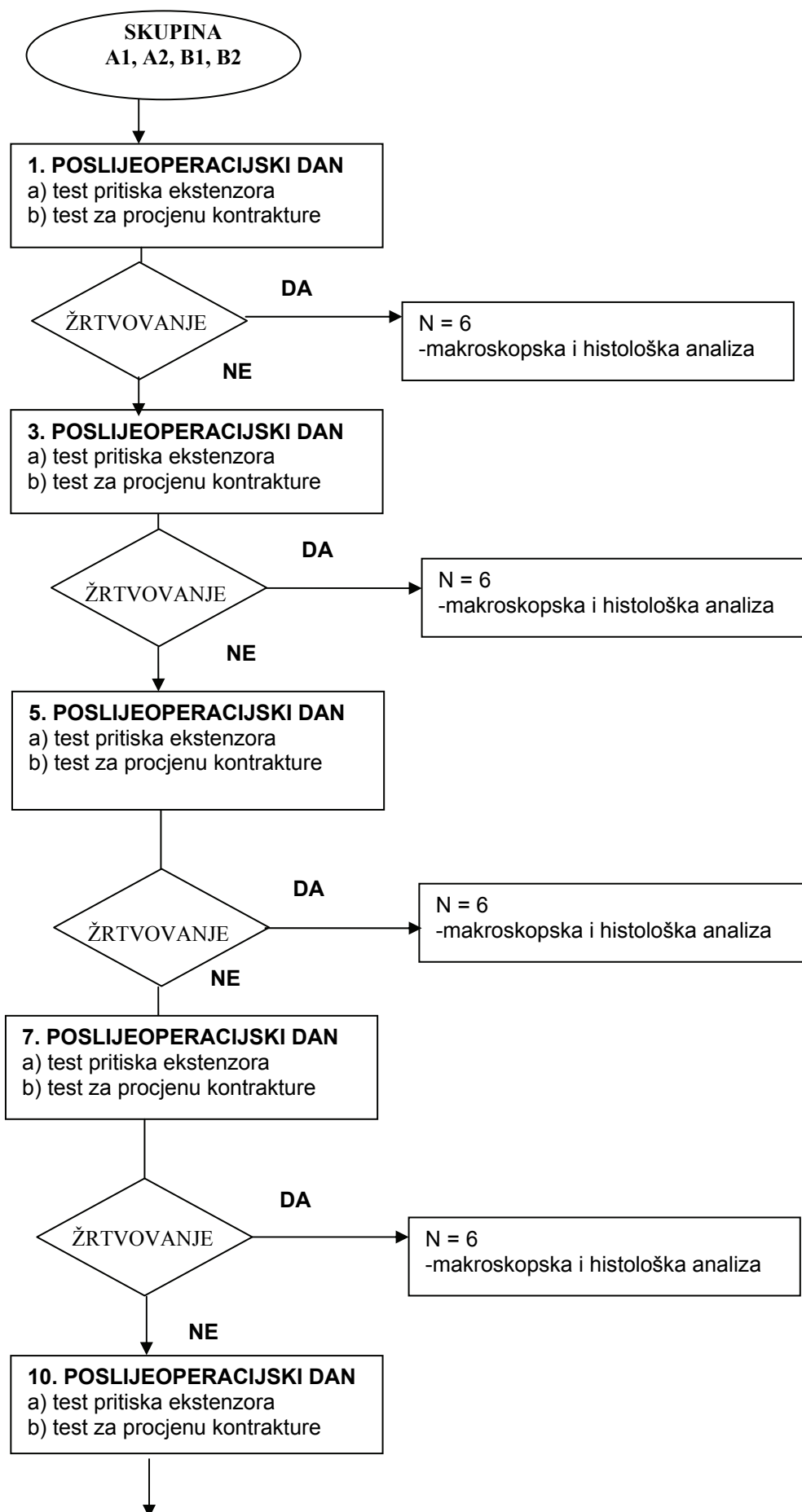


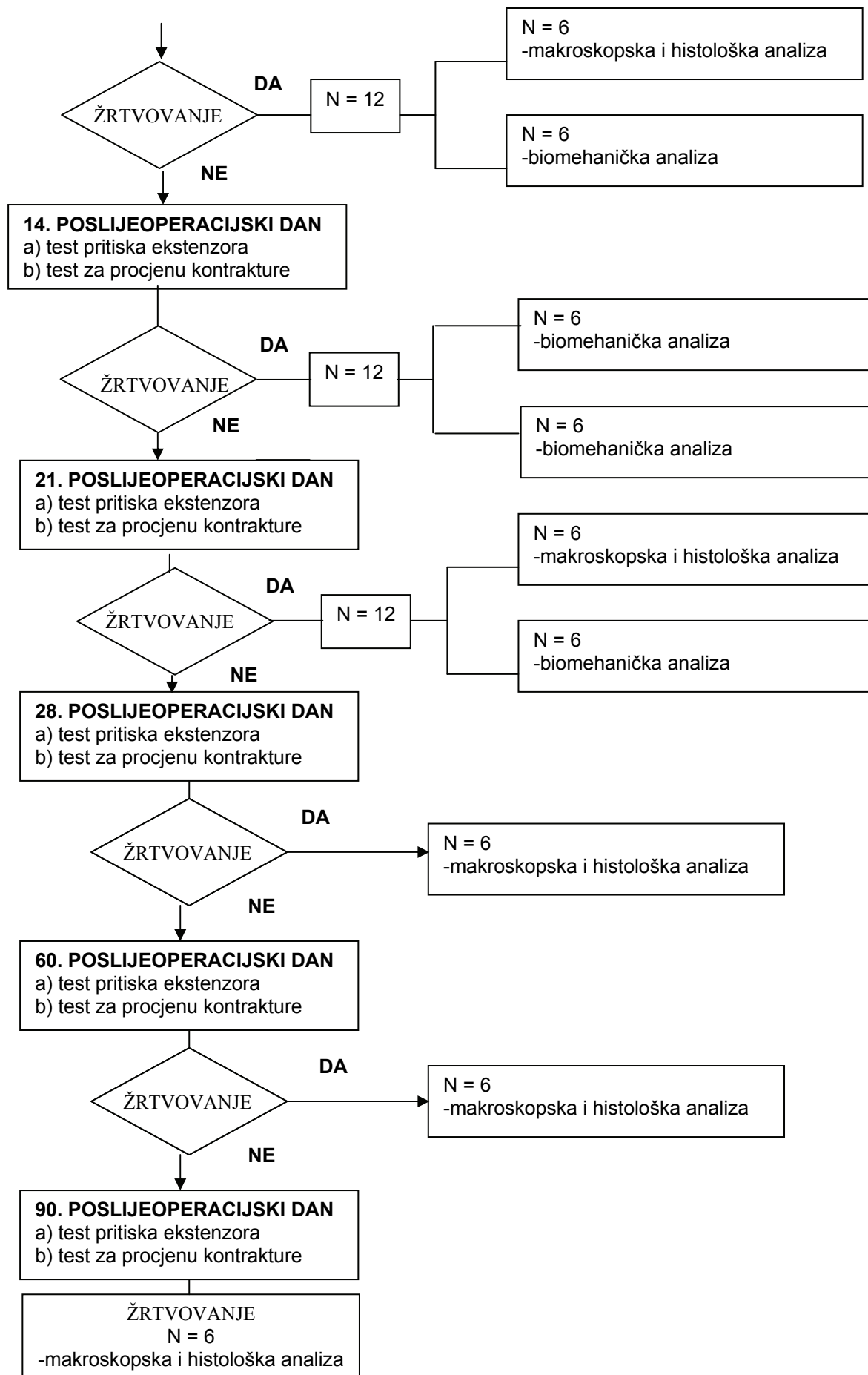
Slika 5. Shematski prikaz podjele eksperimentalnih životinja u skupine obzirom na primijenjeno sredstvo i način primjene.

Eksperimentalne životinje svrstane u SKUPINU A1 dobile su odmah po učinjenom kirurškom zahvatu intraperitonealnom primjenom pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 µg/kg TT, što se potom ponavljalo, i to na isti način i u istoj dozi svaka 24 sata do žrtvovanja koje se činilo zavisno o protokolu istraživanja (slika 6.). Ta je doza izabrana jer su se njome dobivali najbolji rezultati u istraživanju učinka primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje prerezane Ahilove tetive u štakora, potom na cijeljenje prerezanoga tetivno koštanoga hvatišta Ahilove tetive u štakora, te na cijeljenje prerezanoga mišića kvadricepsa u štakora.^{26,28,29} Kontrolna skupina – SKUPINA A2 dobivala je na isti način, tj. intraperitonealnom primjenom, i u jednakom volumenu fiziološku otopinu po istoj shemi (fiziološka otopina – Pliva, Zagreb, Hrvatska). SKUPINA B1 dobivala je vodu za piće u kojoj je bilo otopljeno 300 µg/l pentadekapeptida BPC 157 a koja se mijenjala svaka 24 sata. Prema zapažanjima iz istraživanja Petrovica i sur. štakor dnevno popije 12 ml vode.¹¹⁷ Kontrolna skupina – SKUPINA B2 dobivala je samo čistu tekuću vodu za piće. Taj je način primjene izabran stoga što u prethodnim istraživanjima nije rabljen i što se željelo istražiti da li je pentadekapeptid BPC 157 jednako djelotvoran primjenjen parenteralno i peroralno.

3.3. Istraživački postupnik i priprema preparata za analize

Kako je i naznačeno u istraživačkome postupniku (slika 6.) 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 60 i 90 poslijeoperacijski dan činili smo kliničko-funkcionalne testove, i to test pritiska ekstenzora te test za procjenu kontrakture. Žrtvovanje eksperimentalnih životinja slijedilo je ovisno o protokolu istraživanja, a činjena je dekapitacija giljotinom.¹¹⁸ Dočim je 1, 3, 5, 7, 10, 60 i 90 dan žrtvovano po 6 životinja iz svake skupine za histološku analizu, 14, 21 i 28 dan žrtvovano je po 12 životinja iz svake skupine, i to 6 za histološku analizu, a drugih 6 za biomehaničko ispitivanje. Po dekapitaciji se kirurški odvoje obje stražnje noge od trupla eksperimentalne životinje, i to u zglobu kuka. Nakon skidanja kože, kao i potkožnoga tkiva pristupa se na medijalni





Slika 6. Shematski prikaz istraživačkog postupnika.

kolateralni ligament (LCM), te se uvijek analizira LCM stražnje lijeve noge i uspoređuje njegov izgled s prethodno presječenim LCM-om desne noge. Pomoću digitalnog fotoaparata – Canon DIGITAL IXUS II snimljeni su svi preparati, i to uvijek obje noge zajedno te desnu, prethodno operiranu nogu zasebno. Ti snimci se kasnije koriste za potrebe makroskopske procjene. Za potrebe histološke analize i za biomehaničko ispitivanje koristi se samo desna noga. Tako se za potrebe histološke analize kirurški odvoji medijalni kolateralni ligament (LCM) s proksimalnog i distalnog hvatišta pomno pazeći da se pritom odstrane sve okolne strukture tako da ostane sam medijalni kolateralni ligament, a sva se daljnja obrada napravila u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za biomehaničko ispitivanje pripremi se preparat kost–ligament–kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija), i to tako što se prvo potpuno skine svo meko tkivo s natkoljениčne i s goljениčne kosti i načini patelektomija, a potom se uz pomoć kirurške lupe identificira i skalpelom oštrom presjeku svi ligamenti koljena izuzev medijalnog kolateralnog ligamenta (slika 7.). Tako načinjen preparat kost–ligament–kost koji ima više od polovine duljine natkoljениčne i goljениčne kosti i čitav medijalni kolateralni ligament, postavlja se u fiziološku otopinu i za otprilike 2 sata od žrtvovanja provede se biomehaničko ispitivanje. To se ispitivanje činilo u MIRTA-KONTROL, d.o.o., Zajčeva 23, Zagreb, Hrvatska na numeričkoj kitalici (TENSO-LAB, STRENGTH TESTER, Mesdan Lab., Raffa di Puegnago, Italija).

3.4. Kliničko-funkcionalno testiranje

Kao odrednica funkcijskog oporavka eksperimentalnih životinja nakon presijecanja medijalnog kolateralnog ligamenta bio je korišten test pritiska ekstenzora, i to 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 60 i 90 poslijeoperacijski dan kako je i naznačeno u istraživačkom postupniku. Test pritiska ekstenzora (engl. extensor postural thrust – EPT) opisali su Thalhammer i sur.¹¹⁹ 1995. godine, a Koka i Hadlock¹²⁰ su dokazali da se može upotrebljavati kao potpuno dostatna metoda za praćenje oporavka motoričke funkcije traumatizirane

stražnje noge štakora. Test pritiska ekstenzora izvodila su dva ispitivača. Prvi je ispitivač držao torzo životinje cijelom šakom dok je malim prstom pridržavao suprotnu nožicu. Pritom je ispitivana životinja bila u uspravnom položaju, a ispitivana slobodno viseća nožica bila je postavljena na digitalnu vagu ravne površine. U trenutku kontakta stopala s ravnom plohom vage štakor se instiktivno odguruje od plohe uporabljajući silu ekstenzornih mišića potkoljenice, te je u tom trenutku ispitivač očitavao rezultat toga pritiska u obliku mase na skali digitalne vage. Za izračunavanje deficita motoričke funkcije, odnosno motoričkog indeksa koji se kreće u rasponu od 0 do 1 s tim da je deficit manji što je rezultat bliži 0, koristili smo slijedeću formulu; $EPT = (NEPT - EEPT) / NEPT$, pri čemu je NEPT vrijednost pritiska neoperirane stražnje lijeve noge, a EEPT vrijednost operirane stražnje desne noge eksperimentalne životinje - štakora.

Tijekom istraživanja zamjetili smo da se nakon kirurškog zahvata i presijecanja LCM-a pojavljuje kontraktura koljena. Za procjenu kontrakture rabili smo test koji smo smislili i za koji su potrebna tri nezavisna, objektivna ispitivača koja imaju iskustva u radu s eksperimentalnim životinjama. Testiranje za procjenu kontrakture provedeno je 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 60 i 90 poslijeoperacijski dan kako je i naznačeno u istraživačkom postupniku. Prilikom testiranja jedan je od ispitivača držao životinju straga lijevom rukom ispod prednjih nožica pazeći pritom da se životinja tijekom ispitivanja ne iskrivljuje, dočim je desnom držao rep ispitivane životinje. Drugi je ispitivač postupno ispružao stražnje nožice životinje do maksimalne ekstenzije. Treći je ispitivač u tome trenutku označio na lijevoj, neoperiranoj nozi točku do koje doseže maksimalno istegnuta desna, operirana nožica svojim palcem (slika). Potom se mikrometarskim vijkom (pomičnom mjerkom) mjerilo od označene točke na lijevoj nozi do vrha palca te noge, a dobivene su se mjere bilježile za kasniju statističku obradu.

3.5. Biomehaničko ispitivanje

Biomehaničko je ispitivanje činjeno 10, 14 i 21 dana jer se prije 10 dana, kao što je i naglašeno u literaturi, vrlo teško može načiniti. To je ispitivanje načinjeno u MIRTA-KONTROL, d.o.o., Zajčeva 23, Zagreb, Hrvatska na numeričkoj kidalici (TENSO-LAB, STRENGTH TESTER, Mesdan Lab., Raffa di Puegnago, Italija) (slika 8.). Preparat kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) bio je postavljen u ranije specijalno izrađene pritezne ploče koje su modelirane prema prosječnoj kosti eksperimentalne životinje i izrađene su korištenjem tekućeg metala «Loctite». Te su ploče bile uklještene u posebne metalne stezaljke koje su bile testirane na sile do 200N. Da bi se povećalo trenje između priteznih ploča od tekućeg metala i specijalnih metalnih stezaljki koristili smo gumene pločice 85shA zbog toga da se spriječi moguće proklizavanje prihvatnih ploča, a samim tim i preparata tijekom mjerenja. Takav se prihvatni sklop onda montirao na numeričku kidalicu pazeći pritom da su kosti postavljene pod kutem od 60 stupnjeva. Ta je kidalica, s mogućnošću mjerenja reda preciznosti od 0,01N, bila spojena sa osobnim računalom sa softverom koji omogućava kako kontrolu pomaka linearne osi kidalice, tako i brzinu pomaka. Na kidalici je prihvatni sklop bio kruto povezan sa senzorom za mjerenje sile, koji može mjeriti sile do 100N s preciznošću od 0,01N. Uvjeti mjerenja bili su standardizirani, a samo je mjerenje činjeno u sobi koja je imala temperaturu od 22° s vlažnošću od 60%. Tijekom mjerenja prostorija je bila zatvorena pa su se strujanje zraka i vibracije mogli zanemariti. Mjerenje se izvodilo s konstantnom brzinom od 0,001m/s. Analogne su se informacije sa senzora prosljeđivale u A/D konverter, karticu i tamo su se prevodile u digitalni zapis. Računalo je mjerilo u realnome vremenu kontinuirano prikazujući promjene u odnosu između primjenjene sile i produljenja ligamenta. Po prekidu kontinuiteta ligamenta računalo je zaustavljalo linearnu os kidalice i prekidalo time mjerenje. Prilikom toga testiranja dobivena je karakteristična krivulja odnosa opterećenja i produljenja, te numeričke vrijednosti sile pucanja izražene u njutnima (N) i produljenja ligamenta u milimetrima (mm). Za izračunavanje podataka o krutosti i energiji

apsorbiranoj do trenutka pucanja korištene su vrijednosti dobivene u granicama od 25 do 75% površine ispod dobivene krivulje. Osim toga, zasebno je zabilježeno i mjesto prekida kontinuiteta ligamenta.

3.6. Makroskopska procjena izgleda ligamenta

Makroskopska procjena izgleda ligamenta činila se po žrtvovanju životinja, i to kako je prikazano u istraživačkome postupniku 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 60 i 90 poslijeoperacijski dan. To se žrtvovanje nije činilo samo za makroskopsku procjenu, već se nakon te procjene činio preparat ili za histološku analizu ili za biomehaničko ispitivanje. Nakon žrtvovanja uvijek se kirurški u zglobu kuka odvajaju obje stražnje noge eksperimentalne životinje. Potom se po skidanju kože i potkožnog tkiva pristupa na medijalni kolateralni ligament (LCM), te se uspoređuje zdrav LCM stražnje lijeve noge s prethodno presječenim LCM-om stražnje desne noge eksperimentalne životinje. Pomoću digitalnog fotoaparata – Canon DIGITAL IXUS II snimaju se svi preparati, i to uvijek obje noge zajedno te desnu, prethodno operiranu, nogu zasebno. Ti snimci kasnije se rabe za potrebe makroskopske procjene. Prilikom makroskopske procjene promatra se i opisuje izgled ligamenta, i to s osobitom pozornošću mjesto cijeljenja ligamenta, kao i izgled okolnih anatomskih struktura.



Slika 7. *Preparat kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) koji je načinjen za potrebe biomehaničkog testiranja. Fotografija je snimljena pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.*



Slika 8. *Fotografija numeričke kitalice (TENSO-LAB, STRENGTH TESTER, Mesdan Lab., Raffa di Puegnago, Italija) na kojoj je i načinjeno biomehaničko testiranje za potrebe ovog istraživanja i koja se nalazi u MIRTA-KONTROL, d.o.o., Zajčeva 23, Zagreb, Hrvatska. Fotografija je snimljena pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.*

3.7. Mikroskopska procjena

Po žrtvovanju životinja i odvajanju medijalnog kolateralnog ligamenta s proksimalnog i distalnog hvatišta te pomnog odvajanja svog mekog tkiva s njega pristupalo se pripremi preparata za patohistološku analizu u Zavodu za patologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 10, Zagreb. Tamo se tkivo fiksiralo u 4% puferiranom formalinu te se nakon toga standardnim postupkom uklapalo u parafin, a potom se rezalo na rezove debljine 3µm i bojalo hemalaun-eozinom (HE). Dodatni rezovi bojali su se metodom po Malloryu za prikaz zrelog veziva (kolagen tipa I) te impregnacijom srebrom po Gomoriju za prikaz retikulinskih vlakana (kolagen tip III). Šifrirane histološke preparate pregledala su pod svjetlosnim mikroskopom dva neovisna patologa u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prisutnost pojedinog tipa kolagena odredilo se semikvantitativnom analizom (skor 0-3), i to za kolagen I slijedećom skalom: 0-nema novog kolagena ni vidljivih promjena na starom; 1-minimalno prisustvo novog kolagena I i/ili početna razgradnja starog; 2-uznapredovalo prisustvo kolagena I (1/4 do 3/4 vlakana); 3-kompaktan kolagen. Za kolagen III rabili smo slijedeću skalu: 0- nema zastupljenosti retikulinskih vlakana u vidnome polju; 1- mala zastupljenost retikulinskih vlakana u vidnome polju; 2- srednja zastupljenost retikulinskih vlakana u vidnome polju; te 3- velika zastupljenost retikulinskih vlakana u vidnome polju. Za analizu krvnih žila koristilo se imunohistokemijsko bojenje na CD34 po specifikaciji proizvođača (DAKO, Glostrup, Danska). Svaka stanična formacija s lumenom koja je pokazivala pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na CD34 smatrala se zasebnim vaskularnim prostorom tj. krvnom žilom, a pojedinačne pozitivne stanice ili manje nakupine stanica bez formiranja lumena interpretirale su se kao kapilarni vaskularni prostori. Semikvantitativnom ocjenskom ljestvicom (skor 1-3) procjenjen je broj vaskularnih prostora u vidnom polju: 1- 1 do 15 vaskularnih prostora u vidnom polju; 2- 16-30 vaskularnih prostora u vidnom polju; 3- više od 30 prostora u vidnom polju. Obrada uzoraka bojenih različitim tehnikama učinila se koristeći se pritom sustavom koji se sastoji od svjetlosnog mikroskopa

Leitz Diaplan, videokamere JVC (monočip) te osobnog računala sa sustavom za pohranu i analizu slike (ISSA/SFORM, Vamstec, Zagreb, Hrvatska). Kvantitativni parametri analizirani su na tri konzekutivna reza, i to tipovi kolagena pod povećanjem objektiva x 25, a vaskularni prostori pod povećanjem objektiva x 40.

3.8. Statistička analiza

Kliničko-funkcionalni pokazatelji oporavka i podaci dobiveni histološkom analizom prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), dok su biomehanički pokazatelji, budući da su pokazali normalnu raspodjelu (Kolmogorov-Smirnovljev test), prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ($M \pm SD$). Usporedba biomehaničkih i kliničko-funkcionalnih pokazatelja između ispitivanih skupina učinjena je uz pomoć Kruskal-Wallis testa i Mann-Whitney U testa kao post-hoc postupka.

Usporedba biomehaničkih pokazatelja između i unutar skupina (ponovljena mjerenja) učinjena je pomoću složene analize varijance (engl. 4X3 between-within groups ANOVA). S obzirom na mali broj eksperimentalnih životinja u skupini posebna pozornost posvećena je pretpostavkama u osnovi složene analize varijance. Kao što je već spomenuto, za sve četiri varijable rezultati su bili normalno raspodijeljeni. Također, prilikom svake složene analize varijance testirana je i homogenost varijanci koja je preduvjet za taj postupak. Box-ov test je u sva četiri slučaja bio statistički neznačajan što je ukazalo na to da se varijance međusobno ne razlikuju te su time bile zadovoljene pretpostavke za provedbu tog postupka.

Za usporedbe histoloških pokazatelja među skupinama također su korišteni Kruskal-Wallisov test i Mann-Whitneyev U test kao post-hoc postupak, a za usporedbe unutar skupina korišteni su Friedmanov test i Wilcoxonov test ekvivalentnih parova kao post-hoc postupak.

Prilikom svih usporedbi razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Funkcionalni parametri oporavka

4.1.1. Test pritiska ekstenzora

Kao odrednica funkcijskog oporavka nakon presijecanja medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM-a) korišten je test pritiska ekstenzora, i to 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 60 i 90 poslijeoperacijski dan. Za sve točke mjerenja nađena je statistički značajna razlika u motoričkom indeksu (Kruskal–Wallisov test; $p < 0.001$ za sve usporedbe) dobivenom tim testiranjem. Post-hoc usporedbe pokazale su da se skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom (10 $\mu\text{g/kg}$ TT) ili peroralnom (u vodi za piće otopljeno 300 $\mu\text{g/l}$) primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; $p < 0.001$ za sve usporedbe). Naime, deficit motoričke funkcije jasno je vidljiv u kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) tijekom čitavog vremenskog razdoblja praćenja što je razvidno iz numeričkih podataka koji su prikazani u Tablici 2. medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$). Tako je primjerice vrijednost motoričkog indeksa dobivena tim testom trećeg poslijeoperacijskog dana u tretiranim skupinama (skupina A1 i B1) iznosila oko 0,09, a u kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) oko 0,50; $n=72$; $p < 0,001$. Valja istaknuti da se skupine A1 i B1, kao i skupine A2 i B2, nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

Dobiveni rezultati postotka deficita motoričke funkcije, tzv motoričkog indeksa prikazani su i grafički po danima testiranja (slike 9. do 18.), i to grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon.

