

# Uloga peptida BPC 157 u cijeljenju mišićno-tetivne sveze mišića kvadricepsa u štakora

---

Japjec, Mladen

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:693935>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Mladen Japjec

**ULOGA PEPTIDA BPC 157 U CIJELJENJU  
MIŠIĆNO-TETIVNE SVEZE MIŠIĆA  
KVADRICEPSA U ŠTAKORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Mladen Japjec

**THE ROLE OF THE PEPTIDE BPC 157 IN  
HEALING MUSCLE-TENDON JUNCTION IN THE  
QUADRICEPS MUSCLE IN RAT**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019.

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

## **Životopisi mentora**

### **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 položenim 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 razvoju 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. Božidar Šebečić**

Rođen je 22.03.1958. g. u Jastrebarskom. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1977. g. i diplomirao 1982. g. Nakon specijalizacije iz kirurgije i položenog specijalističkog ispit 1991. g. primljen je na Traumatološki odjel Klinike za kirurgiju Kliničke bolnice Merkur. Voditelja Zavoda za traumatologiju Klinike za kirurgiju postaje 1999. g, a 2006. g.i predstojnik Klinike za Kirurgiju KB Merkur. Obje funkcija obnaša i danas. Stručno i znanstveno se usavršavao u nizu vanjskih ustanova. Kao istaknutom stručnjaku 2004. g.

priznati mu je status subspecijaliste iz traumatologije, a 2015. g. priznata su mu stečena prava i kompetencije specijaliste ortopedije i traumatologije.

Magistarski rad obranio je 1988. g, a doktorsku disertaciju 1995. g.

2004. g. izabran je za docenta na Katedri za kirurgiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, 2009. g. za zvanje izvanrednog profesora, a 2018. g. za redovitog profesora na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Objavio je više od šezdeset publikacija u istaknutim indeksiranim međunarodnim stručnim časopisima te ima 525 nezavisna citata. Autor je više poglavlja u knjigama. Aktivni je istraživač na tri projekta i voditelj je znanstvenog projekta „Pentadekapeptid BPC 157- učinkovita terapija ozljeda mišića i tetiva“.

Sudjeluje u diplomskoj i postdiplomskoj nastavi iz područja kirurgije i kirurške propedeutike, voditelj je dva izborna predmeta iz područja traumatologije, voditelj kolegija „Ortopedija i traumatologija“ poslijediplomskog specijalističkog studija Opće kirurgije, suvoditelj kolegija „Traumatologija sustava za kretanje“ i predavač na kolegiju „Sportska traumatologija“ poslijediplomskog specijalističkog studija Ortopedije i traumatologije. Mentor je više diplomskih radova i mentor/komentor u poslijediplomskom, doktorskom studiju.

## **Zahvala**

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru i vrsnom stručnjaku prof.dr.sc. Predragu Sikiriću. Uz pružanje svih potrebnih stvari u radu s eksperimentalnim životinjama, bio je uvijek spreman ponuditi najbolje rješenje za probleme koji su se javljali. Cijelo vrijeme bio je veliki motivator i bez njega ovaj rad nebi uspio.

Zahvalu, također, dugujem kolegama i osoblju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Kliničke bolnice Merkur 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.

