Učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 u atrofiji mišića nakon resekcije patelarnoga ligamenta na modelu štakora

Knez, Nikica

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:718110

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Nikica Knez

UČINAK PRIMJENE PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 U ATROFIJI MIŠIĆA NAKON RESEKCIJE PATELARNOGA LIGAMENTA NA MODELU ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Nikica Knez

THE EFFECT OF APPLYING PENTADECAPEPTIDE BPC 157 IN MUSCLE ATROPHY AFTER RESECTION OF PATELLAR LIGAMENT IN A RAT MODEL

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019.

Ovaj doktorski rad je izrađen na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Predraga Sikirić, dr.med., i prof. dr. sc. Aljoše Matejčić, dr. med., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORIMA

Prof.dr.sc. Predrag Sikirić

Rođen je 22.05.1954. g. u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1973. g. i diplomirao 1978. g. Nakon trogodišnjeg rada u ambulanti hitne medicinske pomoći u Kutini, 1982. g. dolazi na specijalizaciju iz farmakologije na Kliniku za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Po poloţenim specijalističkim ispitom 1987. g. primljen je na Kliniku za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu gdje ostaje do danas. Svih godina odlikuje se stručnim radom na području farmakologije posebno u razoju novih lijekova i farmakoterapije peptidima. Magistarski rad obranio je 1982. g. a doktorsku disertaciju 1987. g.

1990. g. izabran je za docenta na Katedri za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, 1996. g. za zvanje izvanrednog profesora, a 2007. za redovitog profesora na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2004 voditelj je ureda za studentska pitanja na Medicinskom fakultetu. Objavio je više od 130 publikacija u istaknutim indeksiranim međunarodnim stručnim časopisima te ima 2800 citata.

Aktivni je istraživač na projektu „Aplikacije dopamina u gastrointestinalnom traktu“ i voditelj je znanstvenog projekta „Pentadekapeptid BPC 157-daljnji razvoj“. Sudjeluje u diplomskoj i postdiplomskoj nastavi iz područja farmakologije. Mentor je brojnih diplomskih radova i mentor/komentor u poslijediplomskom, doktorskom studiju.

Prof. dr. sc. Aljoša Matejčić

Rođen je 16.2.1956. godine u Puli, osnovnu školu i gimnaziju završio u Rovinju, a Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci diplomirao 5.1.1981.

1985. započeo specijalizaciju iz ortopedije za Ortopedsku bolnicu u Rovinju, iste godine upisao poslijediplomski studiji iz ortopedije na Sveučilištu u Zagrebu. 1988. promijenio specijalizaciju u opću kirurgiju i položio ispit iz specijalizacije 1990. Od tada radi kao odjelni liječnik na traumatološkom odjelu KB"Sestre milosrdnice" u svojstvu specijaliste opće kirurgije.1992. završio postdiplomski iz ortopedije s magistarskim radom : Razvoj krova acetabuluma nakon repozicije prirođenog iščašenja kuka.1992. postaje znanstveni asistent u znanstvenom području medicine a 1992. asistent za kolegij opća i ratna kirurgija Stomatološkog fakulteta. 1994. doktorira na temu: Stupanj stabilnosti osteosinteze košarastom pločicom u ozljeđenika s prijelomom patele ispitano u eksperimentu i kliničkoj kazuistici. Stekao akademski stupanj doktora medicinskih znanosti na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 1995. biran u znanstveno nastavno zvanje docenta na SF Sveučilišta u Zagrebu. 2001. izabran za Predstojnika Klinike za kirurgiju KB „Sestre milosrdnice" u mandatu od četiri godine. 2005. drugi izbor u znanstveno nastavni zvanje izvanrednog profesora na Katedri za opću i ratnu kirurgiju SF u nastavnoj bazi KB „Sestre milosrdnice".

2010. Redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu u području biomedicine i zdravstva , polje kliničke znanosti – kirurgija a 2012. godine postaje predstojnik Klinike za traumatologiju KBC „Sestre milosrdnice" u Zagrebu.

Voditelj Poslijediplomskog specijalističkog studija SF Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj je predmeta: Cijeljenje kostoloma u konzervativnom i operativnom postupku.

Glavni ispitivač međunarodnog projekta odobrenog od Ministarstva zdravstva RH: Prospektivna radiostereometrijska studija kod potpune zamjene zgloba kuka pomoću medicinskog proizvoda Scyon orthopaedics THR kroz 5 godina u 15 bolesnika s neupalnim artritisom kuka kod kojih je bila potrebna totalna artroplastika kuka.

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru i vrsnom stručnjaku prof. dr. sc. Predragu Sikirić i Prof. dr. sc. Aljoši Matejčić. Uz pružanje svih potrebnih stvari u radu s eksperimentalnim životinjama, bili su uvijek spremni ponuditi najbolje rješenje za probleme koji su se javljali. Cijelo vrijeme su bili veliki motivatori i bez njih ovaj rad ne bi uspio.

Zahvalu, također, dugujem kolegama i osoblju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Opće bolnice Varaždin koji su uvijek imali razumjevanje za moj rad i pružali pomoć kada je bila potrebna. Velika Hvala na radu i zalaganju kolegama sa Zavodu za patologiju MEF-a na čelu sa Prof. dr.sc. Svenom Seiwerth.

I na kraju, najveću zahvalu iskazujem cijeloj svojoj obitelji koja me je poticala, davala snagu u teškim trenutcima nakon iscrpnog rada u bolnici i laboratoriju te nudila razumjevanje za sve trenutke kada nisam bio s njima.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

UČINAK PRIMJENE PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 U ATROFIJI MIŠIĆA NAKON RESEKCIJE PATELARNOGA LIGAMENTA NA MODELU ŠTAKORA

NIKICA KNEZ

Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Atrofija mišića je neminovna pri imobilizaciji ekstremiteta. Definitivno smanjuje izglede za dobrim ishodom liječenja. Radi se uglavnom o reverzibilnom oštećenju mišića koje u većini slučajeva rezultira samo produženom rehabilitacijom, međutim, nije rijedak slučaj da dovodi do trajne smanjene funkcije ekstremiteta.

S obzirom da ne postoji za sada farmakoterapija koja bi spriječila ili umanjila razvoj atrofije mišića mi smo postavili hipotezu da pentadekapeptid BCP157 preko NO sustava sprečava razvoj atrofije te kasnije pospješuje regeneraciju mišića, imajući u vidu ranija istraživanja o resekciji i natučenju mišića, resekciji tetive i ligamenta, cijeljenju rana te protuupalnom djelavnju pentadekapeptida BCP 157.

Štakore sa reseciranim patelarnim ligamentom na stražnjoj lijevoj nozi smo tretirali peroralno i parenteralno s BPC157 (10ug/kg), L-NAME (5 mg/kg) i L-argininom (100 mg/kg) pojedinačno i/ili u kombinaciji.

Imajući u vidu da kod reseciranog patelarnog ligamenta dolazi do atrofije mišića, a shodno prethodnim našim radovima, mjerili smo učinak pentadekapeptida BPC 157 tako što smo činili kliničko-funkcionalne testove i histološki analizirali promjene u mišiću.

Pomoću RT-PCR-a su istraživane razine eNOS, iNOS, COX-2 mRNA iz tkiva mišića. Doprinos rada (definiranje opsežnosti razvoja atrofije te sprečavanje iste, te benefitni učinak BPC 157) predstavljat će značajnu znastvenu novost.

(73 stranica, 16 slika, 5 tablica, 83 literaturnih navoda, jezik izvornika - hrvatski)

Ključne riječi: atrofija mišića, BPC 157, NO sustav, cijeljenje, štakori

Mentori: Prof.dr.sc. Predrag Sikirić, Prof.dr.sc. Aljoša Matejčić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Ivan Bojanić; Prof. dr. sc.Zoran Tadić; dr. sc. Josipa Vlainić

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

THE EFFECT OF APPLYING PENTADECAPEPTIDE BPC 157 IN MUSCLE ATROPHY AFTER RESECTION OF PATELLAR LIGAMENT IN A RAT MODEL

NIKICA KNEZ

Department of Pharmacology, University of Zagreb Medical School

Muscle atrophy is inevitable in limb immobilization. Definitely reduces the chances of a good outcome. It is usually about reversible muscle damage, which in most cases results in only prolonged rehabilitation, however, is not a rare case that leads to a permanently reduced extremity function.

Given that there is no pharmacotherapy that would prevent or reduce the development of muscle atrophy, we hypothesized that pentadecapeptide BCP157 in relation to NO system reduces the development of atrophy and subsequently promotes muscle regeneration, taking into account previous studies of muscle resection, tendon and ligament resection, wound healing and favorable antiinflammatory effects of pentadecapeptide BCP 157.

Rats with a resected patellar ligament on the back left leg will be treated with oral and parenteral BPC157 (10ug/kg, 10ng/kg), L-NAME (5 mg / kg) and L-arginine (100 mg / kg) alone and / or in combination.

Having in mind that the resection of patellar ligament causes muscle atrophy, according to our previous work, we will measure the effects of pentadecapeptide BPC 157, we will do clinical functional tests and histological analysis of the lesions in the muscle.

RT-PCR will investigated levels of eNOS, iNOS, COX-2 mRNA from muscle tissue. The contribution of study will be in defining comprehensive development of atrophy and prevention of the same, and benefit effects of BPC 157 which will provide a significant scientific novelty.

(73 pages, 16 images, 5 tables, 83 literary citations, source language - Croatian)

Key words: muscle atrophy, BPC 157, NO system, healing, rats

Mentors: Prof.dr.sc. Predrag Sikirić, Ph.D. Aljoša Matejčić

Evaluators: Prof. dr. sc. Ivan Bojanić; Prof. dr. sc. Zoran Tadić; dr. sc. Josipa Vlainić

S A D R Ž A J

1. UVOD 12
   1.1 Hipoteza 12
   1.2 Cilj rada 13
2. LITERATURNI PREGLED 14
   2.1 Anatomija mišića 14
   2.2 Funkcija mišića 16
   2.3 Atrofija mišića – patofiziologija 17
      2.3.1 Ubikvitin-proteasomalni sustav 17
      2.3.2 Autofagosom-lizosomalni mehanizam 18
   2.4 Pentadekapeptid BPC 157 20
   2.5 NO sustav 24
   2.6 NO sustav - pentadekapeptid BPC 157 26
   2.7 Učinak pentadekapeptida BPC 157 na tkiva i organske sustave 28
   2.8 Učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje 31
3. MATERIJALI I METODE 34
   3.1 Protokol pokusa 34
      3.1.1 Lijekovi korišteni u istraživanju 34
   3.2 Razina MDA u tkivu 37
   3.3 Genska testiranja 37
      3.3.1 Kvantitativni PCR (PCR u stvarnom vremenu) 39
   3.4 Statističke metode 41
4. REZULTATI 42
   4.1 Kliničko morfološka testiranja: 42
   4.2 Patohistološka analiza 50
   4.3 Rezultati genskog testiranja 52
   4.4 Razina nitrit oksida u tkivima 53
5. RASPRAVA 55
6. ZAKLJUČAK 62

7. LITERATURA 63
8. POPIS KRATICA 71
9. ŽIVOTOPIS 73

1. UVOD

Atrofija mišića je definirana kao smanjenje mišićne mase, može biti djelomična ili potpuna, a razvija se kod neaktivnosti mišića koji mogu biti posljedica dugotrajne imobilizacije, denervacije ili nekih drugih patoloških oboljenja koji imaju za posljedicu neaktivnost mišića. Obično se javlja kao reverzibilni proces kod kojeg nakon otklanjanja uzroka neaktivnosti mišića dolazi do potpunog oporavka mišića uz fizikalnu terapiju, ali kod dugotrajnije neaktivnosti nerijetko dođe i do trajne atrofije mišića i ireverzibilnog gubitka snage. U suvremenoj medicini glavni čimbenik za pojavu mišićne atrofije je imobilizacija, nemogućnost kretanja uslijed ozljeda u smislu prijeloma kosti, puknuća tetiva, ligamenata ili mišića te za sada jedini način sprječavanja i liječenja mišićne atrofije je što prije mogući povratak funkcije mišića tako što se reparira ozlijeđeni mišić, tetiva, ligament ili kost.

Atrofija mišića može rezultirati i kao posljedica nekoliko uobičajenih bolesti, uključujući zloćudnu bolest, AIDS, kongestivno zatajenja srca, KOPB (kronična opstruktivna plućna bolest), zatajenja bubrega ili teških opeklina. Osim toga, dugotrajno izgladnjivanje na kraju dovodi do atrofije mišića.

U slučaju prijeloma kosti kad se odluči za konzervativnu terapiju ozlijeđeni se ekstremitet imobilizira sadrenom longetom te takvo liječenje traje najmanje 3 tjedna te neminovno dolazi do atrofije mišića. Jedini način u tom slučaju je da se imobilizira funkcionalnom imobilizacijom kod koje se minimalno imobilizira ozlijeđeni ekstremitet te uz pomoć fizikalne terapije se započne čim prije sa vježbama ekstremiteta.

Kod neurološki uzrokovane atrofije mišića dolazi do gubitka inervacije, centralno kod oštećenja mozga ili periferno kod prekida živčanih putova, a za posljedicu također ima neaktivnost mišića i posljedičnu atrofiju. U ovom slučaju ako uzrok gubitka inervacije potraje kraće može se spriječiti pasivnim vježbama u sklopu fizikalne terapije, no, kod dugotrajnijih oštećenja ireverzibilna atrofija mišića je neizbježna.

Za sada ne postoji farmakoterapija koja bi spriječila ili umanjila pojavnost atrofije mišića.

1.1 Hipoteza

Iz dosadašnjih istraživanja učinaka pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje rana, reparaciju tetiva te učinak na cijeljenje kosti kao i utjecaja pentadekapeptida BPC 157 na regulaciju NO-sustava hipoteza ovog istraživanja jest da primjena pentadekapeptida BPC 157 sprečava razvoj atrofije te poboljšava reparaciju mišića u štakora. To se pokazuje primjenom

pentadekapeptida BPC 157 kod blokade (L-NAME) i/ili stimulacije (prekursor L-arginin).
Do sada nije otkrivena farmakoterapija koja bi spriječila razvoj atrofije mišića kod imobilizacije, odnosno neaktivnosti mišića a koja predstavlja jako veliki problem kod različitih ozljeda mekih i tvrdih tkiva koji za posljedicu imaju dugotrajnu neaktivnost a učinak pentadekapeptida BPC 157 već je dokazan u cijeljenju drugih tkiva, te je pretpostavka je da se povoljan učinak primjene ovog agensa koji utječe na NO-sustav može očekivati i u sprečavanju razvoja atrofije mišića te kontrakture zgloba.

1.2 Cilj rada

Cilj ovog istraživanja je utvrditi uključenost NO-sustava, stimulacije i/ili blokade, u proces razvoja atrofije mišića prilikom resekcije patelarnog ligamenta te utvrditi učinak pentadekapeptida BPC 157 na navedeni proces u interakciji s NO-sustavom, blokadom (L-NAME) odnosno stimulacijom (L-arginin).
Specifični ciljevi istraživanja:

1. Ispitati učinak pentadekapeptida BPC 157 na razvoj atrofije mišića nakon resekcije patelarnog ligamenta
2. Ispitati učinak pentadekapeptida BPC 157 na razvoj kontrakture ekstremiteta
3. Ispitati učinak pentadekapeptida BPC 157 na smanjenje opsega natkoljenice
4. Ispitati učinak pentadekapeptid BPC 157 na gubitak snage ekstremiteta nakon resekcije patelarnog ligamenta
5. Ispitati na koji način pentadekapeptid BPC 157 utječe na funkciju ekstremiteta nakon resekcije ligamenta
6. Ispitati međusobni odnos kombinacije pentadekapeptida BPC 157, L-arginina i L-NAME odnosno NO-sustava na gore navedeno (ad 1-5).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Anatomija mišića

Mišićno tkivo predstavlja najveće i najzastupljenije tkivo u ljudskom tijelu i tvori oko 40% težine tijela. Uglavnom se hvata na dvije susjedne kosti koji su povezane zglobom koji isti premošćuje. Nazva se poprečnoprugasti mišić jer pod mikroskopom daje efekt poprečne ispruganosti, a javlja se zbog posebne ultrastrukture mišičinih vlakanaca koje se nalaze u citoplazmi mišićnih stanica. Osim poprečnoprugastog mišića postoje još i glatki mišići te srčani mišić, ali oni neće biti razmatrani u ovom radu.

Mišić je sačinjen od mišićnih stanica, dobro organizirane živčane i vaskularne mreže te međustaničnog vezivnog tkiva. Ovakva složena struktura neophodna je kako bi se omogućilo pokretanje zglobova, njihova sihroniziranost koja uvjetuje kretanje tijela, a na kraju prilikom ozljeda i mogućnost regeneracije (Garrett WE Jr BT, 1994.).

Osnovni element mišića je više jezgrena stanica koja se naziva i mišićno vlakno. Ono ima oblik cilindra sa zaobljenim krajevima koji završavaju u vezivnom tkivu tetive. Međusobno su usporedna tako da na transverzalnoj projekciji imaju kružan oblik promjera 10-100 μm. Dužinom variraju, tako da mogu biti duga od 1 mm pa sve do 30 cm. Citoplazma miofibrila tj. sarkoplazma sadrži brojne jezgre, stanične organele kao što su Golđijev aparat, mitohondriji i citoplazmatski retinakulum, lipide, glikogen i mioglobin, a sve obavija stanična ovojnica - sarkolema. Sarkolema ima dva sloja, unutarnji sloj je plazmalema, a vanjski bazalna membrana. Jezgre su periferno postavljene. U trenutku nastanka mišićnog vlakna fuzijom mnogih mioblasta jezgre su centralno da bi kasnije poprimile subsarkolemsku poziciju. Ponovna pojava centralne nukleacije u zrelom mišiću ukazuje na trenutni proces regeneracije. Mišićna vlakanca se pružaju dužinom vlakna u sarkoplazmi. Ona zauzimaju 80% ukupnog volumena mišićne stanice. Sastoje se od kontrakcijskih proteina aktina i miozina. Tanki filamenti su građeni većinom od aktina, a debeli od miozina te su naizmjenično raspoređeni u mišićnom vlakancu. Debeli filamenti miozina zauzimaju središnji dio sarkomere te se dijelom preklapaju s tankim filamentima aktina. To mjesto na mikroskopskom preparatu je deblje što rezultira tamnom anizotropnom prugom (A-pruga). Mjesto na mikroskopskom preparatu gdje se nalaze samo filamenti aktina čine svjetliju izotropnu prugu (I-pruga). U središnjem dijelu tamne A-pruge nalazi se malo svjetlija H-pruga (samo filamenti miozina, ne preklapaju se s aktinom), a u njenom središtu je svjetlija M-crta. Anizotropna i izoptropna pruga se izmjenjuju što rezultira karakterističnim optičkim

svojstvom ovog mišićnog tkiva i daje mu poprečnu prugavost. Miofilamenti su ustrojeni u veće funkcionalne jedinice koje se nazivaju sarkomere veličine 2 μm i debljine 1 μm. Upravo sarkomere daju karakterističan, poprečno prugasti izgled mišiću vidljiv na mikroskopu. One su okružene mrežom srakoplazmatskog retinakuluma i sustavom T-tubula. Sarkoplazmatski retinakulum služi kao rezervoar kalcija koji se otpušta prilikom mišićne kontrakcije. T-tubuli su invaginacije sarkoleme koji se okomito spuštaju te prilikom kontrakcije prenose val depolarizacije s površine u dubinu stanice. Između miofibrila, a posebice ispod stanične membrane nalaze se mitohondriji koji služe za dobivanje energije u stanici, a u samoj sarkoplazmi je pohranjena i velika količina glikogena. Sve to daje mišićnom vlaknu da se može skratiti i rastegnuti za polovicu svoje dužine u mirovanju.