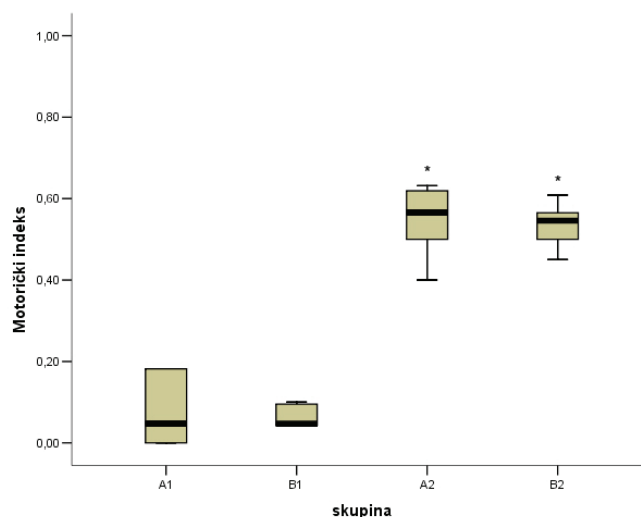
Tablica 2. Vrijednosti motoričkog indeksa dobivene u testu pritiska ekstenzora prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), i to kako s obzirom na testiranu skupinu eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2), tako i s obzirom na dan testiranja i broj eksperimentalnih životinja u skupini. Način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju “Materijali i metode”.

DAN TESTIRANJA	BROJ ŽIVOTINJA U SKUPINI	TEST PRITISKA EKSTENZORA					
		SKUPINA A1†	SKUPINA B1†	SKUPINA A2	SKUPINA B2	p^*	
		$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$		
1.	78	0.05±0.05	0.05±0.06	0.55±0.12	0.54±0.12	<0.001	
3.	72	0.09±0.12	0.09±0.10	0.50±0.13	0.50±0.14	<0.001	
5.	66	0.00±0.05	0.00±0.05	0.52±0.12	0.53±0.12	<0.001	
7.	60	0.00±0.07	0.00±0.07	0.52±0.11	0.52±0.11	<0.001	
10.	54	0.00±0.05	0.00±0.05	0.40±0.14	0.40±0.13	<0.001	
14.	42	0.00±0.05	0.04±0.05	0.47±0.14	0.47±0.11	<0.001	
21.	30	0.04±0.05	0.04±0.05	0.37±0.16	0.37±0.17	<0.001	
28.	18	0.04±0.05	0.04±0.05	0.43±0.12	0.40±0.14	<0.001	
60.	12	0.00±0.08	0.05±0.05	0.43±0.20	0.40±0.12	<0.001	
90.	6	0.02±0.05	0.02±0.04	0.32±0.15	0.38±0.11	<0.001	

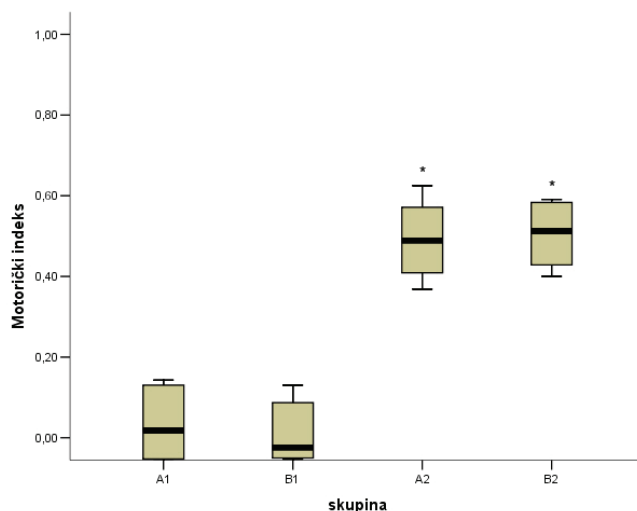
$C \pm Q$ medijan $\pm$ interkvartilni raspon

* Kruskal – Wallisov test

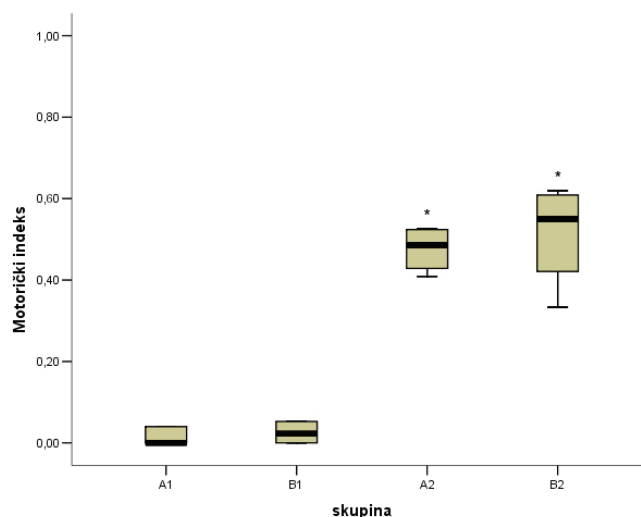
† statistički značajne razlike u odnosu na Skupine A2 i B2 ($p < 0.001$, Mann – Whitneyev U test)



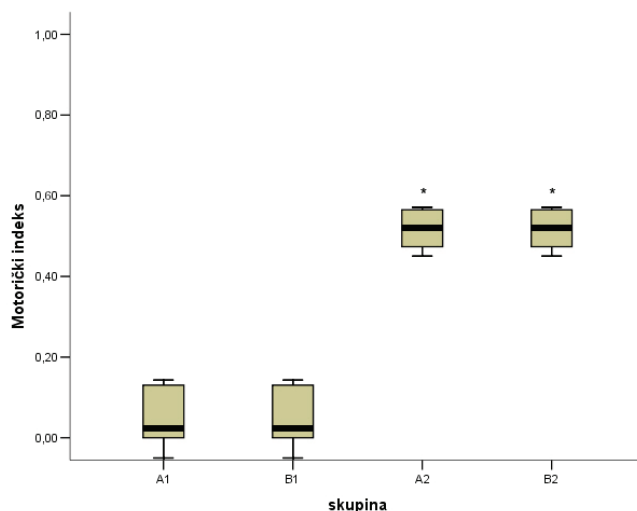
Slika 9. Motorički indeks svih testiranih skupina prvog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 78$).



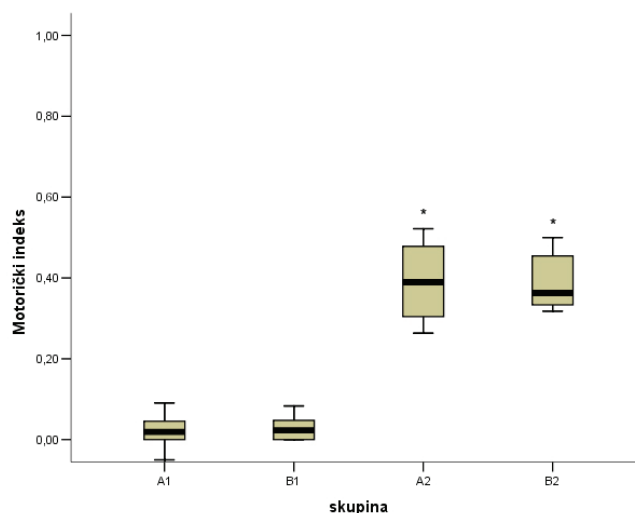
Slika 10. Motorički indeks svih testiranih skupina trećeg poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 72$).



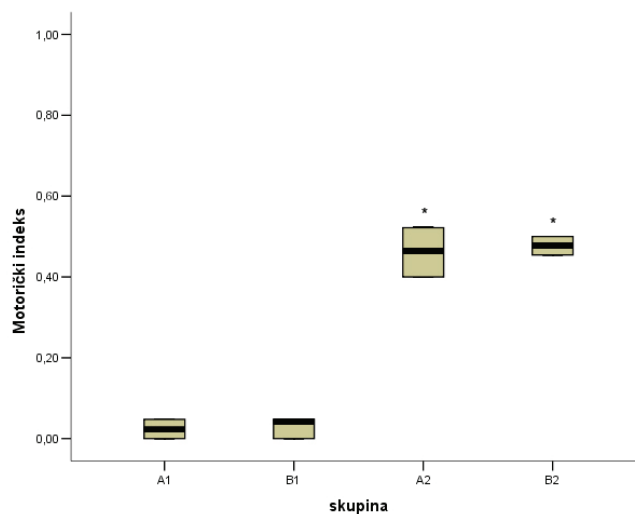
Slika 11. Motorički indeks svih testiranih skupina petog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 66$).



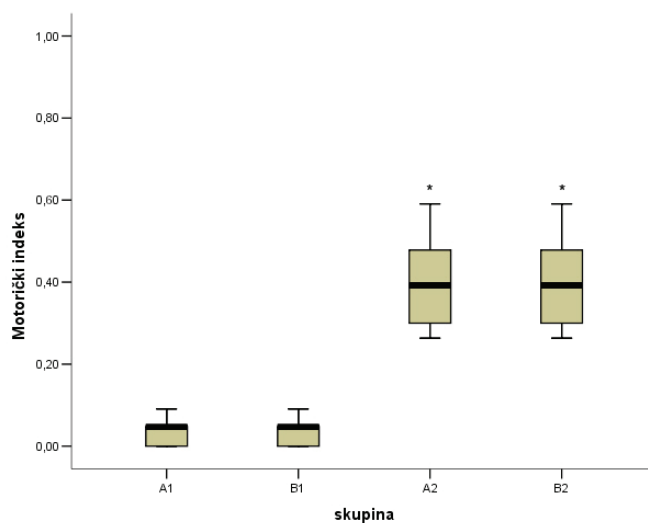
Slika 12. Motorički indeks svih testiranih skupina sedmog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 60$).



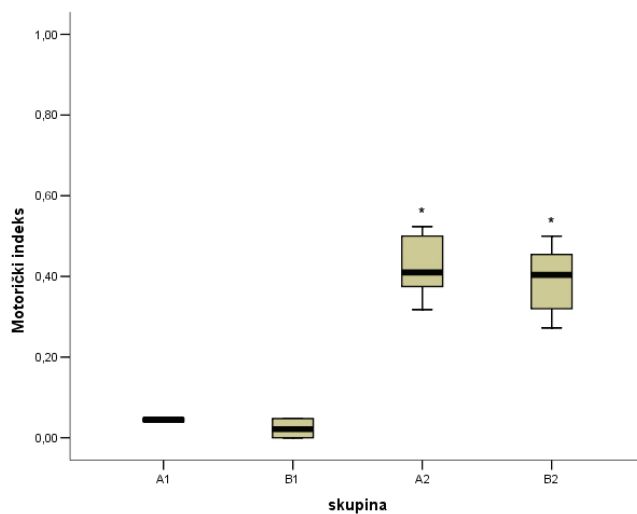
Slika 13. Motorički indeks svih testiranih skupina desetog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 54$).



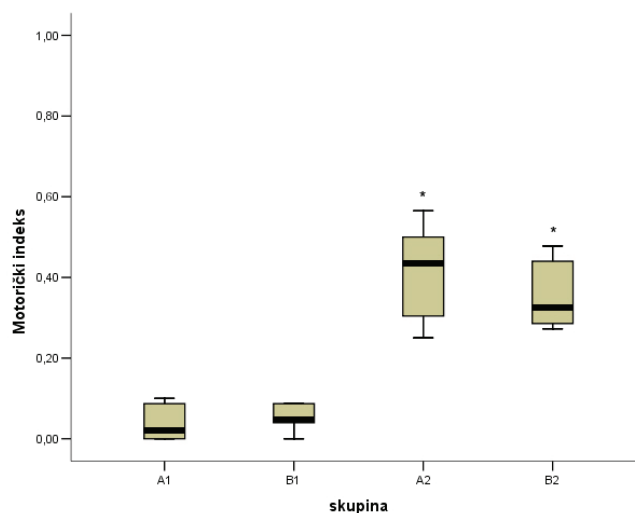
Slika 14. Motorički indeks svih testiranih skupina četrnaestog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 42$).



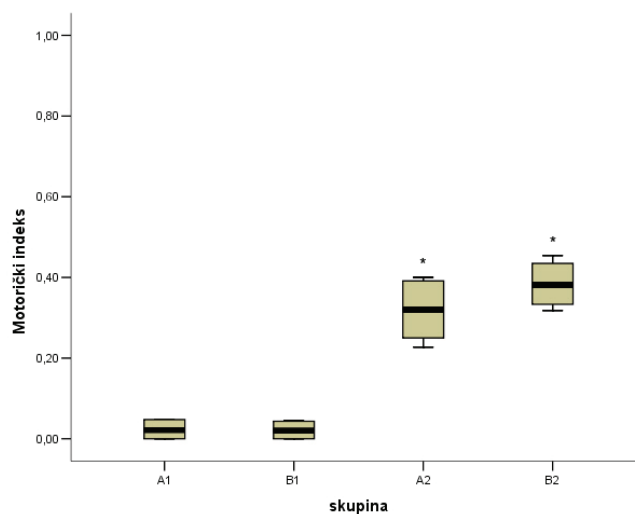
Slika 15. Motorički indeks svih testiranih skupina dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; $*p<0.001$; $n=30$).



Slika 16. Motorički indeks svih testiranih skupina dvadesetosmog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; $*p<0.001$; $n=18$).



Slika 17. Motorički indeks svih testiranih skupina šezdesetog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 12$).



Slika 18. Motorički indeks svih testiranih skupina devedesetog poslijeoperacijskog dana prikazan grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon. Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 6$).

4.1.2. Testiranje kontrakture

Tijekom istraživanja zamijetili smo da se nakon kirurškog zahvata i presijecanja LCM-a u skupinama koje nisu dobivale pentadekapeptid BPC 157 javlja kontraktura na operiranom koljenu, i to takva da se niti pasivnim ispružanjem nogu nemože dobiti jednaka duljina operiranog i neoperiranog ekstremiteta. Testiranjem koje smo proveli 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 60 i 90 poslijeoperacijski dan nađena je za sve točke mjerenja statistički značajna razlika u kontrakturi (Kruskal–Wallisov test; $p < 0.001$ za sve usporedbe). Post-hoc usporedbe pokazale su da se skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom (10 µg/kg TT) ili peroralnom (u vodi za piće otopljeno 300 µg/l) primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; $p < 0.001$ za sve usporedbe). Skupine A1 i B1, kao i skupine A2 i B2, nisu se statistički značajno razlikovale. Numerički podaci za sve četiri skupine prikazani su u Tablici 3. medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), i to za svaki dan testiranja. Tim je testiranjem mjerena razlika u duljini između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge i uočeno je kako u tretiranim skupinama životinja (skupina A1 i B1) nije bilo razlike tijekom čitavog vremena praćenja, dok je u kontrolnim skupinama (skupina A2 i B2) razlika bila čitavo vrijeme prisutna te je primjerice 14-ti poslijeoperacijski dan iznosila 7.4 ± 4 mm, odnosno 7.6 ± 4 mm; $n=42$; $p < 0.001$.

Rezultati testiranja kontrakture prikazani su i grafički po danima testiranja (slike 19. do 28.), i to grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon.

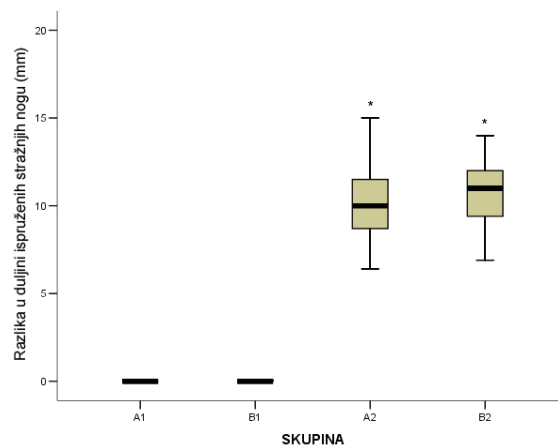
Tablica 3. Vrijednosti izmjerene razlike u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), i to kako s obzirom na testiranu skupinu eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2), tako i s obzirom na dan testiranja i broj eksperimentalnih životinja u skupini. Način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju "Materijali i metode".

DAN TESTIRANJA	BROJ ŽIVOTINJA U SKUPINI	TEST ZA PROCJENU KONTRAKTURE				p*
		SKUPINA A1†	SKUPINA B1†	SKUPINA A2	SKUPINA B2	
		$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$	
1.	78	0.0±0	0.0±0	10.0±3	11.0±3	<0.001
3.	72	0.0±0	0.0±0	11.0±3	11.0±2	<0.001
5.	66	0.0±0	0.0±0	10.6±3	10.6±2	<0.001
7.	60	0.0±0	0.0±0	9.3±4	8.9±2	<0.001
10.	54	0.0±0	0.0±0	8.1±4	8.0±2	<0.001
14.	42	0.0±0	0.0±0	7.4±4	7.6±4	<0.001
21.	30	0.0±0	0.0±0	7.1±4	7.0±4	<0.001
28.	18	0.0±0	0.0±0	7.5±3	9.1±2	<0.001
60.	12	0.0±0	0.0±0	5.5±3	5.1±3	<0.001
90.	6	0.0±0	0.0±0	5.1±3	4.2±1	<0.001

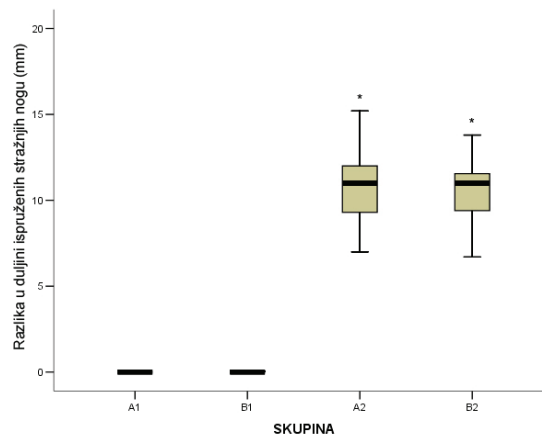
$C \pm Q$ medijan $\pm$ interkvartilni raspon

* Kruskal – Wallisov test

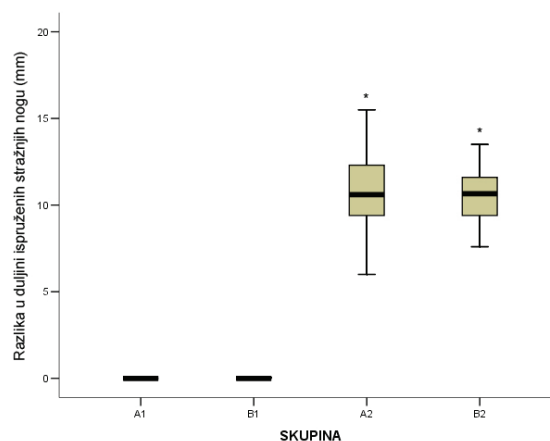
† statistički značajne razlike u odnosu na Skupine A2 i B2 ($p < 0.001$, Mann – Whitneyev U test)



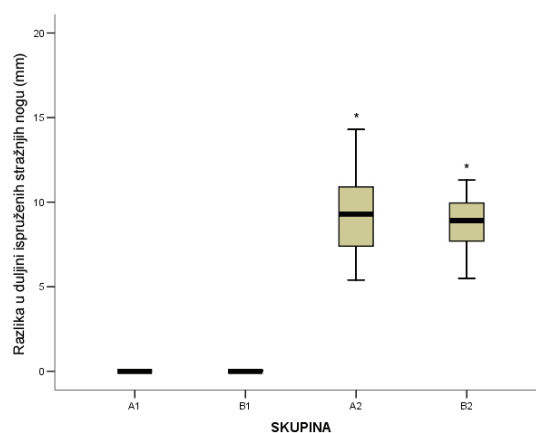
Slika 19. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje prvog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 78$).



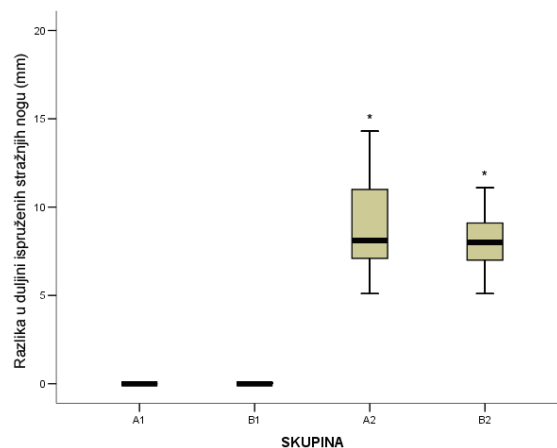
Slika 20. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje trećeg poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 72$).



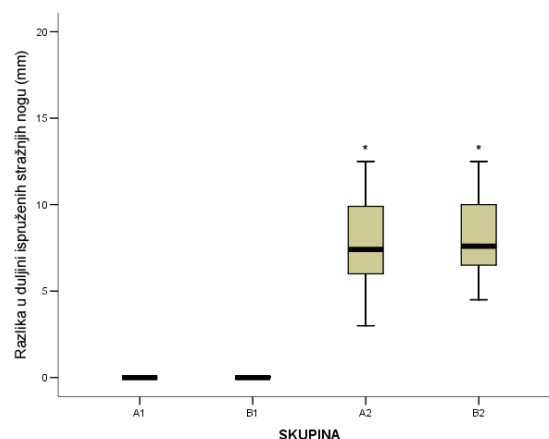
Slika 21. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje petog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 66$).



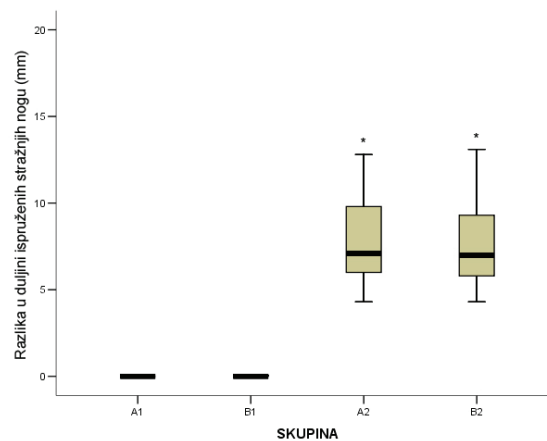
Slika 22. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje sedmog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 60$).



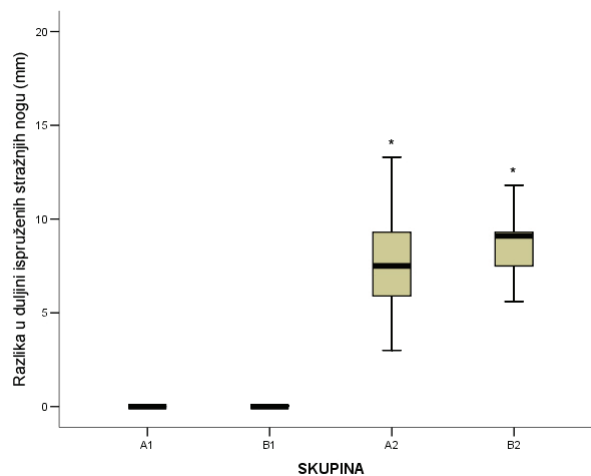
Slika 23. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje desetog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; $*p < 0.001$; $n = 54$).



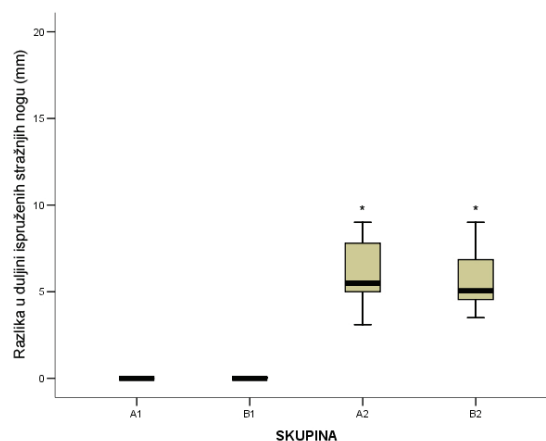
Slika 24. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje četrnaestog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; $*p < 0.001$; $n = 42$).



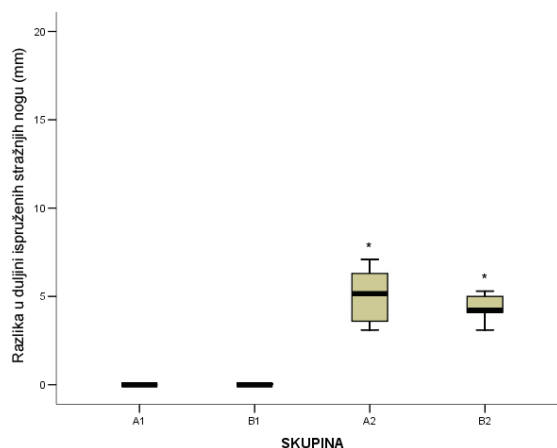
Slika 25. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 30$).



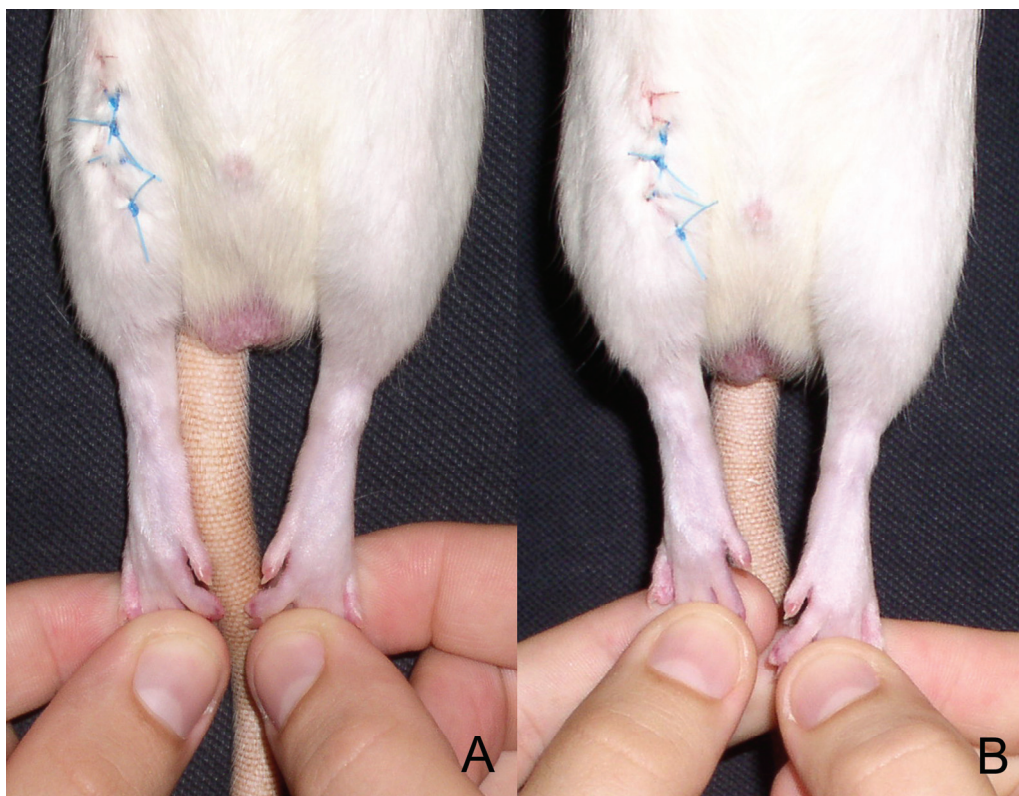
Slika 26. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje dvadesetosmog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 18$).