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

# **ULOGA PEPTIDA BPC 157 U CIJELJENJU MIŠIĆNO-TETIVNE SVEZE MIŠIĆA KVADRICEPSA U ŠTAKORA**

**MLADEN JAPJEC**

Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Svakodnevno, a posebno tijekom sportskih aktivnosti česta su oštećenja mišića i tetiva. Mišićno-tetivni spoj je najslabija komponenta u cijeloj jedinici i veliki broj oštećenja događa se na njemu. Na temelju rezultata ranijih istraživanja u kojima terapija BPC 157 dovodi do cijeljenja oštećene tetive ili mišića, postavili smo hipotezu da BPC 157 utječe pozitivno na cijeljenje i ponovnu uspostavu čvrste i kvalitetne mišićno-tetivne sveze mišića kvadricepsa u štakora. Eksperimentalnim životinjama, s kirurški razdvojenim mišićnim od tetivnih niti u području četveroglavog mišića desne natkoljenice raspodjeljenim u 3 skupine davali smo: BPC 157 u dozi od 10 ng/kg, BPC 157 u dozi od 10 µg/kg ili fiziološku otopinu. Pratili smo kliničko-fiziološke promjene, a po žrtvovanju napravili makroskopske i histološke analize te biomehanička i laboratorijska testiranja tkiva. U patohistološkim preparatima obje skupine BPC tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu, bila je značajno manja upala te puno brža i kvalitetnija reparacija mišićno-tetivog spoja. Cijeljenje je bilo popraćeno većom ekspresijom eNOS mRNA i smanjenom razinom NO i slobodnih radikala kod jedinki koje su tretirane BPC 157 u odnosu na kontrolnu skupinu. Isto je rezultiralo manjim razvojem atrofije mišića i nastajanja defekta na mjestu spoja. Tretirane životinje bolje su hodale, imale jaču snagu pritiska i nisu razvijale kontrakturu noge. Naši rezultati pokazuju da bi se BPC 157 mogao koristiti kod ozljeda mišićno-tetivne sveze obzirom da poboljšava cijeljenje, a za kliničku praksu neophodna su još dodatna istraživanja.

(85 stranica, 20 slika, 12 tablica, 151 literaturnih navoda, jezik izvornika - hrvatski)

Ključne riječi: mišićno-tetivna sveza, BPC 157, NO sustav, cijeljenje, štakori

Mentor: Prof.dr.sc. Predrag Sikirić, Prof.dr.sc. Božidar Šebečić

Ocjenjivači: Doc.dr.sc. Aleksandar Vojta; Prof.dr.sc. Žarko Rašić; Doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević



# **THE ROLE OF THE PEPTIDE BPC 157 IN HEALING MUSCLE-TENDON JUNCTION IN THE QUADRICEPS MUSCLE IN RAT**

MLADEN JAPJEC

Department of Pharmacology, University of Zagreb Medical School

Daily and especially during sports activities muscle and tendon are often damaged. How is the muscular tendon junction weakest component in the entire unit so that a large number of defects occurring right on that part. According to the results of previous studies in which therapy BPC 157 leads to successful healing of injuries isolated tendon or muscle tissue, we hypothesized that BCP157 positively affects on the healing and restoration of solid and quality muscular-tendon connection. Experimental animals with surgical separate muscle from tendon in the right muscle quadriceps and randomly divided into the 3 groups, will be treated parenterally with: BPC 157 at a dose of 10 ng/kg, BPC 157 at a dose of 10 µg/kg or saline. During research, we followed clinical-physiological changes and after sacrificing macroscopic, histological and biomechanical tissue testing were done. In the pathohistological preparations of both groups of BPC treated animals in comparison to the control, there was noticeably less inflammation and a much faster and better repair of the muscle-tendon join. Healing was followed with greater expression of the eNOS mRNA and reduced levels of NO and free radicals. This has resulted, macroscopically, with the lower development of muscle atrophy and the formation of a defect in the muscle-tendon junction. Treated animals walked better, they had stronger pressure with leg and the contractures did not developed. The contribution of labor would represent unquestionable novelty in healing muscle-tendon junction.