Mišićno tkivo nema međustanične tvari te je između vlakana uloženo rahlo vezivno tkivo koje vlakna povezuje u organiziranu jedinicu, dajući mu oblik, a osigurava dovod krvnih žila, limfnih žila i živčanih vlakana do svakog mišićnog vlakna. Udio strome u mišiću je 10 do 40 %. Oko svakog vlakna nalazi se rahlo vezivno tkivo, endomizij. U njemu se nalaze kapilare koje anastomoziraju i živčano vlakno koje pristupa na motornu ploču na površini vlakna. Vlakna se udružuju u snopiće koji su obavijeni vezivom, perimizijem. A oko cijelog mišića je isto sloj vezivnog tkiva, epimizij. On je povezan ovojnicom tj. fascijom sačinjenom od formiranog vezivnog tkiva. Mišići slične funkcije uglavnom se udružuju u skupine, a nalaze se u odjeljcima, kompartmentima, koje odjeljuju vezivne pregrade odgovarajuće fascije koja obavija taj dio tijela.

2.2 Funkcija mišića

Mišić je putem živčanih vlakana uključen u živčani sustav i funkciju cijelog organizma. Motoneuron po dolasku na mišić daje brojne aksonalne ogranke koji se preko motorne ploče vežu za pojedino mišićno vlakno. Svaka stanica ima po jedan ogranak, a pojedini ogranak može inervirati više mišićnih stanica. Stanice i pripadajući akson čine motornu jedinicu. Njena veličina ovisi o potrebama pojedinog mišića. Tako u mišićima gdje su nužni precizni pomaci, motorne jedinice sadržavaju svega nekoliko mišićnih vlakana za razliku od onih gdje je važna snažna reakcija. U njima svaki akson može opskrbljivati i tisuću vlakana.

Kada impuls, odnosno val depolarizacije, stigne živcima do motorne ploče na njenoj presinaptičkoj strani otvaranjem kanala i ulaskom kalcijevih iona dolazi do otpuštanja mjehurića ispunjenih acetilkolinom. Na mišićnoj strani sinapse vezanjem acetilkolina na receptore dolazi do depolarizacije mišićne stanice. Akcijski potencijal T-tubusima putuje i duboko se spušta u mišićnu stanicu te otpušta ione kalcija iz sarkoplazmatskog retinakuluma. Oni se potom vežu za troponin koji sa svojim strukturnim promjenama omogućuje miozinu savijanje i vezanje za aktin i pri tome dolazi do njihovog međusobnog pomicanja što vidimo kao kontrakciju (Amthor i sur. 2009.). Ubrzo dolazi do vezanja ATP-a na miozin što pak uzrokuje otpuštanje međusobnog spoja aktin-miozin te vraćanje na prvotni položaj. Vezanjem ATP se hidrolizira, a energija oslobođena time ostaje pohranjena na molekuli miozina što je potrebno za sljedeću kontrakciju. Na kraju molekule kalcija se pohranjuju u sarkoplazmatskoj mrežici, a troponin ponovno zauzima svoje inhibitorno mjesto između aktin-miozin kompleksa (Lecker i sur. 2006.).

Mišići da bi ostvarili pokret moraju raditi u strogo kontroliranom i koordiniranom odnosu. S jedne strane nalazi se grupa mišića koja čini pokret (sinergisti), a nasuprot njih grupa mišića (antagonisti) radi im otpor. Njihov međusobni odnos se mijenja ovisno o specifičnosti pojedinog pokreta. Postoje 3 tipa mišićnih vlakana. Tip 1 označava spora vlakna izdržljiva na opterećenje, tib 2B brza vlakna neotporna na duže opterećenje te tip 2A brza i srednje otporna vlakna. U svakom mišiću postoji njihova kombinacija koja se može mijenjati ovisno o fiziološkim zahtjevima. Snaga mišića proporcionalna je njegovoj debljini, a brzina o tipu i dužini pojedinih mišićnih vlakana.

Ovisno o broju i snazi živčanih impulsa razlikuje se jačina kontrakcije. Mišić se može kontrahirati na mnogo načina. U koncentričnoj kontrakcija snaga stiskanja mišića je jača nego otpor tako da dolazi do skraćenja mišića i kretanje ekstremiteta u smjeru skraćenja mišića. Suprotno od toga ukoliko je otpor veći od stiska mišića dolazi do ekscentrične kontrakcije i produženja mišića te kretanja ekstremiteta u suprotnom smjeru. Ukoliko je snaga mišića

upravo onolika koliko i otpor ne dolazi do promjene dužine mišića i ekstremitet zadržava položaj. Tada govorimo o izometričkoj kontrakciji.

2.3 Atrofija mišića – patofiziologija

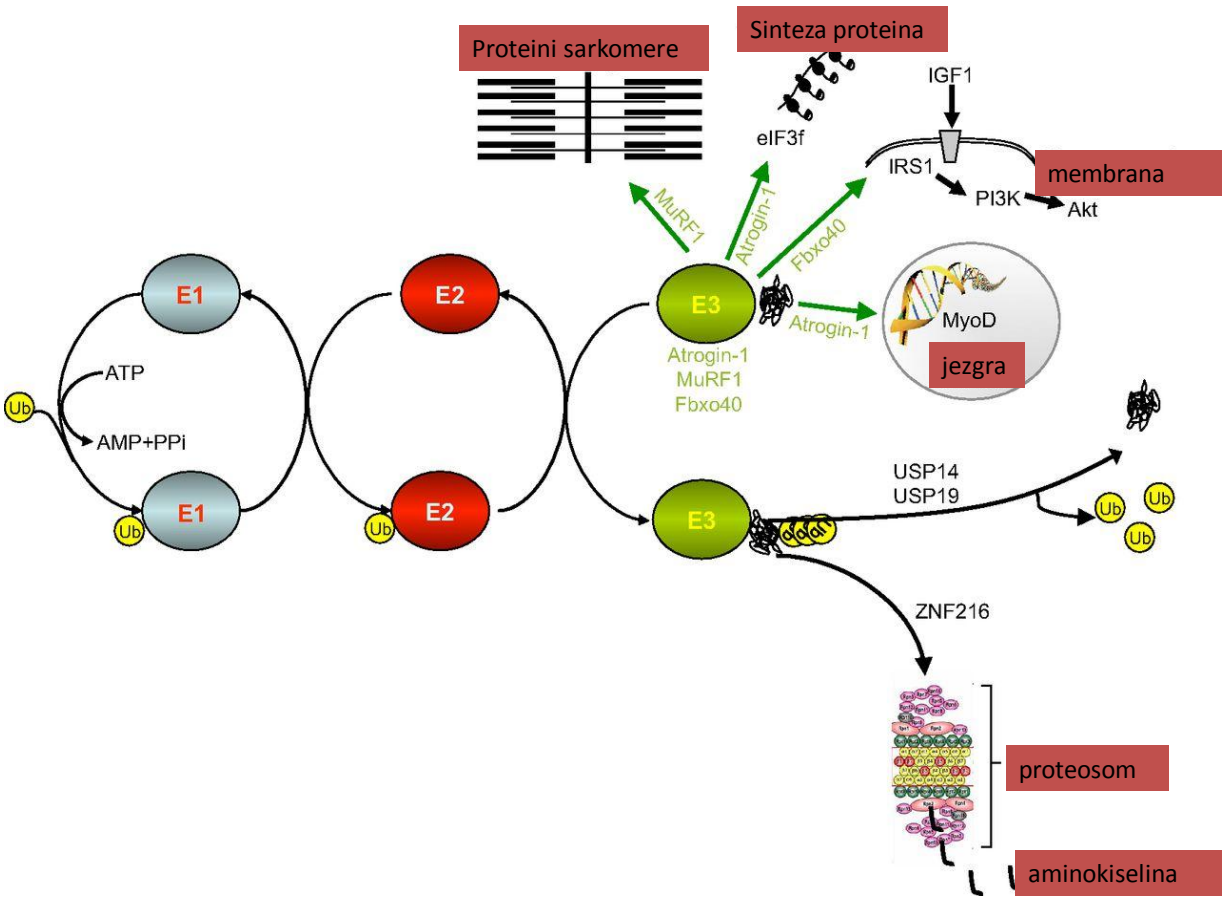
Mišići su najveći proteinski rezervoar u tijelu. Mišići služe kao izvor amino kiselina koji se mogu upotrijebiti za proizvodnju energije u različitim organima (uključujući srce, jetru i mozak) tijekom perioda kada dolazi do katabolizma a to su stanja kao što je rak, sepsa, opekline, zatajenja srca i AIDS-a. Međutim, prekomjerna razgradnja proteina u skeletnim mišićima vrlo je štetno i može dovesti do smrti. Osim toga, prekomjerni gubitak mišićne mase je loš prognostički pokazatelj i može negativno utjecati na učinkovitost različitih terapijskih postupaka. Tako kaheksija u konačnici pogoršava bolest te povećava morbiditet i mortalitet.

Mišićna masa ovisi o prometu proteina u stanici (Sartorelli i Fulco, 2004.). U smislu regeneracije mišića, glavni čimbenik su satelitske stanice, populacija nediferenciranih miogenih stanica koje su smještene između bazalnog sloja i plazma membrane mišićnih vlakana. Iako ove stanice igraju važnu ulogu u postnatalnom rastu mišića, nedavna istraživanja su dokazala da su satelitske stanice potrebne za održavanje mišićne mase i hipertrofije u odrasloj dobi (Amthor i sur. 2009.; Blaauw i sur., 2009. ; McCarthy i sur., 2011, Raffaello i sur. 2010.; Sartori i sur., 2009).

Atrofija je definiran kao smanjenje veličine tkiva ili organa zbog smanjenja veličine stanica. Smanjenje veličine stanica uzrokovano je gubitkom organela, citoplazme i proteina. Postoje dva najvažnija proteolitička mehanizma koji nadziru promet proteina u stanici a to su ubikvitin-proteosomalni i autofagosom-lizosomalni mehanizam.

2.3.1 Ubikvitin-proteasomalni sustav

U mišića ubikvitin-proteasomalni sustav je zadužen za uklanjanje sarkomera koje uzrokuju smanjenje aktivnosti mišića. Smanjenje mišićne mase je povezano sa: (1) povećanjem konjugacije ubikvitina sa mišićnim proteinima; (2) povećanjem proteasomalne aktivnosti; (3) povećanjem razgradnje inhibitora proteasoma; i (4) regulacijom transkripcije ubikvitina te nekih njegovih enzima (Lecker i sur., 2006) (Sl. 1).



Slika 1. Ubikvitin-proteasomalni mehanizam. E1 enzim aktivira ubikvitin nakon cijepanja ATP-a te prelazi na Enzim E2. Konačnu ubikvitilaciju katalizira E3 enzim. E3 se veže na E2 i protein supstrat, inducira prijenos ubikvitina sa E2 na supstrat. Kad se supstrat poliubikvitinira na njega se veže proteasom te se razgradi. ZNF216 sudjeluje u prepoznavanju ubikvitiliranog proteina i njegovom vezanju za proteasom te razgradnji kod mišićne atrofije. Atrogin-1 regulira transkripciju faktora MyoD i eIF3f, što je presudno za sintezu proteina. Fbxo40 regulira transkripciju IRS1, bitan faktor za IGF1 / inzulinske signalizacije, dok MuRF1 regulira nekoliko sarkomerskih proteina. E3 ubikvitin ligaza su prikazane u zelenoj boji. IRS1 receptor inzulina supstrata 1; Ub, ubikvitin.

2.3.2 Autofagosom-lizosomalni mehanizam

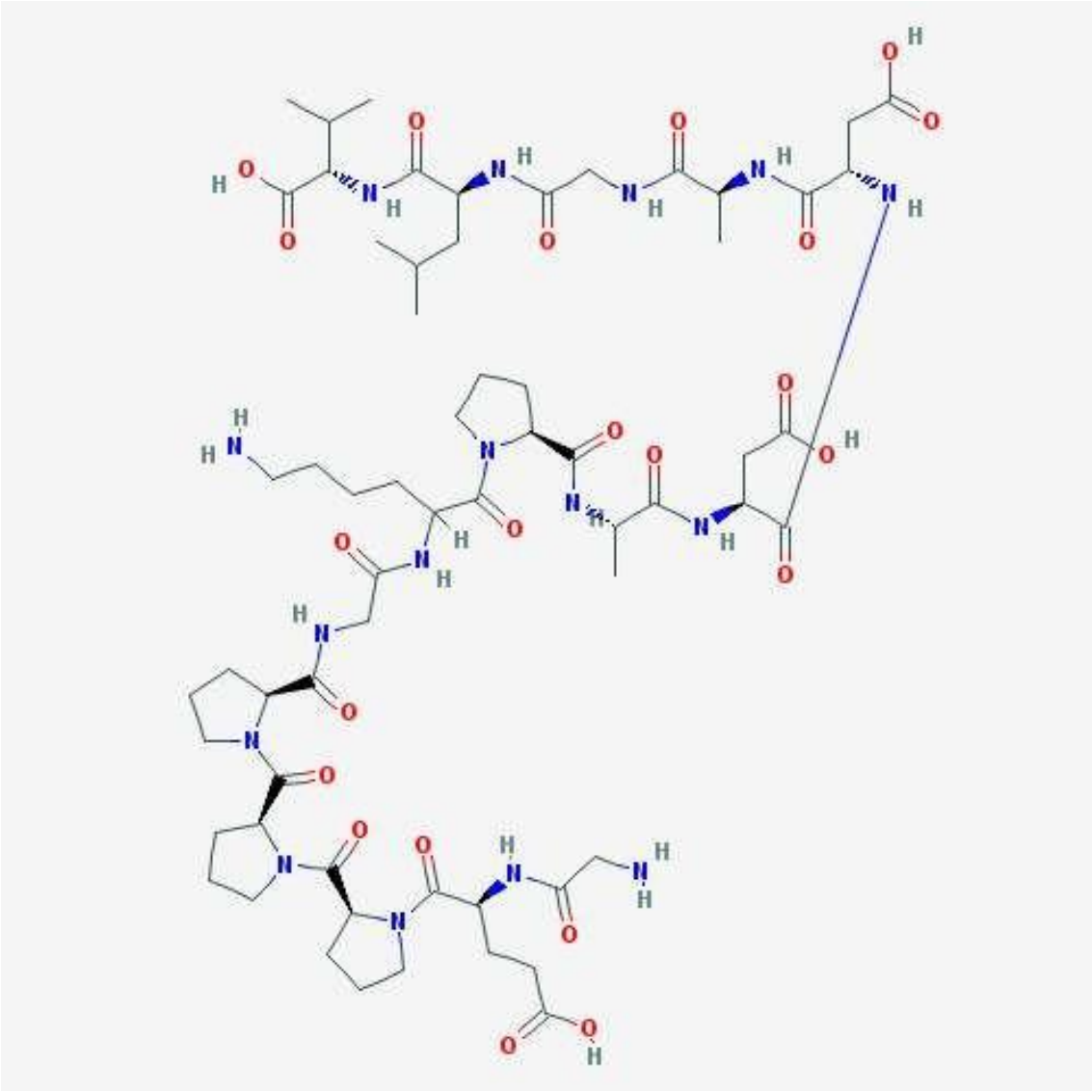
Makroautofagija je mehanizam degradacije proteina unutar stanice u kojem sudjeluju dva najvažnija čimbenika a to su autofagosom i lizosom. Autofagosom je okrugla stanična struktura s dvostrukim slojem membrana. To je ključna struktura u makroautofafgiji, unutarstaničnoj razgradnji citoplazmatskog sadržaja (npr. abnormalni untarstanični proteini, višak ili oštećenja organela), kao i za invaziju mikroorganizama. Nakon formiranja, autofagosomi dostavljaju citoplazmatske komponente u lizosome.

Vanjska membrana autofagosoma se spaja sa lizosomom i formiraju autolizosome. U

lizosomima, hidrolaze degradiraju sadržaj koji su isporučili autofagosomi i njihove unutrašnje membrane. Formiranje autofagosoma je regulirano genima.

2.4 Pentadekapeptid BPC 157

Devedesetih godina prošlog stoljeća Sikirić i suradnici su postavili teoriju da organizam proizvodi inicijatore stresnog odgovora koji protektivno mogu djelovati na cijeli organizam. Želudac je najosjetljiviji dio probavne cijevi i najveći neuroendokrini organ pa su zato Sikirić i suradnici pretpostavili da bi baš želudac bio mjesto sintetiziranja ovakvog inicijatora stresnog odgovora. Koncept je prema tome nazvan organoprotekcija. Neki od organoprotektora su već bili poznati kao što su na primjer prostaglandini, somatostatin i dopamin. Sikirić i suradnici su tako iz želučanog soka izolirali polipeptid koji su nazvali BPC (Body Protection Compound) i zatim istražili njegov ulomak dug 15 aminokiselina (BPC157) za koji su misli da ima ključne terapijske učinke (Sikirić i sur. 1992). Sikirić i suradnici su koristeći različite modele tkivnog oštećenja pokazali da BPC157 ima protektivni učinak na gotovo sve organske sustave, iako tada još nije bio ustanovljen mehanizam njegovog djelovanja. Učinak je bio ostvaren vrlo niskim dozama (reda veličine mikrogarama ili nanograma po kilogramu tjelesne težine), nakon različitih modaliteta primjene bilo intraperitonealno, intragastično, intramuskularno ili lokalno. Dugodjelujući učinak se vidio nakon prve terapijske primjene. BPC157 je pokazao učinak bilo da je bio primijenjen zajedno s patološkom noksom ili nakon razvijene kliničke slike, ali i u kroničnim patološkim uvjetima. Time se BPC157 izdvojio kao posebno terapijsko sredstvo različito od svih dotadašnjih odnosno konvencionalnih organoprotektora. Posebno s toga što nije toksičan jer letalna doza unatoč vrlo visokim koncentracijama nije postignuta. Time je BPC157 kao polipeptid ostao prototip za stvaranje sasvim nove skupine lijekova (Sikirić i sur. 1993). Ova skupina autora je do sada objavila 82 znanstvena rada koja je odnose na učinke polipeptida BPC157, od čega jedan izvještaj o fazi II kliničkog ispitivanja terapijske primjene BPC157 u upalnoj bolesti crijeva (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL 14736). Pentadekapeptid BPC 157 (BPC 157) stabilni je polipeptid molekularne težine 1419 čija je aktivnost prvi puta opisana u preglednome radu „Journal of Physiology“ (Paris) 1993. godine. Aktivna komponenta ovoga polipeptida građena je od 15 aminokiselina (Gly, Glu, Pro, Pro, Pro, Gly, Lys, Pro, Ala, Asp, Asp, Ala, Gly, Leu, Val). Izoliran je primarno iz želučanoga soka te je imunohistokemijski dokazan u želučanoj mukozi i lumenu (Slika 2).