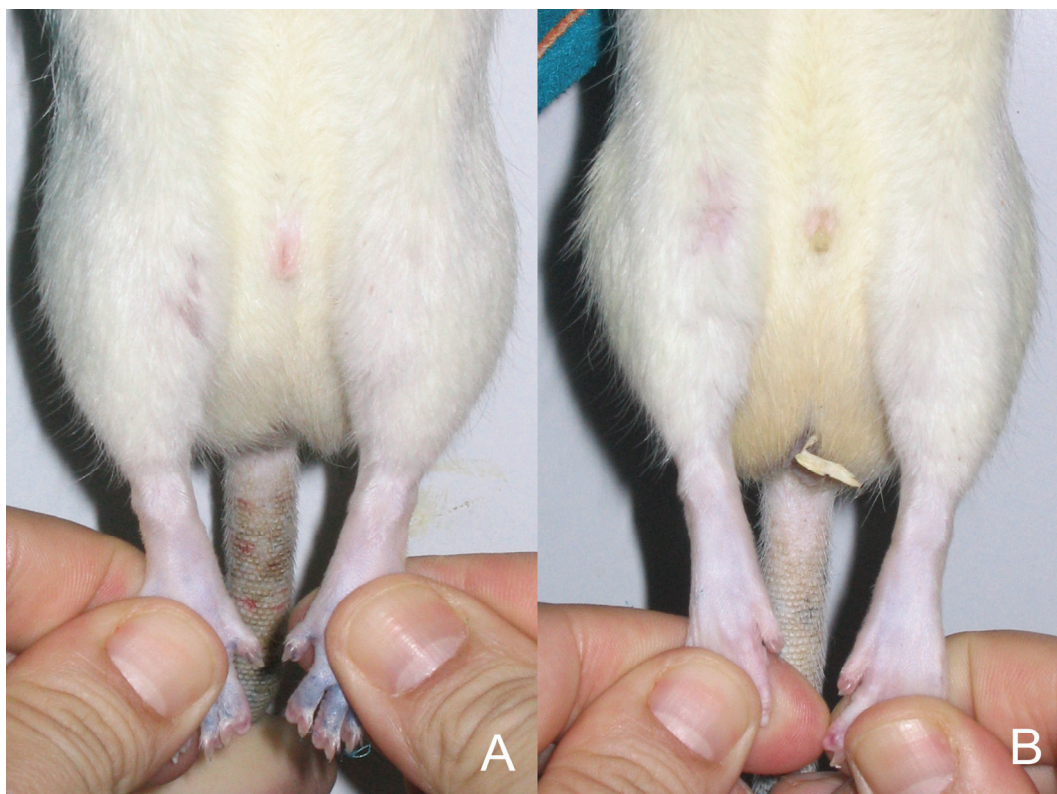
Slika 27. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje šezdesetog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 12$).



Slika 28. Izmjerena razlika u duljini (milimetri) između ispružene desne (operirane) i lijeve stražnje noge eksperimentalne životinje devedesetog poslijeoperacijskog dana u svim testiranim skupinama prikazana je grafikonom «kutija i brkovi» u kojem središnja crta predstavlja medijan, «kutija» interkvartilni raspon, a «brkovi» totalni raspon (način mjerenja opisan je u tekstu u poglavlju «Materijali i metode»). Skupine A1 i B1, tj. životinje koje su intraperitonealnom ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 (Mann-Whitneyev U test; * $p < 0.001$; $n = 6$).



Slika 29. Test za procjenu kontrakture koja se javlja po kirurškom presijecanju medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM-a), a čiji se detaljni opis nalazi u poglavlju «Materijali i metode». A) Testiranje prvog poslijeoperacijskog dana eksperimentalne životinje iz tretirane skupine (skupina A1 - životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 μ g/kgTT) potvrđuje da životinja nije razvila kontrakturu – palci stražnjih nogu su u razini. B) Testiranje prvog poslijeoperacijskog dana eksperimentalne životinje iz kontrolne skupine (skupina A2 - životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale fiziološku otopinu) upućuje na pojavu kontrakture nakon kirurškog zahvata – palci stražnjih nogu nisu u razini. Fotografije su snimljene pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.



Slika 30. Test za procjenu kontrakture koja se javlja po kirurškom presijecanju medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM-a), a čiji se detaljni opis nalazi u poglavlju «Materijali i metode». A) Testiranje dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana eksperimentalne životinje iz tretirane skupine (skupina A1 - životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157 u dozi od $10\mu\text{g/kgTT}$) potvrđuje da životinja nije razvila kontrakturu – palci stražnjih nogu su u razini. B) Testiranje dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana eksperimentalne životinje iz kontrolne skupine (skupina A2 - životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale fiziološku otopinu) upućuje na pojavu kontrakture nakon kirurškog zahvata – palci stražnjih nogu nisu u razini. Fotografije su snimljene pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.

4.2. Biomehaničko testiranje

Kao što je već istaknuto prilikom biomehaničkog testiranja (slika 31.) preparata kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) dobija se karakteristična krivulja odnosa opterećenja i produljenja, kao i numeričke vrijednosti sile pucanja izražene u njutnima (N) te elongacije (krajnjeg produljenja) ligamenta u milimetrima (mm). Za izračunavanje podataka o krutosti (N/mm) i energiji apsorbiranoj do trenutka pucanja (N·mm) korištene su vrijednosti dobivene u granicama od 25 do 75% površine ispod dobivene krivulje. Svi dobiveni podaci testiranjem prikazani su u Tablici 4. kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija, i to kako s obzirom na eksperimentalne skupine tako i s obzirom na dane testiranja.



Slika 31. A) Preparat kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) postavljen u pritezne ploče koje su uklještene u posebne metalne stezaljke na početku biomehaničkog testiranja koje je načinjeno na numeričkoj kitalici (TENSO-LAB, STRENGTH TESTER, Mesdan Lab., Raffa di Puegnago, Italija) u MIRTA-KONTROL, d.o.o., Zajčeva 23, Zagreb, Hrvatska. B) Preparat kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) s puknutim LCM-om po završetku testiranja. Fotografije su snimljene pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.

Tablica 4. Vrijednosti sile pucanja (N), elongacije (mm), absorbirane energije (N·mm) i krutosti (N/mm) prikazane su kao aritmetička sredina±standardna devijacija, i to kako s obzirom na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2) tako i s obzirom na dane testiranja (10., 14. i 21. poslijeoperacijski dan).

POKAZATELJ (mjerna jedinica)	DANI TESTIRANJA	SKUPINA A1	SKUPINA B1	SKUPINA A2	SKUPINA B2
		n=6 (M±SD)	n=6 (M±SD)	n=6 (M±SD)	n=6 (M±SD)
SILA PUCANJA (N)	10.	20,7±2,5†	19,7±2,1†	14,4±3,2	13,8±1,8
	14.	33,5±6,3†	30,2±4,4†	22,3±6,6	22,8±4,4
	21.	35,4±7,5†	33,2±3,7†	24,9±10,7	21,6±5,0
ELONGACIJA (mm)	10.	2,8±0,4†	2,7±0,4†	2,4±0,6	2,3±0,4
	14.	2,4±0,3†	2,3±0,4†	1,9±0,5	1,9±0,6
	21.	2,2±0,2†	2,2±0,5†	1,7±0,5	1,8±0,5
ABSORBIRANA ENERGIJA (N·mm)	10.	24,3±4,1†	22,5±2,6†	14,3±3,3	13,5±2,5
	14.	34,6±11,1†	30,5±7,7†	19,3±9,4	18,6±5,6
	21.	32,5±5,9†	30,3±6,1†	19,8±15,8	16,9±7,4
KRUTOST (N/mm)	10.	9,2±1,7	9,1±2,3	8,0±4,1	7,5±1,8
	14.	17,1±2,1	15,8±1,9	14,2±4,7	15,5±5,8
	21.	20,1±5,5	19,4±4,4	17,7±5,2	15,1±4,3

M±SD aritmetička sredina±standardna devijacija

† statistički značajne razlike u odnosu na skupine A2 i B2

Na kraju svakog biomehaničkog testiranja preparata kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) zabilježeno je mjesto prekida kontinuiteta ligamenta. Tako je uočeno da je prilikom testiranja provedenog desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana u 47 od 48 testiranih preparata do pucanja došlo na mjestu na kojemu je LCM i bio kiruški presječen, a samo je u jednom slučaju u skupini B2 došlo do prijeloma femura prilikom testiranja. No, prilikom testiranja dvadesetprvog poslijeoperacijskoga dana došlo je do pucanja na mjestu transekcije u 9

životinja, u 14 je došlo do avulzije tibijalnog hvatišta, dočim je u 1 životinje došlo do odvajanja na femoralnom hvatištu. Ta je raspodjela prikazana u Tablici 5., i to s obzirom na skupine eksperimentalnih životinja i dane testiranja.

Tablica 5. *Mjesto pucanja LCM-a (ožiljak, avulzija tibijalnog hvatišta, drugo) prilikom biomehaničkog testiranja preparata kost-ligament-kost, i to kako s obzirom na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2) tako i s obzirom na dane testiranja (10., 14. i 21. poslijeoperacijski dan).*

DAN TESTIRANJA – SKUPINA	MJESTO PUCANJA LCM-A PRILIKOM BIOMEHANIČKOG TESTIRANJA		
	OŽILJAK	AVULZIJA TIBIJALNOG HVATIŠTA	DRUGO
10. DAN – A1	6	0	0
10. DAN – B1	6	0	0
10. DAN – A2	6	0	0
10. DAN – B2	5	0	1†
14. DAN – A1	6	0	0
14. DAN – B1	6	0	0
14. DAN – A2	6	0	0
14. DAN – B2	6	0	0
21. DAN – A1	2	4	0
21. DAN – B1	1	5	0
21. DAN – A2	3	2	1*
21. DAN – B2	2	4	0

† prijelom femura

* odvajanje na femoralnom hvatištu

4.2.1. Sila pucanja

Promatrajući numeričke vrijednosti sile pucanja dobivene provedenim biomehaničkim testiranjem vidi se da usporedno s danima testiranja raste i dobivena vrijednost sile u svim testiranim skupinama. Ti su numerički podaci izraženi u njutnima (N) prikazani u Tablici 4., i to kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ($M \pm SD$).

Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju benefitni učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 na ispitivani biomehanički parametar silu pucanja. Naime, usporedba skupina pokazuje da su rezultati u skupinama A2 i B2, tj. u onima u kojima nije primjenjivan pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno niži od dobivenih rezultata sile pucanja u skupinama A1 i B1 ($F_{3,20}=23.29$; $p<0.001$, parcijalni $\eta^2=0.78$). S obzirom na dan mjerenja nađena je statistički značajna razlika u sili pucanja (Wilksov $\lambda=0.11$; $F_{2,19}=76.83$; $p<0.001$, parcijalni $\eta^2=0.89$). Tako je primjerice iz Tablice 4. vidljivo da je sila pucanja 14-tog poslijeoperacijskog dana u tretiranim skupinama iznosila $33,5 \pm 6,3N$ i $30,2 \pm 4,4N$, dok je u kontrolnim skupinama iznosila $22,3 \pm 6,6N$ i $22,8 \pm 4,4N$ ($n=6$; $p<0,001$). Ti rezultati ukazuju na znatno bolje cijeljenje ligamenta u tretiranih skupina životinja. Post-hoc usporedba pokazala je da su dobiveni rezultati testiranja provedenog četrnaestog i dvadesetprvog dana statistički značajno viši od onih desetog poslijeoperacijskog dana, dok se oni sami međusobno ne razlikuju (Least significant difference test). Osim toga, statističkom analizom nije nađen statistički značajan interakcijski učinak za dane testiranja i skupine (Wilksov $\lambda=0.76$; $F_{6,38}=0.94$; $p=0.428$).

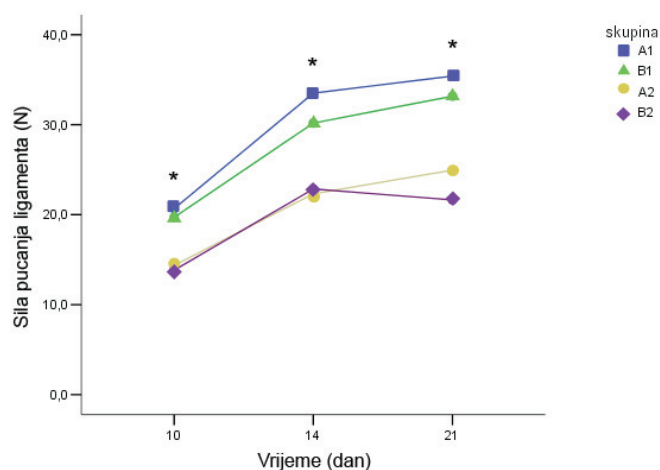
Dobiveni rezultati sile pucanja prikazani su kao aritmetička sredina (M) i grafički (slika 32.), i to linijskim grafikonom poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos rezultata s obzirom na dan testiranja i testirane skupine.

4.2.2. Elongacija

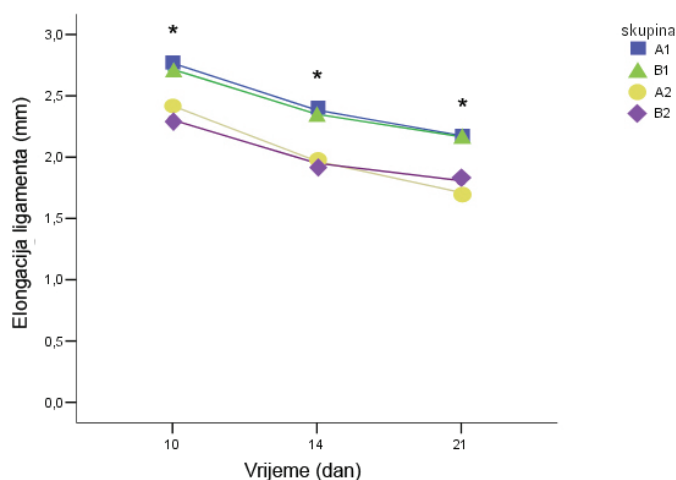
Promatrajući dobivene numeričke vrijednosti elongacije (krajnjeg produljenja) ligamenta provedenim biomehaničkim testiranjem vidi se da usporedno s danima testiranja pada i dobivena vrijednost elongacije u svim testiranim skupinama. Ti podaci izraženi u milimetrima prikazani su u Tablici 4.

Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju benefitni učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 na ispitivani biomehanički parametar elongaciju. Naime, usporedba skupina pokazala je da su rezultati u skupinama A2 i B2, tj. u onima u kojima nije primjenjivan pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno niži od dobivenih rezultata u skupinama A1 i B1 ($F_{3,20}=4.51$; $p<0.014$, parcijalni $\eta^2=0.41$). S obzirom na dan mjerenja pronašli smo statistički značajnu razliku (Wilksov $\lambda=0.53$; $F_{2,19}=8.30$, $p<0.003$; parcijalni $\eta^2=0.47$). Tako je primjerice vidljivo iz Tablice 4. da se 10-ti poslijeoperacijski dan u tretiranim skupinama (skupine A1 i B1) ligament mogao elongirati $2,8\pm0,4\text{mm}$ i $2,7\pm0,4\text{mm}$, 14-ti poslijeoperacijski dan $2,4\pm0,3\text{mm}$ i $2,3\pm0,4\text{mm}$, dok se u kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) 10-og poslijeoperacijskog dana mogao elongirati $2,4\pm0,6\text{mm}$ i $2,3\pm0,4\text{mm}$, a 14-og dana $1,9\pm0,5\text{mm}$ i $1,9\pm0,6\text{mm}$. Ti podaci jasno ukazuju na veću čvrstoću LCM-a u tretiranim skupinama eksperimentalnih životinja. Post-hoc usporedba pokazala je da su rezultati četrnaestog i dvadesetprvog dana statistički značajno niži od onih desetog dana, dok se oni međusobno ne razlikuju (Least significant difference test). Nije pronađen statistički značajan interakcijski učinak za dane mjerenja i skupine (Wilksov $\lambda=0.98$; $F_{6,38}=0.05$; $p>0.950$).

Dobiveni rezultati elongacije prikazani su kao aritmetička sredina (M) i grafički (slika 33.), i to linijskim grafikonom poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos tih rezultata, kako s obzirom na dan testiranja, tako i s obzirom na testirane skupine.



Slika 32. Grafički prikaz promjene aritmetičke sredine sile pucanja ligamenta (N) linijskim grafikonom obzirom na dan testiranja (10., 14. i 21. poslijeoperacijski dan) i ispitivane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2). Usporedba skupina pokazala je da su rezultati u kontrolnim skupinama A2 i B2, tj. u onima u kojima nije primjenjivan pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno niži od dobivenih rezultata u skupinama A1 i B1 ($F_{3,20}=23.29$; $*p<0.001$, parcijalni $\eta^2=0.78$; $n=6$).



Slika 33. Grafički prikaz promjene aritmetičke sredine elongacije ligamenta (mm) linijskim grafikonom obzirom na dan testiranja (10., 14. i 21. poslijeoperacijski dan) i ispitivane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2). Usporedba skupina pokazala je da su rezultati u kontrolnim skupinama A2 i B2, tj. u onima u kojima nije primjenjivan pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno niži od dobivenih rezultata u skupinama A1 i B1 ($F_{3,20}=4.51$; $*p<0.014$, parcijalni $\eta^2=0.41$; $n=6$).

4.2.3. Energija apsorbirana kod pucanja

Numerički podaci o energiji apsorbiranoj do trenutka pucanja ligamenta prilikom biomehaničkog testiranja izračunati su u granicama od 25 do 75% površine ispod dobivene krivulje opterećenje - produljenje i izraženi su u jedinici N·mm (vidi Tablica 4.).

Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju benefitni učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 na ispitivani biomehanički parametar energiju apsorbiranu kod pucanja. Naime, usporedba skupina pokazala je da su rezultati u skupinama A2 i B2, tj. u onima u kojima nije primjenjivan pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno niži od dobivenih rezultata u skupinama A1 i B1 ($F_{3,20}=15.90$; $p<0.001$, parcijalni $\eta^2=0.71$). S obzirom na dan mjerenja nađena je statistički značajna razlika u energiji apsorbiranoj kod pucanja (Wilksov $\lambda=0.48$; $F_{2,19}=10.30$; $p=0.001$, parcijalni $\eta^2=0.52$). Tako se iz rezultata prikazanih u Tablici 4. može uočiti da je u tretiranim skupinama životinja energija apsorbirana kod pucanja bila prosječno oko 30 Nmm 14-og i 21-og poslijeoperacijskog dana, dok je u kontrolnim skupinama iznosila oko 19 Nmm što jasno upućuje da se primjenom pentadekapeptida BPC 157 postiže znatno veća čvrstoća mjesta cijeljenja ligamenta. Post-hoc usporedba pokazala je da su dobiveni rezultati testiranja provedenog četrnaestog i dvadesetprvog dana statistički značajno viši od onih desetog poslijeoperacijskog dana, dok se oni sami međusobno ne razlikuju (Least significant difference test). Osim toga, statističkom analizom nije nađen statistički značajan interakcijski učinak za dane testiranja i skupine (Wilksov $\lambda=0.91$; $F_{6,38}=0.32$; $p=0.921$).

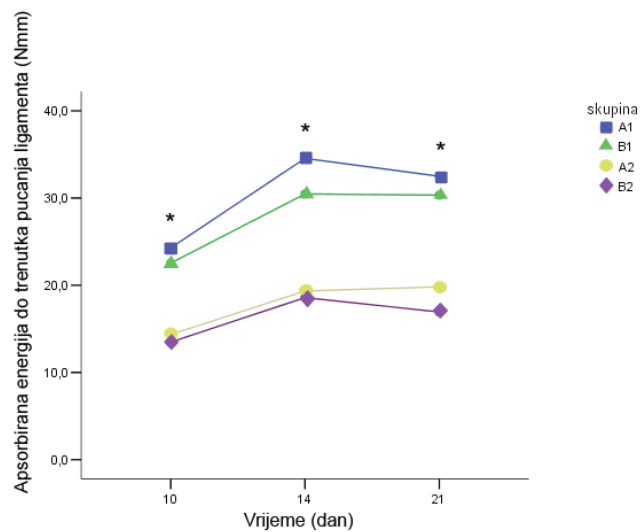
Dobiveni rezultati o energiji apsorbiranoj do trenutka pucanja LCM-a prilikom biomehaničkog testiranja prikazani su kao aritmetička sredina (M) i grafički (slika 34.), i to linijskim grafikonom poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos rezultata s obzirom na dan testiranja i testirane skupine.

4.2.4. Krutost

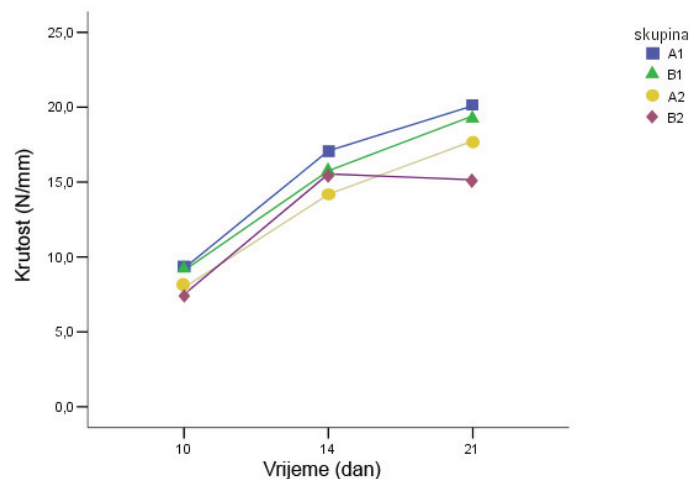
Numeričke vrijednosti krutosti su izračunate iz krivulje opterećenje – produljenje, i to je u stvari odnos između opterećenja i produljenja izmjeren ispod nagiba linearnog dijela dobivene krivulje, a izražava se u njutnima po milimetru (N/mm) (vidi Tablicu 4.). Uočljiv je porast numeričkih vrijednosti krutosti za sve skupine u svim promatranim vremenima testiranja.

Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 nema učinka na ispitivani biomehanički parametar krutost. Tako je primjerice vidljivo iz Tablice 4. da se i u tretiranim (skupine A1 i B1) i u kontrolnim skupinama eksperimentalnih životinja (skupine A2 i B2) vrijednosti dobivene za krutost 14-og i 21-og poslijeoperacijskog dana kreću između 15 i 20 N/mm. Osim toga, usporedba skupina pokazala je da razlike između skupina nisu statistički značajne ($F_{3,20}=2.45$, $p=0.093$). No, provedenom statističkom analizom pronašli smo statistički značajnu razliku s obzirom na dan mjerenja (Wilksov $\lambda=0.17$, $F_{2,19}=45.60$, $p<0.001$, parcijalni $\eta^2=0.83$), a post-hoc usporedba je pokazala da se rezultati četrnaestog i dvadesetprvog dana međusobno ne razlikuju, ali da su statistički značajno viši od rezultata desetog dana (Least significant difference test). Nije pronađen ni statistički značajan interakcijski učinak za dane mjerenja i skupine (Wilksov $\lambda=0.91$, $F_{6,38}=0.32$, $p=0.922$).

Rezultati su prikazani i grafički, i to linijskim grafikonom prikazujući samo aritmetičku sredinu (M) poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos rezultata s obzirom na dan testiranja i testirane skupine (slika 35.).



Slika 34. Promjena aritmetičke sredine apsorbirane energije do trenutka pucanja ligamenta (N·mm) prikazana linijskim grafikonom obzirom na dan testiranja (10., 14. i 21. poslijeoperacijski dan) i ispitivane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2). Usporedba skupina pokazala je da su rezultati u kontrolnim skupinama A2 i B2, tj. u onima u kojima nije primjenjivan pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno niži od dobivenih rezultata u skupinama A1 i B1 ($F_{3,20}=15.90$; $*p<0.001$, parcijalni $\eta^2=0.71$; $n=6$).



Slika 35. Promjene krutosti ligamenta (N/mm) obzirom na dan testiranja (10., 14. i 21. poslijeoperacijski dan) i ispitivane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2) prikazane su linijskim grafikonom. Točke su aritmetičke sredine. Usporedba skupina pokazala je da razlike između skupina nisu statistički značajne ($F_{3,20}=2.45$; $p=0.093$; $n=6$).