(85 pages, 20 figures, 12 tables, 151 references, original in Croatian)

Keywords: muscle-tendon junction, BPC 157, NO system, healing, rats

Supervisor: Prof Predrag Sikirić; Prof Božidar Šebečić

Reviewers: Asst Prof Aleksandar Vojta; Prof Žarko Rašić; Asst Prof Sofia Ana Blažević

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Struktura mišića .....	1
1.2. Struktura tetiva .....	3
1.3. Struktura mišićno-tetivne sveze .....	4
1.4. Funkcija mišića .....	5
1.5. Ozljeda i cijeljenje.....	7
1.6. Pentadekapeptid BPC 157 – važan promotor cijeljenja .....	9
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	16
2.1. Hipoteza.....	16
2.2. Ciljevi istraživanja.....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Preoperativna priprema i operativni postupak .....	17
3.2. Postoperativni postupak i primjena pentadekapeptida BPC 157 .....	20
3.3. Funkcionalna testiranja.....	22
3.4. Makroskopska i patohistološka analiza .....	25
3.5. Biomehanička testiranja.....	25
3.6. Analiza ekspresije gena .....	28
3.7. Mjerenje razine lipidne peroksidacije u tkivu .....	34
3.8. Određivanje razine nitrit oksida u tkivu .....	34
4. REZULTATI.....	35
4.1. Statistička analiza.....	35
4.2. Indeks oporavka hoda i veličina stopala.....	37
4.3. Kontraktura operiranog ekstremiteta .....	40
4.4. Makroskopska analiza preparata .....	41
4.5. Izdržljivost na istezanje .....	51
4.6. Histologija.....	55
4.7. Molekularne analize .....	58
5. RASPRAVA .....	62
5.1. BPC 157 i drugi faktori rasta u složenim procesima cijeljenja.....	65
6. ZAKLJUČAK .....	71
7. POPIS LITERATURE.....	72
8. ŽIVOTOPIS.....	85

# 1. UVOD

## 1.1. Struktura mišića

Poprečnoprugasto mišićje predstavlja težinom najzastupljenije tkivo u ljudskom tijelu (oko 40% težine tijela). Većinom se hvata na kostima i prelazi preko zglobova, tako da njihovom kontrakcijom dolazi do primicanja hvatišta. Sačinjeno je 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 sinhroniziranost koja uvjetuje kretanje tijela, a na kraju prilikom ozljeda i mogućnost regeneracije (1).

Osnovni građevni element mišića je višejezgreni stanica koja se često naziva i mišićno vlakno. Ono ima oblik cilindra sa zaobljenim krajevima koji završavaju u vezivnom tkivu tetive. Međusobno se pružaju usporedno tako da na transverzalnoj projekciji imaju kružan oblik promjera 10-100  $\mu\text{m}$ . Dužinom izuzetno variraju tako da mogu biti duga od 1 mm pa sve do 30 cm, a neka ponekad duga kao i sam mišić. Dužina je najčešće genetski uvjetovana i podređena fiziološkim potrebama pojedinog mišić (2). Citoplazma miofibrila (sarkoplazma) sadrži brojne jezgre, stanične organele kao što su Goldžijev aparat, mitohondrije i citoplazmatski retikulum, nakupine lipida, glikogena i mioglobina, a sve obavija stanična ovojnica (sarkolema). Sarkolema ima dva sloja, unutarnji sloj je plazmalema, a vanjski bazalna membrana koja daje vezu s međustaničnim vezivnim tkivom, endomizijem. Jezgre su spljoštene i periferno postavljene. U trenutku nastanka mišićnog vlakna fuzijom mnogih mioblasti, jezgre su centralizirane da bi kasnije poprimile subsarkolemsku poziciju. Ponovna pojava centralne nukleacije u zrelom mišiću ukazuje na trenutni proces regeneracije. U tom procesu važnu ulogu, svojom proliferacijom, daju i malobrojne satelitske stanice smještene uz bazalnu membranu (3). Dužinom vlakna u sarkoplazmi pružaju se mišićna vlaknca, odnosno miofibrile. Ona zauzimaju 80% ukupnog volumena mišićne stanice. Sačinjeni su od kontrakcijskih proteina aktina i miozina. Tanki filamenti građeni uglavnom od aktina, a debeli od miozina pravilno su naizmjenično raspoređeni u mišićnom vlakancu. Debeli filamenti miozina zauzimaju središnji dio sarkomere i djelomično se preklapaju s tankim filamentima aktina. To mjesto na mikroskopskom preparatu je deblje, dvostruko lomi svjetlost što rezultira tamnom anizotropnom prugom (A-pruga). Tanki filamenti se djelomično protežu između