Slika 2. Molekula BPC-a 157

Ovaj je peptid postojan u ljudskome želučanom soku duže od 24 sata dok drugi standardni peptidi (kao EGF ili TGFb) bivaju razgrađeni vrlo brzo. BPC 157 snažan je antiulcerogeni faktor. Jednako je učinkovit bez obzira na dozu (µg/kg ili ng/kg) protiv niza gastrointestinalnih lezija izazvanih različitim ulcerogenim procedurama. Ima snažan efekt zarastanja poslije peroralne, kao i parenteralne primjene, bez obzira na vrlo niske doze. Za razliku od ostalih standardnih polipeptida, koji su aktivni uz dodatak različitih nosača, ovaj postojani peptid učinkovit je bez njih. Nekolicina studija pokazuje da BPC 157 snažno inhibira alkoholne lezije želuca, kao i druge citotoksične lezije. U gastrektomiranoga štakora svi su standardni agensi aktivni. Poslije sialoadenektomije samo BPC 157 je aktivan i,

najvažnije, njegova antiulkusna aktivnost prati oporavak AMP-ADP-ATP sustava u mukozi želuca. Dokazana je mogućnost korištenja BPC-a 157 u terapiji ulceroznoga kolitisa. Za razliku od sulfasalazina BPC 157 ne ublažuje samo leziju, već u modelu kroničnog kolitisa (cistamin) sprječava recidive bolesti. Poboljšanje cijeljenja davanjem BPC-a 157 uključuje razne rane: duboke opekline, lezije laserom, kožne rane, rane u dijabetičara, pseudoartroze, presječene tetive, presječene i konkvasirane mišiće, presječene živce, otkidanje tetiva od kostiju, oštećenja rožnice, peritonitis, ileoilealne anastomoze, kolokolične anastomoze, plućne lezije. U svim ovim terapijskim djelovanjima pentadekapeptid BPC 157 efikasan je bez obzira je li primijenjen lokalno ili sistemski.

Pentadekapeptid BPC 157 po svojim svojstvima spada u skupinu u antiulkusnih peptidergičkih agenasa, te je dio sekvence proteina BPC izoliranog iz ljudskog želučanog soka. Nalazimo ga s 99% čistoćom uz 1-DES-GLY peptid koji predstavlja 1% nečistoće. Proizvodi se u tvrtci Diagena iz Ljubljane u Sloveniji, GEPPPGKPADDAGLV, M.T. 1419 Da, PL 14736. Za njegovo djelovanje nije potreban nosač. S obzirom da nije postignuta LD1 smatramo ga potpuno sigurnim i netoksičnim. U vodi je topljiv pri pH vrijednosti 7,0 i u fiziološkoj otopini. Kliničkim istrživanjima cijeljenja rana te upalnih bolesti crijeva pokazao se kao siguran (Sikirić i sur., 2010).

Prema suvremenom farmakološkom shvaćanju peptidi imaju bitnu ulogu u imunološkim zbivanjima i u procesima cijeljenja. S obzirom da su uglavnom nestabilni u brojnim eksperimentalnim radovima pojavljuje se problem procjene stvarne njihove uloge i učinkovitosti. Zbog nestabilnosti većina peptida se ne može primijeniti bez jednog ili više nosača, jer bez istih imaju slabu ili gotovo nikakvu aktivnost. Sami nosači također ovise čak i o proizvođaču pa tako isti nosač proizveden u različitim komercijalnim i istraživačkim tvrtkama može imati različita svojstva, stoga se aktivnost takvih peptida s nosačima ne može točno definirati kako njihovo otpuštanje na mjestu djelovanja tako ni samo djelovanje jer se ne može utvrditi da li je učinak tog kompleksa peptid – nosač zaslužan samo peptid ili samo nosač ili kombinaija navedenih komponenti. Zbog toga je primjena peptida kao lijeka u praksi ograničena.

S obzirom da je pentadekapeptid BPC 157 stabilan te ne treba nosač, nije sporno da je isti zaslužan za određeni učinak u pripadajućim eksperimentalnim istraživanjima. Nadalje, za razliku od peptida kao što su EFG ili TGF-beta koji se razgrade u samo nekoliko minuta, pentadekapeptida BPC 157 se pokazao iznimno otporan i stabilan te spada u posebnu skupinu peptida probavnog trakta. Već smo naveli da je kod nestabilnih peptida (EFG ili TGF-beta) potrebna primjena nosača te samim time se komplicira validacija djelotvornosti kompleksa

peptid-nosač (Urist i sur. 1996, Mustoe Tai i sur. 1987). Kako su probavnom traktu iznimno nepovoljni uvjeti poput širokog raspona pH vrijednosti, raspon temperature koji se može kretati od 4 stupnja do 80 stupnjeva Celziusa, zbog brojnih mikroorganizama i proteolitičkih enzima dolazi do izražaja stabilnost i otpornost pentadekapeptida BPC 157. Pored navedenog, unutar želuca, na njegovoj sluznici se događa iznimno brzo izmjena sluzničnog pokrova pa potencijalni lijekovi moraju biti rezistentni na takve brze promjene. Pentadekapeptid BPC 157 je zahvaljujući svojim iznimnim svojstvima zadovoljava kriterije koji su nužni kod primjene lijekova u probavnom traktu gdje su za peptide nepovoljni uvjeti. U dosadašnjim kliničkim istraživanjima na modelima kod cijeljenja rane te upalnih bolesti probavnog trakta nije dokazana njegova toksičnost, stabilan je u želučanom soku, nije mu potreban nosač te je nedvojbeno dokazano *in vitro* i *in vivo* njegova djelotvornost kod sprečavanja pojave lezija želučane sluznice pri induciraju istih različitim agensima kao i nedvojbena učinkovitost pri procesima cijeljenja tkiva te se može primijeniti topički ili sistemski.

Osim navedenih istraživanja, dokazan je terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 i na gastrokutanim, kolokutanim i ezofagokutanim fistulama te ileoilealnim anastomozama (Cesarec V i sur. 2015). Mehanizam djelovanja pentadekapeptida BPC 157 je opisan u nedavno objavljenom preglednom radu (Sikirić P. i sur., 2014) gdje je dokazana povezanost NO sustava i pentadekapeptida BPC 157 na različitim eksperimentalnim modelima u procesima cijeljenja. Naime, specifični učinci pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje utječu i na sve događaje nakon vaskularne ozljede. On konzistentno pospješuje cijeljenje različitih tkiva nakon ozljeda pa čak i dovodi do cijeljenja u onim tkivima koja spontano ne cijele. Stimulira *egr-1 i naB2* gene. Posebno je važna činjenica da se pentadekapeptid BPC 157 nalazi većinom u želučanoj mukozi i stabilan je u želučanom soku. Pokazuje djelotvornu kompeticiju i sa L argininom i njegovim analozima (npr. L – NAME).

Sinteza NO i bazična formacija NO u želučanoj sluznici je veća nego li u drugim tkivima što ima fiziološki značaj. Posebno podupire pozitivne učinke koji pokazuju uzajamnu povezanost pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava u želučanoj sluznici. Navedena uzajamna povezanost je prisutna i kod citoprotekcije sluznice nakon alkoholne lezije, generiranju NO i regulaciji krvnog tlaka, akutnoj i kroničnoj intoksikaciji alkoholom, kardiovaskularnim poremećajima, plućnoj hipertenziji, kroničnom zatajenju srca i aritmijama. Nadalje, dokazana je i kod hipokalijemije te hiperkalijemije, odnosno, disfunkcije stanične membrane povezane s kalijem i na kraju kod kompliciranih poremećaja cijeljenja što je pokazano na modelima sa cijeljenjem kolokutane i ezofagokutane fistule. Tek treba utvrditi na koji način bi ova prednost moduliranja NO sustava mogla biti prenesena u učinkovitu kliničku praksu.

2.5 NO sustav

Prema Flemingu i sur. 1989. godine identificirana je molekula NO kao Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF). U sisavaca, pa tako i u čovjeka, NO (dušikov monoksid, dušikov (II) oksid) važna je stanična signalna molekula kratkoga poluvremena raspada, svega nekoliko sekundi. Zbog svoje važnosti u razvoju neuroznanosti, fiziologije i imunologije NO je 1992. godine proglašen „molekulom godine". Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 1998. godine dodijeljena je R. F. Furchgottu, L. J. Ignarrou i F. Muradu upravo za istraživanja vezana uz NO kao signalnu molekulu kardiovaskularnoga sustava.

U ljudskome organizmu NO sintetizira enzim NOS (NO sintetaza, sintetaza dušičnoga monoksida). Tri su izoforme NOS-a: endotelijalna NOS (eNOS, NOS-3), neuralna NOS (nNOS, NOS-1) i induktibilna NOS (iNOS, NOS-2). Dok su NOS-1 i NOS-3 ovisne o kalciju, NOS-2 je neovisna o kalciju. NOS oksidira gvanidinsku grupu iz L-arginina čime nastaje NO. Time je L-arginin prekursor NO. NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je analog L-arginina čija je funkcija blokiranje NO sintetaze. Na taj se način iz L-arginina ne može sintetizirati NO te su svi efekti djelovanja L-arginina blokirani što L-NAME čini njegovim antagonistom (91,92). Brojna istraživanja pokazala su utjecaj NO-sustava na cijeljenje rana, a nepobitnu važnost NO-sustava u cijeljenju pokazalo je istraživanje na „knockout" miševima za iNOS (miševima kod kojih ne postoji, unutar DNK-a, gen za stvaranje iNOS-a).

S obzirom da se direktno sintetizira iz L-arginina široko je rasprostranjena, te ima različite uloge u različitim organskim sustavima. Sudjeluje također s mitohondrijskim sustavima u procesima staničnog disanja gdje povećava stvaranje reaktivnog kisika, te na taj način posredno utječe na stanično preživljavanje odnosno smrt stanice (Fleming i sur., 1999). Utvrđeno je da NO sustav ima značajne uloge u različitim procesima, a posebno važnu ulogu ima u cijeljenju rane (Frank i sur., 1998). Iako su postojale pretpostavke o povezanosti s NO sustavom utjecaj specifičnih agensa na NO sustav do sad nije značajnije istraživan. Vrlo mali je broj istraživanja koji su se bavili utjecajem NO prekursor L-arginina, NO - sintetaza blokatora L - NAME i učinka njihove kombinacije kod istraživanja cijeljenja tkiva i organa (Cesarec i sur., 2013). Tako je u preglednom radu gdje su ispitivani stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 i NO – sustav dokazana uska povezanost s Moncadinim homeostatskim odgovorom kod ozljeda (održavanje krvožilnog sustava i kontrola trombocita) (Fleming i sur., 1999, Frank i sur., 1998, Sikirić i sur., 2010, Balenović i sur., 2009, Boban – Blagajić i sur., 2006). Naime, dokazano je da BPC 157 pored gore navedenog utječe i na sve događaje nakon gubitka vaskularnog integriteta. Ovisno o okolnostima smanjuje trombozu kod anastomoze abdominalne aorte ali i smanjuje krvarenje odnosno trombocitopeniju kod

amputacija ili primjene antiagregacijskih lijekova kao što su heparin, varfarin i aspirin. Također u nizu drugih modela koji mogu biti akutni ili kronični, pentadekapeptid BPC 157 ubrzava cijeljenje tkiva koja spontano ne cijele nakon teških ozljeda, dakle, stimulira *egr – l i naB2* gene, a u isto vrijeme pokazuje visoku sigurnost odnosno LD1 nije postignut (Sikirić, 1999). Pentadekapeptid BPC 157 se nalazi prirodno u želučanom soku, stabilan je a bazična aktivnost NO – sintetaze je viša u želučanoj sluznici nego u drugih tkiva, te se povoljan učinak može objasniti aktivnom kompeticijom s oba dva analoga L – arginina, što u konačnici dovodi do povećanog stvaranja NO (Whittle i sur., 1992). Na temelju gore navedenog objašnjavaju se i drugi pozitivni učinci zajedničkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava, kao što su:

a) zaštitu sluznice želuca u istraživanjima citoprotekcije, stvaranje NO i regulacija krvnog tlaka,
b) kod intoksikacije alkoholom i sindroma ovisnosti koji mogu biti akutni ili kronični,
c) različit kardiovaskularni poremećaji, kronično zatajenje srca i aritmije te plućna hipertenzija,
d) kod poremećaja kao posljedica hipokalijemije i hiperkalijemije i
e) kod različitih poremećaja cijeljenja fistule kao npr., kolokutane, duodenokutane i ezofagokutane fistule (Škorjanec i sur., 2015).

Kako bi se potvrdila praktična korist moduliranja NO sustava potrebna su daljnja istraživanja.

2.6 NO sustav - pentadekapeptid BPC 157

U ranijim je radovima već pokazan učinak Pentadekapeptida BPC 157 na djelovanje NO sustava (Sikirić i sur., 1999.). Međuodnos pentadekapeptida BPC 157 i NO-sustava demonstriran je njihovim sudjelovanjem u Mocadinom homeostatskom odgovoru NO-sustava na oštećenje (očuvanje vaskularnog integriteta i kontrola trombocita). Također, brojna istraživanja potvrđuju međuodnos pentadekapeptida BPC 157 s L- NAME-om i L-argininom; kolaborativni dokazi postoje kod želučane sluznice i njene protekcije uslijed alkoholne lezije (i u uvjetima u kojima L-arginin ne djeluje), kod regulacije krvnog tlaka, akutne i kronične alkoholne intoksikacije, kroničnog srčanog zatajenja, plućne hipertenzije, aritmija, hiperkalijemije i hipokalijemije te konačno cijeljenja fistula (gastrokutane, duodenokutane, kolokutane, ezofagokutane, kolovezikalne i rektovezikalne fistule). Nedavno je potvrđeno da BPC 157 također može sudjelovati u miozi kod atropinske midrijaze vjerojatno preko NO-sustava i/ili kolinergičkih mehanizama (Kokot A i sur. 2016.). Dakle, postoje brojni dokazi međuodnosa BPC 157 s NO-sustavom, gdje se BPC 157 suprotstavio nuspojavama primjene L-NAME kao i učincima L-arginina što je indikativno za generalizaciju ovog učinka BPC 157. Važno je naglasiti da se njegova interakcija s ova dva preparata događa neovisno o njihovim efektima, ukoliko se radi o djelovanju putem istih signalnih putova. Češće je djelovanje L-NAME i L-arginina suprotna patološka reakcija (npr. hipertenzija kod aplikacije L-NAME i hipotenzija kod aplikacije L-arginina i sl.) te se BPC 157 jednako suprotstavlja efektima oba preparata. Rjeđe je efekt primjene L-NAME i L-arginina isti (npr. mioza, trombocitopenija, pogoršanje alkoholne intoksikacije i sl.) te su ti efekti također neutralizirani primjenom BPC 157, s obzirom da se radi o istim putovima djelovanja. Ovi efekti posljedica su kompeticije pentadekapeptida BPC 157 s L-argininom na NOS, a antagonizirajući efekt BPC 157 na L-NAME-u jači od onog koji se postiže primjenom L-arginina. Modulatorni efekt pentadekapeptida BPC 157 na NO-sustav djeluje kako bi osigurao homeostatske uvjete, što se jasno očituje kod kompleksnijeg pristupa analizi njegovog efekta (primjena i L-NAME, i L-arginina i njihove kombinacije), s obzirom da su ranija istraživanja NO-sustava bila temeljena na njegovoj jednostavnijoj modulaciji (primjena ili L-NAME ili L-arginina). U brojnim ispitivanjima se pokazala interakcija s NO sustavom primjenom kako NO prekursora i NOS blokatora, tako i NO prekursora i NOS blokatora zajedno. Pentadekapeptid BPC 157 potiče na otpuštanje NO kod brojnih životinjskim vrsta i u različitim tkivima. Pentadekapeptid BPC 157 dokazano poništava djelovanje NOS blokatora L - NAME i NO prekursora L – arginina. Takovo međudjelovanje s NO sustavom daje objašnjenje za više različitih povoljnih učinaka Pentadekapeptid BPC 157 u prethodnim istraživanjima (Grebarović i sur., 1997). Kao

kompetitivni inhibitor endotelnog NO, L – NAME se može blokirati s pentadekapeptid BPC 157 *in vitro i in vivo*, te se tako očituje međudjelovanje s NO sustavom. Pretpostavljamo da L – NAME inhibira tako što se natječe s L argininom, te tako smatramo da pentadekapeptid BPC 157 slično utječe na NO sustav. U monoterapiji primijenjeni Pentadekapeptid BPC 157 i L arginin djeluju tako što potiču sintezu NO, dok zajedničkom primjenom do smanjenog stvaranja NO iz čega slijedi da dolazi do aktivne kompeticije. Još veće smanjenje stvaranja NO smo vidjeli ako u kombinaciji pentadekapeptid BPC 157 i L arginina dodamo i L-NAME što je se dokazalo u istraživanju gdje su proučavane lezije želuca koje su uzrokovane alkoholom, te istraživanja promjene krvnog tlaka (Sikirić, Seiwerth i Gragarević, 1997) pa se pretpostavlja da je to posljedica ograničene raspoloživosti NOS.

Ipak, utvrđeno je da pentadekapeptid BPC 157 ima nešto drugačiji učinak od L arginina jer se njegovo djelovanje na sintezu NO nije uspjelo blokirati primjenom L – NAME koja se primijenila i do deset puta u većoj dozi od one koja je bila dovoljna za blokadu učinka L arginina. Ovakav različit učinak pentadekapeptid BPC 157 na stvaranje NO u usporedbi s L argininom potvrđen je i na modelu homogenata sluznice želuca štakora. Nadalje, na modelu plućne hipertenzije i ascitesa uzrokovanih kroničnom aplikacijom L-NAME kod pilića, uspješno su se prevenirale promjene primjenom L arginina i pentadekapeptid BPC 157 u kombinaciji.

Ispitivani su akutna i kronična toksičnost L NAME na istom modelu te su se verificirala oštećenja srca, jetra i slezene, dok je primjena L arginina za posljedicu imao edem i hemoragiju u više organskih sustava kao i kongestiju. I u ovom istraživanju se uspješno inhibirao učinak L NAME upotrebom kombinacije pentadekapeptid BPC 157 te su izostala bilo kakva oštećenja. Najizraženiji učinak pentadekapeptida BPC 157 je verificiran na prevenciji lezija želuca, a upotrebom L-NAME je bio nešto oslabljen dok se učinak L arginina u kombinaciji s L-NAME se potpuno blokirao. Posebni značaj gore navedenom daje i činjenica da razina NOS i bazična razina NO značajno veća u sluznici želuca nego u ostalim tkivima. Kompleksno međudjelovanje Pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava bitno pridonose protekciji integriteta želučane sluznice i očuvanju normalnih vrijednosti krvnog tlaka prvenstveno zbog iznimnih karakteristika Pentadekapeptida BPC 157 jer je stabilan kod niskih vrijednosti ph koje nalazimo u želučanom soku.