4.3. Makroskopska procjena

Za makroskopsku procjenu cijeljenja ligamenta promatran je i opisan izgled medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM), mjesto cijeljenja ligamenta te izgled okolnih anatomskih struktura. Presječeni krajevi LCM-a vrlo se jasno mogu identificirati prvog i trećeg dana po kirurškoj transekciji. Samo mjesto cijeljenja ligamenta je na dnu ispunjeno hematomom. Ligament je zadebljan, edematozan, i to i iznad i ispod mjesta presijecanja. To je zadebljanje izrazitije u kontrolnim skupinama životinja (skupine A2 i B2), tj. u životinja koje nisu dobivale pentadekapeptid BPC 157. Osim toga, LCM se doima zamućenim, izgubio je svoju providnost, a i boja mu je potpuno drugačija od one zdravog ligamenta. U okolnome se tkivu nalazi krvi.

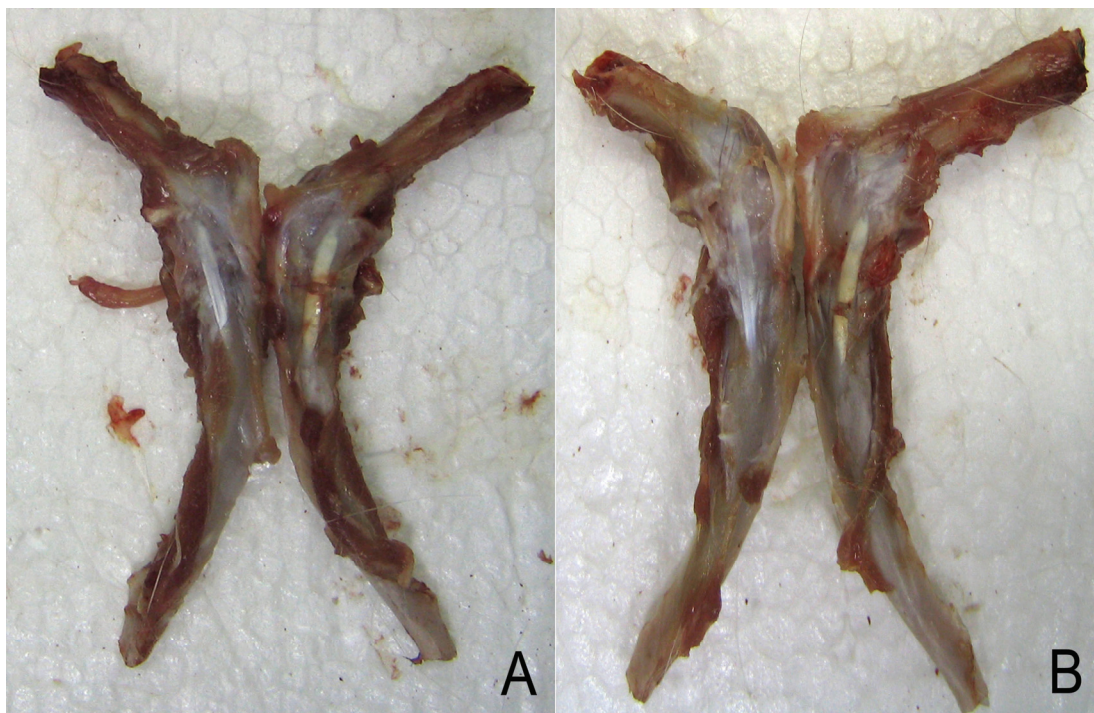
Petog poslijeoperacijskog dana zamjećuje se ispunjavanje mjesta cijeljenja ugruškom s tračcima fibrina, a već sedmog poslijeoperacijskog dana ono je u potpunosti ispunjeno tim tkivom te se dobija dojam cjelovitosti ligamenta. Presječeni se krajevi ligamenta i u tom razdoblju vrlo lako mogu identificirati, ali oni više nisu tako jasno ograničeni kao prvog i trećeg poslijeoperacijskog dana. Upravo se u tom detalju jasno razlikuju skupine životinja koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) od kontrolnih skupina (skupine A2 i B2). Naime, ti presječeni krajevi LCM-a u kontrolnim su skupinama znatno nepravilniji i edematozniji. Osim toga, u životinja koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 znatno je jače izražena pojava hemoragičnoga tkiva na rubnome području cijeljenja. Iako je LCM i nadalje zadebljan i edematozan, on je to znatno manje no prvog i trećeg poslijeoperacijskog dana, a valja naglasiti da od sedmog poslijeoperacijskog dana postaje na svojim hvatištima providan i u tome segmentu sve sličniji zdravom LCM-u. Tkivo u okolini LCM-a je blago edematozno i još se u tom području nalazi i krvi. U ovome se razdoblju zamjećuje tijekom prepariranja u kontrolnim skupinama životinja pojava znatne fibrozacije okolnoga tkiva koja se očituje vrlo teškim odvajanjem okolnog tkiva i fascije od LCM-a.

Mjesto cijeljenja desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana je i nadalje očito, a ispunjeno je novostvorenim vlaknastim tkivom koje je providno ali i neznatno tamnije od ostatka ligamenta. To je tkivo u ravnini s

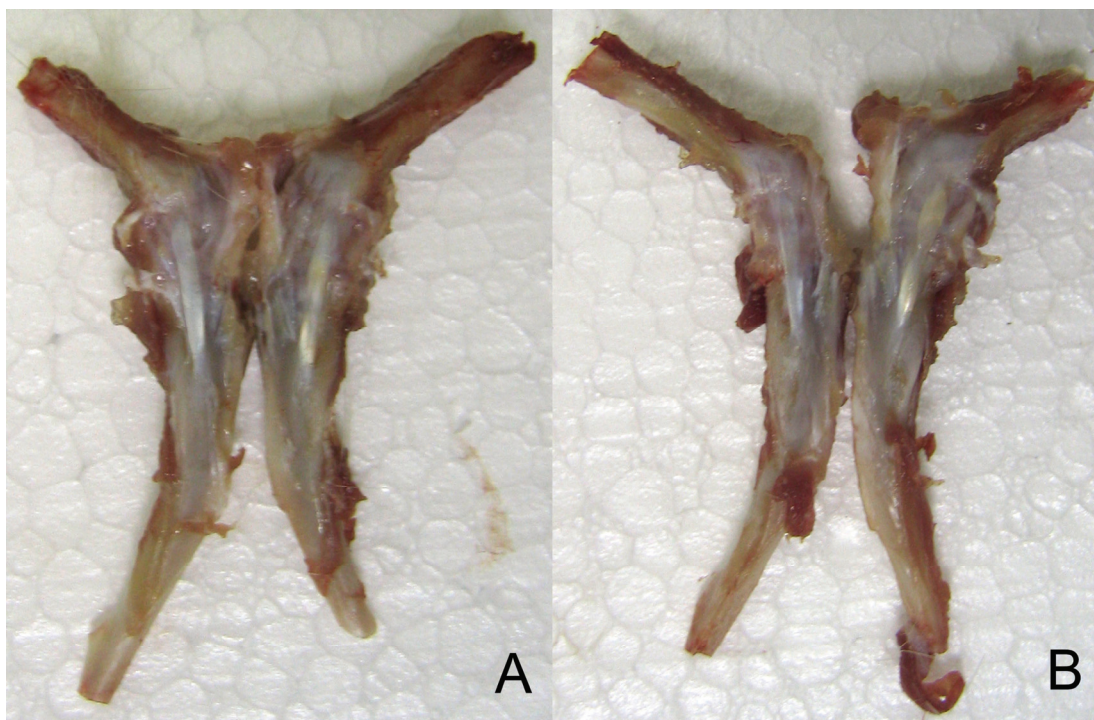
ligamentom i iznad i ispod mjesta presijecanja i dobija se dojam znatno veće čvrstoće tog tkiva od onoga u ranijim razdobljima promatranja. Rubovi na mjestu presijecanja LCM-a sve se teže jasno identificiraju. Iako se u pojedinim životinja koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) još desetog poslijeoperacijskog dana na rubovima mjesta cijeljenja nalazi hemoragičnog tkiva više no u kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2), ipak se od četrnaestog dana to tkivo na rubovima više ne nalazi. Trend smanjivanja edematoznosti presječenog LCM-a se nastavlja i u ovome promatranome razdoblju, a hvatišta postaju gotovo identična hvatištima zdravog LCM-a i u veličini i u providnosti. Tkivo u okolini presječenog LCM-a još je neznatno edematoznije od onoga oko zdravog LCM-a. I u ovome je promatranome razdoblju prepariranje kontrolnih skupina životinja bilo otežano poradi veće prisutnosti adhezija u tkivima oko LCM-a.

Dvadesetprvog, kao i dvadesetosmog poslijeoperacijskog dana više se ne mogu identificirati presječeni krajevi LCM-a. Mjesto cijeljenja je u potpunosti ispunjeno novostvorenim vlaknastim tkivom koje je providno i sve sličnije ostatku ligamenta. Ono je posve u razini s ostatkom ligamenta koji se više ne doima edematoznim i konačno postaje u veličini sličan zdravome ligamentu. Osim toga, i nadalje se čitav ligament doima zamućenijim i tamnijim u usporedbi sa zdravim ligamentom. U ovom promatranom razdoblju više se nije našlo nekih očitih makroskopskih razlika između skupina koje su primale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) i kontrolnih skupina životinja (skupine A2 i B2), no i nadalje je prepariranje kontrolnih skupina životinja bilo otežano poradi veće prisutnosti adhezija u tkivima oko LCM-a.

U eksperimentalnih životinja koje su žrtvovane dva i tri mjeseca nakon kirurškog presijecanja LCM nije zapaženo nikakvih razlika između tih i zdravih ligamenta u izgledu i boji, i to bez obzira dali su pripadali skupinama koja su primale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) ili je pak riječ o kontrolnim skupinama životinja (skupine A2 i B2). Mjesto cijeljenja se, kao i presječeni krajevi LCM-a, više ne razaznaje. No, i u ovom promatranome razdoblju prepariranje kontrolnih skupina životinja bilo je otežano poradi veće prisutnosti adhezija u tkivima oko LCM-a.



Slika 36. Preparati obje stražnje noge eksperimentalne životinje načinjeni za potrebe makroskopske procjene po žrtvovanju koje je činjeno dekapitacijom giljotinom. S lijeve strane postavljen je preparat stražnje lijeve noge, dočim se desno uvijek postavlja preparat stražnje desne noge te se na taj način omogućuje usporedba zdravog LCM-a s prethodno presječenim LCM-om desne noge na kojem se analizira još i samo mjesto cijeljenja. A) Na slici se vide tako načinjeni preparati iz tretirane skupine životinja (skupina A1 - životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10µg/kgTT) po žrtvovanju koje je načinjeno trećeg poslijeoperacijskog dana. B) Na slici se vide tako načinjeni preparati iz kontrolne skupine životinja (skupina A2 - životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale fiziološku otopinu) po žrtvovanju koje je načinjeno trećeg poslijeoperacijskog dana. Fotografije su snimljene pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.



Slika 37. Preparati obje stražnje noge eksperimentalne životinje načinjeni za potrebe makroskopske procjene po žrtvovanju koje je činjeno dekapitacijom giljotinom. S lijeve strane postavljen je preparat stražnje lijeve noge, dočim se desno uvijek postavlja preparat stražnje desne noge te se na taj način omogućuje usporedba zdravog LCM-a s prethodno presječenim LCM-om desne noge na kojem se analizira još i samo mjesto cijeljenja. A) Na slici se vide tako načinjeni preparati iz tretirane skupine životinja (skupina B1 - životinje koje su dobivale vodu za piće u kojoj je bilo otopljeno 300 µg/l pentadekapeptida BPC 157) po žrtvovanju koje je načinjeno dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana. B) Na slici se vide tako načinjeni preparati iz kontrolne skupine životinja (skupina B2 - životinje koje su dobivale samo čistu vodu za piće) po žrtvovanju koje je načinjeno dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana. Fotografije su snimljene pomoću digitalnog fotoaparata Canon DIGITAL IXUS II.

4.4. Mikroskopska procjena

4.4.1. Bojanje hemalaun-eozinom (HE)

Prvog i trećeg poslijeoperacijskog dana se na preparatima obojenim hemalaun-eozinom u području defekta nastalnog presjecanjem LCM-a nalaze ekstravazati eritrocita uz prisustvo neutrofila, a prisutni su i tračci fibrina koji su nešto gušći u skupinama A1 i B1, tj. u onim skupinama koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157. Petog se poslijeoperacijskog dana u tom području nalaze debele niti fibrina uz mjestimično prisustvo kolagenih niti te rijetki vaskularni prostori što odgovara početnom granulacijskom tkivu. To je tkivo osobito izraženo u preparatima skupina koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157.

Od sedmog poslijeoperacijskog dana granulacijsko se tkivo nalazi u svim promatranim preparatima. No, zastupljenost gustih kolagenih snopova koji se zamjećuju nakon desetog, a osobito nakon četrnaestog poslijeoperacijskog dana, i koji postupno premoštavaju defekt znatno je veća u preparatima skupina koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1). Valja istaknuti da se broj vaskularnih prostora u preparatima skupina koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 postupno ali kontinuirano smanjivao za razliku od kontrolnih skupina u kojih je zamjećeno brže inicijalno smanjivanje broja vaskularnih prostora ali i pojava novog «pika» četrnaestog poslijeoperacijskog dana iza kojega je slijedilo ponovno naglo smanjivanje njihovoga broja. Broj neutrofila u obje skupine vrlo brzo pada, i to već od sedmog poslijeoperacijskoga dana, a valja naglasiti da i prisustvo mononuklearnih upalnih stanica nije osobito izraženo. Od dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana u gotovo svim promatranim preparatima vidljivo je da je uspostavljen kontinuitet LCM-a bez uočljivih razlika između skupina na razini standardnog HE preparata.

4.4.2. Bojanje po Gomoriju (Gömöry)

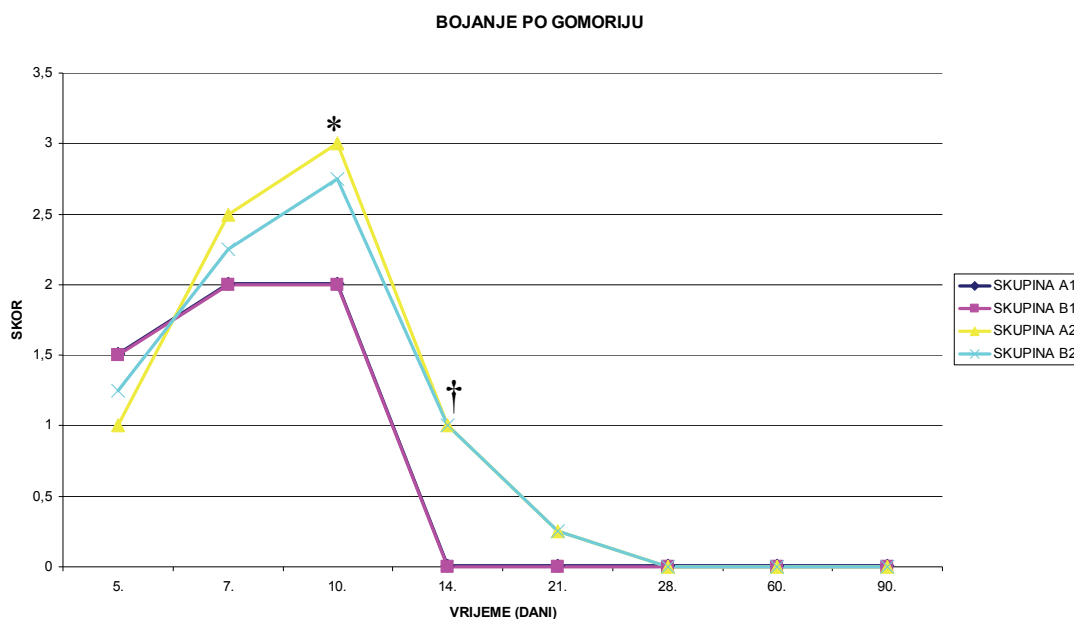
Dobiveni rezultati nakon analize i skoriranja histoloških preparata impregniranih srebrom po Gomoriju (Gömöry) prikazani su u tablici 6. medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), a isti su prikazani i grafički, i to linijskim grafikonom poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos rezultata s obzirom na poslijeoperacijski dan i testirane skupine (slika 38.).

Tablica 6. Rezultati nakon analize i ocjene ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) histoloških preparata impregniranih srebrom po Gomoriju prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), i to kako s obzirom na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2) tako i s obzirom na promatrane poslijeoperacijske dane.

POSILIJEOPERACIJSKI DAN	BOJANJE PO GOMORIJU			
	SKUPINA A1 (n=6)	SKUPINA B1 (n=6)	SKUPINA A2 (n=6)	SKUPINA B2 (n=6)
	$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$
5.	1.5 ± 1.2	1.5 ± 1.1	1.0 ± 1.0	1.2 ± 1.0
7.	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.5 ± 1.0	2.2 ± 1.0
10.	$2.0 \pm 0.1 \dagger$	$2.0 \pm 0.2 \dagger$	3.0 ± 1.0	2.7 ± 1.0
14.	$0.0 \pm 0.5 \dagger$	$0.0 \pm 0.1 \dagger$	1.0 ± 1.1	1.0 ± 0.7
21.	0.0 ± 0.5	0.0 ± 0.1	0.2 ± 1.0	0.2 ± 0.6
28.	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.6	0.0 ± 0.5
60.	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2
90.	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2

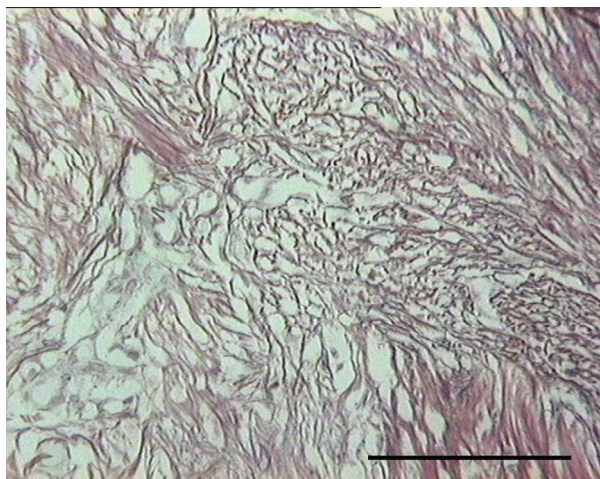
$C \pm Q$ medijan $\pm$ interkvartilni raspon

$\dagger$ statistički značajne razlike u odnosu na skupine A2 i B2 (Kruskal-Wallis test)

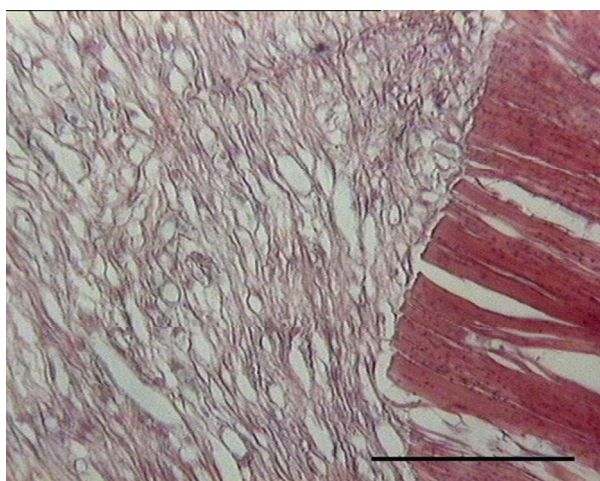


Slika 38. Stupanj gustoće retikulinskih vlakana ocjenjen ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) na histološkim preparatima impregniranim srebrom po Gomoriju, a prikazan s obzirom na promatrane poslijeoperacijske dane i na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2). Točke označavaju medijan 6 životinja po skupini. Kruskal-Wallis test, * $p=0.038$, † $p=0.011$.

Provedenom statističkom analizom (Kruskal-Wallis test) pronađena je statistički značajna razlika u zastupljenosti retikulinskih vlakana u vidnom polju za deseti poslijeoperacijski dan (tretirane su skupine imale za taj dan skor $2,0 \pm 0,1$ i $2,0 \pm 0,2$, a kontrolne $3,0 \pm 1,0$ i $2,7 \pm 1,0$; $n=6$; $p=0,038$), kao i za četrnaesti poslijeoperacijski dan (tretirane su skupine imale za taj dan skor $0,0 \pm 0,5$ i $0,0 \pm 0,1$, a kontrolne $1,0 \pm 1,1$ i $1,0 \pm 0,7$; $n=6$; $p=0,011$). Post-hoc usporedbe pokazale su da su u desetome poslijeoperacijskome danu rezultati dobiveni za skupinu A1 (životinje koje su intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157) bili statistički značajno niži od rezultata kontrolne skupine A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.045$). No, u odnosu na drugu kontrolnu skupinu B2 pronađena razlika nije dostigla statističku značajnost (Mann-Whitney U test; $p=0.058$), a to je vjerojatno posljedica malih skupina a ne stvarnog nepostojanja razlika. Rezultati skupine B1



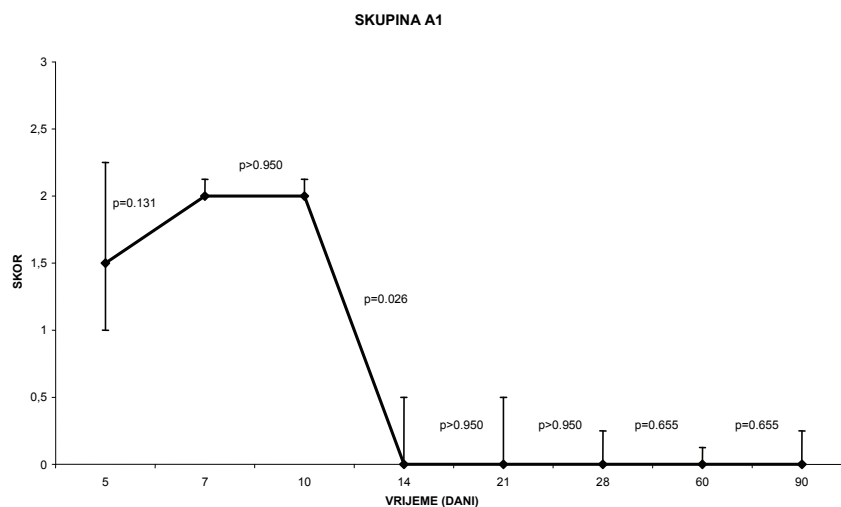
Slika 39. Prikaz uzdužnog presjeka medijalnog kolateralnog ligamenta štakora (LCM) uz rub transekcije iz kontrolne skupine eksperimentalnih životinja (skupina B2 – životinje koje su dobivale čistu vodu za piće) koje su žrtvovane sedmog poslijeoperacijskog dana. Preparat je bojan po Gomoriju uz povećanje x25, a snimljen je pomoću kamere JVC TK-1270. Kolagen tip III prikazan je gracilnim crnim linijama, dok je kolagen tip I prikazan debljim smeđim linijama. Horizontalna linija na slici označava 100 μ m.



Slika 40. Prikaz uzdužnog presjeka medijalnog kolateralnog ligamenta štakora (LCM) uz rub transekcije iz tretirane skupine eksperimentalnih životinja (skupina A1 – životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 μ g/kgTT) koje su žrtvovane sedmog poslijeoperacijskog dana. Preparat je bojan po Gomoriju uz povećanje x25, a snimljen je pomoću kamere JVC TK-1270. Kolagen tip III prikazan je gracilnim crnim linijama, dok je kolagen tip I prikazan debljim smeđim linijama. Horizontalna linija na slici označava 100 μ m.

(životinje koje su peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157) bili su u tom desetome poslijeoperacijskome danu statistički značajno niži od rezultata obje kontrolne skupine, skupina B1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.047$) i skupina B1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.036$). Nadalje su te post-hoc usporedbe pokazale da su za skupinu A1 u četrnaestome poslijeoperacijskome danu dobiveni statistički značajno niži rezultati od rezultata u obje kontrolne skupine, skupina A1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.029$) i skupina A1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.028$). U tom četrnaestome poslijeoperacijskome danu su i za skupinu B1 dobiveni statistički značajno niži rezultati od onih u obje kontrolne skupine, skupina B1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.026$) i skupina B1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.016$). U tim navedenim danima (deseti i četrnaesti poslijeoperacijski dan) nije bilo statistički značajnih razlika između skupina A1 i B1, kao niti između skupina A2 i B2.

Također smo za svaku ispitivanu skupinu posebno ispitali statističku značajnost razlika u vrijednostima histoloških procjena ovisno o vremenu proteklome od kirurškog presijecanja LCM-a. Za sve četiri skupine pronađene su statistički značajne razlike u vrijednostima procjena histoloških preparata impregniranih srebrom po Gomoriju (Friedmanov test; $p<0.001$ za sve usporedbe). U skupini A1 (životinje koje su intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157) nije bilo statistički značajnih razlika u vrijednostima dobivenim do desetog poslijeoperacijskog dana. Nakon tog dana došlo je do statistički značajnog pada (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova; $p=0.026$), a nakon četrnaestog poslijeoperacijskog dana ponovno nije bilo statistički značajnih promjena (slika 41.). Isti trend rezultata, a to je nepromijenjen do desetog poslijeoperacijskog dana, zatim pad do četrnaestog dana i onda zadržavanje na tim vrijednostima, dobiven je i u prostalet tri promatrane skupine – Skupine A2, B1 i B2.



Slika 41. Prikaz vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona dobivenog nakon analize i ocjene ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) histoloških preparata impregniranih srebrom po Gomoriju za skupinu A1 (skupina eksperimentalnih životinja koja je intraperitonealnom primjenom dobivala pentadekapeptid 157 u dozi od 10 μ g/kg TT) u osam promatranih vremenskih točaka. P-vrijednosti odnose se na usporedbe susjednih vremenskih točaka (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova).