debelih filamenata dok su drugim krajem pričvršćeni za Z-membranu. Prostor između dvije Z-membrane čini funkcionalnu jedinicu mišićnog vlakna. Mjesta 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 (tamna) i izotropna (svijetla) pruga se izmjenjuju što rezultira karakterističnim optičkim svojstvom ovog mišićnog tkiva i daje mu poprečnu prugavost. Miofilamenti su ustrojani u veće funkcionalne jedinice koje se nazivaju sarkomere veličine 2  $\mu\text{m}$  i debljine 1  $\mu\text{m}$ . 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 za polovicu svoje dužine u mirovanju (1).

Mišićno tkivo nema svoje međustanične tvari, ali je između vlakana uloženo rahlo vezivno tkivo koje mišićna vlakna povezuje u organiziranu jedinicu, dajući mu oblik, a osigurava dovod krvnih žila, limfnih žila i živčanih vlakana do svakog mišićnog vlakna. Volumni 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. Oko cijelog mišića je također 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.

## 1.2. Struktura tetiva

Mišići se na jednoj ili s obje strane vezivnom vrpcom hvataju na kost. Kad je vrpca okrugla nazivamo je tetiva, a pločastu aponeuroza. Tetive su bijele boje i nitaste strukture. Unutar ekstracelularnog matriksa uzdužno su postavljene niti kolagena, a između njih su smješteni fibroblasti i fibrociti. Oni čine 90% staničnih elemenata te su zaduženi za proizvodnju energije i produkciju kako ekstracelularnog matriksa tako i kolagena. Fibrociti imaju sposobnost proizvodnje energije aerobno Krebsovim ciklusom i anaerobno glikolizom. Starenjem sve više dominira anaeroban način dobivanja energije (4) tako da je u odnosu na mišiće potrošnja kisika 7,5x manja (5). Preostale stanice su hondrociti, smješteni uglavnom na tetivno-koštanom hvatištu, sinovijalne stanice i vaskularne stranice (6). Tetiva sadrži 70% vode dok najveći dio suhe tvari otpada na niti kolagena tip I (80%). Tek manji dio čine niti elastina (2%). Niti kolagena uglavnom su paralelno postavljene i hijerarhijski organizirane počevši od trostrukog polipeptidnog lanca tropokolagena koji međusobno tvore vlakanca pa vlakna, zatim fascikle i na kraju cijelu tetivu. Glavni sastojak ekstracelularnog matriksa čine proteoglikani, glikozaminoglikani, glikoproteini i različite druge manje molekule zadužene za ustroj kolagenih vlakana i regeneraciju nakon ozljede (7). Snopovi vlakana su obavijeni rijetkim vezivom (peritenon), a površinu tetive obavija vezivna ovojnica (epitenon). Kolagena vlakna nisu rastezljiva, no zbog valovitog oblika u kontrakciji mišića se mogu izravnati. Prenoseći silu s mišića na kost tetiva na taj način djeluje kao amortizer apsorbirajući dio energije (8). Takva struktura tetivu odlikuje visokom mehaničkom čvrstoćom, dobrom fleksibilnosti i optimalnom razinom elastičnosti. Dok god vanjska sila nije prevelika, odnosno tetiva se ne rastegne više od 4%, kolagena vlakna se nakon kontrakcije intaktno vraćaju u prvobitan položaj. Kada sila vlaka prelazi tu granicu nastaju prvo mikroskopska oštećenja u vidu klizanja između pojedinih kolagenih vlakana, da bi iznad 8% istezanja nastala i makroskopska oštećenja tetive. Daljnje istezanja vrlo brzo dovodi do potpunog raspada vlakana i ruptur tetive (8).