Također, dokazano je međudjelovanje Pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava kod modela induciranih aritmija metildigoksinom. Naime, primjenom pentadekapeptida BPC 157 su prevenirane aritmije, dok su se iste pogoršavale primjenom L-NAME a neznatno lošije aritmije su dokazane istovremenom primjenom L-NAME i Pentadekapeptida BPC 157 u

odnosu na primjenu Pentadekapeptida BPC 157 u monoterapiji, dok primjena L arginina u monoterapiji nije imala učinka na aritmije (Balenović i sur., 1999). Dakle, aritmije koje se induciraju digitalisom mogu se spriječiti primjenom pentadekapeptida BPC 157 u monoterapiji u međudjelovanju s NO sustavom. Nadalje, dokazana je citoprotektivna uloga pentadekapeptida BPC 157 u sprječavanju lezija želuca induciranih alkoholom preko promjene tonusa krvnih žila u želucu oslobađanjem NO.

Osim gore navedenog dokazan je *in vivo* i angiogenetski učinak pentadekapeptida BPC 157, te potvrđen i povećanjem VEGF, CD 34 i FVIII, kao i prisutnim znakovima angiogeneze. Pored navedenog dokazana je i uključenost NO sustava pri cijeljenju fistula (ezofagokutanih i kolokutanih).

2.7 Učinak pentadekapeptida BPC 157 na tkiva i organske sustave

Dosadašnja klinička istraživanja pokazala su da pentadekapeptid BPC 157 djeluje na udaljena tkiva i organe. To se događa u međudjelovanju s različitim sustavima npr. sa središnjim dopaminergičkim NO sustavom, GABA-ergičkim mehanizmima, inhibitornim somatosenzornim i nekolinergičkim sustavom. Dokazano je da pentadekapeptida BPC 157 djeluje korektivno na sve navedene sustave (Bilić I., i sur., 2001). Već je dokazano djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na probavni sustav na modelima upalne bolesti crijeva (Veljača M., i sur., 2003), komplikacijama upalne bolesti crijeva (Ruenzi M., i sur., 2005) i sindroma kratkog crijeva (Sever M., i sur., 2009). Također, dokazani su pozitivni učinci pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje crijevnih anastomoza u štakora gastrokutanih fistula, kolokutanih fistula i cervikalnih ezofagokutanih fistula (Vukšić T., i sur., 2007). Posebno se učinkovitim pokazao kod cijeljenja rana i to onih kada rane teško cijele npr. opeklinske lezije želuca, te opekline kože (Seiwerth i sur., 1997). Dokazali su se povoljni učinci na obnovu mišićnih struktura kod cijeljenja rana lokomotornog sustava (Stare, Šimić i sur., 2006), perifernih živaca (Giurašin M., 2010), koštanog tkiva i tetiva (Šebečić B., i sur., 1999).

Učinak pentadekapeptida BPC 157 vidljiv je i kod otežanog cijeljenja rana izazvanih primjenom kortikosteroida i imunosupresije bez obzira da li se primali sistemski ili lokalno (Cerovečki, 2010).

Pentadekapeptid BPC 157 sudjeluje u održavanju integriteta sluznice probavnog takta, te žlijezda slinovnica nakon sijaloadenektomije (Bedeković i sur., 2009).

Pentadekapeptid BPC 157 pokazao se i kao antiulkusni lijek na modelu želučanih ulceracija uzrokovanih primjenom nesteroidnih antiupalnih lijekova (Prkačin i sur., 2001). Ovo djelovanje, također, dokazano je i u kliničkim istraživanjima i kod drugih dijelova probavnog

sustava npr. kod upalne bolesti crijeva. Učinak pentadekapeptida BPC 157 značajno je bolji kod cijeljenja ulkusa u odnosu na primjenu standardnih lijekova za upalne bolesti crijeva (Xue XC i sur., 2004). Kod istraživanja crijevnih anastomoza pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje same anastomoze, što se očituje višim tlakovima koje podnosi anastomoza tretirana s pentadekapeptidom BPC 157.

Pentadekapeptid BPC 157 dokazano poboljšava epitelizaciju kože (Mikus i sur., 2001). U navedenim modelima dokazalo se da pentadekapeptid BPC 157 stimulira granulacije slično učinku PDGF-BB, uz napomenu da osim navedenog pentadekapeptida BPC 157 aktivnije stimulira i ranu organizaciju kolagena. Taj učinak vjerojatno je posljedica ekspresije *egr-1* gena. Pentadekapeptid BPC 157 sprječava negativan učinak nesteroidnih lijekova kao što su diklofenak ili acetilsalicilna kiselina, modulira NO sustav djelovanjem i na NO agoniste i na NOS blokatore (Turković B., i sur., 2004). Alkoholom inducirane lezije želuca mogu se spriječiti primjenom pentadekapeptida BPC 157, kao i alkoholom uzrokovane lezije jetre (Prkačin i sur., 2001). Na kliničkom modelu istraživanja cijeljenja ozljeda vaskularnih struktura dokazalo se da pentadekapeptida BPC 157 potiče angiogenezu te sprečava pretjeranu ekspresiju endotelina (Lovrić Benčić i sur. 2004). Primjenom topički u lumenu želuca na modelu prolongiranog ezofagitisa dokazalo se da smanjuje disfunkciju donjeg sfinktera jednjaka i piloričnog sfinktera. Mehanizam ovog djelovanja je taj da smanjuje sintezu prostaglandina te time smanjuje povratak gastroduodenalnog sadržaja u jednjak a samim time i ublažava ili sprečava pojavu upale donjeg dijela jednjaka. Ovaj učinak traje do 24 sata ukoliko ga primijenimo sistemski tako da tlak sfinktera donjeg dijela bude na normalnoj razini barem 24 sata (Petrović I., i sur., 2011).

Na modelu zatajenja srca uzrokovanog doksorubicinom dokazalo se povoljno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 kao i to da antagonizira aritmije, te smanjuje oštećenje endotel srca (Balenović D., i sur., 2009).

Na kliničkim istraživanjima na modelima gdje su se primjenjivali alkohol u akutnim i kroničnim induciranjima dokazalo se da pentadekapeptid BPC 157 sprečava stvaranje kako lezija želuca tako i jetrenih lezija, te pored toga smanjuje i apstinencijske krize pri kroničnom unosu alkohola. Također, mehanizmom citoprotekcije pentadekapeptida BPC 157 štiti želučanu sluznicu i na modelima gdje se koristio indometacin ili acetilsalicilna kiselina. U navedenim modelima se pokazalo da primjenom pentadekapeptida BPC 157 dolazi do smanjenja broja upalnih stanica, dolazi do smanjenja leukotrijena LTB4, tromboksana TXB2 te mijeloperoksidaze NPU u seruma i tkivima zahvaćenim upalnim procesom (Veljača M., i sur., 1995).

Na modelu utjecaja morfija pokazalo se da se isti smanjuje primjenom pentadekapeptida BPC 157. Gore navedenim bihevioralnim istraživanjima dokazalo se da pentadekapeptid BPC 157 ima učinak i na središnji živčani sustav (Sikirić P., i sur., 1999). Na istom modelu prikazane su različita djelovanja primjene pentadekapeptida BPC 157: dijazepamska tolerancija, hiperosjetljivost dopaminskih receptora, stereotipsko amfetaminsko ponašanje, neuroleptička katalepsija, serotoninski sindrom, te akutna alkoholna intoksikacija. Primjenom pentadekapeptida BPC 157 periferno dolazi do sinteze serotonina u supstanciji nigri (Tohyama Y., i sur., 2004).

Tkalčević i suradnici su 2007. godine objavili rad u kojem govore o utjecaju BPC 157 na stvaranje granulacijskog tkiva, organizaciju kolagena i povećanu ekspresiju egr-1 (early growth response gene-1) (Tkalčević i sur. 2007). Autori su primijetili da postoji jako malo spojeva koji farmakološki mogu potaknuti cijeljenje kroničnih rana kao što je dijabetički ulkus. Zato su usporedili jedan spoj za koji je već ustanovljeno da ima pozitivan učinak na stvaranje granulacijskog tkiva i organizaciju kolagena (rekombinantni homodimer B lanca faktora rasta izoliranog iz trombocita - PDGF-BB) i BPC157 za koji je ustanovljeno da ima pozitivan učinak na cijeljenju rana. Naglasak su stavili na otkrivanje mehanizma njihovog djelovanja. Kod normoglikemičnih štakora su potkožno implantirali poliuretanske spužve promjera 14 mm, a kod genetički dijabetičnih miševa (db/db) su izrezali dio kože pune debljine promjera 8 mm. Ekspresija gena egr-1 su proučavali in vitro na karcinomskim stanicama Caco-2. Dok su PDGF-BB i BPC157 imali sličan utjecaj na stimulaciju stvaranja granulacijskog tkiva u obje skupine, BPC157 je pokazao izraženiju aktivnost povezanu s ranom organizacijom kolagena. BPC157 stimulira ekspresiju egr-1 gena i njegovog represora smještenog u jezgri stanica (nab-2) mnogo brže nego PDGF-BB. Budući da egr-1 inducira stvaranje citokina, faktora rasta i rano stvaranje izvanstaničnog matriksa (kolagena) autori su kao objašnjenje pozitivnog djelovanja BPC157 na zarastanje rane ponudili njegov utjecaj na ekspresiju egr-1 gena.

Krivić i suradnici (2006) su proučavali utjecaj stabilnog gastričnog pentadekapeptida na cijeljenje presječene Ahilove tetive na distalnom hvatištu za petnu kost. Utjecaj BPC157 su uspoređivali s utjecajem metilprednizolona jer se kortikosteroidi primjenjuju kod ozljede tetivno-koštanog spoja s intencijom da se smanji upalna reakcija i tako pospješi cijeljenje i bolji funkcionalni rezultat. Autori su zapravo proučavali rani funkcionalni rezultat četiri dana nakon ozljede, a prije nego što nastupi organizacija kolagena. U eksperimentu su koristili 72 Wistar Albino štakora prosječne težine 290 g podijeljenih u tri skupine po 24 životinje, od čega je svaki dan žrtvovano po šest životinja u svakoj skupini od prvog do četvrtog dana.

Transekcija Ahilove tetive na distalnom kraju je učinjena kirurški. Pentadekapeptid BPC157 je primijenjen u dozi 10 μg/kg tjelesne težine intraperitonealno, a metilprednizolon u dozi 5 mg/kg tjelesne težine intraperitonealno. U kontrolnoj skupini je primijenjena fiziološka otopina u dozi 5 ml/kg tjelesne težine intraperitonealno. Kako bi utvrdili rani funkcionalni oporavak autori su mjerili funkcionalni indeks Ahilove tetive, aktivnost mijeloperoksidaze, broj upalnih stanica i broj novostvorenih krvnih žila. Pentadekapeptid je statistički značajno poboljšao funkcionalni oporavak Ahilove tetive mjeren funkcionalnim indeksom (AFI). Njegov učinak je vjerojatno posredovan smanjenjem upalne reakcije što je prikazano značajno smanjenom aktivnosti mijeloperoksidaze, manjim brojem upalnih stanica i povećanim brojem novostvorenih krvnih žila. Metilprednizolon je smanjio funkcionalni indeks Ahilove tetive i upalnu reakciju, ali nije doveo do stvaranja novih krvnih žila i boljeg funkcionalnog rezultata. Autori zaključuju da stabilni pentadekapeptid BPC 157 ima kombinirani protuupalni i angiogenetski učinak te da na takav način dovodi do ranog funkcionalnog oporavka. Hvatište Ahilove tetive za petnu kost predstavlja hipovaskularno područje u kojem su na mjestu hrskavično-vezivne zone krvne žile potpuno odsutne. Time oštro prerezana tetiva na ovom hipovaskularnom mjestu predstavlja poseban izazov za cijeljenje. Klinički je nakon ovakvih ozljeda zabilježena jaka upalna reakcija i niska metabolička aktivnost koje pogoršavaju funkcionalni rezultat. Rani funkcionalni oporavak je od najveće važnosti jer upalna reakcija koja dugo traje dovodi do obilnog stvaranja kolagena i mostova tkiva zbog regeneracije ekstracelularnog matriksa što onda dovodi do ukočenja i lošeg funkcionalnog rezultata. Pentadekapeptid BPC157 tako pruža potpuno novi terapijski pristup u liječenju ozljeda u hipovaskularnim uvjetima jer dovodi do ranog funkcionalnog oporavka koji se ne može objasniti samo smanjenjem upalne reakcije. Autori su u svom radu pokazali da je BPC157 prvi eksperimentalni spoj koji u isto vrijeme djeluje na smanjenje upalne reakcije i rano urastanje novih krvnih žila što je osnovni uvjet dobrog funkcionalnog rezultata. Na kliničkim istraživanjima pri kojima se izaziva regurgitacijska upala pluća. Primjenom pentadekapeptida BPC 157 izostaje oštećenje sluznice, te posljedično i upala pluća (Stančić-Rokotov D., i sur., 2001). Također, pokazalo se pozitivno djelovanje na cijeljenje traheotomijske rane na životinjskom modelu primjenom pentadekapeptida BPC 157 (Madžarac G., i sur., 2013).

2.8 Učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje

Starešinić i suradnici (2006) su u svom radu pokazali pozitivan učinak pentadekapeptida u cijeljenju presječenog mišića za koji je ranije pokazano da ne može biti kompenziran. Defekt mišića na dužini od 10mm su učinili proksimalno od hvatišta četveroglavog mišića

natkoljenice za patelu. Pentadekapeptid BPC 157 su primijenili intraperitonealno u tri različite doze (10 μg, 10 ng i 10 pg po kilogramu tjelesne težine). Cijeljenje mišića je prikazano tijekom perioda od 72 dana koliko su životinje praćene. U skupinama koje su bile tretirane pentadekapeptidom BPC 157 je došlo do biomehaničkog i funkcionalnog oporavka presječenog mišića što se klinički očitovalo funkcionalnim indeksom koji je bio gotovo jednak zdravim kontrolnim životinjama. Atrofija presječenog mišića je u BPC 157 tretiranoj skupini bila značajno manja i nije bilo kontrakture nakon učinjenog operativnog zahvata niti kod jedne životinje. Histološki i imunohistokemijski su autori potvrdili svoj nalaz na način da se na preparatima vidjelo da je prethodno učinjeni defekt bio ispunjen mišićnim stanicama. Uočili su pojačanu dezminsku aktivnost i veći promjer miofibrila na proksimalnom i distalnom kraju presječenog mišića.

Pentadekapeptid BPC 157 je do sada pokazao učinak u zarastanju različitih vrsta rana uključujući presječenu tetivu i mišić. Pokazujući tako snažan angiogeni i protuupalni učinak u cijeljenju različitih tkiva pentadekapeptid BPC157 ima terapijski potencijal da bude primijenjen u modelu osteonekroze glavice femura kod štakora gdje je koncept urastanja krvnih žila i stvaranje nove kosti ključni koncept. Za razliku od drugih peptida koji pokazuje učinak u cijeljenju kosti pentadekapeptid BPC 157 je vrlo stabilan i pruža mogućnost različite vrste primjene, peroralno, intraperitonealno i lokalno. Puni značaj ovog peptida se tek treba razjasniti te je i ovo istraživanje dio toga napora, posebno s toga što je njegova primjena vrlo jednostavna i nema negativnih učinaka kao što je stvaranje hipertrofične kosti i heterotopičnih osifikacija.

Pri istraživanju djelovanja pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje prijeloma kostiju korišten je model pseudoartroze radijusa u kunića (Šebečić B., i sur., 1999). Za verificiranje učinka primjene pentadekapeptida BPC 157 koristile su se radiološke procjene kvantitativna histomorfometrija, te mikrofotodenzitometrijska mjerenja, nakon čega se nedvojbeno dokazalo da se nakon intramuskularne i lokalne primjene nakon šest tjedana verificiralo značajno ubrzanje pregradnje koštanog defekta radijalne kosti u odnosu na skupinu eksperimentalnih životinja koje su liječene uobičajenim postupcima a to je primjena autolognog presatka ili koštane srži. Poučeni tim saznanjima i spoznajom o novom djelovanju pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje kosti krenulo se u istraživanje njegova utjecaja na cijeljenje rupture ahilove tetive na štakorskom modelu (Starešinić M., i sur., 2004).

Obzirom da je ahilova tetiva hipovaskularno, hipocelularno i hiponeuralno tkivo, ima vrlo slab potencijal cijeljenja i reparacija iste je dugotrajna, te ne postoje bilo kakva farmakoterapijska sredstva za poboljšanje cijeljenja, vrlo je značajno što se u navedenim

istraživanjima pokazalo pozitivno djelovanje primjenom pentadekapeptida BPC 157. Naime, biomehanički parametri jasno su pokazali povećanu čvrstoću i krutost tetive u skupini životinja koje su tretirane s pentadekapeptida BPC 157. Histološka analiza analiziranih tetiva pokazala je veću prisutnost mononukleara i manju eksudaciju polimorfonukleara, značajno veću količinu fibroblasta, te u konačnici veću količinu kolagena u analiziranim tetivama.

Slijedom navedenih istraživanja krenulo se u izradu novih modela u smislu istraživanja utjecaja pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje tetivnokoštanih hvatišta, pri čemu se nije koristila kirurška fiksacija tetive za kost (Cerovečki T., i sur., 2011). Rezultati tih istraživanja nedvojbeno su pokazali pozitivni utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje tetivno koštanog prijelaza ako se koriste sistemski (intraperitonealno), bilo da se radi o dozama od 10 mikrograma ili 10 nanograma na kilogram tjelesne težine. Životinje tretirane pentadekapeptidom BPC 157 pokazale su brži i funkcionalni oporavak, kako neposredno nakon operativnog zahvata tako i četiri tjedna nakon zahvata. Biomehaničkim ispitivanjima utvrdile su se statistički značajne razlike u pozitivnom smislu kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolne skupine životinja koje su dobivale fiziološku otopinu. Također, histološkom analizom verificiralo se puno bolje formiranje direktnog tetivno koštanog spoja dočim je imunohistokemijski dokazan značajan rast gustoće kolagenih vlakana tipa1, za koji znamo da je glavni nositelj vlačne čvrstoće u području tetivnih hvatišta (Bojanić I., i sur., 2009). Također, istražen je i utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na modelu cijeljenja mišića kvadricepsa nakon potpune transekcije u štakora (Krivić A., i sur., 2006). Dobiveni rezultati pokazali su bolje rezultate kako u biomehaničkim parametrima i funkcionalnom ishodu tako i u histološkim i imunohistokemijskim pokazateljima u odnosu na kontrolnu skupinu koja je dobivala fiziološku otopinu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Protokol pokusa

Istraživanje je provedeno na laboratorijskim životinjama, Wistar štakorima, mužjacima tjelesne težine 301 – 331 g koji su uzgojeni u nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. registracije: HR-POK-007). 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. 1967 godine, a koji su kasnije koristili i drugi istraživači.

3.1.1 Lijekovi korišteni u istraživanju

Medikacija je korištena neposredno po operativnome zahvatu te se primjena nastavila svakoga dana u isto vrijeme, dok je zadnja primjena bila 24 sata prije žrtvovanja.