4.4.3. Bojanje po Malloryu

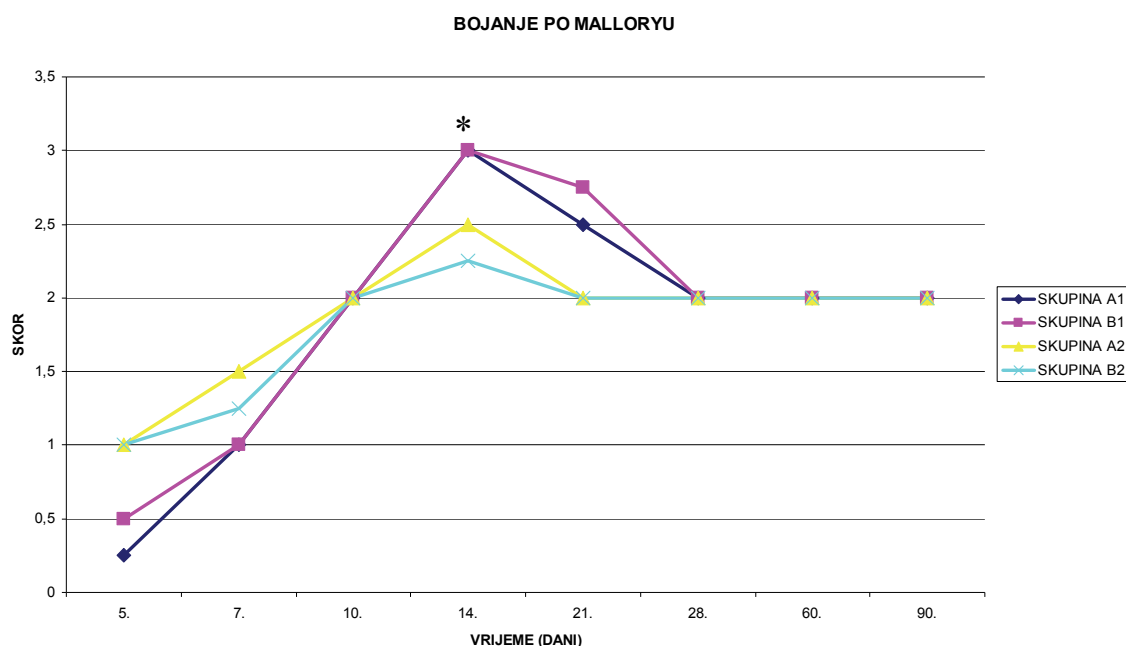
Dobiveni rezultati nakon analize i skoriranja histoloških preparata bojanih metodom po Malloryu za ocjenjivanje prisustva kolagena tip I prikazani su u tablici 7. medijanom i interkvartilnim rasponom ($C\pm Q$), a isti su prikazani i grafički, i to linijskim grafikonom poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos rezultata s obzirom na poslijeoperacijski dan i testirane skupine (slika 42.).

Tablica 7. Rezultati nakon analize i ocjene ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) histoloških preparata bojanih metodom po Malloryu prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom ($C\pm Q$), i to kako s obzirom na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2) tako i s obzirom na promatrane poslijeoperacijske dane.

POSILIJEOPERACIJSKI DAN	BOJANJE METODOM PO MALLORYU			
	SKUPINA A1 (n=6)	SKUPINA B1 (n=6)	SKUPINA A2 (n=6)	SKUPINA B2 (n=6)
	$C\pm Q$	$C\pm Q$	$C\pm Q$	$C\pm Q$
5.	0.2±0.6	0.5±0.6	1.0±2.0	1.0±1.6
7.	1.0±1.2	1.0±1.0	1.5±1.0	1.2±1.0
10.	2.0±0.2	2.0±0.6	2.0±1.2	2.0±1.1
14.	3.0±0.2†	3.0±0.6†	2.5±0.6	2.2±0.6
21.	2.5±1.0	2.7±1.0	2.0±0.5	2.0±0.5
28.	2.0±1.0	2.0±0.6	2.0±1.0	2.0±1.0
60.	2.0±0.5	2.0±0.2	2.0±0.5	2.0±0.4
90.	2.0±0.5	2.0±0.9	2.0±1.5	2.0±1.2

$C\pm Q$ medijan±interkvartilni raspon

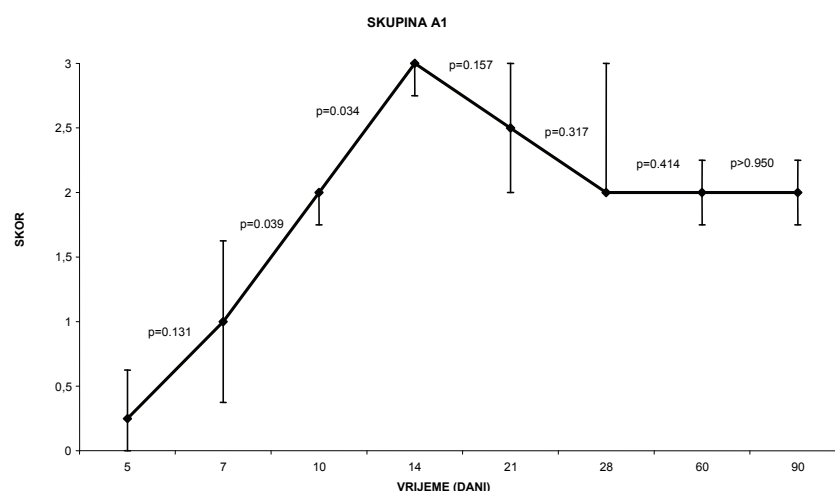
†statistički značajne razlike u odnosu na skupine A2 i B2 (Kruskal-Wallis test)



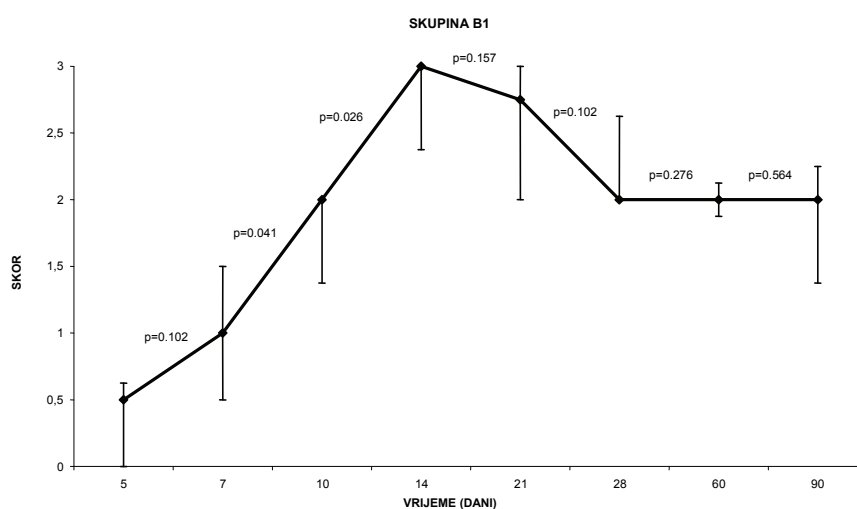
Slika 42. Prisustvo kolagena tip I ocjenjeno ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) na histološkim preparatima bojanim metodom po Malloryu i prikazano s obzirom na promatrane poslijeoperacijske dane i na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2). Točke označavaju medijan 6 životinja po skupini. Kruskal-Wallis test, * $p=0.011$.

Provedenom statističkom analizom (Kruskal-Wallis test) pronađena je statistički značajna razlika u histološkom nalazu preparata bojanih metodom po Malloryu između četiri ispitivane skupine za četrnaesti poslijeoperacijski dan (tretirane skupine imale su za taj dan skor $3,0 \pm 0,2$ i $3,0 \pm 0,6$, a kontrolne $2,5 \pm 0,6$ i $2,2 \pm 0,6$; $n=6$; $p=0.011$). Post-hoc usporedbama ustanovljeno je da su rezultati u skupini A1 (životinje koje su intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157) bili statistički značajno viši od rezultata u obje kontrolne skupine, skupina A1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.022$) i skupina A1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.018$). Tom je usporedbom ustanovljeno i da su rezultati u skupini B1 (životinje koje su peroralnom primjenom dobivale BPC 157) bili statistički značajno viši od rezultata u obje kontrolne skupine, skupina B1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.037$) i skupina B1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.049$). Nije bilo međusobnih razlika između skupina A1 i B1, kao niti između kontrolnih skupina A2 i B2.

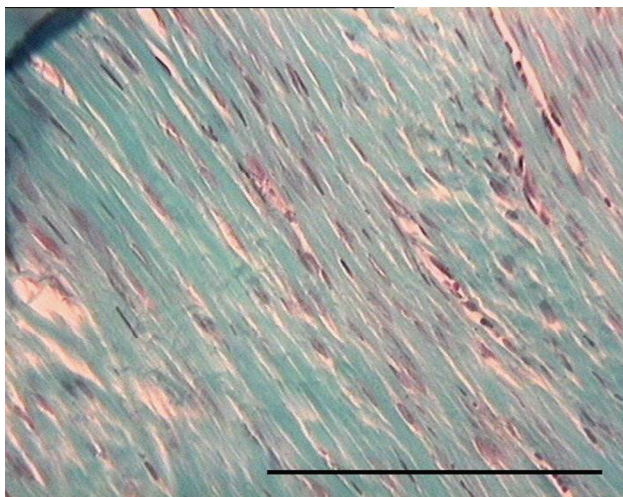
Ispitivanjem razlika u vrijednostima histoloških procjena ovisno o vremenu proteklom od kirurškog presijecanja LCM-a ustanovljeno je da je u svim skupinama došlo do statistički značajnih promjena u funkciji vremena (Friedmanov test; $p < 0.01$ za skupine A1 i B1, $p = 0.029$ za skupinu A2, a $p = 0.031$ za skupinu B2). Za obje skupine eksperimentalnih životinja koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157, bilo intraperitonealnom (skupina A1), bilo peroralnom primjenom (skupina B1), pronađen je statistički značajan porast vrijednosti dobivenih analizom histoloških preparata, i to između sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana te između desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova; $p = 0.039$ za skupinu A1 između sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana te $p = 0.034$ za skupinu A1 između desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana, a $p = 0.041$ za skupinu B1 između sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana te $p = 0.026$ za skupinu B1 između desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana) (slike 43. i 44.). U kontrolnim skupinama, skupina A2 i skupina B2, nisu pronađene statistički značajne razlike između susjednih vremenskih točaka. Ipak, u te dvije skupine pronađene su statistički značajne razlike između vrijednosti petog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova; $p = 0.027$ za skupinu A2, a $p = 0.022$ za skupinu B2).



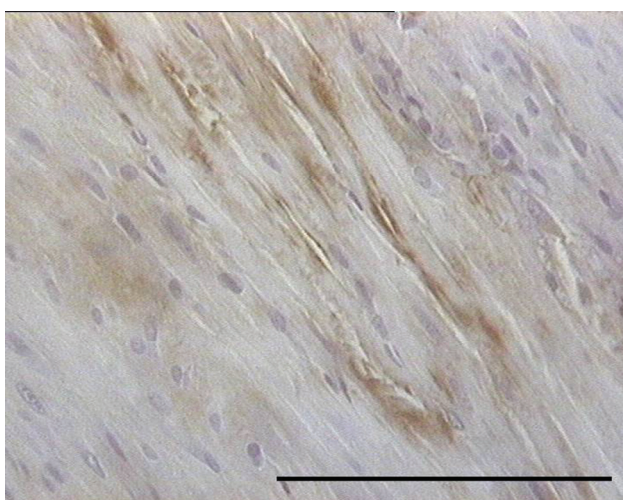
Slika 43. Prikaz vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona dobivenog nakon analize i ocjene ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) histoloških preparata bojanih metodom po Malloryu za skupinu A1 (skupina eksperimentalnih životinja koja je intraperitonealnom primjenom dobivala pentadekapeptid 157 u dozi od 10 μ g/kg TT) u osam promatranih vremenskih točaka. P-vrijednosti odnose se na usporedbe susjednih vremenskih točaka (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova).



Slika 44. Prikaz vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona dobivenog nakon analize i ocjene ocjenskom ljestvicom (SKOR 0-3) histoloških preparata bojanih metodom po Malloryu za skupinu B1 (skupina eksperimentalnih životinja koja je peroralnom primjenom u vodi za piće dobivala pentadekapeptid BPC 157 koji je otopljen u dozi 300 μ g/l) u osam promatranih vremenskih točaka. P-vrijednosti odnose se na usporedbe susjednih vremenskih točaka (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova).



Slika 45. Prikaz uzdužnog presjeka medijalnog kolateralnog ligamenta štakora (LCM) uz rub transekcije iz kontrolne skupine eksperimentalnih životinja (skupina A2 – životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale fiziološku otopinu) koje su žrtvovane četrnaestog poslijeoperacijskog dana. Preparat je bojan po Malloryu uz povećanje x40, a snimljen je pomoću kamere JVC TK-1270. Kolagen tip I prikazan je debljim zelenkastim linijama između kojih su vidljivi vaskularni prostori. Horizontalna linija na slici označava 100 μm .



Slika 46. Prikaz vaskularnih prostora na uzdužnom presjeku medijalnog kolateralnog ligamenta štakora (LCM) uz rub transekcije iz tretirane skupine eksperimentalnih životinja (skupina A1 – životinje koje su jednom dnevno intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 $\mu\text{g/kgTT}$) koje su žrtvovane sedmog poslijeoperacijskog dana. Preparat bojan protutijelom na CD 34 uz povećanje x40, a snimljen je pomoću kamere JVC TK-1270. Endotelne stanice pokazuju pozitivnu reakciju. Horizontalna linija na slici označava 100 μm .

4.4.4. Imunohistokemijsko bojanje protutijelom na CD 34

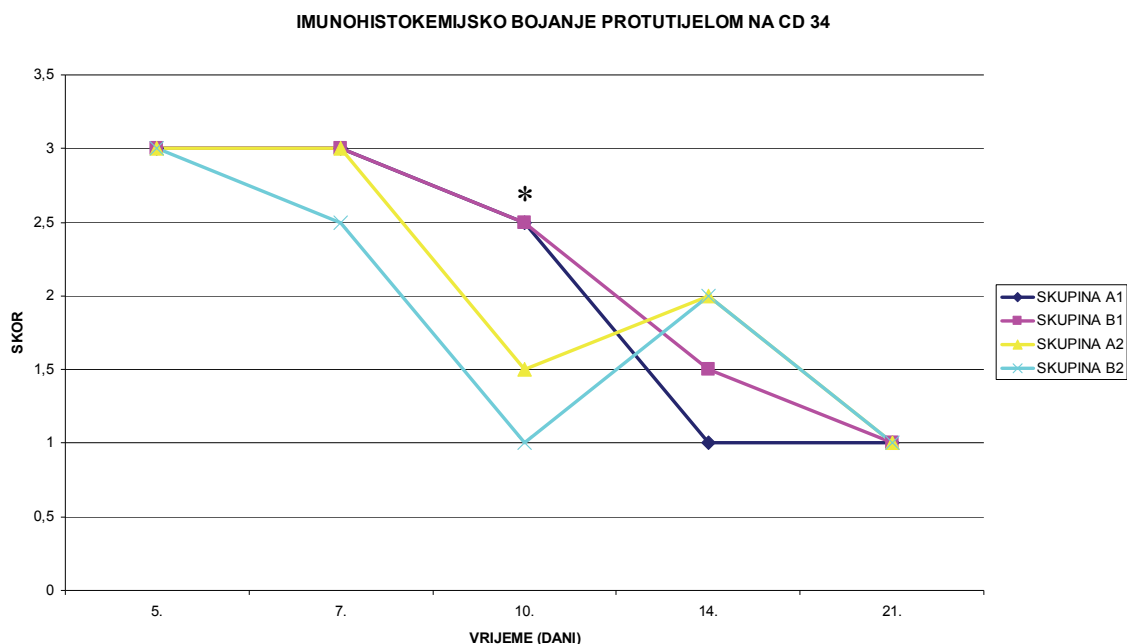
Dobiveni rezultati nakon analize i skoriranja histoloških preparata bojanih protutijelom na CD 34 za analizu krvnih žila prikazani su u tablici 8. medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), a isti su prikazani i grafički, i to linijskim grafikonom poradi jasnijeg uvida u međusobni odnos rezultata s obzirom na poslijeoperacijski dan i testirane skupine (slika 47.).

Tablica 8. *Rezultati nakon analize i ocjene ocjenskom ljestvicom (SKOR 1-3) histoloških preparata bojanih protutijelom na CD 34 za procjenu broja vaskularnih prostora u vidnom polju prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom ($C \pm Q$), i to kako s obzirom na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2) tako i s obzirom na promatrane poslijeoperacijske dane.*

POSILIJEOPERACIJSKI DAN	IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE PROTUTIJELOM NA CD 34			
	SKUPINA A1 (n=6)	SKUPINA B1 (n=6)	SKUPINA A2 (n=6)	SKUPINA B2 (n=6)
	$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$	$C \pm Q$
5.	3.0±1.0	3.0±1.0	3.0±1.0	3.0±1.0
7.	3.0±1.0	3.0±1.0	3.0±1.0	2.5±1.0
10.	2.5±1.0†	2.5±1.0†	1.5±1.0	1.0±1.0
14.	1.0±1.0	1.5±1.0	2.0±0.5	2.0±0.5
21.	1.0±0.2	1.0±1.0	1.0±0.2	1.0±1.0

$C \pm Q$ medijan±interkvartilni raspon

†statistički značajne razlike u odnosu na skupine A2 i B2 (Kruskal-Wallis test)



Slika 47. Prisustvo vaskularnih prostora ocjenjeno ocjenskom ljestvicom (SKOR 1-3) na histološkim preparatima bojanim protutijelom na CD 34 i prikazano s obzirom na promatrane poslijeoperacijske dane i na testirane skupine eksperimentalnih životinja (tretirane skupine A1 i B1 i kontrolne skupine A2 i B2). Točke označavaju medijan 6 životinja po skupini. Kruskal-Wallis test, * $p=0.005$.

Provedenom statističkom analizom (Kruskal-Wallis test) pronađena je statistički značajna razlika u broju vaskularnih prostora u vidnom polju histoloških preparata između četiri ispitivane skupine za deseti poslijeoperacijski dan (tretirane skupine A1 i B1 imale su taj poslijeoperacijski dan skor $2,5 \pm 1,0$ i $2,5 \pm 1,0$, dok je u kontrolnim skupinama A2 i B2 iznosio $1,5 \pm 1,0$ i $1,0 \pm 1,0$; $n=6$; $p=0.005$). Post-hoc usporedbama ustanovljeno je da su rezultati u skupini A1 (životinje koje su intraperitonealnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157) bili statistički značajno viši od rezultata dobivenih u obje kontrolne skupine, skupina A1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.019$) i skupina A1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.011$). Tom je usporedbom ustanovljeno i da su rezultati u skupini B1 (životinje koje su peroralnom primjenom dobivale BPC 157) bili statistički značajno viši od rezultata dobivenih u obje kontrolne skupine, skupina B1 vs. skupina B2 (Mann-Whitney U test; $p=0.011$) i skupina B1 vs. skupina A2 (Mann-Whitney U test; $p=0.019$). U tom vremenu mjerenja nije bilo

međusobnih razlika između skupina A1 i B1, kao niti između kontrolnih skupina A2 i B2.

Ispitivanjem razlika u vrijednostima histoloških procjena ovisno o vremenu proteklom od kirurškog presijecanja LCM-a ustanovljeno je da je u svim skupinama došlo do statistički značajnih promjena u funkciji vremena (Friedmanov test; $p=0.002$ za skupinu A1, $p=0.009$ za skupinu B1, a $p=0.004$ za skupine A2 i B2). Iako niti u jednoj skupini nije bilo statistički značajnih razlika u susjednim točkama mjerenja, ipak su za skupine A1 i B1 pronađene statistički značajne razlike između vrijednosti dobivenih u početnim točkama mjerenja (peti i sedmi poslijeoperacijski dan) u odnosu na vrijednosti dobivene u završnoj točki mjerenja dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova; $p=0.038$ za usporedbu 5. i 21. dana u obje skupine, a $p=0.024$ za usporedbu 7. i 21. dana u obje skupine). U skupini A2 vrijednosti dobivene petog i sedmog poslijeoperacijskog dana statistički su se značajno razlikovale od vrijednosti dobivenih dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova; $p=0.034$ za usporedbu 5. i 21. dana, a $p=0.024$ za usporedbu 7. i 21. dana), dok su se u skupini B2 statistički značajno razlikovale vrijednosti dobivene petog poslijeoperacijskog dana od vrijednosti dobivenih desetog i dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana (Wilcoxonov test ekvivalentnih parova; $p=0.034$ za usporedbu 5. i 10. dana, a $p=0.024$ za usporedbu 5. i 21. dana).

5. RASPRAVA

Osvrt na rezultate provedenog istraživanja

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157, i to bilo parenteralna bilo peroralna, zaista poboljšava cijeljenje kirurški načinjene ozljede LCM-a koljena u štakora. To je razvidno kako iz rezultata praćenja kliničko-funkcionalnih pokazatelja, tako i iz rezultata biomehaničkog testiranja te analize histoloških preparata. Usporedbe skupina pokazale su da se eksperimentalne skupine A1 i B1, tj. one koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 intraperitonealnom primjenom u dozi 10 µg/kg TT (skupina A1), odnosno one koje su dobivale peroralnom primjenom u vodi za piće u dozi od 300 µg/ml vode za piće (skupina B1), statistički značajno razlikuju od kontrolnih skupina A2 i B2 u oba promatrana parametra funkcionalnog oporavka (tablice 2. i 3.). Naime, u skupinama A2 i B2, tj. u skupinama koje nisu dobivale pentadekapeptid BPC 157, razvila se nakon kirurškog zahvata i presijecanja LCM-a kontraktura koljena koja je i zaostala do kraja praćenja za razliku od skupina A1 i B1 u kojima životinje nakon kirurškog zahvata nisu niti razvile kontrakturu koljena (slike 19. do 28.). Isto je tako tijekom čitavog razdoblja praćenja bio jasno vidljiv deficit motoričke funkcije u kontrolnim skupinama A2 i B2 koji je praćen i testiran testom pritiska ekstenzora (slike 9. do 18.).

Prilikom biomehaničkog testiranja preparata kost–ligament–kost dobivena je karakteristična krivulja odnosa opterećenja i produljenja, kao i numeričke vrijednosti sile pucanja izražene u njutnima (N), te numeričke vrijednosti elongacije ligamenta izražene u milimetrima (mm). Iz tih su vrijednosti izračunata i druga dva parametra koja prikazuju strukturalne osobine ligamenta, a to su energija apsorbirana do trenutka pucanja (N·mm), te krutost (N/mm), i to na način da su korištene vrijednosti dobivene u granicama od 25 do 75% površine ispod dobivene krivulje. Analizom dobivenih rezultata biomehaničkog testiranja dobivene su statistički značajne

razlike između skupina koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) od kontrolnih skupina (skupine A2 i B2) u tri parametra - sili pucanja, elongaciji te energiji apsorbiranoj do trenutka pucanja, i to za svako od tri mjerenja koja su bila provedena desetog, četrnaestog te dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana (tablica 4. te slike 32. do 35.).

Osim standardnog bojanja preparata hemalaun-eozinom dodatni su rezovi obojani metodom po Malloryu za prikaz zrelog veziva (kolagen tip I) te impregnacijom srebrom po Gomoriju za prikaz nezrelog veziva (kolagen tip III). Za analizu krvnih žila koristilo se imunohistokemijsko bojanje na CD 34. Dobiveni rezultati nakon analize i skoriranja tako načinjenih histoloških preparata pokazali su da je u skupinama koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) statistički značajno veći udio kolagena tip I četrnaestog poslijeoperacijskog dana, te statistički značajno manji udio kolagena tip III desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana u usporedbi s kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) (tablice 6. i 7. te slike 38. i 42.). Osim toga, analiza histoloških preparata bojanih protutijelom na CD 34 pokazala je da skupine koje su primale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) imaju statistički značajno veći broj vaskularnih prostora deseti poslijeoperacijskog dana od kontrolnih skupina (skupine A2 i B2) (tablica 8. i slika 47.). No, još valja istaknuti i pojavu da se broj vaskularnih prostora u skupinama koje su primale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) postupno ali kontinuirano smanjivao za razliku od kontrolnih skupina (skupine A2 i B2) u kojih je zabilježeno brže inicijalno smanjivanje broja vaskularnih prostora ali i ponovno povećanje broja vaskularnih prostora, tj. pojava novog «pika» četrnaestog poslijeoperacijskog dana iza kojeg je slijedilo ponovno smanjivanje njihovoga broja.

Osvrt na korišteni model u istraživanju

Cijeljenje ligamenata proučava se na životinjskim modelima već dugi niz godina. Isprva su ta istraživanja provođena s ciljem da se definira način cijeljenja ligamenta, a potom da se usporede rezultati cijeljenja nakon različitih načina liječenja. Na osnovi tih istraživanja može se zaključiti se da su strukturalna obilježja koja najviše utječu na cijeljenje ligamenta veličina prekinuća ligamenta i mjesto same ozljede.^{1-10,30,46} Zbog toga su provedena brojna bazična istraživanja sa svrhom da se analizira kako lokalizacija i način ozljede medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM-a) mijenjaju odgovor na cijeljenje.^{1-10,30,46}

Kako bi odredili da li lokalizacija ligamentarne ozljede ima utjecaj na cijeljenje LCM-a, Frank i sur.¹²¹ su 1995. godine u svom istraživanju uspoređivali cijeljenje nakon potpunoga presijecanja LCM-a kunića na tri razine; na femoralnom hvatištu, na tibijalnom hvatištu te u središnjem dijelu ligament. Rezultati tog istraživanja pokazali su da su ligamenti koji su presječeni blizu hvatišta cijelili znatno sporije, uz pojavu promjena morfologije hvatišta, od onih koji su bili presječeni u središnjem dijelu.