Na kost se drže tako da urastaju u periost ili direktno u kost preko Sharpeyevih vlakana. Osteotetivni spoj čini postepeni prijelaz kolagena u vezivno hrskavično tkivo koje dalje prelazi u mineralizirano vezivno-hrskavično tkivo i naposljetku u kost.

Tetiva je vaskularizirana iz tri smjera: preko mišićno-tetivnog spoja, tetivno-koštanog spoja i direktno preko ovojnice, a krvne žile iz različitih izvora međusobno oskudno

anastomoziraju. Ovisno o pojedinoj tetivi omjer interne i eksterne vaskularizacije je bitno različit. Također na mnogim dijelovima pojedinih tetiva krvna opskrba može biti kompromitirana vanjskim utjecajima kao što su trenje, pritisak i torzija te na taj način stvaraju zone hipovaskularizacije nepovoljne za cijeljenje nakon ozljede (9). Inervacija tetive također dolazi s ista tri smjera kao i krvne žile. Živčani završeci uglavnom završavaju već u tetivnim spojevima ili na samoj njenoj površini. Preko mehanoreceptora, proprioceptora i noncioceptora daju različite informacije o vlaklu i tlaku tetive, položaju ili boli koja se javlja prilikom kretanja (10) .

### **1.3. Struktura mišićno-tetivne sveze**

Mišićno-tetivna sveza (MTS) je kompleksna struktura na rubovima mišićnih niti gdje se miofibrili vežu s tetivnim vlaknima. Takvi spojevi nisu samo na rubnom, zašiljenom dijelu mišića gdje mišić makroskopski jasno prelazi u tetivu već nastaju i unutar trbuha mišića na mjestu hvatišta mišićnih niti za intermuskularnu fasciju (11). Poneki mišić, kao što je četveroglavi mišić natkoljenice, upravo na taj način duboku unutar mišića na velikoj površini ostvaruje najveću količinu svojih mišićno tetivnih konekcija.

Taj spoj čine prstoliki izdanci tetivnih niti koji ulaze duboko u mišićno tkivo i tako povećavaju površinu spoja (12). Na taj način kolagena vlakna su duboko isprepletana s mišićnim vlaknima i okomito orijentirana prema njima. Čvrstoću spoja daje ekstracelularni matriks koji, uz važnu ulogu održavanja strukture, omogućuje i siguran prijenos jakih sila koje nastaju prilikom kontrakcije mišića. Taj prijenos sile između dva spojna tkiva uglavnom teče preko dva strukturna lanca povezanih proteina. Aktin, kao glavni građevni element kontraktilnih elemenata mišića, na svom kraju veže se uz proteine smještene na unutarnjoj strani sarkoleme. Jedan put teče od aktina preko distrofina, distroglikana pa na laminin ekstracelularnog matriksa. Drugi put ostvaruju veze aktina preko podmembranskog talina, vinkulina pa na integrin i kolagen ekstracelularnog matriksa (13)(14). Koliko su važne navedene veze pokazuju i posljedice mutacije gena zaduženih za navedene proteine. Tako promjena gena za  $\alpha 7$  integrin uzrokuje kongenitalnu miopatiju ljudi, a kod miševa mišićnu

distrofiju (15)(16). Potpuno isključenje tog gena daje i kompletan prekid veza između mišićnih vlakana i ekstracelularnog matriksa (ECM) (17).