- Pentadekapeptid BPC 157 (molekularna težina 1419) (Diagen, Ljubljana, Slovenija) pripremljen je s postignutom čistoćom od 99 % izmjerenom HPLC-om (High Pressure Liquid Chromatography). U svim postupcima ovoga istraživanja koristio se otopljen u vodi i primijenjen u vodi za piće u različitim koncentracijama (10 μg/kg, 10 ng/kg, 0,16 μg/mL, 0,16 ng/mL) u količini od 12 mL/dan/štakor.

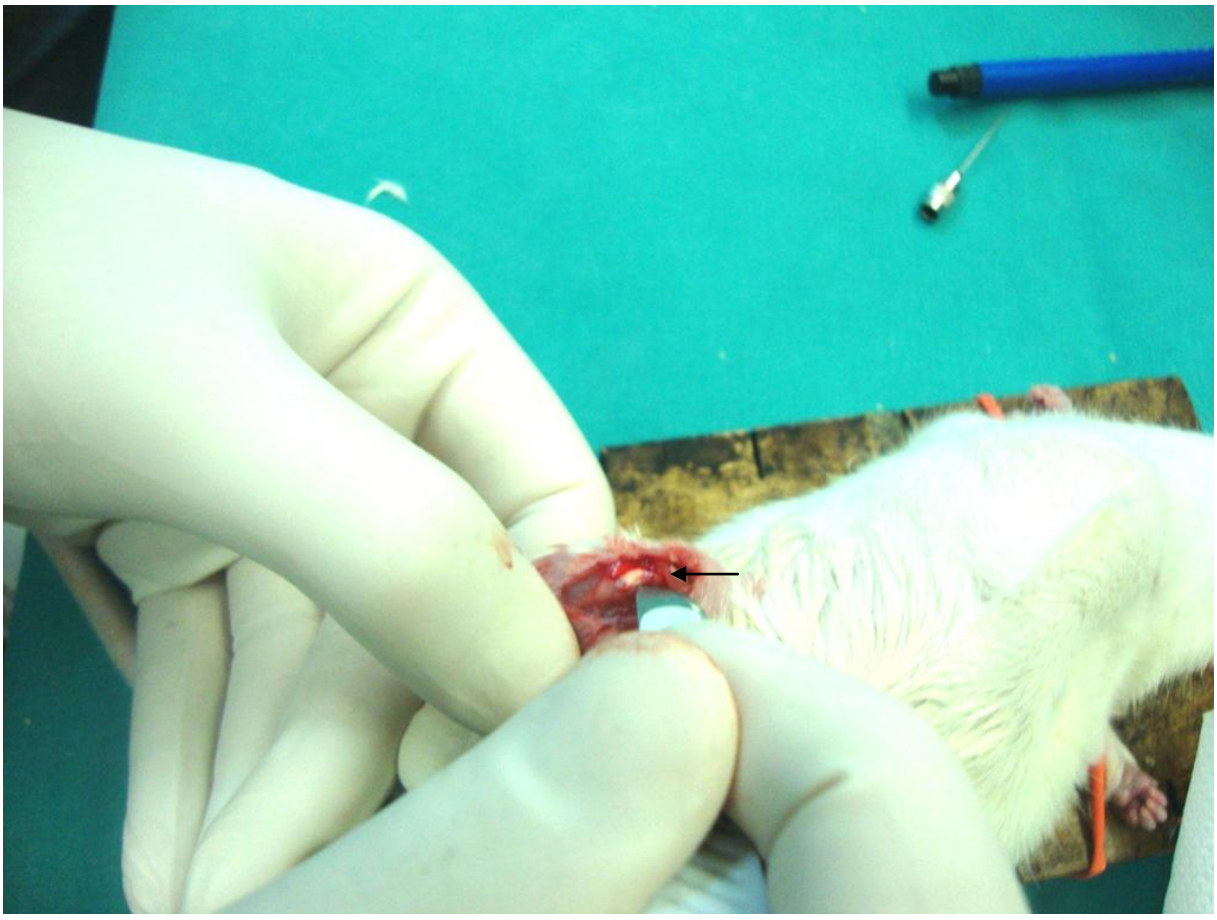
- L-arginin i L-NAME (Sigma, St. Louis, MO, USA) korišteni samostalno ili u kombinacijama bili su rastopljeni u fiziološkoj otopini (Pliva, Zagreb, Hrvatska). Primjenjivali su se intraperitonealno: L-NAME - 5 mg/kg i L-arginin - 100 mg/kg, jednom dnevno.

- Kontrolna skupina pije vodu (12 mL/dan/štakor).

Koristili smo muške albino Wistar štakore tjelesne mase 250-300 grama, koji su uzgajani i držani pod normalnim uvjetima, s najmanje 10 štakora po eksperimentalnoj skupini i periodu, nasumično raspoređenih. Štakori su anestezirani Thyopentalom i Apaurinom 10 mg/2 ml,

nakon čega je učinjena resekcija patelarnog ligamenta bez uspostave kontinuiteta. Štakori su podijeljeni u 8 skupina. Prva skupina je kontrolna te se nju nije tretiralo. Druga skupina je pentadekapeptid BPC 157 (bez nosača ili inhibitora peptidaze) (proizveden u Diagen, Ljubljana, Slovenija, kao što je opisano prije /1,19-23/, GEPPPGKPADDAGLV, M.W.1419) (0.16 μg/l) u vodi za piće (12 ml/štakor/dan) do žrtvovanja; ili samo voda za piće; ili jednom dnevno, BPC 157 10 μg/kg, ip/dan. Treća skupina je L-NAME 5 mg, L-arginin 100 mg/kg ili fiziološka otopina (5.0 ml/kg) (i.p., postoperativne dane 1,2,3,4,7 i 14) davani sami ili zajedno (sa prvom aplikacijom 30 min. nakon kirurškog zahvata, a zadnja aplikacija 24 sata prije žrtvovanja). Četvrta skupina je sam L-arginin (100 mg/kg). Peta skupina se tretira sa L NAME+L-arginin. Šesta skupina se tretira sa L-Name+BPC 157. Sedma skupina se tretira sa L-arginin+BPC 157, te osma skupina koja se tretira sa L-NAME+L-arginin+BPC 157.

Svi lijekovi komercijalno dostupni su kupljeni kod Sigma (SAD). Za postizanje ligamentarne ozljede u štakora upotrebljen je model koji su opisali Tipton i sur. 1967 godine, a koji su kasnije koristili i drugi istraživači.



Slika 3. Operativni postupak. U općoj anesteziji u području patelarnog ligamenta smo prerezali kožu i potkožje te pristupili ligamentu koji je na slici označen strelicom. Učinili smo disekciju istog te zašili kožu i potkožje šavovima po slojevima.

Napravljeni su kliničko-funkcionalne testove, i to test pritiska ekstenzora, test za procjenu kontrakture te smo mjerili opseg natkoljenice.

Test pritiska ekstenzora (engl. extensor postural thrust – EPT) opisali su Thalhammer i sur. 1995. godine, a Koka i Hadlock su 2001.godine dokazali da se može upotrebljavati kao potpuno dostatna metoda za praćenje oporavka motoričke funkcije stražnje noge štakora. Test su izvodila dva ispitivača. Prvi je ispitivač držao torzo životinje cijelom šakom dok je malim prstom pridržavao suprotnu nožicu. Pritom je 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 instinktivno odguruje od plohe uporabljujući silu ekstenzornih mišića potkoljenice, te je u tom trenutku ispitivač očitavao rezultat pritiska u obliku mase na skali digitalne vage.

Za izračunavanje deficita motoričke funkcije (EPT), 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.

Za procjenu kontrakture koristili smo test koji smo osmislili i za koji su potrebna tri ispitivača koja imaju iskustva u radu s eksperimentalnim životinjama. Prilikom testiranja jedan od ispitivača drži životinju straga lijevom rukom ispod prednjih nožica pazeći pritom da se životinja tijekom ispitivanja ne iskrivljuje, dočim desnom drži 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. 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.

Opseg natkoljenice smo mjerili tako što smo krojačkim metrom mjerili opseg natkoljenice u području srednje trećine natkoljenice.

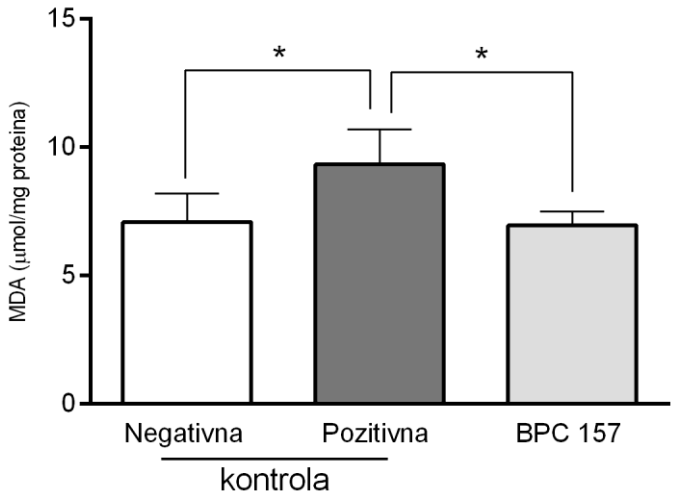
Žrtvovanje eksperimentalnih životinja se provodilo ovisno o protokolu istraživanja, a činilo se dekapitacija giljotinom. 14. dan su se žrtvovale životinje te se uzimao preparat za histološku analizu. Po dekapitaciji su se kirurški odvoje obje stražnje noge od trupla eksperimentalne životinje, i to u zglobu kuka. Nakon skidanja kože, kao i potkožnoga tkiva pristupi se na 4.glavi mišić obje natkoljenice te resecira.

Nakon žrtvovanja životinja i odvajanja 4-glavog mišića pristupi se pripremi preparata za

patohistološku analizu. Tkivo se fiksira 4% puferiranom formalinu te nakon toga standardnim postupkom uklapa u parafin, a potom se reže na rezove debljine 3 μm i boji hemalaun-eozinom (HE). Dodatni rezovi se boje metodom po Malloryu za prikaz zrelog veziva (kolagen tipa I) te impregnacijom srebrom po Gomoriju za prikaz retikulinskih vlakana (kolagen tip III).

3.2 Razina MDA u tkivu

Nadalje, vidljive su značajno veće vrijednosti MDA u kontrolnim skupinama u odnosu na BPC 157 (slika 4). Naime, kako je na slici pokazano, sam BPC ne dovodi do promjene u razini lipidne peroksidacije tkiva mišića i tetiva kod zdravih jedinki. Kako kod ozljede dolazi do oštećenja tkiva pa time i pokretanja oksidacijske kaskade promjena, među njima i lipidne peroksidacije vidljivo je značajno povećanje razine MDA kod skupine ozljeđenih životinja dok nema statistički značajne razlike između negativne kontrolne skupine i skupine životinja tretiranih BPC-om ($p<0.05$ naspram pozitivne kontrole).



Slika 4. Rezultati mjerenja MDA. Značajno manja razina MDA kod životinja koje su tretirane BPC 157 u odnosu na pozitivnu kontrolu tj uzorak iz mišića operirane noge te nema signifikantne razlike u odnosu na negativnu kontrolu tj. uzorak iz mišića zdrave neoperirane životinje. *p <0.05

3.3 Genska testiranja

RNA smo ekstrahirali iz pet svježih uzoraka tkiva kvadricepsa koja smo odmah po uzimanju stavili u RNAlater otopinu (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Izolacija RNA je napravljena pomoću PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Nakon ekstrakcije, koncentracija RNA se izmjeri pomoću Nano Drop ND-1000

spektrofotometra (Nano DropTechnologies, Wilmington, Delaware, SAD). Napravili smo reverznu transkripciju pomoću komercijalno dostupnog kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kita (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) prema uputama proizvođača te nakon toga izmjerili koncentraciju cDNA pomoću Nano Drop ND-1000 spektrofotometra.

Za analizu ekspresije eNOS, iNOS i COX-2 gena smo koristili reagense i komercijalno dostupne komplete prema uputama proizvođača, a qPCR smo izveli u stroju 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD).

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju. Reakcija se odvija u uređaju za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700, SAD) prema sljedećem programu: 25°C 10 min 37°C 120 min, 95°C 5 min. Nakon reakcije cDNA se pohranjuje na -20°C do korištenja.

Sastojak	Volumen (µl) po uzorku
10×RT pufer	2.0
Reverse Transcriptas(50 U/µL)	1.0
dNTP (100 mM)	0.8
Inhibitor RNaze (20U/µL)	1.0
Nasumični heksameri (50 µM)	2.0
Uzorak RNA	1 µg
H_2O slobodna od nukleaza	Do volumena od 20 µL

3.3.1 Kvantitativni PCR (PCR u stvarnom vremenu)

Karakteristika kvantitativnog PCR-a je mogućnost praćenja novonastalih molekula DNA sa svakim ciklusom. Tijekom PCR reakcije svakim ciklusom eksponencijalno se povećava količina DNA u uzorku, što se prati fluorescentnom bojom SYBR Green, koja se veže na novostvorene lance DNA te time omogućuje kontinuirano praćenje procesa stvaranja dvolančane DNA u stvarnom vremenu. Naime, fluorescencija se povećava sa svakim ciklusom, te ciklus u kojem ima dovoljno DNA te je fluorescencija porasla iznad praga detekcije naziva se vrijednost Ct (Slika 3). Što neke cDNA u uzorku ima više, ranije će se umnožiti dvolančana DNA, odnosno vrijednost Ct će biti manja, dok će uzorak s manje DNA imati veću vrijednost Ct. Eventualne razlike u početnoj koncentraciji DNA u pojedinom uzorku ispravljaju se normiranjem pomoću referentnog gena (engl. housekeeping gene). Naime pojedini geni u stanici mogu služiti kao kontrola obzirom je njegova ekspresija stabilna te ih u svim tkivima, u bilo kojem trenutku ima jednaka količina. Mi smo kao gen za normiranje odabrali GAPDH. Za izračunavanje razlike u ekspresiji gena između tretiranih i netretiranih uzoraka korištena je formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdje je $\Delta\Delta Ct$ razlika između ΔCt tretiranog uzorka i ΔCt netretiranog uzorka.

Kvantitativni PCR se radi u posebnim optičkim pločicama s 96 bunarića da bi se mogla očitavati fluorescencija. Vrijednost fluorescencije eksponencijalno raste sa svakim ciklusom, dok ne dosegne plato, gdje dolazi do zasićenja reakcije. Ct vrijednost označava broj ciklusa u kojem vrijednost fluorescencije prelazi prag detekcije. Reakcijska smjesa se radi za svaki gen posebno. Za pripremu reakcijske smjese korišten je PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD). Kvantitativni PCR se izvodi minimalno u duplikatu za svaki uzorak, a za reakcijsku mješavinu za svaki gen radi se i jedna dodatna negativna kontrola, u koju se ne stavlja uzorak. Nukleotidne sekvence korištenih početnica navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Konačna koncentracija korištenih uzvodnih (forward, F) I nizvodnih (reverse, R) početnica je bila 0.5 µM. Nakon miješanja svih komponenti reakcija je provedena u uređaju za PCR u stvarnom vremenu (Applied Biosystems) u tri koraka:

1. 95°C tijekom 10 min (obzirom je potrebno denaturirati cDNA I aktivirati polimerazu)
2. 40 ciklusa (tijekom kojih se prikupljaju podaci o fluorescenciji) 95°C 15 sek, 60°C 1 min
3. 1 ciklus 95°C 15 sek, 60°C 1 min, 95°C 15 sek, 60°C 15 sek

Gen	Genska sekvenca	Umnoženi odsječak (pb)	
GAPDH	F: TGGCAAGTTCAACGGCACAGT	193	XM_221353
	R: TTTGGCCTCACCCTTCAGGT		
iNOS	TTGGAGCGAGTTGTGGATTGTTGTTC	126	NM_012611
	GGTGAGGGCTTGCCTGAGTGAGC		
eNOS	CTGGCAAGACCGATTACACGA	206	NM_021838
	TCAGGAGGTCTTGCACATAGG		
COX-2	TCAGGAGGTCTTGCACATAGG	157	AF233596
	CTGTATCCCGCCCTGCTGGTG		

Specifičnost reakcije provjerena je elektroforezom u gelu agaroze (2 %) kako bi se provjerila specifičnost produkata te analizom krivulje taljenja.

3.4 Statističke metode

Dobiveni podaci su obrađeni u programskom paketu IBM SPSS Statistics 20. Analiza distribucije podataka je testirana Kolmogorov-Smirnof testom. Za normalno distribuirane podatke koristili smo ANOVA test i prikladne post hoc testove. Za nenormalno distribuirane podatke koristili smo Kruskal-Wallis te prikladne post hoc testove. Razina signifikantnosti je postavljena na razinu $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1 Kliničko morfološka testiranja:

I. KONTROLNA SKUPINA

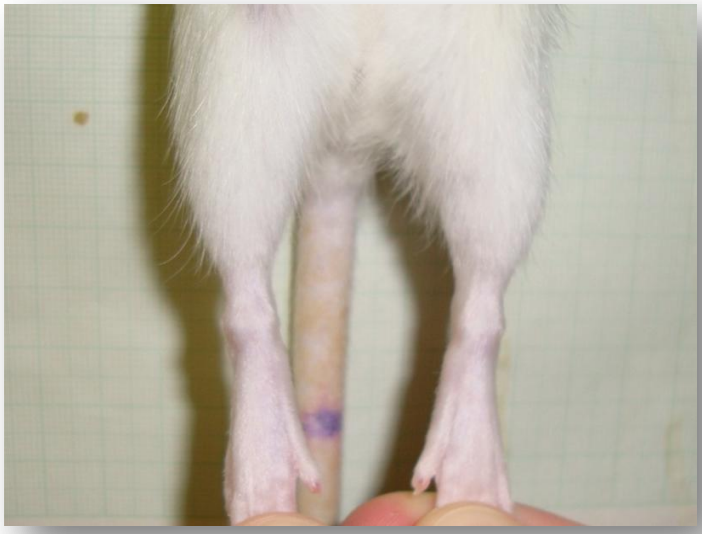
U prvoj skupini smo dobili razvoj kontrakture odmah prvi postoperativni dan da bi kroz 14 dana ona bila izraženija. Opseg natkoljenice u odnosu na zdravu stranu je manji već prvi dan da bi 14. dan bio najizraženiji. Deficiti motoričke snage također je značajan za vrijeme cijelog istraživanja s tim da je imao tendenciju rasta do 14. dana. (Slika 5. i tablica 3- 5).



Slika 5. Test procjena kontrakture. Pri ekstenziji obje noge vidi se skraćenje operirane noge koje smo mjerili u milimetrima te smo rezultate uspoređivali sa neoperiranom nogom po danima i skupinama životinja. Na slici je prikazano značajno skraćenje operirane noge u odnosu na zdravu nogu u kontrolnoj skupini (Tablica 3).

II. BPC 157 SKUPINA

Za razliku kod kontrolne skupine u ovoj skupini ne dolazi do razvoja kontrakture što je dokazano i u prethodnim sličnim istraživanjima. Deficit motoričke snage nije prisutan u ovoj grupi životinja. Opseg natkoljenice je jednak kao i kod zdrave strane prvi postoperativni dan kao i 14. dan (Slika 6. i tablica 3 - 5).