U početku se u svim istraživanjima ligament potpuno presijecao skalpelom, tj. činjena je transekcija, a presječeni krajevi ligamenta uvijek su ostajali u doticaju. Frank i sur.¹²² su dokazali da ligament zacijeljuje uvijek na isti način ožiljnim tkivom bilo da se šiva bilo da se ostavi bez ikakvog liječenja, te da je to ožiljno tkivo i mehanički i biokemijski slabije od normalnog ligamenta. Tek su Chimich i sur.¹²³ 1991. godine prikazali drugačiji model u kojem su izrezivali dio ligamenta i na taj način stvorili prazninu između presječenih krajeva ligamenta. Rezultati tog istraživanja pokazali su da i ligament kojem se cijeljenje odvija preko kirurški načinjene praznine zacijeljuje na isti način, tj. ožiljnim tkivom. No, tako zacijeljeni ligament ipak je biomehanički slabiji nego ligament kojem su presječeni krajevi ostali u doticaju. I rezultati drugog istraživanja koje je provedeno na takvom modelu pokazali su da ta strukturalna slabost ligamenta koji cijeli preko pukotine perzistira i tijekom duljeg vremena praćenja – 104 tjedna.¹²⁴ Pokušaj da se poveća područje zacijeljivanja u takvom modelu činjenjem

resica na presječenim krajevima ligamenta (engl. mop-ending) nije uspio jer su dobiveni rezultati biomehaničkog ispitivanja bili isti kao i u slučaju kad su krajevi ostali samo oštro presječeni.¹²⁵ S obzirom na rezultate tih istraživanja Woo i suradnici su zaključili da liječenje koje postiže i održava presječene krajeve ligamenta u blizini i/ili doticaju smanjuje volumen ožiljnog tkiva koji je neophodan za zacijeljivanje, a samim tim poboljšavaju se i rezultati biomehaničkih ispitivanja.⁴

Prikladnost ispitivanja ozljede LCM-a eksperimentalne životinje načinjene u laboratoriju

Osnovna zamjerka kirurškoj transekciji ligamenta jest u tome što ona ne oponaša nastanak ozljede ligamenta u normalnome životu, pa su neki istraživači pokušali načiniti tupu ozljedu ligamenta koristeći se pritom različitim napravama.¹²⁶ No, niti kirurškim presijecanjem niti tupom ozljedom ligamenta nije se uspjelo kreirati ozljedu sličnu onoj koja nastaje u prirodi kada osim LCM-a bude ozlijeđeno i okolno tkivo, u prvome redu zglobna čahura. Upravo to ozljeđivanje okolnoga znatno prokrvlijenijeg tkiva zglobne čahure dovodi do znatno većeg krvarenja u okolinu puknuća od situacije kada se primjerice LCM samo kirurški presiječe.¹²⁷

U svakodnevnom životu u više od 85% ozljeda LCM-a riječ je o istegnuću (distenziji) ili pak djelomičnom puknuću (parcijalnoj rupturi) ligamenta.⁹ Upravo je to razlogom što su pojedini istraživači pokušavali iznaći model koji bi mogao oponašati te ozljede, a ne da se na životinjskim modelima samo istražuje cijeljenje potpunog prekinuća LCM-a. No, bilo da je to ozljeđivanje načinjeno kirurškim načinom (djelomičnim presijecanjem), bilo tupom ozljedom, nije se uspjela u potpunosti i dosljedno kreirati ozljeda ligamentarnog tkiva kakva se dešava prilikom prirodne ozljede LCM-a tipa istegnuća ili pak djelomičnog puknuća.¹²⁶

Biomehaničko ispitivanje cijeljenja LCM-a u štakora – mjesto pucanja

Pojedini istraživači ističu da se cijeljenje LCM-a nakon kirurške transekcije u štakora može pratiti pomoću biomehaničkog testiranja njegovih strukturalnih osobina samo tijekom prvih 14 dana nakon operacijskog zahvata.^{57,60,62,63,74,113,114,116} Naime, rezultati biomehaničkog testiranja prvih istraživanja Dahnersa i sur.^{57,60} pokazali su da nakon 14 dana LCM puca na mjestu na kojem je bio presječen, a da nakon 21 dana dolazi do avulzije tibijalnog hvatišta LCM-a. Iako je taj rezultat testiranja 21 dana izrečen samo riječima te čak nije bio niti prikazan u postotku u kojem se dogodio, ipak su svi kasniji radovi u kojima je Dahners bio suradnik u istraživanju provodili biomehaničko ispitivanje ili 12 ili 14 poslijeoperacijski dan.^{57,60,62,63,74,113,114,116} Objašnjenje koje se provlači kroz te radove jest da je već nakon 14 dana zacijeljeni ligament u štakora toliko čvrst da ne puca na mjestu transekcije već da dolazi do avulzije tibijalnog hvatišta. Kao dodatnu potvrdu tom objašnjenju Campbell i sur.¹¹⁵ ističu da u štakora vrlo kasno tijekom njihova života dolazi do zatvaranja ploča rasta te da je stoga hvatište ligamenta u kompleksu kost-ligament-kost koje se rabi za biomehaničko ispitivanje najslabije mjesto i stoga da čim snaga zacijeljenog ligamenta nadmaši snagu hvatišta dolazi do avulzije tibijalnog hvatišta. Tako Campbell i sur.¹¹⁵ izvješćuju u svom radu da je u svih štakora prilikom biomehaničkog testiranja desetog poslijeoperacijskog dana došlo do pucanja na mjestu transekcije, dok je dvadesetog dana u svih ispitivanih štakora došlo do avulzije tibijalnog hvatišta. Horn i sur.⁶⁴ izvještavaju da je u njihovom istraživanju u kojemu su provodili biomehaničko testiranje 2, 4, 6 i 8 tjedana po transekciji LCM-a u 33 od 48 testiranih životinja došlo do avulzije tibijalnog hvatišta, što nažalost nisu popratili točnom raspodjelom broja životinja obzirom na tjedne u kojima je testiranje provođeno. Warden i sur.⁶⁹ su u svom radu izvijestili da je u svih životinja prilikom biomehaničkog testiranja provedenog dva tjedna nakon kirurškog presijecanja LCM-a došlo do pucanja na mjestu transekcije. Rezultate testiranja nakon 4 tjedna nisu ni objavili, dočim je nakon 12 tjedana u 20 od 32 testirane eksperimentalne životinje došlo do pucanja na mjestu transekcije. No, u literaturi nalazimo i izvješća, u prvome redu Funga i

Nga^{67,128-130}, u kojima se ne izvještava o mjestu puknuća LCM-a prilikom biomehaničkog ispitivanja nakon načinjene kirurške transekcije ligamenta, iako se to ispitivanje čini tri i šest tjedana po učinjenom kirurškom zahvatu.

Biomehaničko ispitivanje cijeljenja LCM-a u štakora – usporedba dobivenih rezultata

Uspoređivati rezultate biomehaničkih testiranja gotovo da nije moguće, jer osim razlika u sojevima korištenih eksperimentalnih životinja te njihovoj životnoj dobi i težini u času kirurškog zahvata, postoje i razlike u načinu testiranja i pripreme preparata kost-ligament-kost kao i u aparatima za testiranje. Ipak se, prema našem mišljenju, mogu usporediti dobiveni rezultati, i to tako da usporedimo eventualne razlike rezultata biomehaničkog testiranja između tretirane i kontrolne skupine u istraživanjima u kojima su testiranja činjena u bar dva vremenska razdoblja. Tako su primjerice Bayat i sur.⁶⁸ našli statistički značajnu razliku između kontrolne i tretirane skupine u sili pucanja LCM-a prilikom testiranja 12 poslijeoperacijskog dana. Međutim, prilikom testiranja 21 poslijeoperacijskog dana te razlike više nije bilo i autori su zaključili da terapija laserom ima učinak samo u ranom stadiju cijeljenja, a da se poradi brzog zacijeljivanja LCM-a u štakora taj učinak gubi te da je vjerojatno učinak prirodnog procesa cijeljenja ligamenta veći od učinka lasera. Horn i sur.⁶⁴ su našli statistički značajnu razliku u sili pucanja i krutosti LCM-a tretiranog s hiperbaričnom oksigenacijom samo pri testiranju 4 tjedna nakon kirurškog zahvata. Prilikom svih drugih testiranja 2, 6 i 8 tjedan nakon kirurškog zahvata nisu našli nikakve statistički značajne razlike u promatranim biomehaničkim obilježjima između tretirane skupine hiperbaričnom oksigenacijom i kontrolne skupine životinja. Za razliku od tih istraživanja Warden i sur.⁶⁹ nisu našli nikakav utjecaj niti nesteroidnih protuupalnih lijekova niti ultrazvučne terapije na promatrana biomehanička obilježja ligamenta tijekom praćenja i provedenih testiranja 2, 4 i 12 tjedan. Isto tako niti Campbell i sur.¹¹⁵ nisu našli statistički značajnih razlika u sili pucanja prilikom testiranja desetog i dvadesetog poslijeoperacijskog dana

između kontrolne skupine i skupine tretirane steroidima. Jedino je u istraživanju Funga i sur.¹²⁹, kao i u ovom istraživanju, u dva vremenska razdoblja nađena statistički značajna razlika u sili pucanja LCM-a između kontrolne skupine i skupine tretirane oblogama s ljekovitim travama, i to tri i šest tjedana nakon kirurškog presijecanja LCM-a štakora čineći pritom pukotinu u ligamentu s ciljem dobivanja modela s produženim zaraštavanjem.

U našem je istraživanju usporedba skupina obzirom na silu pucanja pokazala statistički značajnu razliku između skupina koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) i kontrolnih skupina (skupine A2 i B2) za sva tri vremena mjerenja, a to su bili deseti, četrnaesti i dvadesetprvi dan nakon kirurškog presijecanja LCM-a (tablica 4.). Prilikom biomehaničkog testiranja desetog i četrnaestog poslijeoperacijskoga dana došlo je u 47 od 48 testiranih preparata kost–ligament–kost do pucanja na mjestu prethodne kirurške transekcije LCM-a, a samo je u jednom slučaju došlo do prijeloma femura. No, prilikom testiranja dvadesetprvog poslijeoperacijskog dana došlo je do pucanja na mjestu transekcije samo u devet životinja a u čak četrnaest je došlo do avulzije tibijalnog hvatišta, dočim je u jedne životinje došlo do odvajanja na femoralnome hvatištu (tablica 5.). Zbog takvih dobivenih rezultata valja još jednom istaknuti činjenicu da prilikom biomehaničkog testiranja tri tjedna nakon kirurške transekcije LCM-a u štakora dolazi u pravilu do avulzije tibijalnog hvatišta ligamenta a ne do pucanja na mjestu transekcije. U tom slučaju nam dobivene vrijednosti sile pucanja više ne pokazuju snagu ligamenta na mjestu prethodne kirurške transekcije pa više niti ne možemo na osnovi tog pokazatelja procijenjivati kvalitetu cijeljenja ligamenta. Ta činjenica upravo dovodi u pitanje rezultate biomehaničkog ispitivanja Funga i sur.¹²⁹ jer oni uopće ne izvješćuju o mjestu pucanja prilikom biomehaničkog testiranja ligamenta.

Kontraktura zgloba – nastanak i mogućnosti liječenja

Ozljede različitih struktura zgloba (zglobne čahure, ligamenata, hrskavice i/ili kosti) mogu u konačnici dovesti do gubitka kretnje u tom zglobu, pa stoga ne čudi činjenica da se još od vremena Hipokrata piše o poslijetraumatskim kontrakturama zglobova i njihovim funkcionalnim posljedicama (sekvelama).¹³¹ Anatomska osnova za nastanak kontrakture zgloba je dobro poznata, pa tako razlikujemo unutrašnje ili zglobne čimbenike te vanjske ili mišićne čimbenike. U skupinu zglobnih čimbenika ubrajamo zglobnu čahuru, sinovijalnu ovojniciu, ligamente, hrskavicu i kost, dočim su tetive i fascija uz mišiće u skupini mišićnih čimbenika za nastanak kontrakture zgloba.¹³² Katkad spominjemo i tzv. komplicirane kontrakture, a to su one u kojima je uzrok promjena kože iznad i/ili oko zgloba, primjerice nakon opekline, te tzv. neurogene kontrakture.¹³²

Jasno je da trajan gubitak kretnje u zglobu onemogućuje potpunu funkciju toga zgloba. Primjerice, kada je kontraktura lakta takva da bolesnik ne može flektirati lakat više od osamdesetak stupnjeva tada je onemogućen doticaj glave i vrata dlanom te ruke i samim je tim onemogućen velik broj funkcija (hranjenje, osobna higijena i dr.) te je na taj način smanjena i neovisnost te osobe.^{133,134} Nemogućnost potpunog ispružanja koljena, dakle ekstenzijska kontraktura koljena, onemogućava trčanje i na taj način limitira radne i sportske aktivnosti bolesnika.¹³³ Liječenje kontrakture zgloba u najvećem je broju slučajeva vrlo dugotrajno i teško. Osnova neoperacijskog liječenja su vježbe razgibavanja zgloba koje bolesnik provodi sam ili uz pomoć fizioterapeuta te uz pomoć različitih naprava, primjerice «Kineteka». Naravno da se pritom rabe i drugi oblici fizikalne terapije kao što su elektroterapija, magnetoterapija te ultrazvuk.¹³¹⁻¹³⁶ Iako se za kirurško liječenje kontrakture zgloba rabe različiti postupci ovisno o osnovnom uzroku nastanka kontrakture, ipak su gotovo uvijek potrebni zahvati na zglobnoj čahuri, i to u prvome redu presijecanje čahure, a katkad i ekscizija dijela čahure.¹³¹⁻¹³⁶ Kao potporu tom principu kirurškog liječenja valja istaknuti da je u istraživanjima, i to kako u ljudi tako i u eksperimentalnih životinja, nađen

značajno povišen broj miofibroblasta mjeren imunohistokemijski u zglobnoj čahuri kod kontrakture zgloba.^{131,134}

Osvrt na nedostatke dosadašnjih istraživanja o kontrakturi

I za proučavanje kontrakture zgloba korišteni su različiti životinjski modeli.^{132,135,137} No, najveća zamjerka tim istraživanjima jest da je u većini slučajeva bio imobiliziran inače zdrav zglob, pa je nakon skidanja imobilizacije s vremenom došlo do ponovnog dobivanja punog opsega kretanja, tj. tako nastala kontraktura bila je reverzibilna.¹³⁸ Scenario kod ljudi je potpuno drugačiji. Nakon periartikularne ili intraartikularne ozljede kada se odluči za neoperacijsko liječenje i imobilizira ozljeđeni zglob, duljina se imobilizacije najčešće zasniva na praćenju zacjeljivanja kosti radiološkim metodama. Budući da su pritom ozljeđene i druge strukture zgloba koje cijele ožiljnim tkivom jasno je da će nastati kontraktura zgloba koja će zaostati po skidanju imobilizacije znatno dulje no u gore spomenutom životinjskom modelu. Upravo zato se danas i istražuju novi životinjski modeli i načini ozljeđivanja zglobnih struktura koji bi doveli do nastanka kontrakture zgloba koja bi bila to sličnija kontrakturi u ljudi, i to kako po uzroku nastanka tako i po ponašanju tijekom vremena.^{132,135,137} Obzirom na to smatramo kako je model kakav se dobije nakon kirurškog presijecanja LCM-a, tj. kakav je bio u ovom istraživanju, u potpunosti pogodan za ispitivanje ponašanja kontrakture i ispitivanja različitih modaliteta njenog liječenja.

Kontraktura nakon ozljede LCM-a i osvrt na mogućnosti mjerenja kontrakture

Iz medicinske literature i svakodnevne kliničke prakse dobro nam je poznata činjenica da se nakon ozljede LCM-a u ljudi javlja nemogućnost punog ispružanja koljena, tj. deficit ekstenzije. Naime, osobe nakon takve ozljede imaju pun opseg kretnji, no nakon nekog vremena, obično 10 do 18 sati kasnije, dolazi do gubitka pune ekstenzije te koljeno izgleda kao da je u «blokadi». Budući da do tog gubitka ekstenzije dolazi s odmakom od nekoliko sati govori se o simptomu «jutra poslije» (engl. «morning-after»)^{139,140}. Ukoliko se uzme nepotpuna anamneza i ne doznaju sve pojedinosti o ozljeđivanju i funkciji koljena nakon ozljeđivanja ta se «blokada» može zamijeniti s pravom blokadom koljena uzrokovanom puknućem meniska pa se može započeti s potpuno pogrešnim liječenjem. Uobičajeno je da ta nemogućnost punog ispružanja koljena uzrokovana ozljedom LCM-a nestaje nakon kratkotrajne imobilizacije i/ili analgezije. No, jednako tako ukoliko se ne liječi ona traje znatno dulje i može zaostati trajno.¹⁴⁰

Međutim, začuđujuće je da se u literaturi prateći cijeljenje kirurški presječenog LCM-a ne govori o gubitku mogućnosti punog ispružanja operiranog koljena u eksperimentalne životinje. Jedino su Tashiro i sur.¹⁴¹ u svome radu istaknuli da su prilikom žrtvovanja životinja 21 dan nakon učinjenog kirurškog zahvata zamjetili da su životinje ponovno dobile pun opseg kretnji u operiranome desnomo koljenu koji je u tom trenutku bio jednak kretnjama u neoperiranome lijevome koljenu. Pa tako jedino zasnivajući zaključak na izrazu «ponovno dobiti» (engl. resume) možemo reći da su oni u svom istraživanju zamjetili kontrakturu nakon kirurškog presijecanja LCM-a u štakora.¹⁴¹ Razlog tome jest činjenica da gotovo svi istraživači svoje zaključke donose na osnovi makroskopskog i histološkog izgleda LCM-a, te na rezultatima biomehaničkih ispitivanja i da gotovo nitko ne izvješćuje o kliničko-funkcionalnim pokazateljima tijekom istraživanja. Stoga i ne treba čuditi kako autori nisu ni izvještavali o pojavi kontrakture nakon kirurškog presijecanja LCM-a u štakora. Zbog tih razloga smatram kako je ovo istraživanje još jednom potvrdilo da je klinički pregled od najveće

važnosti, te da ga svakako valja koristiti i u eksperimentalnom radu. Takav pristup eksperimentalnom radu i dobiveni rezultati trebali bi potaknuti i druge istraživače da prate kliničko-funkcionalne pokazatelje prilikom istraživanja cijeljenja LCM-a u eksperimentalnih životinja.

Valja istaknuti i problem mjerenja nastale kontrakture zgloba u eksperimentalnih životinja. Tako su pojedina mjerenja činjena na anestetiziranim životinjama pa se odmah mora postaviti pitanje nivoa anestetiziranosti i samim tim utjecaja anestezije na kontrakturu zgloba.¹³⁷ Druga su pak istraživanja mjerila kontrakturu tek nakon žrtvovanja životinja što nikako ne slijedi logiku razmišljanja o kontrakturi budući da je ona klinički simptom i budući da ju valja pratiti tijekom vremena.^{131-133,135} Osim toga, problem jest što se gotovo za svako takvo istraživanje posebno izrađivala aparatura za mjerenje. Mjerenje klasičnim goniometrom, koji se rabi u svakodnevnom kliničkom radu za mjerenje opsega kretnji u zglobu, nije se pokazalo uspješnim kod eksperimentalnih životinja. To je osobito dobro razvidno iz istraživanja Akaia i sur.¹⁴² kada su autori goniometrom mjerili kut između natkoljenice i potkoljenice, prilikom kojeg je krak goniometra bio postavljen uz femur, a drugi je postavljen uz potkoljenicu koja je ostavljena da visi. Budući da se tim mjerenjem ne mjeri deficit ekstenzije, a to je bila intencija istraživača, i budući da nam je dobro poznat klinički način mjerenja deficita ekstenzije koljena u ljudi, u ovom je istraživanju korišten način mjerenja kontrakture koji je opisan u poglavlju «Materijali i metode» (slike 29. i 30.). Iako bi i za taj način mjerenja kontrakture mogli naći zamjerke, ipak smatram da ono zadovoljava jer se može rabiti na eksperimentalnim životinjama bez anestezije, potom što se može rabiti kontinuirano i tijekom duljeg vremena praćenja i u konačnici što u stvari mjerimo pravi deficit ekstenzije u koljenskom zglobu i to na vrlo sličan način kao i u ljudi. Osim toga, i dobiveni rezultati pokazuju da se i u eksperimentalnih životinja (štakora) kontraktura ponaša vrlo slično kao i u ljudi te da bez provođenja fizikalne terapije i bez eventualnih drugih modaliteta liječenja (kirurško, farmakološko) nakon minimalnog početnog povećanja pokretljivosti dolazi do stagnacije kontrakture, tj. ona biva prisutna tijekom daljnjeg praćenja. Upravo takav scenario bio je i u našem istraživanju. Naime, u skupinama A2 i B2, tj.

u skupinama koje nisu dobivale pentadekapeptid BPC 157, razvila se nakon kirurškog zahvata i presijecanja LCM-a kontraktura koljena, tj. prilikom testiranja za kontrakturu nije se moglo operirano koljeno u potpunosti ispružiti. Takva je situacija zaostala tijekom daljnjeg praćenja što je i razvidno iz dobivenih rezultata (tablica 3.). Skupine koje su primale pentadekapeptid BPC 157, skupine A1 i B1, nisu niti razvile kontrakturu operiranog koljena. I u istraživanjima cijeljenja nakon transekcije Ahilove tetive, kao i koštano-tetivnog hvatišta Ahilove tetive te mišića kvadricepsa u skupinama eksperimentalnih životinja koje su primale pentadekapeptid BPC 157 nije se razvila kontraktura.^{26,28,29} Razlog tome mogao bi biti u tome što pentadekapeptid BPC 157 uspostavlja funkciju krvnih žila koje su komprimirane i, kao drugo, zbog njegove snažne protuupalne aktivnosti.

Nedostaci primjene faktora rasta i razlozi za primjenu pentadekapeptida BPC 157 za cijeljenje ligamentarne ozljede

Iako su već u uvodu prikazani neki rezultati istraživanja cijeljenja LCM-a u kojima su primjenjivani faktori rasta, potrebno je osvrnuti se na još neke detalje tih istraživanja kao što su način primjene faktora rasta, te nosači koji su korišteni za njegovu primjenu. Dobro je poznata činjenica kako je poradi vrlo brze enzimatske razgradnje faktora rasta u organizmu potrebna njihova primjena vrlo blizu mjestu ozljede. Tako su primjerice Letson i Dahners⁷⁶ odmah po presijecanju LCM-a u štakora injicirali faktore rasta na mjesto transekcije ligamenta, a u istraživanju su rabili kolagenu emulziju PDGF-a, potom kolagenu emulziju PDGF-a u kombinaciji s IGF-I, te kolagenu emulziju PDGF-a u kombinaciji s bFGF-om. I drugi su istraživači odmah po kirurškom presijecanju LCM-a injicirali faktor rasta na mjesto transekcije ligamenta, pa je tako Fukui sa suradnicima¹⁴³ implantirao rekombinantni humani bFGF s fibrinskim gelom kao nosačem na mjesto transekcije LCM-a kunića. Hildebrand i sur.⁷⁷ su u svom istraživanju injicirali PDGF-BB u mjesto transekcije LCM-a kunića, a u tom je istraživanju kao nosač korišteno fibrinsko ljepilo. Spindler i sur.^{79,80} su u svojim istraživanjima na kunićima

odmah po presijecanju LCM-a primjenjivali TGF- β 2 s fibrinskim ugruškom kao nosačem. I u istraživanju cijeljenja LCM-a u štakora u kojem je primjenjivan GDF-5 s fibrinskim ljepilom kao nosačem, primjenjeni je faktor rasta injiciran odmah po presijecanju LCM-a.¹⁴¹ Jedino su Hildebrand i sur.⁷⁸ primjenjivali TGF- β 1 tijekom drugog kirurškog zahvata također ga injicirajući na mjesto cijeljenja u soluciji s nosačem, i to tri tjedna nakon kirurške transekcije LCM-a kunića.