Za stvaranje mišićno-tetivnog spoja izuzetno su važne kontrakcije mišića tj. sila vlaka koja se prenosi na tetive. To možemo zaključiti gledajući elektronskim mikroskopom štakorske modele s promjenom na mišićima tokom odrastanja. Vidjelo se, kako po rođenju na mjestu MTS gotovo ne postoje karakteristične prstolike strukture. Na tom mjestu kranje sarkoleme daju tek neznatne invaginacije. Tokom naredna 2-4 tj. pod utjecajem kontrakcija mišića na mjestu MTS postepeno nastaju sve brojniji i dublji „prstići“ koji ulaze u mišić i isprepliću tetivno i mišićno tkivo (18). Također, utjecaj mišićnih kontrakcija na razvoj MTS jasno je vidljiv i na drugim eksperimentalnim modelima. Tako je na štakorima koji su bili podvrgnuti intenzivnijoj fizičkoj aktivnosti u području MTS-a jasto uočljivo progresivno povećanje broja i dužine prstolikih invaginacija sarkoleme, zadebljanje bazalne membrane mišićnih vlakana te povećanje količine kolagena na terminalnim krajevima tetive (19). S druge pak strane neaktivnost tj. imobilizacija ekstremiteta i nedostatak mišićne aktivnosti, mikroskopski gledano, u samo mjesec dana mogu smanjiti površinu spoja mišića i tetive za 50% uz stanjenje bazalne membrane sarkoleme (20).

Na humanim i životinjskim modelima vidjelo se da prilikom kontrakcije zbroj skraćanja pojedinačnih miofibrila ne odgovara i promjeni dužine cijelog mišića. Uzrok toga je posljedica zrakastog, kosog vezanja pojedinih mišićnih dijelova kao i elastični efekt mišića (21). Za taj efekt upravo je zadužena prstolika mišićno-tetivna sveza koja je s takvom konstrukcijom podložna istezanju i skupljanju. Zajedno s valovitim kolagenim vlaknima tetive, prstolike formacije sveze se prilikom istezanja djelomično izravnavaju. Osim što daju sigurnost od puknuća jer kompenziraju jake vlačne sile, pohranjuju i dio te energije i vraćaju je prilikom faze kontrakcije (22).

#### **1.4. 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 njoj 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 (23). 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 (24).

Mišići da bi ostvarili pokret moraju raditi u strogo kontroliranom i kordiniranom 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, tip 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 (1).

Ovisno o broju i snazi živčanih impulsa razlikuje se jačina kontrakcije. Mišić se može kontrahirati na mnogo načina. U koncentričnoj kontrakciji snaga stiskanja mišića je jača nego otpor tako da dolazi do skraćanja mišića i kretanje ekstremiteta u smjeru skraćanja 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.



## 1.5. Ozljeda i cijeljenje

Mišić se može ozlijediti na različite načine, a uglavnom se sve može sažeti u dva osnovna principa nastanka ozljede: direktan (laceracija, kontuzija, istegnuće) i indirektan (ishemija, pareza). Preko 90% ozljeda mišića ljudi posljedica je istegnuća ili kontuzije, dok su laceracije puno rjeđe (25). Težinu istegnuća može se podijeliti na tri razine. Blagu u kojoj je oštećeno tek nekoliko mišićnih niti uz održanu mišićnu funkciju, srednje tešku karakteriziranu većim oštećenjem i jasnim gubitkom funkcije i tešku za koju je vezan potpuni gubitak funkcije ozljeđenog mišića kao posljedice potpune transekcije mišića. Ova oštećenja mišića najčešće se događaju uz mišićno-tetivni spoj (25)(26)(27).

Bez obzira kako je trauma nastala, cijeljenje mišića uvijek ide ustaljenim procesom. Tako, nakon faze degeneracije (nekroze) i upale, slijedi faza regeneracije, a proces završava fibrozom, tj. stvaranjem ožiljka.