Slika 6. Test procjene kontrakture. Na slici se vidi identična dužina obje noge kod životinja koje su dobivale BPC 157 14. postoperativni dan (Tablica 3).

III. L-NAME SKUPINA

Kod ove skupine životinja dobili smo izraženije razlike u odnosu na zdravu stranu čak i od kontrolne, netretirane skupine. Tako smo dobili najizraženiju kontrakturu kako prvi tako i 14. postoperativni dan. Također je i deficit motoričke snage bio najizraženiji u ovoj skupini. Opseg natkoljenice se najbrže smanjuje kod ove skupine i do kraja istraživanja je bio najizraženiji (Slika 7. i tablica 3 - 5).



Slika 7. Test procjene kontrakture. Na prikazanoj slici se vidi da je kontraktura najizraženija u životinja koje su dobivale L-NAME (Tablica 3).

IV. L-arginin SKUPINA

U ovoj skupini životinja dobili smo rezultate koji upućuju da L-arginin značajno smanjuje pojavu razvoja kontrakture, smanjuje motorički deficit kao i smanjuje izraženost atrofije mišića ali ne kao što ima učinak lijek BPC 157, njegovo djelovanje je polovično u odnosu na BPC (Slika 8 i tablica 3 – 5).



Slika 8. **Test procjene kontrakture.** Na ovoj slici se vidi da je kontraktura manje izražena u skupini životinja koje su dobivale L- arginin u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3).

V. L- NAME I L- ARGININ SKUPINA

U skupini životinja koje su dobivale L-NAME i L-arginin u kombinaciji dobili smo rezultate koji ukazuju da L-arginin ublažuje negativni učinak od L-NAME (Slika 9. tablica 3 - 5).



Slika 9. Test procjene kontrakture. Na slici se vidi da je kontraktura kod skupine životinja koje su dobivale kombinaciju lijekova L arginin i L NAME izražajnija u odnosu na skupinu životinja koje su dobivale samo L Arginin ali manje izražena u odnosu na skupinu koja je dobivala L- NAME u monoterapiji i u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3).

VI. L- NAME I BPC 157 SKUPINA

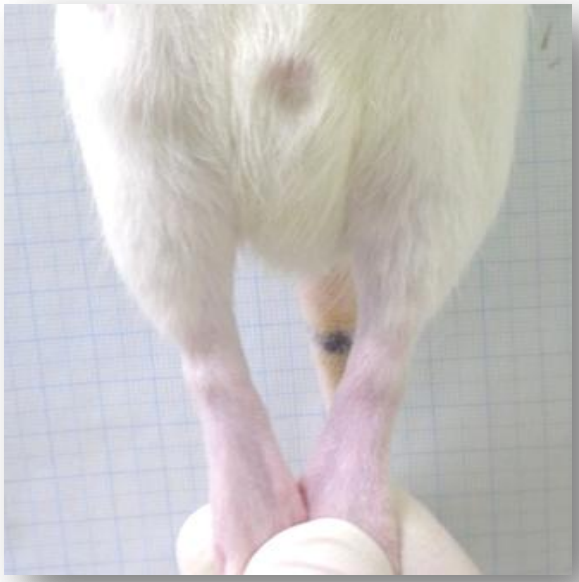
Kod ove skupine životinja rezultati te u usporedbi sa prethodnom skupinom je razvidno da BPC ima dvostruko bolji učinak od L arginina u kombinaciji sa L-NAME istraživanja su pokazali da BPC 157 u potpunosti sprječava negativni učinak L NAME (Slika 10. i tablica 3 - 5).



Slika 10. **Test procjene kontrakture.** Na slici se vidi da nema kontrakture u životinja koje su dobivale BPC 157 u kombinaciji sa L NAME (Tablica 3).

VII. L -ARGININ I BPC 157 SKUPINA

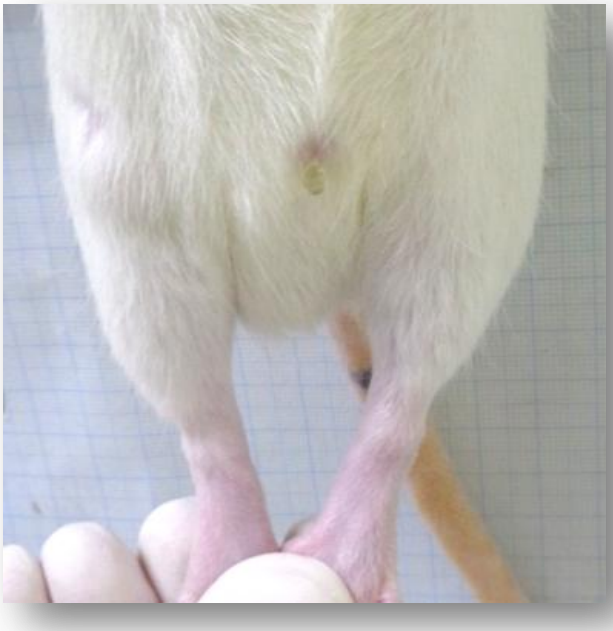
U ovoj skupini životinja dobili smo identične rezultate u odnosu na primjenu samo BPC 157. Iz ovoga je razvidno da je za protektivno djelovanje kod atrofije mišića zaslužan BPC 157 iako i L arginin ima protektivno djelovanje kad se daje u monoterapiji jer u monoterapiji kod primjene pentadekapeptida 157 rezultati su bolji u odnosu na primjenu L-arginina u monoterapiji a u kombinaciji ne dolazi do sinergističkog učinka(Slika 11. i tablica 3 - 5.).



Slika 11. Test procjene kontrakture. Na slici se vidi da nema kontrakture u životinja koje su dobivale BPC 157 u kombinaciji sa L NAME (Tablica 3).

VIII. L-NAME, L-ARGINI I BPC 157 SKUPINA

U skupini životinja koje su dobivale L-NAME, L-arginin i BPC 157, kao i u skupini životinja koje su dobivale L-NAME i BPC 157, vrijednosti su identične kao kod drugih skupina koje su dobivale BPC 157 tj. ne dolazi do razvoja atrofije, kontrakture kao ni gubitka motoričke snage ekstremiteta (Slika 12. i tablica 3-5.).



Slika 12. Test procjene kontrakture. Na slici se vidi da nema kontrakture u životinja koje su dobivale BPC 157 u kombinaciji sa L- NAME I L- ARGININ.

Tablica 3. Rezultati mjerenja kontrakture u milimetrima. Mjerili smo skraćenje operirane noge u odnosu na kontralateralnu stranu tj. neoperiranu nogu te razliku u duljini uspoređivali po danima i skupinama. Rezultat je izražen kao prosječno skraćenje uz izračun standardne devijacije. *p <0.05,najmanje,u odnosu na kontrolu

DAN	SKUPINA							
	Kontrola	BPC 157	L NAME	L ARGININ	L NAME L ARGININ	L NAME BPC 157	L ARGININ BPC 157	BPC 157 L ARGININE L NAME
1	7,4±0,3	0*	9,7±0,2	2,9±0,1	6,1±0,3	0*	0*	0*
2	7,7±0,2	0*	10,2±0,4	3,3±0,15	6,3±0,29	0*	0*	0*
3	8,1±0,3	0*	10,6±0,3	3,6±0,16	6,6±0,31	0*	0*	0*
4	8,5±0,4	0*	11,1±0,4	4±0,19	6,8±0,3	0*	0*	0*
7	9±0,3	0*	11,9±0,4	4,4±0,2	7±0,35	0*	0*	0*
10	9,6±0,4	0*	12,4±0,2	5±0,25	7,4±0,3	0*	0*	0*
14	10,3±0,5	0*	13,2±0,5	5,4±0,26	7,6±0,35	0*	0*	0*

Ranije studije su pokazale da je izuzetno važan integritet mišića kako za njegovu čvrstoću i otpor na pasivno istezanje tako i za njegovu aktivnu funkciju. Transekcijom ili rupturom mišića gubi se pravilan odnos između mišićnih vlakana, tetive i okolnog vezivnog tkiva što rezultira smanjenom kontraktilnom funkcijom i smanjenom čvrstoćom odnosno povećanjem otpora mišićno tetivnog aparata na pasivna istezanja (Huijang PA i sur. 2001, Gindre J i sur. 2013).

Tablica 4. Test mišićne snage donjih ekstremiteta tj. motor function index- MFI (EPT). Rezultat dobiven odnosom neoperirane (NEPT) i operirane (EPT) noge po formuli EPT=(NEPT-EEPT)/NEPT. Rezultat se kretao između 0 i 1 gdje je deficit funkcije manji, odnosno rezultat bolji što je vrijednost bila bliže nuli. Rezultat je izražen u indeksima kao prosječna vrijednost sa standardnom devijacijom po danima i skupinama. *p <0.05,najmanje,u odnosu na kontrolu

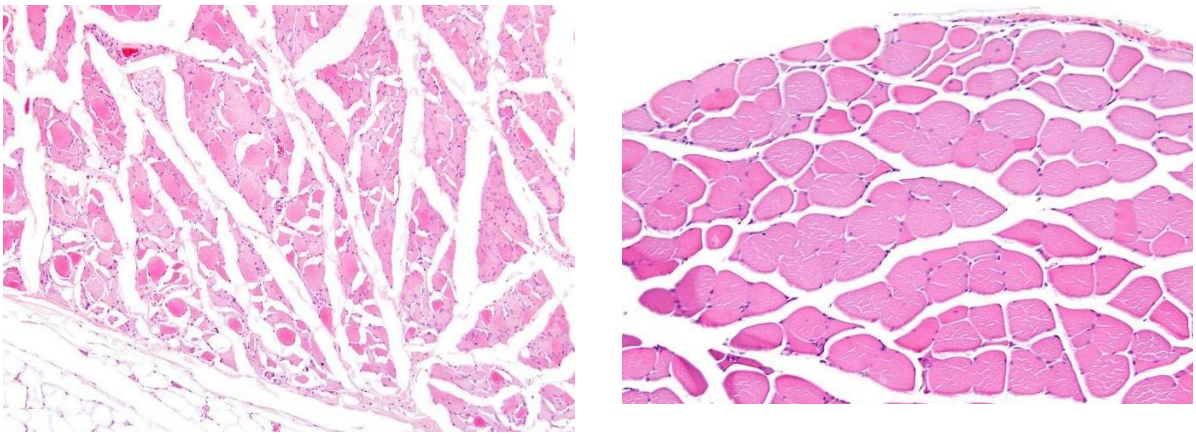
	SKUPINA							
DAN	Kontrola	BPC 157	L NAME	L ARGININ	L NAME L ARGININ	L NAME BPC 157	L ARGININ BPC 157	BPC 157 L ARGININ L NAME
1	0,72±0,02	0,71±0,02	0,72±0,01	0,72±0,02	0,72±0,02	0,71±0,02	0,71±0,02	0,71±0,02
2	0,70±0,02	0,69±0,02	0,72±0,02	0,70±0,02	0,70±0,02	0,69±0,02	0,69±0,02	0,69±0,02
3	0,65±0,01	0,64±0,01	0,72±0,02	0,65±0,01	0,65±0,01	0,64±0,01	0,64±0,01	0,64±0,01
4	0,64±0,02	0,60±0,02	0,73±0,02	0,61±0,02	0,61±0,02	0,60±0,02	0,60±0,02	0,60±0,02
7	0,63±0,01	0,48±0,01	0,8±0,02	0,49±0,01	0,5±0,01	0,48±0,01	0,48±0,01	0,48±0,01
10	0,62±0,02	0,40±0,02*	0,85±0,02	0,44±0,02	0,5±0,02	0,40±0,02*	0,40±0,02*	0,40±0,02*
14	0,61±0,02	0,3±0,02*	0,91±0,03	0,38±0,02	0,48±0,02	0,3±0,02*	0,3±0,02*	0,3±0,02*

Tablica 5. Rezultati mjerenja opsega četveroglavog mišića u milimetrima. Mjerili smo opseg mišića operirane noge u odnosu na kontralateralnu stranu tj. neoperiranu lijevu nogu te razliku u opsegu uspoređivali po danima i skupinama. Rezultat je izražen kao prosječno smanjenje opsega uz izračun standardne devijacije. *p <0.05,najmanje,u odnosu na kontrolu

DAN	SKUPINA							
	Kontrola	BPC 157	L NAME	L ARGININ	L NAME L ARGININ	L NAME BPC 157	L ARGININ BPC 157	BPC 157 L ARGININ L NAME
1.	1,3±0,05	0*	3,5±0,04	0,6±0,02	0,8±0,02	0*	0*	0*
2.	1,9±0,09	0*	5,2±0,09	1±0,05	1,5±0,05	0*	0*	0*
3.	2,9±0,15	0*	6,5±0,1	2±0,09	2,5±0,06	0*	0*	0*
4.	4±0,2	0*	8,1±0,2	2,4±0,1	3,4±0,07	0*	0*	0*
7.	6,4±0,3	0*	9,8±0,3	3,8±0,015	4,2±0,08	0*	0*	0*
10.	8,4±0,4	0*	10,9±0,4	4,4±0,2	5,7±0,08	0*	0*	0*
14.	10,4±0,4	0*	13,2±0,5	4,9±0,22	6,3±0,11	0*	0*	0*

4.2 Patohistološka analiza

Atrofija skeletnih mišića može se pojaviti uslijed degenerativnih procesa koji potječu iz vlakana skeletnih mišića, sekundarne u odnosu na denervaciju ili spontano u starenju glodavaca. To je uobičajena reakcija na bilo koju ozljedu koja rezultira razgradnjom i / ili gubitkom miofibrilnih organela. Primjeri uključuju neupotrebljivost, kaheksiju, nutricionističke ili metaboličke poremećaje, vaskularnu insuficijenciju, poremećaje mehanizama kontrole hormonskog rasta i primjenu mikotoksičnih ksenobiotika. Kompenzacijska hipertrofija preživjelih / nepromijenjenih mikrovlakana često je prisutna istovremeno, bez obzira na uzrok.



Slika 13. Atrofija skeletnih mišića kod kontrolne skupine (lijevo) u odnosu na skupiu štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 (desno). Kod kontrolne skupine štakora prisutna je uz smanjen promjer mišićnih vlakan i hipereozinofilija samih mišićnih vlakana te prostor oko istih (slika lijevo), dok se kod skupine štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 mjereći promjer mišićnih vlakana jasno vidi odsustvo atrofije mišića (slika desno). HE, originalno povećanje objektiva 10x.

Histološki se na preparatima poprečnih rezova kvadricepsa kod kontrolnih životinja nalazi jasna atrofija poprečno prugaste muskulature, dok tretirane životinje pokazuju morfologiju koja odgovara onoj zdrave kontrole.

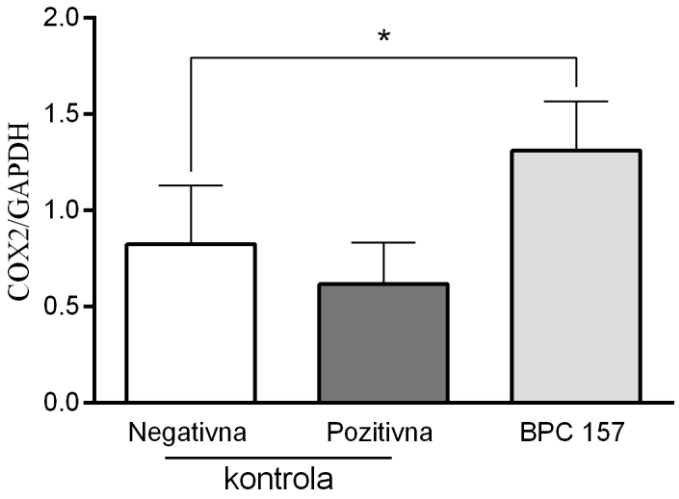
Glavna histološka značajka atrofije skeletnih mišića je smanjenje promjera mišićnih vlakana. (Slika 13). Oštećeno vlakno se često zaobljuje te je prisutna hipereozinofilna sarkoplazma. U atrofiji uzrokovanoj denervacijom karakteristična je histološka značajka komprimiranih mišićnih vlakana sa prenapučenim jezgrama. Atrofija zbog ne-neurogenskih uzroka, kao što je ona inducirana primjenom miotoksičnih ksenobiotika, često takvim vlaknima nedostaje te je popraćena tradicionalnim miopatijskim promjenama, kao što su nekrotična ili hijalinizirana

mišićna vlakna, podijeljena ili fragmentirana vlakna i vlakna sa središnje pozicioniranom jezgrom.

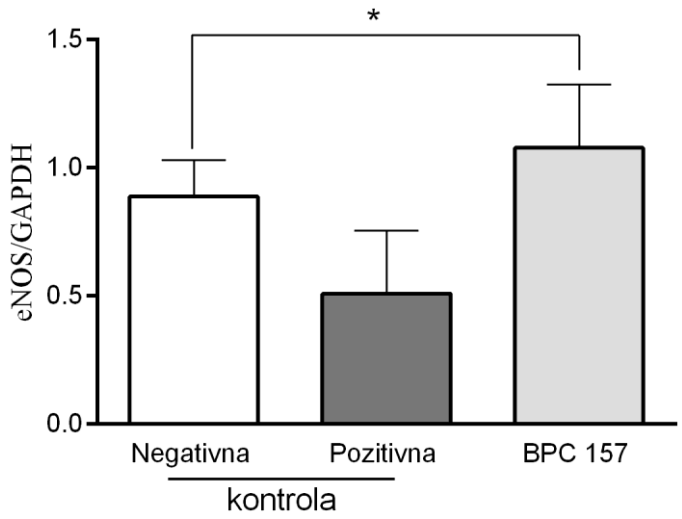
Atrofija može ravnomjerno utjecati na mišićna vlakna ili selektivno ciljati na specifične vrste mišićnih vlakana. Vlakna tipa II su selektivno zahvaćena kada je atrofija povezana s neuporabom, kaheksijom ili pothranjenošću. Kronična primjena kortikosteroida kod štakora dovodi do selektivne atrofije vlakana tipa II koja se brzo trzaju. Suprotno tome, vlakna tipa I su selektivno ciljana tijekom eksperimentalno inducirane tirotoksikoze.

4.3 Rezultati genskog testiranja

Rezultati pokazuju statistički značajno povećanje ekspresije mRNA za eNOS te ekspresije COX2 mRNA (Slika 14. i 15.) u svim BPC 157 tretiranim skupinama u odnosu na kontrolne skupine s istovjetnom ozljedom. Naime, kako se može vidjeti na navedenim grafovima razina mRNA za gene eNOS i COX 2 je nepromijenjena u skupinama tretiranim BPC 157 (zdrave jedinke) u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu (negativna kontrola). Međutim, nastankom ozljede dolazi do značajnog povećanja razine mRNA za gene eNOS i COX2 (skupina ozljeda) u odnosu na zdravu kontrolu. Ono što je za naše istraživanje posebno važno je povećanje razine eNOS mRNA u skupini tretiranoj BPC 157 u odnosu ne samo na kontrolnu zdravu skupinu nego u odnosu na skupinu s istovjetnom ozljedom ($p<0.05$ naspram pozitivne kontrole). Naše istraživanje nadalje pokazuje da nakon disekcije patelarnog ligamenta dolazi do povećanja razine ekspresije COX 2 mRNA (pokazano ranijim radovima) te da BPC 157 dovodi do sličnih promjena. Na slici 14. je također vidljivo kako BPC 157 kod zdravih jedinki ne dovodi do promjene u razini ekspresije mRNA za COX 2 gen (u odnosu na zdravu jedinku). Također je vidljivo kako je razlika u razini mRNA ekspresije COX 2 gena između ozlijeđene skupine te skupine koja je pretrpjela istovjetnu ozljedu ali nije tretirana ničim značajno različita ($p<0.05$ vs. pozitivna kontrola) i to u negativnom smjeru, odnosno kod ozljede BPC 157 smanjuje razinu ekspresije mRNA za COX 2 gen u odnosu na ozlijeđenu životinju.