Svi testirani faktori rasta su primjenjivani na mjesto ozljede i svaki je primjenjen s nosačem. Činjenica što je svaki faktor rasta primjenjivan s nosačem otvara čitav niz vrlo teško rješivih metodoloških i praktičnih pitanja. Naime, nužnost primjene kompleksa faktor rasta + nosač uz veliku različitost primjenjenih nosača ostavlja nedefiniranu aktivnu supstanciju (faktor rasta, nosač ili pak kompleks faktor rasta+nosač) te na taj način onemogućuju točnu procjenu djelovanja. Potvrda tome jesu i rezultati biomehaničkog ispitivanja u istraživanjima Hildebranda i sur.^{77,78}, te Toshira i sur.¹⁴¹, prema kojima je došlo do blagog poboljšanja u promatranim parametrima strukturalnih obilježja LCM-a u životinja u kojih je na mjesto transekcije injiciran samo nosač u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja. No, s druge strane dobro je poznato da faktori rasta vezanjem na specifične receptore na površini stanica aktiviraju putove za složeno intracelularno prenošenje signala koji pak stimuliraju stvaranje proteina koji su potrebni za cijeljenje rana, te da faktori rasta imaju različite učinke na različitim ciljnim stanicama i da su uključeni u mnoštvo interakcija tijekom cijeljenja.^{6,10} Upravo se zbog toga danas istražuju moguće alternative toj egzogenoj primjeni faktora rasta koja do danas nije dala očekivane rezultate. Tako su predmetom istraživanja neki poticaji, primjerice hipoksija, ultrazvuk i električna stimulacija, koji bi potaknuli produkciju i/ili aktivnost endogenih faktora rasta.^{6,10,144} Već su prva takva istraživanja pokazala da se ti različiti fizički i kemijski poticaji efikasno prenose u biološki poticaj koji rezultira aktivacijom procesa cijeljenja. Korištenje tih poticaja kojima se aktivira i pojačava produkcija endogenih faktora rasta uz znatno poboljšanu egzogenu primjenu faktora rasta, i to po mogućnosti bez nosača, mogli bi dovesti do boljeg i bržeg cijeljenja LCM-a a samim tim mogli bi uzrokovati i znatno bolje

rezultate biomehaničkih ispitivanja od dosadašnjih nakon samo egzogene primjene faktora rasta za liječenje ozljeda ligamenata.

S obzirom na opisane korisne učinke primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje drugih tkiva, primjerice kože, crijeva, tetive, tetivno-koštanog hvatišta, mišića i kosti; kao i s obzirom da ne postoji «zlatni standard» za liječenje ligamentarne ozljede u ljudi pokušali smo istražiti njegov učinak na cijeljenje LCM-a u štakora primjenivši ga na dva načina, i to intraperitonealnim i peroralnim putem.^{22-29,90-96} Pentadekapeptid BPC 157 je primjenjivan u ovom istraživanju u dozi od 10 µg/kg TT intraperitonealnim putem. Ta je doza odabrana jer je u prethodnim istraživanjima cijeljenja prerezane Ahilove tetive u štakora, potom cijeljenja prerezanoga tetivno koštanog hvatišta Ahilove tetive u štakora te cijeljenja prerezanoga mišića kvadricepsa u štakora davala znatno bolje rezultate nego primjena pentadekapeptida BPC 157 u nižim dozama (primjerice doze 10 ng/kg TT ili 10 pg/kg TT).^{26,28,29} Budući da je u prethodnim istraživanjima ukazano kako je pentadekapeptid BPC 157 netoksičan i stabilan, te da se ne razgrađuje niti nakon 24 sata inkubacije u želučanome soku omogućena je i njegova peroralna primjena.⁹⁷ U istraživanjima cijeljenja tetive, tetivno koštanog hvatišta, te mišića ona nije korištena, pa je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio da se procijeni da li je ta primjena jednako djelotvorna intraperitonealnoj primjeni.^{26,28,29} U ovom je istraživanju, kao i u istraživanju Petrovica i sur.¹¹⁷, pentadekapeptid BPC 157 primjenjivan u vodi za piće u koncentraciji od 300 µg/l. Iz rezultata ovog istraživanja razvidno je da nema nikakve razlike u dobivenim rezultatima s obzirom na način primjene pentadekapeptida BPC 157 (vidi slike 9. do 28. i 32. do 35. te tablice 2. do 8.).

Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na strukturu ciljnog tkiva

Od osobite je važnosti istaknuti činjenicu da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje ciljnog tkiva (primjerice kože, crijeva, tetive, tetivno-koštano hvatište, mišići i kosti) pritom ne mijenjajući strukturu tkiva i ne izazivajući patološke promjene u drugom tkivu, i to bez obzira na način primjene (lokalna, peroralna, parenteralna).^{22-29,90-96} Tako se niti u ovom istraživanju, kao niti u spomenutim prethodnim istraživanjima, nije prilikom patohistološke obrade našlo promjena strukture tkiva, kao niti područja okoštavanja. Upravo suprotan primjer tom učinku jest pojava prilikom primjene koštanog morfogenetskog proteina (engl. bone morphogenetic protein – BMP) koji primjenjen izvan područja kosti inducira stvaranje koštanog tkiva. Tako je primjerice implantacija BMP-2 u subkutano tkivo štakora rezultirala enhondralnim stvaranjem koštanog tkiva na tom mjestu, dok je primjena OP-1 (sinonim BMP-7) za cijeljenje kirurški presječene Ahilove tetive štakora inducirala stvaranje koštanog tkiva u samoj Ahilovoj tetivi.¹⁴⁵ U literaturi su opisane promjene strukture tkiva i prilikom primjene faktora rasta člana obitelji TGF- β kojoj pripada i BMP. Tako je opisano formiranje hrskavičnog tkiva unutar Ahilove tetive prilikom primjene faktora rasta i diferenciranja-5 (engl. growth and differentiation factor-5; GDF-5) za poboljšanje cijeljenja presječene Ahilove tetive u štakora.^{146,147} No, prilikom primjene tog faktora rasta u istraživanjima cijeljenja LCM-a u štakora nisu nađene nikakve promjene strukture tkiva, kao niti formiranje hrskavičnog tkiva.

Primjena pentadekapeptida BPC 157 - učinak na sintezu krvnih žila

Granulacijsko tkivo sastavljeno od fibroblasta koji sintetiziraju kolagen, kolagenih vlakana tipa I i III, te novoformiranih krvnih žila osnovna je struktura u procesu cijeljenja tkiva nakon ozljeđivanja, pa tako i pri cijeljenju ligamentarnih ozljeda. Povećanjem gustoće i pravilnosti rasporeda kolagenih vlakana i smanjenjem broja krvnih žila tkivo u cijeljenju kontinuirano mijenja svoju strukturu s krajnjim ciljem postizanja izgleda i kvalitete tkiva što sličnijeg onomu prije same ozljede. Istraživanja na modelima kožne incizijske rane i anastomoze kolona pokazala su sposobnost poticanja sinteze krvnih žila pentadekapeptidom BPC 157.²² Poznato je da je sinteza krvnih žila u ranoj etapi cijeljenja od najveće važnosti za opskrbu kisikom i hranjivim sastojcima. No, modeli kožne incizijske rane i anastomoze kolona predstavljaju visoko prokrvljena tkiva s relativno niskim udjelom kolagena (koža 30%, crijevo 2 do 8% kolagena) dok je za razliku od njih ligamentarno tkivo hipovaskularno s visokim udjelom kolagena (i do 75%).^{1-4,30-33} No, i u takvom tkivu primjena pentadekapeptida BPC 157 snažno stimulira angiogenezu i dovodi do značajnog povećanja vaskularizacije granulacijskog tkiva u ranoj etapi cijeljenja (vidi sliku 47.). To je potvrđeno i patohistološkom analizom u ovom istraživanju, a ti su rezultati u skladu s rezultatima primjene pentadekapeptida BPC 157 u istraživanjima transekcije Ahilove tetive te koštano-tetivnog hvatišta Ahilove tetive.^{26,28} Ovom prilikom valja još jednom istaknuti da je ta povećana vaskularizacija od osobite važnosti u ranoj etapi cijeljenja jer se na taj način brzo otplavljaju štetni produkti upalne reakcije. Dva su moguća mehanizma kojima pentadekapeptid BPC 157 potiče sintezu novih krvnih žila. Prvi mehanizam jest zaštita postojećih krvnih žila u rubnome području ozljede s obzirom na dokazani citoprotektivni učinak ovog peptida na endotel, a poznato je da je upravo endotel mjesto nastanka endotelne nitrit-oksida sintaze (eNOS) jednog od tri izoenzima NOS, koji formira NO-spoj vazodilacijskog učinka.^{95,98-100,104} Drugi mogući mehanizam jest poticanje formiranja novih izdanaka iz granulacijskog tkiva.^{106,107} Ta sinteza novih krvnih žila uvjet je formiranja granulacijskog tkiva te početka sinteze nezrelog kolagena tip III koji inicijalno premošćuje defekt

nastao ozljedom. No, nakon 7 dana od učinjenog kirurškog zahvata i transekcije LCM-a uočljiv je i pad broja krvnih žila u skupinama tretiranim s pentadekapeptidom BPC 157 u usporedbi s kontrolnim skupinama što je razvidno i iz rezultata imunohistokemijskog bojanja preparata (vidi slika 47. i tablica 8.). Mehanizam nastanka ovog učinka još je nepoznat, ali valja naglasiti korist tog učinka jer je dobro poznato da krvne žile u kasnijim etapama cijeljenja povećavaju degenerativne promjene perifibrilarno, te povećavaju ugradnju nezrelog kolagena tipa III u mrežu kolagenih vlakana što u konačnici rezultira znatno slabijim strukturalnim obilježjima ožiljkastog tkiva. S obzirom na navedeno jasno je kako je to smanjenje broja krvnih žila udruženo s dokazanim porastom udjela kolagena tip I u toj etapi cijeljenja u životinja koje su primale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) razlogom statistički značajno boljih rezultata biomehaničkog ispitivanja od rezultata dobivenih u kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2).

Primjena pentadekapeptida BPC 157 – protuupalni učinak

Od velike važnosti u ranoj etapi cijeljenja jest i antiinflamatorni učinak primjene pentadekapeptida BPC 157. Naime, histološka je analiza i u ovome istraživanju, kao i u istraživanjima učinka primjene pentadekapeptida BPC 157 nakon transekcije Ahilove tetive, koštano-tetivnog hvatišta Ahilove tetive, te mišića kvadricepsa u štakora, pokazala tijekom ranog razdoblja cijeljenja značajno manju eksudaciju polimorfonukleara uz veću eksudaciju mononukleara u području ozljede.^{26,28,29} Taj je učinak u potpunosti u skladu s ranijim zapažanjima prema kojima primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje eksudaciju upalnih medijatora (lukotrijena B4-LTB4, te tromboksana B2-TxB2) u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze u području ozljede.^{22,108} Znatno brži funkcijski oporavak koji je zamijećen u ovom istraživanju i nepostojanje kontraktura operiranog koljena u štakora u kojih je primjenjen pentadekapeptid BPC 157, i to bilo intraperitonealnim, bilo peroralnim načinom, nije samo posljedica angiogenog i antinflatarnog

učinka te tvari jer u prvim satima i danima nakon ozljede defekt ligamentarnog tkiva nastao presijecanjem LCM-a još nije premošten. Stoga se čini kako se uzrok tog bržeg funkcijskog oporavka najvjerojatnije nalazi u tome što pentadekapeptid BPC 157 uspostavlja funkciju krvnih žila koje su komprimirane, što potiče sintezu dušik oksida (NO) spoja s snažnim vazodilatacijskim i reparacijskim učincima te što smanjuje upalnu infiltraciju.

Primjena pentadekapeptida BPC 157 – učinak na sintezu kolagena

Praćenjem udjela tipova kolagena u granulacijskom tkivu, kao i dinamike njihova pojavljivanja tijekom cijeljenja, može se procijeniti utjecaj nekog agensa na cijeljenje ligamenta.^{3-10,41,45,46} Naime, dobro je poznata činjenica da između 70 i 80% kolagenih vlakana normalnog ligamenta pripada kolagenu tip I, potom oko 8% kolagenu tip III, a da preostali dio pripada tipovima II, V, IX, X, XI i XII.^{1-4,30-33} Osim toga, dokazano je i da je kolagen tip III prvi oblik kolagena koji se pojavljuje u ranoj etapi cijeljenja u granulacijskom tkivu koje inicijalno premošćuje defekt nastao ozljedom i koje na taj način omogućuje održavanje kontinuiteta ligamenta.^{3-10,41,45,46} Taj porast količine kolagena tip III dovodi i do tzv. «turnover-a» kolagena jer se mijenja odnos kolagena tip I naspram kolagena tip III.^{48,49} Isto tako, dobro je poznato da tkivo bogato kolagenom tip III nema značajnu čvrstoću i da puca pri relativno malim opterećenjima.^{3-10,41,45,46} Zadržavanje visokog udjela kolagena tip III i kasnije, u drugim fazama cijeljenja, rezultira slabim rezultatima prilikom biomehaničkog testiranja takvog tkiva, te potpunom dezorganiziranošću međustanične tvari bez adekvatnog usmjerenja vlakana. S druge strane, u tim kasnijim fazama cijeljenja, veća produkcija kolagena tip I povećava volumen reparacijskog tkiva i poboljšava mehaničku snagu ligamenta i druge rezultate biomehaničkog testiranja.^{3-10,41,45,46} S obzirom na navedene činjenice može se zaključiti da će doprinos kvaliteti cijeljenja ligamenta koju procjenjujemo biomehaničkim testiranjem dati tvar koja će odmah po završetku rane etape cijeljenja smanjivati udio kolagena tip III u

granulacijskom tkivu, a povećavati udio kolagena tip I. Upravo to i čini primjena pentadekapeptida BPC 157 što je razvidno iz rezultata mikroskopske procjene (vidi slike 38. do 40. te 42. i 45., kao i tablice 6. i 7.). Naime, u skupinama koje su primale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) nakon analize i skoriranja histoloških preparata impregniranih srebrom po Gomoriju za prikaz retikulinskih vlakna (kolagen tip III) nađena je desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana statistički značajno manja zastupljenost retikulinskih vlakana u usporedbi s kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) (slika 38.). Također je u tim skupinama (skupina A1 i B1) nakon analize i skoriranja histoloških preparata bojanih metodom po Malloryu za prikaz zrelog veziva (kolagen tip I) nađeno statistički značajno veće prisustvo kolagena tip I četrnaestog poslijeoperacijskog dana u usporedbi s kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) (slika 42.). Osim toga, ispitivanjem razlika u dobivenim vrijednostima nakon skoriranja preparata bojanih metodom po Malloryu ovisno o vremenu proteklom od kirurškog presijecanja LCM-a ustanovljeno je da je u skupinama koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 (skupine A1 i B1) došlo do statistički značajnih promjena u funkciji vremena. Tako je pronađen statistički značajan porast tih vrijednosti što označava i porast udjela kolagena tip I u tim preparatima između sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana, te između desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana, dočim u kontrolnim skupinama (skupine A2 i B2) nisu pronađene statistički značajne razlike između susjednih vremenskih točaka (slike 43. i 44.). Taj je rezultat u potpunosti u skladu s rezultatom istraživanja utjecaja primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje prerezane Ahilove tetive u štakora u kojem je analiza preparata obojenih metodom po Van Giesonu za prikazivanje kolagena pokazala statistički značajno veću proporciju kolagena desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana u skupinama životinja tretiranih intraperitonealnom primjenom pentadekapeptida BPC 157 u dozi od 10 µg/kg i 10 ng/kg tjelesne težine.²⁶ I u istraživanju utjecaja primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje Ahilove tetive za petnu kost u štakora dobiveni su vrlo slični rezultati obzirom na praćenje udjela tipova kolagena tijekom cijeljenja.²⁸ Naime, imunohistokemijska analiza pokazala je u granulacijskom tkivu koje je

ispunilo defekt tijekom ranog razdoblja cijeljenja pravilno raspoređena kolagena vlakna dominantno tipa III u skupinama koje su primale pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 µg/kg i 10 ng/kg tjelesne težine, s najvišom vrijednošću tog tipa kolagena sedmog poslijeoperacijskog dana za razliku od kontrolne skupine koja je imala takvu vršnu vrijednost četrnaestog poslijeoperacijskog dana. Osim toga, ta je analiza pokazala statistički značajan porast udjela kolagenih vlakana tip I u području cijeljenja tetive u skupinama koje su primale pentadekapeptid BPC 157 u svim promatranim intervalima, tj. i u ranoj i u kasnoj etapi cijeljenja, u odnosu na kontrolne skupine. Posljedica toga jesu statistički značajno bolji rezultati biomehaničkog ispitivanja u skupinama koje su primale pentadekapeptid BPC 157 u odnosu na kontrolne skupine, i to kako u ovom istraživanju, tako i u spomenutim istraživanjima cijeljenja prerezane Ahilove tetive i cijeljenja tetivno-koštanog hvatišta Ahilove tetive, kao i cijeljenja presječenoga mišića kvadricepsa.^{26,28,29} Iz tih je rezultata razvidno da pentadekapeptid BPC 157 potiče sintezu kolagena. Poznato je da su medijatori NO i VEGF spregnuti sa sintezom kolagena. Stoga je moguće da pentadekapeptid BPC 157 na taj način ostvaruje svoj učinak na sintezu kolagena, ili pak možda nekim drugim načinom, primjerice direktnim poticanjem sinteze.

Predviđanje o daljnjim istraživanjima cijeljenja ligamenata

Smatramo da je era istraživanja cijeljenja ligamenta samo s biološke i biomehaničke osnove iza nas i da nas u budućnosti čeka interdisciplinarni i multidisciplinarni pristup tim istraživanjima. Naime, smatramo da će svi zainteresirani istraživači – liječnici, biolozi, biokemičari, bioinženjeri, kao i svi drugi neophodno potrebni znanstvenici morati surađivati i raditi zajedno bez ikakvih zidova ili ograda između tih disciplina i smatram da će takav pristup rezultirati nekim novim i, nadamo se, još boljim metodama liječenja ligamentarnih ozljeda u ljudi.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški načinjene ozljede medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM-a) koljena u štakora, a na osnovi tih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. primjena pentadekapeptida BPC 157 sprečava nastanak kontrakture kolenskog zgloba nakon kirurškog presijecanja LCM-a štakora;
2. primjena pentadekapeptida BPC 157 povećava čvrstoću ligamenta što dovodi do statistički značajno viših vrijednosti biomehaničkih pokazatelja (sila pucanja, elongacija ligamenta i energija apsorbirana do trenutka pucanja ligamenta) koje se dobivaju biomehaničkim testiranjem preparata kost-ligament-kost (femur-medijalni kolateralni ligament-tibija) u svim skupinama tretiranih životinja u svakom ispitivanju (deseti, četrnaesti i dvadesetprvi poslijeoperacijski dan);
3. primjena pentadekapeptida BPC 157 ima koristan učinak na sintezu kolagena i mijenja dinamiku pojavljivanja različitih tipova kolagena tijekom cijeljenja ligamenta što je razvidno iz rezultata nakon analize i skoriranja histoloških preparata bojanih po Malloryju i Gomoriju koji pokazuju da se po završetku rane etape cijeljenja statistički značajno smanjuje udio kolagena tip III (deseti i četrnaesti poslijeoperacijski dan) i povećava udio kolagena tip I (četrnaesti poslijeoperacijski dan) u granulacijskom tkivu tretiranih skupina životinja;
4. primjena pentadekapeptida BPC 157 dovodi do pojave većeg broja vaskularnih prostora u području ozljede što je razvidno iz rezultata nakon analize i skoriranja histoloških preparata bojanih protutijelom na CD 34 koji pokazuju da tretirane skupine životinja imaju statistički značajno veći broj vaskularnih prostora deseti poslijeoperacijski dan i da se broj tih prostora kasnije postupno i kontinuirano smanjuje za razliku od kontrolnih skupina;
5. primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje LCM-a štakora nakon kirurške transekcije ne mijenjajući pritom strukturu tkiva i ne izazivajući patološke promjene u drugom tkivu;

6. djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje LCM-a nakon kirurške transekcije najvjerojatnije se zasniva na poticanju stvaranja novih krvnih žila i na poticanju sinteze kolagena, kao i na promjeni dinamike pojavljivanja različitih tipova kolagena tijekom cijeljenja, te na snažnom protuupalnom djelovanju;
7. potrebno je provesti istraživanja i na drugim životinjskim modelima o učincima primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje LCM-a u cilju utvrđivanja potencijalne primjenjivosti rezultata ovog istraživanja na liječenje ljudi.

7. SAŽETAK

Brojna su istraživanja pokazala povoljne učinke primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje različitih tkiva. Hipoteza ovog rada bila je da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški načinjene ozljede medijalnog kolateralnog ligamenta (LCM) koljena u štakora. Ciljevi ovog rada bili su analizirati učinke pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje kirurški načinjene ozljede LCM-a u štakora, i to kako na razini kliničkog i funkcionalnog ishoda te na razini morfoloških promjena s pretragom makroskopskih i mikroskopskih obilježja, tako i procjenom biomehaničkih osobina zacijeljenog LCM-a. Pored toga cilj je bio prosudba da li primjena pentadekapeptida BPC 157 dovodi do regeneracije ligamenta umjesto reparacije, da li smanjuje kontrakturu zgloba nakon kirurškog zahvata te postoji li razlika u konačnom ishodu liječenja ovisno o načinu primjene. Nakon odobrenja Etičkog povjerenstva u istraživanju su korišteni muški štakori soja Albino Wistar težine oko 400 g. Za izazivanje ligamentarne ozljede u štakora upotrebljena je metoda koju su opisali Tipton i sur. Po učinjenom kirurškom zahvatu eksperimentalne su životinje podijeljene u dvije skupine ovisno o načinu primjene, a potom su te skupine podijeljene u tretirane (SKUPINA A1 – eksperimentalne životinje dobivale su pentadekapeptid BPC 157 intraperitonealnom primjenom jedanput dnevno u dozi od 10 µg/kg TT i SKUPINA B1 – eksperimentalne životinje dobivale su vodu za piće u kojoj je bilo otopljeno 300 µg/l pentadekapeptida BPC 157) i kontrolne skupine (SKUPINA A2 – eksperimentalne životinje dobivale su intraperitonealnom primjenom fiziološku otopinu jedanput dnevno i SKUPINA B2 – eksperimentalne životinje dobivale su samo čistu tekuću vodu za piće). Za prosudbu funkcionalnog oporavka životinja korišteni su test pritiska ekstenzora i test za procjenu kontrakture. Životinje su žrtvovane prema protokolu istraživanja, a nakon žrtvovanja učinjena je makroskopska procjena, histološka analiza preparata te biomehaničko testiranje. Rezultati provedenog istraživanja potvrdili su postavljenu hipotezu i pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje ligamenta nakon kirurškog presijecanja LCM-a štakora te da su učinci podjednaki bez

obzira na način primjene (parenteralna ili peroralna). Praćenjem kliničko-funkcionalnih pokazatelja utvrđeno je da tretirane skupine životinja nisu razvile kontrakturu nakon kirurškog zahvata te da je u tim skupinama bio statistički značajno manji deficit motoričke funkcije. Analiza rezultata biomehaničkog testiranja pokazala je statistički značajne razlike između skupina koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 od kontrolnih skupina životinja glede sile pucanja, elongacije i energije apsorbirane do trenutka pucanja ligamenta. Rezultati mikroskopske analize i skoriranja preparata pokazali su u tretiranim skupinama 14. poslijeoperacijski dan statistički značajno veći udio kolagena tip I (bojanje po Malloryju), odnosno statistički značajno manji udio kolagena tip III 10. i 14. poslijeoperacijski dan (bojanje po Gomoriju). Tretirane skupine životinja imale su statistički značajno veći broj vaskularnih prostora u području ozljede desetog poslijeoperacijskog dana od kontrolnih skupina što su pokazali rezultati nakon analize i skoriranja histoloških preparata bojanih protutijelom na CD 34. Na osnovi rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje LCM-a štakora nakon kirurške transekcije ne mijenjajući pritom strukturu tkiva i ne izazivajući patološke promjene u drugom tkivu. Osim toga, ti rezultati upućuju da se djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje LCM-a nakon kirurške transekcije najvjerojatnije zasniva na poticanju stvaranja novih krvnih žila i na poticanju sinteze kolagena, kao i na promjeni dinamike pojavljivanja različitih tipova kolagena tijekom cijeljenja, te na snažnom protuupalnom djelovanju.

8. SUMMARY

Numerous researches have shown the favorable effects of pentadecapeptide BPC 157 application on the healing process of various tissues. The hypothesis of this study was that application of pentadecapeptide BPC 157 improved healing of the surgically transected medial collateral ligament (MCL) in rats. The purpose of the study was to clarify the effects of pentadecapeptide BPC 157 on ligament healing by performing clinical, functional, biomechanical and histological evaluations. An additional purpose was to investigate whether the application of pentadecapeptide BPC 157 resulted in regeneration instead of ligament reparation. BPC 157 effectiveness after various routes of application (intraperitoneally and per orally), as well as its influence on the appearance of joint contracture, was also evaluated. After approval by the Ethics Committee, Wistar Albino male rats weighting about 400 g underwent transection of the MCL using the established model described by Tipton et al. Postoperatively the rats were divided into two groups according to route of application: the animals in group A1 received 10 µg/kg BW BPC 157 intraperitoneally once a day and the animals in group B1 received 300 µg/l BPC 157 in their drinking water. The animals in control group A2 received isotonic saline intraperitoneally while the animals in group B2 were given water without any drugs. Extensor postural thrust test and test for contracture assessment were performed for functional evaluation. The animals were sacrificed according to study design by cervical dislocation. Tissues were taken for histological examination and bone-ligament-bone specimens for biomechanical testing of the ligaments. The results of this study confirmed the hypothesis and showed that the use of pentadecapeptide BPC 157 improved healing of rat MCL and that the effect was about equal regardless of the route of application. Clinical and functional evaluation proved that joint contracture did not appear in BPC 157 treated rats which also had a statistically significantly lower motor function deficit. The evaluation of biomechanical testing showed a statistically significant difference between BPC 157 treated animals and the control group regarding ultimate load, ultimate elongation and energy absorbed at failure. Histological

findings in treated animals demonstrated statistically significantly increased collagen type I (Mallory stain) proportion at 14 days and statistically significantly reduced collagen type III (Gomory) proportion at 10 and 14 days. Microscopic analysis with scoring of slides stained with CD34 antibody showed that BPC 157 treated animals at 10 days had a statistically significantly higher number of newly formed vascular spaces in the ligament healing area as compared to the control groups. The results of the current study suggest that the use of pentadecapeptide BPC 157 improves the healing of the MCL after surgical transection without modification of tissue structure or causing any pathological changes in other tissues. In addition, the suggested effectiveness of pentadecapeptide BPC 157 on ligament healing should be the result of the stimulation of angiogenesis and collagen formation, changes in collagen content and appearance of various collagen types during healing process, as well as strong anti-inflammatory activity.