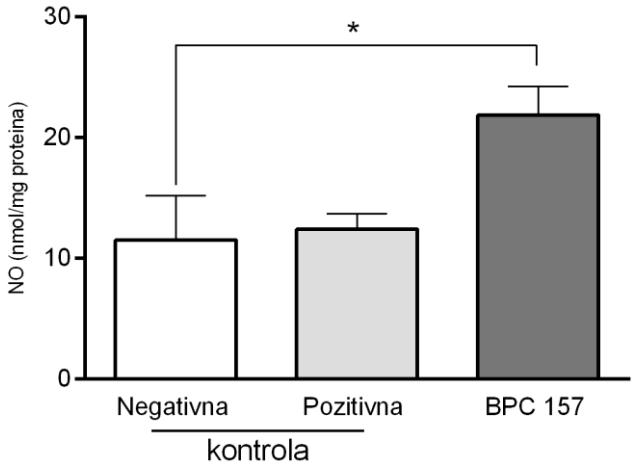
Slika 14. Rezultati mjerenja COX2/GAPDH. Značajno viša razina mRNA COX2/GAPDH kod životinja koje su tretirane BPC 157 u odnosu na negativnu kontrolu tj. uzorak iz mišića zdrave neoperirane životinje. *p <0.05 u odnosu na kontrolu



Slika 15. Rezultati mjerenja eNOS/GAPDH. Značajno veća razina mRNA eNOS kod životinja koje su tretirane BPC 157 u odnosu na negativnu kontrolu tj. uzorak iz mišića zdrave neoperirane životinje. *p <0.05 odnosu na kontrolu

4.4 Razina nitrit oksida u tkivima

NO je uključen u brojne fiziološke procese koji među ostalim reguliraju imunološki odgovor i neuralnu komunikaciju, te je stoga njegova razina važna za određivanja statusa i razumijevanje neke ozljede odnosno stanja zdravlja. Korištenjem jednostavne metode po Griessu odredili smo razinu NO u tkivima kako zdravih tako i ozljeđenih životinja te životinja tretiranih dvjema koncentracijama BPC 157. Analize dobivenih rezultata pokazuju povišene razine NO u operiranim skupinama (ozljeda, ozljeda + BPC). Iz slike je također vidljivo da u skupini koja je podvrgnuta ozljedi no bez tretmana razina NO ostaje tijekom promatranog perioda na visokim razinama dok se skupini tretiranoj BPC 157 ta razina smanjuje, i u relativnom i u apsolutnom iznosu, te je značajno manja (*P<0.05 i **P<0.01 vs. pozitivna kontrola) u svim mjerenim točkama u odnosu na kontrolnu ozljeđenu skupinu (pozitivna kontrola) (slika 16.). Na slici 16 je također vidljivo kako BPC 157 kod neozljeđene životinje ne mijenja razinu NO u odnosu na zdravu životinju (kontrola naspram BPC 157 skupine).



Slika 16. Rezultati mjerenja NO. Značajno viša razina NO kod životinja koje su tretirane BPC 157 u odnosu i na pozitivnu kontrolu tj uzorak iz mišića operirane noge i na negativnu kontrolu tj. uzorak iz mišića zdrave neoperirane životinje. *p <0.05

5. RASPRAVA

Ovim radom smo na modelu resekcije patelarnog ligamenta simulirali atrofiju mišića kvadricepsa kod štakora koja se normalno razvija pri ozlijedi lokomotornog sustava koja za posljedicu ima gubitak funkcije mišića tj, neaktivnost nakon čega se razvija atrofija mišića zahvaćenog ekstremiteta. Da bi se spriječila ista za sada nema poznate medikamentozne terapije osim ublažavanja atrofije fizikalnom terapijom u smislu masaža i pasivnih razgibavanja.

Uvidom u rezultate koje smo dobili praćenjem funkcionalnih parametara, mjerenjima te patohistološkom analizom jasno možemo potvrditi postavljenu hipotezu da primjena peptida BPC 157 sprečava pojavu atrofije mišića kvadricepsa kod štakora nakon resekcije patelarnog ligamenta.

Uspoređujući skupine životinja koje su dobivale monoterapiju ili kombinaciju više lijekova u odnosu na kontrolnu skupinu koja je dobivala fiziološku otopinu u svim parametrima smo dobili statistički značajnu razliku kod životinja koje su dobivale peptid BPC 157 u monoterapiji ili u kombinaciji sa L argininom i L NAME u odnosu na kontrolnu skupinu. Naime, za razliku od kontrolne skupine koja je odmah prvi dan pokazala značajnu razliku u svim mjerenjima u odnosu na kontralateralnu neoperiranu nogu, a ta razlika se povećavala do kraja istraživanja tj. do 14. postoperativnog dana kod skupina životinja koje su dobivale peptid BPC 157 nismo našli nikakvu razliku u parametrima u odnosu na neoperiranu kontralateralnu zdravu nogu.

Slični povoljni učinci su zabilježeni i kada se pentadekapeptid BPC 157 primjenjuje s NO-agensima zasebno (L-NAME+pentadekapeptid BPC 157; L-arginin+pentadekapeptid BPC 157) ili zajedno (L-NAME+L-arginin+pentadekapeptid BPC 157). Ovi rezultati odgovaraju učincima pentadekapeptida BPC 157 u drugim studijama cijeljenja anastomoza (Cesarec V i su. 2014), eksternih i internih fistula (Škorjanec S i sur. 2015), cijeljenje mišića i ligamenta te oporavka ili uspostave funkcije sfinktera (Starešinić M i sur. 2007). L-arginin (poboljšani tijek) i L-NAME (dodatno pogoršani tijek) pokazuju međusobno suprotne učinke.

Analizirajući rezultate mjerenja promjene opsega mišića kvadricepsa na mjestu srednje trećine natkoljenice uvidjeli smo da nema razlike u opsegu mišića mjereno u milimetrima kod životinja koje su bile tretirane peptidom BPC 157 u monoterapiji ili u kombinaciji sa L argininom ili sa L NAME kao i zajedno sa L argininom i L NAME-om u odnosu na kontralateralnu zdravu neoperiranu nogu dok je kod kontrolne skupine koja je dobivala

fiziološku otopinu ta razlika bila uočljiva već prvi dan nakon operacije te bi svakim daljnjim protokom vremena bila sve izraženija te najveća zadnji dan promatranja.

Tijekom cijelog razdoblja praćenja životinja (14 dana) bio je jasno vidljiv deficit motoričke funkcije u kontrolnim skupinama koji je praćen i testiran testom mišićne snage donjih ekstremiteta (motor function index- MFI). Rezultati ukazuju da u svim parametrima promatranja postoji statistički značajna razlika između skupine životinja tretiranih BPC 157 bez obzira na dozu, u odnosu na kontrolnu skupinu. Gubitak snage operirane noge bio je izražen odmah nakon operacije te se statistički nesignifikantno pogoršao u kontrolnoj skupini. Kod skupina koje smo tretirali peptidom BPC 157 našli smo statistički puno manji gubitak snage na operiranoj nozi.

Peptid BPC 157 inicijalno je definiran kao snažan antiulkusni peptid, čija su terapijska svojstva ekstenzivno istraživana u gastrointestinalnom traktu. Kao temeljni protektant u slini i želučanom soku (Sikirić P i sur. 2013), pokazao je široki antiulkusni potencijal superioran standardnim lijekovima s iznimno visokim terapijskim indeksom dokazanim u studijama o sigurnosti lijeka gdje nije postignuta letalna doza. Tijekom tih istraživanja primjenjivan je bez nosača samo u vodi za piće. Činjenica da pokazuje postojanost u želučanom soku duže od 24h za razliku od standardnih proteinskih faktora rasta (h-EGF -epidermalnog faktora rasta i h-TGF – transformirajućeg faktora rasta) koji se u istom mediju raspadaju unutar 15 min govori u prilog njegove stabilnosti. Na taj način, ovim posebnim ljekovitim svojstvima može imati poseban utjecaj na zacjeljivanje ozljeda probavnog trakta, ali i drugih tkiva. BPC 157 je svoje antiulkusno djelovanje pokazao duž čitavog gastrointestinalnog trakta. Primjenjivan bez nosača: intragastrično, intraperitonealno, rektalno ili oralno u vodi za piće redovito u istim dozama (10 ng -10 μg / kg TT), imao je pozitivan učinak na akutne i kronične ulceracije duodenuma, želuca, tankog i debelog crijeva.

Pojedini hormoni rasta (npr EGF, bFGF – faktor rasta fibroblasta, HGF – faktor rasta hepatocita, VEGF- faktor rasta endotelnih stanica) također pokazuju cijeljenje tkiva, ali nigdje ovako jedinstveno konstantno i uniformno. Kao ilustraciju toga možemo spomenuti bFGF-W, bFGF-CS23 i PDGF-BB koji su intragastričnom primjenom izliječili kronični, cisteaminom, izazvani, ulkus dvanaesterca kod štakora, a nisu imali zaštitnu ulogu prema kroničnim želučanim ulkusima, erozivnom gastritisu i ulceroznom kolitisu (97)84. S druge strane, rektalno ispiranje crijeva otopinama koje su sadržavale bFGF ili PDGFR – trombocitni faktor

rasta ubrzalo je zacjeljivanje kemijski izazvanog ulceroznog kolitisa kod štakora. Nadalje, VEGF, osim što je važan kod poticanja angiogeneze i granulacije tkiva, važan je i kod zacjeljivanja ulkusa. Pokazao je brzi gastroprotektivni učinak, ali ne i na lezije kolona. Upravo intravenska primjena antiVEGF neutraliziranih antitijela značajno poboljšava zacjeljivanje lezija u donjem gastrointestinalnom traktu. Povećana ekspresija VEGF je pozitivno korelirana s ulkusom dvanaesnika, ali i negativno s ulceroznim kolitisom gdje izaziva patološku angiogenezu (Škorjanec i sur. 2015).

Za razliku od peptida BPC 157 koji dokazano nema toksično ili protumorsko djelovanje, štoviše inhibira rast nekoliko tumorskih staničnih linija, neki faktori rasta, a naročito oni koji se koriste na dugoročnoj osnovi imaju upravo takvo neželjeni efekt. Na primjer, EGF je pokazao da promiče rast nekoliko tumorskih staničnih linija (Cesarec i sur. 2013) kao i primjena peptida sličnog glikogenu 2 (GLP-2) koja je u duljim vremenskim razdobljima izaziva razvoj hiperplastične promjene u kolonu.

Konačno, peroralna primjena većine faktora rasta je ograničena radi proteolitičke razgradnje u želucu tako da njihova primjena iziskuje parenteralne načine primjene i upotrebu različitih proteinskih nosača da bi peptidi dosegnuli ciljano tkivo.

Tokom istraživanja peptida BPC 157, važnost imaju studije koje su pratile liječenje ezofagokutane i gastrokutane fistule. One su pokazale kako BPC 157 je jedini peptid koji istovremeno pozitivno utječe na zacjeljivanje potpuno različitih tkiva, u ovom slučaju jednjaka ili želuca i kože. Ezofagokutana ili gastrokutana fistula su patološka stanja koja spontano ne zacjeljuju i neliječena vrlo brzo dovode do smrtnog ishoda. Na primjenu BPC 157, dolazi do prekida sekrecije te makroskopski i mikroskopski vidljivog zatvaranje zatvaranja fistule pa čak i u teškim uvjetima kao što je bila studija gdje je istovremeno primjenjivan kortikosteroid. Suprotno tom rezultatu, studije s faktorima rasta nisu tako jasne. Koncentracija EGF i TGF-βbeta u plazmi variraju od povišene koncentracije pri zarastanju fistula do stagnacije u bolesnika bez poboljšanja. Tako da studije koje pokazuju moguće liječenje različitih fistula probavnog sustava sa angiogenim faktorima rasta, još uvijek nedostaju. Cijeljenje istovremeno dva različita tkiva bilo je važno i u našoj studiji. S jedne strane to je kolageno, slabo vaskularizirano tkivo tetive, a s druge strane kontraktilna, dobro vaskularizirana mišićna vlakna.

U dosadašnjim radovima navedeni su brojni pozitivni učinci pentadekapeptida BPC 157, upravo na cijeljenje lezija različitih tkiva i organskih sustava, kao što su koža, mišići, tetive, ligamenti, živčano, gastrointestinalni sustav i krvne žile. Osim toga, zanimljivo je njegovo međudjelovanje s brojnim sustavima u organizmu, osobito njegova interakcija s NO sustavom, koji ima dokazanu ulogu u procesu cijeljenja. Istraživanja su pokazala kako pentadekapeptid BPC 157 može u in vivo i u in vitro pokusima nadvladati učinak L-NAME, kompetitivnog inhibitora endotelnog NO-a. To govori u prilog njegove posebne interakcije sa NO sustavom, koja dovodi do izražene regresije pogoršanja uzrokovanog primjenom L-NAME i posljedičnom blokadom NO-sustava. Interakcija pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava dokazana je na nekoliko životinjskih modela i kod različitih životinjskih vrsta. Osim potencijalnog terapeutskog učinka u cijelom gastrointestinalnom sustavu i prethodno navedenog pozitivnog učinka na cijeljenje zasebno mišića i tetiva, pentadekapeptid BPC 157 ima također pozitivan učinak i na proces cijeljenja u specifičnim, kompliciranim i otežanim uvjetima, kao što je u našoj studiji gdje tkiva po odvajanju nisu refiksirana, a ekstremitet nije imobiliziran. Tetive su tijekom svog razvoja bogate stanicama, metabolički aktivne i sadrže velik broj krvnih žila, ali na kraju sazriju u hipovaskularno, hiponeuralno i hipocelularno tkivo koje nakon ozljede teško cijeli.

U in vivo studijama (Starešinić i sur. 2006), FGF-2 (100 μg / kg) vezan fibrinskim ljepilom odnosno (bFGF) i (PDGF-BB) vezani heparinsko-fibrinskim nosačem, korišteni su za cijeljenje lezije tetive na modelu psa te su rezultirali kliničkim poboljšanje u vidu povećanog opsega pokreta tetive, ali biomehanička istraživanja nisu potvrdila povećanje tetivne čvrstoće. Isto tako pozitivan učinak na cijeljenje tetive pokazao je rekombinirani IGF-1 u obliku LR3-IGF-1, kao i GDFs, ali tek vezan na proteinski nosač i davan direktno u ranu. Nasuprot toga u in vivo studijama primjenjivan je peptid BPC 157, a rezultati su pokazali da je u ranim razdobljima nakon ozljede, njegova primjena ili peritonealno ili per os izazvala istaknuto povećanje angiogeneze u štakorskom modelu s presječenom Ahilovom tetivom ili kvadricepsom mišića. Učinak je potvrđen pomoću različitih staničnih antigena endotela, FVIII (uključen s adhezijom trombocita i agregacijom, prikazanog na endotelnim stanicama zrelih krvnih žila) i CD34 (uključen u leukocitnu adheziju i migraciju endotelnih stanica tijekom angiogeneze, prisutan na kapilarnim endotelnim stanicama) i s VEGF (glavni čimbenik u angiogenezi, umnožene na endotelnim stanicama, mitogen za vaskularne endotelne stanice). Općenito, BPC 157 povećao je broj VEGF, CD34 i FVIII pozitivnih vaskularnih elemenata, a angiogeni odgovor redovito je povećan. I, što je najvažnije, taj

angiogeni učinak bio je popraćen funkcionalnim, biomehaničkim, mikroskopskim i kliničkim oporavkom u tetivama ozlijeđenih štakora.

Na temelju dokaza dobivenih s FGF 2-knockoutom životinja (FGF 2-KO) životinja, povećana ekspresija FGF 2 povećava proliferaciju fibroblasta i deponiranje kolagena, ubrzava endotelnu proliferaciju i poboljšava kardiomiocitnu hipertrofiju nakon infarkta te ograničava širenje infarkta i čuva funkciju lijeve klijetke. FGF 2 na različitim tkivima suprotno djeluje, tako dok s jedne strane ubrzava oporavak miokarda nakon infarkta, s druge strane usporava cijeljenje rane kože (Sikirić i sur. 2014.).

Isto tako gledajući utjecaj faktora rasta na cijeljenje mišića, većina dokaza se odnosi na povećanje vrijednosti faktora rasta za vrijeme regeneracije nakon ozljede (tj. povećani su IGF-I, IGF-II, bFGF 2, i TGF-beta1, bFGF -2, bFGF -2 i TGF-beta1, a prilikom vježbanja VEGF-A. Zanimljivo je da imunološka neutralizacija bFGF pokazuje smanjenje broja kapilara, makrofaga i mastocita te odgađa fagocitozu nekrotičnih miocita, dok neutralizacija IGF1 ili TFG beta 1 ubrzava te iste procese. Koristeći različite načine sustavne primjene bFGF (injekcije ili produljeno oslobađanje iz polimera) u različitim životinjskim modelima nije se uspio postići oporavak mišića. Uglavnom, bFGF , IGF-1, i NGF ograničavaju se tek na lokalnu primjenu te mogu postići tek djelomičan oporavak mišića jer uvijek s regeneracijom mišića ide paralelno i proces stvaranja ožiljakastog tkiva koje zamjenjuje mišić. Zbog relativne (ne)učinkovitost takvih načina primjene važno je u budućnosti razmotriti i druge načine primjene kako bi se mogao iskoristiti terapijski potencijal tih proteina. U tom pogledu predložena je sposobnost adenovirusa da posreduju kod izravnog i ex vivo transfera gena beta-galaktozidaze u oštećene stranice potičući trajnu i stabilnu ekspresiju različitih spomenutih faktora rasta u oštećenim mišićima. Nasuprot toga, predložena je i upotreba antifibrotičkih sredstava kao protuteža fibroze koja se javlja usporedno s regenerativnim procesom. Kod velikih ozljeda mišića, proliferacija fibroblasta brzo može dovesti do prekomjernog formiranja gustog ožiljnog tkiva, što ometa regeneraciju mišića i rezultate u nepotpunom oporavku, a time iziskuje korištenje antifibrotička sredstva, odnosno suramina, koji inhibira angiogenezu (Sikirić i sur. 2014).

Naprotiv, koristeći isti protokol kao i kod gastrointestinalnih studija, BPC 157 je pokazao poboljšano cijeljenje teško ozlijeđenog mišića na različitim modelima životinja: kompletno presijecanje, nagnječenje, denervaciju odnosno, sistemsku primjenu kortikosteroida nakon

nagnječenja. Peptid BPC 157 je poticao brže zacjeljivanje presječenog mišića kvadricepsa s funkcionalnom restauracijom. Brz oporavak uključivao je oporavak biomehaničkih testova, kliničkih funkcija (opravak hoda i snagu potisaka) te je bio vidljiv u mikroskopskim (veći promjer miofibrila) i makroskopskim prezentacijama (znatno manja atrofija). Cijeljenje mišića nakon teškog nagnječenja značajno je poboljšano pri davanju peptida u obliku kreme lokalno čak i u uvjetima kada su se istovremeno sistemski primjenjivali kortikosteroidi (Barčan i sur. 1996.).

U prilog pozitivnog utjecaj na cijeljenje masovne ozljede mišića ide i neuroprotektivna uloga BPC 157. On značajno poboljšava regeneraciju femoralnog živca nakon presijecanja, davan intraperitonealno, intragastrično ili lokalno, na mjestu anastomoze ili ostavljenog neanastomoziranog (7mm segment resekcije). Na taj način spriječena je veća atrofija mišića koja se javlja zbog njegove denervacije.

Također, pozitivan utjecaj na oporavak mišića ima i njegova regulativna uloga na dopaminergične receptore koji su važni za mišićno funkcioniranje. Svoju regulativnu ulogu jasno pokazuje u studijama gdje blokirajući utjecaj različitih neuroleptika (haloperidolom, flufenazinom, sulpiridom, klozapinom), sprečava blokadu, ukočenost i somatosenzorne poremećaje. Isto tako, BPC 157 suzbija i učinak dopamina oslobođenog na živčanim završecima nakon aktivacije dopaminskih receptora u striatumu koji mogu biti izazvani akutnim amfetaminskim primjenama. Ove interakcije zanimljive su osobito s obzirom na faktore rasta i dokaze da je epidermalni faktora rasta (EGF) umiješan u neuropatologiji shizofrenije pri razvoju dopaminergičkih receptora. Isto tako, kada se kod štakorima primjeni i. p. BPC 157 on ima specifičan utjecaj na pojedine regije mozga (npr. sinteza 5-HT značajno raste u strukturi substancije nigre i antagonizira nepokretljivost štakora u serotoninskom sindromu). Na taj način vidljivo je da je BPC 157 peptid koji djeluje i na periferni i središnji živčani sustav, a može se zaključit da vjerojatno sudjeluje i u regulatornoj osi mozak-gastrointestinalni sustav.

Na osnovu svega prethodno navedenog, postavili smo hipotezu, kako bi pentadekapeptid BPC 157 mogao imati pozitivan učinak na sprečavanje razvoja atrofije mišića nakon resekcije patelarnog ligamenta.

BPC 157 tijekom procesa liječenja ozljede dovodi do povećane angiogeneze, koja prati

ubrzano cijeljenje. Ovaj učinak se vjerojatno može pripisati specifičnoj stimulaciji gena ranog čimbenika rasta-1 (egrEGF-1), koji se događa zajedno sa stimulacijom njegovog korepresornog živčanog čimbenika rasta 1-A (NGF 1-A) vezujućeg proteina-2 (naB2). Prethodno navedena stimulacija gena egrEGF-1, također je odgovorna za stvaranje citokina i čimbenika rasta te posredno stvaranje ekstracelularnog matriksa (kolagena) i formiranje krvnih žila (angiogeneza). Druga znanstvena istraživanja, na modelu cijeljenja tetive, povezuju pozitivne učinke BPC 157 s aktivacijom staničnog FAK-paxilin signalnog puta fokalne adhezivne kinaze – paxilin (FAK-paxilin) te posljedično tome dokazuju da je učinak BPC 157 ovisan o vremenu i dozi u povećanju ekspresije receptora hormona rasta Janus kinaze 2, silaznog signalnog puta receptora hormona rasta. Stoga, posljedica bi mogla biti istovremeno cijeljenje različitih tkiva, osobito u otežanim i kompliciranim uvjetima, kao što je u ovom našem eksperimentalnom radu.

Kako je već prije spomenuto, pentadekapeptid BPC 157 ima veliki angiogenetski potencijal u procesu cijeljenja tkiva, izravnu zaštitu endotela učinak na NO sustav, koji uključuje protudjelovanje na pretjeranu ekspresiju endotelina te ulogu u interakciji sa eNOS-ekspresijom, osobito viđenu u procesu cijeljenja vanjskih fistula. Pozitivan učinak, koji pentadekapeptid BPC 157 ostvaruje na različita tkiva, tijekom procesa cijeljenja je i protuupalni i sastoji se od sljedećeg: povećava aktivnost makrofaga, smanjuje razinu mijeloperoksidaze (MPO) u serumu i inflamiranim tkivima te smanjuje broj upalnih stanica, leukotriena B4 (LTB4) i tromboksana B2 (TXB2) (Seiwerth i sur 2016.).

Dosadašnje, prethodno navedene spoznaje o djelovanju BPC 157 budući da je uvijek apliciran samostalno, možemo točno i na specifičan način povezati s njegovim molekularnim učincima i time potvrditi njegov pozitivni utjecaj u smislu sprečavanja razvoja atrofije mišića kod imobilizacije što će zasigurno imati svoje mjesto u budućoj terapijskoj primjeni.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i dokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 sprječava razvoj atrofije četveroglavog mišića kod štakora nakon disekcije patelarnog ligamenta. Slijedom tih rezultata zaključuje se:

1. Sprječava razvoj atrofije mišića što se očituje na makroskopskoj i mikroskopskoj razini te tokom funkcionalnih i biomehaničkih testiranja,
2. Sprječava razvoj kontrakture koljenskog zgloba nakon resekcije patelarnog ligamenta,
3. Sprječava smanjenje opsega natkoljenice
4. Smanjuje gubitak snage ekstremiteta
5. Sprečava povećanje razine MDA te time sprečava proces lipidne peroksidacije
6. Ovaj pozitivan rezultat može predstavljati dobar temelj za daljnja laboratorijska istraživanja i prelazak na kliničke studije.

7. LITERATURA

1. Alexander D, Judex M, Meyringer H, Weis-Klemm M, Gay B, Müller-Ladner U. et al. Transcription factor Egr-1 activates collagen expression in immortalized fibroblasts or fibrosarcoma cells. Biological Chemistry. 2002;383(12),1845-53.

2. Amthor H., Otto A., Vulin A., Rochat A., Dumonceaux J., Garcia L., Mouisel E., Hourdé C., Macharia R., Friedrichs M., et al. (2009). Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require

3. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I et all. Mortal furosemide-hypokalemia-disturbances in rats NO-system related. Shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 more than with L-arginine. J Clin Exp Cardiol. 2012;3:201.

4. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, et al. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: A relation with NO-system. Regul Pept. 2009;156(1–3):83–9.

5. Bedekovic V, Mise S, Anic T, Staresinic M, Gjurasin M, Kopljar M et al (2003) Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine- induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. Eur J Pharmacol 477:73-80

6. 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.

7. Blaauw B., Canato M., Agatea L., Toniolo L., Mammucari C., Masiero E., Abraham R., Sandri M.,

8. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z et all. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. Med Sci Monit. 2006;12:36–45.

9. Braddock M. The transcription factor Egr-1: A potential drug in wound healing and tissue repair. Ann. Med. 2001;33(5):313-8.

10. Burridge K. Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between The Extracellular Matrix And The Cytoskeleton. Annu Rev Cell Dev Biol. 1988;4:487-525.

11. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L, Radic B, Vukoja I, Seiwerth S, et al. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. J Orthop Res. 2010;28(9):1155–61.

12. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujic D, Drmic D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. Eur J Pharmacol. 2013;701(1–3):203–12.

13. Chang C-H, Tsai W-C, Lin M-S, Hsu Y-H, Pang J-HS. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. J Appl Physiol. 2011;110(3):774–80.

14. Frank C, Amiel D, Woo SL-Y, Akeson W. Normal ligament properties and ligament healing. Clin Orthop Relat Res 1985;196:15-25.

15. Frank S, Madlener M, Pfeilschifter J, Werner S. Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. J Invest Dermatol. 1998;111(6):1058–64.

16. Garrett WE Jr BT. Anatomy, physiology, and mechanics of skeletal muscle. Orthopaedi. SR S, editor. Rosemont IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994.89-125

17. Gindre J, Takaza M, Moerman KM, Simms CK. A structural model of passive skeletal muscle shows two reinforcement processes in resisting deformation. J Mech Behav Biomed Mater. 2013;22:84–94.

18. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, et al. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. J Physiol Paris. 1997;91(3-5):139-49.

19. 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.

20. Hsieh MJ, Liu HT, Wang CN, Huang HY, Lin Y, Ko YS. et al. Therapeutic potential of pro-angiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and up-regulation. J Mol Med. 2017; 95(3):323–33.

21. Huijing PA, Baan GC. Extramuscular myofascial force transmission within the rat anterior tibial compartment: Proximo-distal differences in muscle force. Acta Physiol Scand. 2001;173(3):297–311.

22. Jopling HM, Odell AF, Pellet-Many C, Latham AM, Frankel P, Sivaprasadarao A. et al. Endosome-to-Plasma Membrane Recycling of VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Endothelial Function and Blood Vessel Formation. Cells 2014; 3(2), 363-85.

23. Kang EA, Han Y-M, An JM, Park YJ, Sikiric P, Kim DH, et al. BPC157 as Potential Agent Rescuing from Cancer Cachexia. Curr Pharm Des. 2018;24(18):1947-56.

24. Klicek R., Sever M., Radic B et all. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. J Pharmacol Sci. 2008;108:7–17.

25. Kloen P, Jennings CL, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. Suramin inhibits growth and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) binding in osteosarcoma cell lines. Eur J Cancer. 1994;30A(5):678–82.

26. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendonto-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. J Orthop Res 2006;24:982-9.

27. 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(5):982–9.

28. Kumbrink J, Gerlinger M, Johnson JP. Egr-1 induces the expression of its corepressor Nab2 by activation of the Nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. J Biol Chem. 2005;280(52):42785-93.

29. Lecker S. H., Goldberg A. L., Mitch W. E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. J. Am. Soc. Nephrol. 17, 1807–1819

30. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S. et al. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. Cell 2007;130:691–703.

31. Lovric-bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwerth S, Rogic D. Full Paper Doxorubicine-Congestive Heart Failure-Increased Big Endothelin-1 Plasma Concentration : Reversal by Amlodipine , Losartan , and Gastric Pentadecapeptide BPC157 in Rat and Mouse. J Pharmacol Sci. 2004;26:19–26.

32. Lucerna M, Mechtcheriakova D, Kadl A, Schabbauer G, Schäfer R, Gruber F. et al. NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278(13):11433-40.

33. McCarthy J. J., Mula J., Miyazaki M., Erfani R., Garrison K., Farooqui A. B., Srikuea R., Lawson B. A., Grimes B., Keller C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. Development 138, 3657–3666

34. 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.

35. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. J R Soc Med. 1999;92:164–9.

36. Orsolic N, Seiwerth S SP. BPC 157 enhances function of immunological effector cells in mice. J Physiol Pharmacol. 2009;60(2):69.

37. Petrovic I1, Dobric I, Drmic D, Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Kolenc D, Zlatar M, Kunjko K, Jurcic D, Martinac M, Rasic Z, Boban Blagaic A, Romic Z, Seiwerth S, Sikiric P. BPC 157 therapy to detriment sphincters failure-esophagitis-pancreatitis in rat and acute pancreatitis patients low sphincters pressure. J Physiol Pharmacol. 2011 Oct;62(5):527-34.

38. Raffaello A., Milan G., Masiero E., Carnio S., Lee D., Lanfranchi G., Goldberg A. L., Sandri M. (2010). JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. J. Cell Biol. 191, 101–113

39. Sartorelli V., Fulco M. (2004). Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. Sci. STKE 2004, re11

40. Sartori R., Milan G., Patron M., Mammucari C., Blaauw B., Abraham R., Sandri M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 296, C1248–C1257

41. Schiaffino S., Reggiani C. (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. FASEB J. 23, 3896–3905

42. 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.

43. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M, et al. BPC 157 and blood vessels. Curr Pharm Des. 2014;20(7):1121–1129

44. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z i sur. BPC 157's effect on healing. J Physiol Paris 1997;91:173-8.45.

45. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D. et al. BPC 157’s effect on healing. J Physiol Paris. 1997;91(3-5):173-8.

46. 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.

47. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S, Grabarević Ž, Ručman R, Petek M, et al. Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. Dig Dis Sci. 1997;42(3):661–71

48. Sikiric P, Mikus D, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M et al (1997) Pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, bromocriptine, and atropine effect

in cysteamine lesions in totally gastrectromized rats: a model for cytoprotective studies. Dig Dis Sci 42:1029-1037

49. Sikirić P, Petek M, Rucman R, et al. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection proothesis and beneficial effects of BPC. J Physiol Paris 1993; 87: 313-27.

50. Sikiric P, Petek M, Rucman R i sur. A new gastric juice peptide BPC. An overwiev of stomach – stress – organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. J Physiol Paris 1993;87:313-27

51. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, Klicek R, Radic B, Keller N, Sipos K, Jakir A, Udovicic M, Tonkic A, Kokic N, Turkovic B, Mise S, Anic T (2006) Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory.

52. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. In: Inflammopharmacology. 2006. 214–21.

53. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, et al. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. Curr Pharm Des. 2010;16(10):1224–34.

54. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et all. The beneficial effect of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopaminepromoters and gut peptides. Life Sci. 1994;54:63–8.

55. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et all. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol. 1997;332:23–33.

56. 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.

57. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V et al (1996) Beneficial effect of novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. Dig Dis Sci 41:1604-1614

58. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V. et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol. 1997;332(1):23–33.

59. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B et al (1994) 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 antagonists, dopamine promoters and gut peptides. Life Sci 54:PL63-PL68

60. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z i sur. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG –nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosal integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol 1997;332:23-33.

61. Sikiric P, Seiwerth S GZ et all. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H2 blockers and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. Gastroenterology. 1997;112(A):291.

62. 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.

63. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des. 2011;17(16):1612–32.

64. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov D, Brcic L. et al. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157-NO-system Relation. Curr Pharm Des. 2014;20(7):1126–35.

65. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, D SR, Brcic L. et al. Focus on ulcerative colitis: Stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem. 2012;19(1):126–32.

66. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Pharm Des. 2013;19(1):76–83.

67. Silverman ES, Collins T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. Am J Pathol. 1999;154(3):665–70.

68. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, Brcic L, Blagaic Boban A, Batelja L. et al. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: Stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. Dig Dis Sci. 2009;54(1):46–56.

69. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S, et al. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. J Orthop Res. 2006;24(5):1109–17.

70. 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.

71. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L, Jadrijevic S, Suknaic S, Perovic D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. J Orthop Res. 2003;21(6):976–83.

72. 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.

73. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. Genes and Cancer. 2011;2: 1097-1105.

74. Šebečić B, Nikolić V, Sikirić P, Seiwerth S, Šoša T, Patrlj L, et al. Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC-157, on the healing of segmental bone defect in rabbits: A comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. Bone. 1999;24(3):195–202.

75. Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershadsky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. Anesthesiology. 1995;82(4):1013-25

76. Tipton CM, Schild RJ, Flatt AE. Measurement of ligamentous strength in rat knees. J Bone Joint Surg 1967;49A:63-72.

77. Tkalčević VI, Čužić S, Brajša K, Mildner B, Bokulić A, Šitum K, et al. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. Eur J Pharmacol. 2007;570(1–3):212–21.

78. 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.

79. Turkovic B, Sikiric P SS et all. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) inducesnitricoxidesynthesis. Gastroenterology. 2006;126:287.

80. Veljaca M, Chan K GA. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-15 in human gastric juice. Gastroenterology. 1995;108(A):761.

81. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1995;272(1):417–22.

82. Veljaca M, Pllana R, Lesch CA, Sanchez B, Chan K, Guglietta A.Protective effect of BPC-157 on a rat model of colitis. Gastroenterology 1994;106:789.

83. 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.

8. POPIS KRATICA

µg	- mikrogram
0,9% NaCl	- fiziološka otopina
ALT	- alanin transaminaza
ASA	- acidifirani aspirin
AST	- aspartat transaminaza
b.w.	- *body weight*, tjelesna težina
BPC 157	- *Body Protective Compound 157*, pentadekapeptid
CGRP	- *calcitonin gene related peptide*, peptid povezan sa kalcitonin genom
cm	- centimetar
COX	- enzim ciklooksigenaza
DES	- donji ezofagealni sfinkter
DMN	- dorzalna motorna jezgra n. vagusa
EDRF	- E*ndotel Derived Releasing Factor*, čimbenik koji potječe iz endotela
EGF	- epidermalni faktor rasta
ET	- endotelin
FDA	- *Food and Drug Assotiation* - Američka agencija za hranu i lijekove
FGF-beta	-*fibroblast growth factor-beta*, čimbenik rasta fibroblasta-beta
GI	- gastrointestinalni
GRP	- *Gastrin-Releasing Peptide*, gastrin oslobađajući peptid
h	- sat
HE	- hematoksilin eozin
i.g.	- intragastrički
i.p.	- intraperitonealno
kg	- kilogram
KGF-2	-*keratinocyte growth factor-2*, čimbenik rasta keratinocita-2
L-arginin	- NO prekursor
LD	- letalna doza
LDH	- laktat dehidrogenaza
L-NAME-N^G	- *Nitro-L-Arginine Methylester*, kompetitivni inhibitor stvaranja endotelnog nitrid oksida (NO)

mg	- miligram
min	- minuta
ml	- mililitar
mm	- milimetar
MPTP	- *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophyridine*
ng	- nanogram
NOS	- NO sintetaza
NSAIL	- nesteroidni antiinflamatorni lijekovi
p.o.	- peroralno, na usta
PG	- prostaglandini
PS	- pilorički sfinkter
S.D.	- Standardna devijacija
TRH	- tireotropin-oslobađajući hormon

9. ŽIVOTOPIS

Rođen u Livnu 1980. g. Od 1996. g. živi u Zagrebu. Osnovnu školu završio u Orguzu pokraj Livna, Bosna i Hercegovina, a opću gimnaziju u Zagrebu 1998. g. Diplomirao na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2004. g. Nakon pripravničkog staža u Klinici za traumatologiju u Zagrebu zapošljava se u hitnoj medicinskoj pomoći Doma zdravlja zagrebačke županije Sv. Ivan Zelina. 2007. g. dobiva specijalizaciju iz opće kirurgije u Općoj bolnici Varaždin koju i uspješno završava 2011. g. te se zapošljava i radi na odjelu za ortopediju i traumatologiju OB Varaždin.

Od 2015. godine do 2017. odlazi na supspecijalističko usavršavanje iz plastične, rekonstrutivne i estetske kirurgije na Klinici za plastičnu, rekonstrutivnu i estetsku kirurgiju u KB Dubrava u Zagrebu, i od 2017. radi u Općoj bolnici Varaždin kao supspecijalist plastične, rekonstruktivne i estetske kirurgije. Bavi se znanstvenim radom na Medicinskom fakultetu u Zagrebu i objavio je dva znanstvena rada u CC indeksiranim časopisima te aktivno sudjeluje na znanstvenim skupovima.