9. LITERATURA

1. Woo SL-Y, Chan SS, Yamaji T. Biomechanics of knee ligament healing, repair and reconstruction. *J Biomechanics* 1997;30:431-9.
2. Frank CB, Hart DA, Shrive NG. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments – a review. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:130-40.
3. Woo SL-Y, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and repair of ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 2000;8:364-72.
4. Woo SL-Y, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomechanics* 2006;39:1-20.
5. Lo IKY, Randle JA, Majima T *i sur*. New directions in understanding and optimizing ligament and tendon healing. *Curr Opin Orthop* 2000;11:421-8.
6. Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33:381-94.
7. Woo SL-Y, Jia F, Zou L, Gabriel MT. Functional tissue engineering for ligament healing: potential of antisense gene therapy. *Ann Biomed Eng* 2004;32:342-51.
8. Hildebrand KA, Gallant-Behm CL, Kydd AS, Hart DA. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. *Sports Med Arthrosc Rev* 2005;13:136-44.
9. Creighton RA, Spang JT, Dahners LE. Basic Science of ligament healing. Medial collateral ligament healing with and without treatment. *Sports Med Arthrosc Rev* 2005;13:145-50.
10. Angel MJ, Sgaglione NA, Grande DA. Clinical applications of bioactive factors in sports medicine: current concepts and future trends. *Sports Med Arthrosc Rev* 2006;14:138-45.
11. Kujala UM, Taimela S, Antti-Poika I *i sur*. Acute injuries in soccer, ice hockey, volleyball, basketball, judo, and karate: analysis of national registry data. *BMJ* 1995;2:1465-8.
12. Miyasaka KC, Stone ML, Daniel DM *i sur*. The incidence of knee injuries in the general population. *Am J Knee Surg* 1991;4:3-8.
13. Nakamura N, Shino K. The clinical problems of ligament healing of the knee. *Sports Med Arthrosc Rev* 2005;13:118-26.

14. *Flik K, Lyman S, Marx RG.* American collegiate men's ice hockey: an analysis of injuries. *Am J Sports Med* 2005;33:183-7.
15. *Majewski M, Susanne H, Klaus S.* Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study. *Knee* 2006;13:184-8.
16. *Pressman A, Johnson DH.* A review of ski injuries resulting in combined injury to the anterior cruciate ligament and medial collateral ligaments. *Arthroscopy* 2003;19:194-202.
17. *Phisitkul P, James SL, Wolf BR, Amendola A.* MCL injuries of the knee: current concepts review. *Iowa Orthop J* 2006;26:77-90.
18. *Reider B, Sathy MR, Talkington J i sur.* Treatment of isolated medial collateral injuries in athletes with early functional rehabilitation. *Am J Sports Med* 1993;22:470-6.
19. *Indelicato P.* Isolated medial collateral ligament injuries of the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 1995;3:9-14.
20. *Jacobson KE, Chi FS.* Evaluation and treatment of medial collateral ligament and medial-sided injuries of the knee. *Sports Med Arthrosc Rev* 2006;14:58-66.
21. *Giannotti BF, Rudy T, Graziano J.* The non-surgical management of isolated medial collateral ligament injuries of the knee. *Sports Med Arthrosc Rev* 2006;14:74-7.
22. *Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z i sur.* BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris* 1997;91:173-8.
23. *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.
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 tendon-to-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. *Frank C, Amiel D, Woo SL-Y, Akeson W.* Normal ligament properties and ligament healing. *Clin Orthop Relat Res* 1985;196:15-25.
31. *Benjamin M, Ralphs JR.* Tendons and ligaments – an overview. *Histol Histopathol* 1997;12:1135-44.
32. *Frank CB.* Ligament structure, physiology and function. *J Musculoskel Neuron Interact* 2004;4:199-201.
33. *Bray RC, Salo PT, Lo IK, Ackermann P, Rattner JB, Hart DA.* Normal ligament structure, physiology and function. *Sports Med Arthrosc Rev* 2005;13:127-35.
34. *Johansson H, Sjolander P, Sojka P.* A sensory role for the cruciate ligaments. *Clin Orthop Relat Res* 1991;268:161-78.
35. *Chi SS, Rattner JB, Sciore P, Boorman R, Lo IKY.* Gap junctions of the medial collateral ligament: structure, distribution, associations and function. *J Anat* 2005;207:145-54.
36. *Chowdhury P, Matyas JR, Frank CB.* The «epiligament» of the rabbit medial collateral ligament: A quantitative morphological study. *Connect Tissue Res* 1991;27:33-50.
37. *Bray RC, Rangayyan RM, Frank CB.* Normal and healing ligament vascularity: a quantitative histological assessment in the adult rabbit medial collateral ligament. *J Anat* 1996;188:87-95.
38. *Cooper RR, Misol S.* Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg* 1970;32A:1-20.
39. *Woo SL-Y, Debski RE, Withrow JD, Janaushek MA.* Biomechanics of knee ligaments. *Am J Sports Med* 1999;27:533-43.

40. Woo SL-Y, Gomez MA, Seguchi Y, Endo CM, Akeson WH. Measurement of mechanical properties of ligament substance from a bone-ligament-bone preparation. *J Orthop Res* 1983;1:22-9.
41. Woo SL-Y, Debski RE, Zeminski J, Abramowitch SD, Chan Saw SS, Fenwick JA. Injury and repair of ligaments and tendons. *Annu Rev Biomed Eng* 2000;2:83-118.
42. Nikolić V, Hudec M. Principi i elementi biomehanike. 1. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1988.
43. Woo SL-Y, Danto MI, Ohland KJ i sur. The use of a laser micrometer system to determine the cross-sectional shape and area of ligaments: A comparative study with two existing methods. *J Biomech Eng* 1990;112:426-31.
44. Cohen RE, Hooley CJ, McCrum NG. Viscoelastic creep of collagenous tissue. *J Biomech* 1976;9:175-84.
45. Woo SL-Y, Smith DW, Hildebrand KA, Zeminski JA, Johnson LA. Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament. *Med Biol Eng Comput* 1998;36:359-64.
46. Woo SL-Y, Hildebrand KA, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res* 1999;367:312-23.
47. Hildebrand KA, Frank CB. Scar formation and ligament healing. *Can J Surg* 1998;41:425-9.
48. Niyibizi C, Kavalkovich K, Yamaji T, Woo SL-Y. Type V collagen is increased during rabbit medial collateral ligament healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;8:281-5.
49. Woo SL-Y, Niyibizi C, Matyas J, Kavalkovich K, Weaver-Green C, Fox RJ. Medial collateral knee ligament healing. Combined medial collateral and anterior cruciate ligament injuries studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1997;68:142-8.
50. Frank C, McDonald D, Shrive N. Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connect Tissue Res* 1997;36:261-9.
51. Hannallah D, Peterson B, Lieberman JR, Fu FH, Huard J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 2002;84A:1046-61.
52. Evans CH, Ghivizzani SC, Herndon JH, Robbins PD. Gene therapy for the treatment of musculoskeletal diseases. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:230-42.

53. *Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D i sur.* Current concepts in gene therapy of the musculoskeletal system. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2006;73:115-22.
54. *Liu TS, Weiss KR, Fu FH, Huard J.* Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect* 2006;55:597-611.
55. *Amiel D, Akeson WH, Harwood FL, Frank CB.* Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization. *Clin Orthop Relat Res* 1983;172:265-70.
56. *Binkley JM, Peat M.* The effects of immobilization on the ultrastructure and mechanical properties of the medial collateral ligaments of rats. *Clin Orthop Relat Res* 1986;203:301-8.
57. *Hart DP, Dahners LE.* Healing of the medial collateral ligament in rats. The effects of repair, motion, and secondary stabilizing ligaments. *J Bone Joint Surg* 1987;69A:1194-99.
58. *Inoue M, Woo SL-Y, Gomez MA, Amiel D, Ohland KJ, Kitabayashi LR.* Effects of surgical treatment and immobilization on the healing of the medial collateral ligament: A long-term multidisciplinary study. *Connect Tissue Res* 1990;25:13-26.
59. *Weiss JA, Woo SL-Y, Ohland KJ, Horibe S, Newton PO.* Evaluation of a new injury model to study medial collateral ligament healing: Primary repair versus non-operative treatment. *J Orthop Res* 1991;9:516-28.
60. *Dahners LE, Gilbert JA, Lester GE, Taft TN, Payne LZ.* The effect of a nonsteroidal antiinflammatory drug on the healing of the ligaments. *Am J Sports Med* 1988;16:641-6.
61. *Moorman CT, Kukreti U, Fenton DC, Belkoff SM.* The early effect of ibuprofen on the mechanical properties of healing medial collateral ligament. *Am J Sports Med* 1999;27:738-41.
62. *Elder CL, Dahners LE, Weinhold PS.* A cyclooxygenase-2 inhibitor impairs ligament healing in the rat. *Am J Sports Med* 2001;29:801-5.
63. *Hanson CA, Weinhold PS, Afshari HM, Dahners LE.* The effect of analgesis agents on the healing rat medial collateral ligament. *Am J Sports Med* 2005;33:674-9.
64. *Horn PC, Webster DA, Amin HM, Mascia MF, Werner FW, Fortino MD.* The effect of hyperbaric oxygen on medial collateral ligament healing in a rat model. *Clin Orthop Relat Res* 1999;360:238-42.

65. *Mashitori H, Sakai H, Koibuchi N i sur.* Effect of hyperbaric oxygen on the ligament healing process in rats. Clin Orthop Relat Res 2004;423:268-74.
66. *Takakura Y, Matsui N, Yoshiya S i sur.* Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral injuries in rats. J Ultrasound Med 2002;21:283-8.
67. *Ng GYF, Fung DTC, Leung MCP, Guo X.* Comparison of single and multiple applications of GaAlAs laser on rat medial collateral ligament repair. Lasers Surg Med 2004;34:285-9.
68. *Bayat M, Delbari A, Almaseyeh MA, Sadeghi Y, Bayat M, Rezaie F.* Low-level laser therapy improves early healing of medial collateral ligament injuries in rats. Photomed Laser Surg 2005;23:566-60.
69. *Warden SJ, Avin KG, Beck EM, Dewolf ME, Hagemeyer MA, Martin KM.* Low-intensity pulsed ultrasound accelerates and a nonsteroidal anti-inflammatory drug delays knee ligament healing. Am J Sports Med 2006;34:1094-102.
70. *Barnard JA, Lyons RM, Moses HL.* The cell biology of transforming growth factor beta. Biochim Biophys Acta 1990;1032:79-87.
71. *Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI i sur.* The effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. J Orthop Res 1997;15:18-23.
72. *Scherping SCJr, Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK, Evans CH, Woo SL-Y.* Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. Connect Tissue Res 1997;36:1-8.
73. *Sciore P, Boykiw R, Hart DA.* Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. J Orthop Res 1998;16:429-37.
74. *Batten ML, Hansen JC, Dahners LE.* Influence of dosage and timing of application of platelet-derived growth factor on early healing of the rat medial collateral ligament. J Orthop Res 1996;14:736-41.
75. *Yoshikawa Y, Abrahamsson S.* Dose-related cellular effects of platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro. Acta Orthop Scand 2001;72:287-92.
76. *Letson AK, Dahners LE.* The effect of combinations of growth factors on ligament healing. Clin Orthop Relat Res 1994;308:207-12.

77. *Hildebrand KA, Woo SL-Y, Smith DW i sur.* The effects of platelet-derived growth factor–BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study. *Am J Sports Med* 1998;26:549-54.
78. *Hildebrand KA, Hiraoka H, Hart DA, Shrive NG, Frank CB.* Exogenous transforming growth factor beta 1 alone does not improve early healing of medial collateral ligament in rabbits. *Can J Surg* 2002;45:330-6.
79. *Spindler KP, Dawson JM, Stahlman GC, Davidson JM, Nanney LB.* Collagen expression and biomechanical response to human recombinant transforming growth factor beta (rhTGF- β 2) in the healing rabbit MCL. *J Orthop Res* 2002;20:318-24.
80. *Spindler KP, Murray M, Detwiler KB i sur.* The biomechanical response to doses of TGF- β 2 in the healing rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res* 2003;21:245-9.
81. *Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan Ai, Gordon SL, Fink DJ.* Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406-13.
82. *Watanabe N, Woo SL-Y, Papageorgiu C, Celechovsky C, Takai S.* Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech* 2002;58:39-44.
83. *Watanabe N, Takai S, Morita N, Kawata M, Hirasawa Y.* A new method of distinguishing between intrinsic cells in situ and extrinsic cells supplied by autogeneic transplantation employing transgenic rats. *Trans Orthop Res Soc* 1998;23:1035.
84. *Day CS, Kasemkijwattana C, Mentrey J i sur.* Myoblast-mediated gene transfer to the joint. *J Orthop Res* 1997;15:894-903.
85. *Hildebrand KA, Deie M, Allen CR i sur.* Early expression of marker genes in the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments: the use of different viral vectors and the effects of injury. *J Orthop Res* 1999;17:37-42.
86. *Hildebrand KA, Jia F, Woo SL-Y.* Response of donor and recipient cells after transplantation of cells to the ligament and tendon. *Microsc Res Tech* 2002;58:34-8.
87. *Lou J, Kubota H, Hotokezaka S, Ludwig FJ, Manske PR.* In vivo gene transfer and overexpression of focal adhesion kinase (pp125FAK) mediated by recombinant adenovirus-induced tendon adhesion formation and epitenon cell change. *J Orthop Res* 1997;15:911-8.

88. *Nakamura N, Shino K, Natsuume T i sur.* Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther* 1998;5:1165-70.
89. *Ozkan I, Shino K, Nakamura N i sur.* Direct in vivo gene transfer to healing rat patellar ligament by intra-arterial delivery of haemagglutinating virus of Japan liposomes. *Eur J Clin Invest* 1999;29:63-7.
90. *Sikiric P, Petek M, Rucman R i sur.* A new gastric juice peptide BPC. An overview of stomach – stress – organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris* 1993;87:313-27.
91. *Sikiric P, Banic M, Brkic T i sur.* Effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 and methylprednisolone in a murine model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104:A782.
92. *Veljaca M, Plana R, Lesch CA, Sanchez B, Chan K, Guglietta A.* Protective effect of BPC-157 on a rat model of colitis. *Gastroenterology* 1994;106:789.
93. *Sikiric P, Seiwerth S, Brkic L i sur.* Stable gastric pentadecapeptid 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.
94. *Pare W, Klucyznski JM.* The effect of new gastric juice peptide BPC on classic stress triad in stress procedure. *Exp Clin Gastroenterol* 1992;2:234-6.
95. *Xue XC, Wu YJ, Gao MT i sur.* Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:1032-6.
96. *Pflaum Z, Rucman R.* Solid phase peptide synthesis of the fragment BPC 157 of human gastric juice protein BPC and its analogues. *Acta Chim Slov* 2005;52:34-9.
97. *Veljaca M, Chan K, Guglietta A.* Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-157 in human gastric juice. *Gastroenterology* 1995;108:761.
98. *Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur.* The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N^G –nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosal integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1997;332:23-33.

99. *Turkovic B, Sikiric P, Seiwerth S i sur.* Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL 14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology* 2004;126:287.
100. *Prkacin I, Aralica G, Perovic D i sur.* Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris* 2001;95:295-301.
101. *Bedekovic V, Mise S, Anic T i sur.* Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacol* 2003;477:73-80.
102. *Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur.* The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H₂ receptor agonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 1994;54:PL63-8.
103. *Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur.* Salutory and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1996;41:1518-26.
104. *Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur.* Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Digest Dis Sci* 1996;41:1604-14.
105. *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.
106. *Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur.* The effect of pentadecapeptide BPC 157, H₂ blockers and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *Gastroenterology* 1997;112:A291.
107. *Sikiric P, Separovic J, Anic T i sur.* The effect of pentadecapeptide BPC 157, H₂-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris* 1999;93:479-85.
108. *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.

109. *Tipton CM, Schild RJ, Flatt AE.* Measurement of ligamentous strength in rat knees. *J Bone Joint Surg* 1967;49A:63-72.
110. *Crowninshield RD, Pope H.* The strength and failure characteristics of rat medial collateral ligaments. *J Trauma* 1976;16:99-105.
111. *Vailas AC, Tipton CM, Matthes RD, Gart M.* Physical activity and its influence on the repair process of medial collateral ligaments. *Connect Tissue Res* 1981;9:25-31.
112. *Burroughs P, Dahners LE.* The effect of enforced exercise on the healing of ligament injuries. *Am J Sports Med* 1990;18:376-8.
113. *Wyland DJ, Dahners LE.* The effects of nerve injury on ligament healing in a rat model. *Clin Orthop Relat Res* 1994;307:255-9.
114. *Litke DS, Dahners LE.* Effects of different levels of direct current on early ligament healing in a rat model. *J Orthop Res* 1994;12:683-8.
115. *Campbell RB, Wiggins ME, Cannistra LM, Fadale PD, Akelman E.* Influence of steroid injection on ligament healing in the rat. *Clin Orthop Relat Res* 1996;332:242-53.
116. *Bogatov VB, Weinhold P, Dahners LE.* The influence of a cyclooxygenase-1 inhibitor on injured and uninjured ligaments in rat. *Am J Sports Med* 2003;31:574-6.
117. *Petrovic I, Dobric I, Drvis P i sur.* An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci* 2006;102:269-77.
118. *Venkataraman BV, Shetty PS, Joseph T.* Variations in brain and heart acetylcholine content in rat: cervical dislocation vs guillotine technique. *Indian J Physiol Pharmacol* 1981;25:289-91.
119. *Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershadsky B, Strichartz GR.* Neurologic evaluation of the rat during sciatic-nerve block with lidocaine. *Anesthesiology* 1995;82:1013-25.
120. *Koka R, Hadlock TA.* Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol* 2001;168:192-5.
121. *Frank CB, Loitz BJ, Shrive NG.* Injury location affects ligament healing. A morphologic and mechanical study of the healing rabbit medial collateral ligament. *Acta Orthop Scand* 1995;66:455-62.

122. *Frank CB, Woo SL-Y, Amiel D, Harwood F, Gomez M, Akeson W.* Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits. *Am J Sports Med* 1983;11:379-89.
123. *Chimich D, Frank C, Shrive N, Dougall H, Bray R.* The effect of initial end contact on medial collateral ligament healing: A morphological and biomechanical study in rabbit model. *J Orthop Res* 1991;9:37-47.
124. *Loitz-Ramage BJ, Frank C, Shrive NG.* Injury size affects long-term strength of the rabbit medial collateral ligament. *Clin Orthop Relat Res* 1997;337:272-80.
125. *Chimich D, Frank C, Shrive N i sur.* No effect of mop-ending on ligament healing. Rabbit studies of severed collateral knee ligaments. *Acta Orthop Scand* 1993;64:587-91.
126. *Provenzano PP, Hayashi K, Kunz DN, Markel MD, Vanderby RJr.* Healing of subfailure ligament injury: comparison between immature and mature ligaments in a rat model. *J Orthop Res* 2002;20:975-83.
127. *Wright RW, Parikh M, Allen T, Brodt MD, Silva MJ, Botney MD.* Effect of hemorrhage on medial collateral ligament healing in a mouse model. *Am J Sports Med* 2003;31:660-6.
128. *Fung DT, Ng GY.* Effects of herbal application on the ultrastructural morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. *Connect Tissue Res* 2004;45:122-30.
129. *Fung DT, Ng GY.* Herbal remedies improve the strength of repairing ligament in a rat model. *Phytomedicine* 2005;12:93-9.
130. *Fung DT, Ng GY, Leung MC.* Combined treatment of therapeutic laser and herbal application improves the strength of repairing ligament. *Connect Tissue Res* 2005;46:125-30.
131. *Hildebrand KA, Sutherland C, Zhang M.* Rabbit knee model of post-traumatic joint contractures: the long-term natural history of motion loss and myofibroblasts. *J Orthop Res* 2004;22:313-20.
132. *Trudel G, Uhthoff HK.* Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular? An experimental longitudinal study in the rat knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2000;81:6-13.
133. *Hildebrand KA, Holmberg M, Shrive N.* A new method to measure post-traumatic joint contractures in the rabbit knee. *J Biomech Eng* 2003;125:887-92.

134. *Hildebrand KA, Zhang M, van Snellenberg W, King GJ, Hart DA.* Myofibroblast number are elevated in human elbow capsules after trauma. *Clin Orthop Relat Res* 2004;419:189-97.
135. *Trudel G, Uthoff HK, Brown M.* Extent and direction of joint motion limitation after prolonged immobility: an experimental study in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:1542-7.
136. *Hildebrand KA, Frank CB, Hart DA.* Gene intervention in ligament and tendon: current status, challenges, future directions. *Gene Ther* 2004;11:368-78.
137. *Fukui N, Nakajima K, Tashiro T, Oda H, Nakamura K.* Neutralization of fibroblast growth factor-2 reduces intra-articular adhesions. *Clin Orthop Relat Res* 2001;383:250-8.
138. *Evans EB, Eggers GWN, Butler JK, Blumel J.* Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. *J Bone Joint Surg* 1960;42A:737-58.
139. *Palmer I.* Patophysiology of the medial ligament of the knee joint. *Acta Chir Scand* 1958;115:312-8.
140. *Strobel M, Stedtfeld H-W.* Diagnostic evaluation of the knee. 1.izd. Berlin: Springer-Verlag; 1990, str.69-70.
141. *Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y i sur.* Effect of GDF-5 on ligament healing. *J Orthop Res* 2006;24:71-9.
142. *Akai M, Shirasaki Y, Tateishi T.* Electrical stimulation on joint contracture: an experiment in rat model with direct current. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:405-9.
143. *Fukui N, Katsuragawa Y, Sakai H i sur.* Effect of local application of basic fibroblast growth factor on ligament healing in rabbits. *Rev Rheum Engl* 1998;65:406-14.
144. *Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA i sur.* Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implication for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:2384-97.
145. *Forslund C, Aspenberg P.* OP-1 has more effect than mechanical signals in the control of tissue differentiation in healing rat tendo. *Acta Orthop Scand* 1998;69:622-6.
146. *Aspenberg P, Forslund C.* Enhanced tendon healing with GDF-5 and 6. *Acta Orthop Scand* 1999;70:51-4.

147. *Rickert M, Jung M, Adiyaman M i sur.* A growth and differentiation factor-5 (GDF-5)-coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. *Growth Factors* 2001;19:115-26.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 13. rujna 1962. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završio sam u Zagrebu, kao i Medicinski fakultet (1982.-1988.). Tijekom studija (1988. i 1989. godine) dobio sam dvije Rektorove nagrade za studentski znanstveni rad. Kao liječnik pripravnik radio sam u Domu zdravlja «Novi Zagreb», a od 02. studenog 1989. godine radio sam kao znanstveni pripravnik Katedre za ortopediju u Klinici za ortopediju KBC-a Zagreb. Od 1991. godine radio sam kao stručni suradnik, a od 1996. do 2001. kao asistent Katedre za ortopediju u Klinici za ortopediju KBC-a Zagreb. Od 2001. godine radim kao odjelni liječnik u Klinici za ortopediju KBC-a Zagreb. Specijalizaciju iz ortopedije provodio sam između 1992. i 1996. godine, a u srpnju 1996. položio sam specijalistički ispit.

Školske godine 1988/89. upisao sam poslijediplomski studij Prirodnih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, znanstveno područje Biologija, smjer Biomedicina (Temeljne biomedicinske znanosti), a u svibnju 1991. godine obranio sam magistarski rad pod nazivom «Doprinos istraživanju nestabilnosti patele». Znanstveno-istraživačko zvanje - znanstveni asistent (MB 171746) dobio sam 1993. godine. Objavio sam devet radova u časopisima koji se citiraju u CC (Current Contents), a četrnaest radova u časopisima koji se indeksiraju u ostalim međunarodnim sekundarnim publikacijama (Medline, EMBASE). Osim toga, autor sam više od dvadeset poglavlja u raznim knjigama i udžbenicima, a koautor sam i knjige «Overuse Injuries of the Musculoskeletal System» koja je u izdanju CRC Press-a izdana u dva izdanja - 1993. i 2003. godine. U prosincu 2006. godine priznat mi je naziv primarijus.

Tijekom 1993. godine boravio sam dva mjeseca kao stipendist Austrijske vlade u Klinici za traumatologiju u Innsbrucku (Austrija), a 1994. godine boravio sam mjesec dana kao stipendist Artroskopskog udruženja njemačkoga govornog područja (AGA) u Klinici za ortopediju u Straubingu (Njemačka). Godine 1995. boravio sam kao stipendist Europskog udruženja ortopeda i traumatologa (EFORT) u Nizozemskoj sedam dana. Potom sam 1999. godine također boravio mjesec dana u Nizozemskoj i to u Klinici za

ortopediju u Nijemegen-u kao stipendist Europskog udruženja za kirurgiju koljena, sportsku traumatologiju i artroskopiju (ESSKA). Tijekom tih boravaka produbljivao sam znanje iz područja svoga interesa, a to su artroskopska kirurgija koljena i gležnja te sportska traumatologija.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog ortopedskog društva, Hrvatskog udruženja ortopeda i traumatologa te Europskog udruženja za kirurgiju koljena, sportsku traumatologiju i artroskopiju (ESSKA). Aktivno sam sudjelovao na brojnim domaćim i međunarodnim ortopedskim simpozijima i kongresima.

Engleski jezik govorim i pišem.

Oženjen sam i otac sam dviju kćeri.