Pobliže gledano, vidljivo je da ozljeda uzrokuje prekid integriteta sarkoleme i ulazak ekstracelularnog kalcija u stanicu (28). On uzrokuje aktivaciju staničnih proteaza s posljedičnom razgradnjom (nekrozom) miofibrila. Daljnju nekrozu pospješuju oslobođeni slobodni radikali kao i brojni makrofagi koji pristižu na mjesto ozljede kroz postojeće i novoformljene male krvne žile (29). Cijelo je područje otečeno, ispunjeno brojnim upalnim stanicama (monociti, makrofagi, T-limfociti) i upalnim medijatorima (interleukini, tumor nekrotizirajući faktor (TNF), inzulinu sličan faktor rasta (IGF), transformirajući faktor rasta (TGF), faktor rasta iz trombocita (PDGF), epidermalni faktor rasta (EGF)) koji nakon degradacije u fazi upale počinju stvarati podlogu za novu izgradnju. To se događa u prvih nekoliko dana nakon ozljede. Dolazi do proliferacije i diferencijacije mioblasti kao i aktivacije satelitskih stanica smještenih uz bazalnu membranu. One nakon toga proliferiraju i diferenciraju u multinuklearne stanice, a naposljetku se stvaraju regenerirana mišićna vlakna (30). Proces regeneracije započinje 7-10 dana nakon traume, a na vrhuncu je nakon drugog tjedna kada se polako usporava i zamjenjuje ga faza fibroze. Tada se stvara ožiljak koji, manje ili više, nadomješta ozljeđeni mišić. Stvaranje ožiljka sprečava potpunu regeneraciju mišića. Kontrakcijom ožiljka približavaju se novonastale mišićne niti, ali na kraju između njih uvijek zaostaje sloj vezivnog tkiva.

Kako je tetiva sasvim različita u odnosu na mišić tako su i načini rupturiranja pa i etape cijeljenja različite. Ruptura tetive može se podijeliti na akutnu i kroničnu, te se mogu

razlikovati vanjski i unutarnji čimbenici koji utječu na nju. Unutarnji čimbenici su različiti procesi koji utječu na razgradnju tetive, a vanjski sile koje utječu na istezanje tetive. I kod akutnih i kod kroničnih ruptura radi se zapravo o međudnosu tih dvaju faktora.

Preopterećenje tetive nastalo nakon intenzivnog istezanja dovodi do kroničnih upalnih procesa i degeneracije tetivnih niti i/ili tetivne ovojnice. Čak i opterećenja unutar fizioloških granica mogu izazvati iste promjene ukoliko su preučestala jer tako ne dozvoljavaju tetivi da se u potpunosti obnovi (31). Sam uzrok degenerativnih procesa nije posve jasan.

Najvjerojatnije postoji više razloga među kojima je ishemija, koja se javlja pri dugotrajnom prekomjernom istezanju te slobodni radikali nastali po reperfuziji (32), hipertermija usljed aktivnosti (33), apoptoza tenocita i otpuštanje upalnih faktora usljed preopterećenja (34). U podlozi akutne i kronične rupture nalazi se određena količina upalno-degenerativnih promjena. Tako akutnu rupturu izaziva veliko opterećenje na više ili manje uredne tetivne niti, za razliku od spontanijih ruptura koje se događaju pri fiziološkim opterećenjima, ali na osnovi uznapređovalih degenerativnih promjena.

Tetiva je prilično avaskularno tkivo s niskim metaboličkim potrebama i s velikim anaerobnim sposobnostima stvaranja energije. S jedne strane to je poželjno jer omogućuje dugotrajna opterećenja bez razvoja ishemije, a s druge strane daje sporije i lošije mogućnosti cijeljenja, nego mišić. Cijeljenje teče kroz tri međusobno povezane faze: upala, regeneracija i remodelacija. U prvoj fazi upalne stanice se nakupljaju na mjestu rupture i fagocitiraju nekrotički materijal. Ubrzo dolazi do angiogeneze i stimulacije fibroblasta na proliferaciju. Oni dolaze u ranu i počinju stvarati kolagen tip III. Potom slijedi faza regeneracije počevši od 2. tjedna i traje nekoliko tjedana. Sintetizira se kolagen tip III i ekstracelularni matriks. Cijelo područje je otečeno zbog povećane količine vode. U posljednjoj, remodelacijskoj fazi, koja nastupa nakon 6. tjedna smanjuje se celularnost, otok i stvaranje kolagena. Dominira stvaranje kolagen tip I, a niti se usmjeravaju u smjeru stresa. Nakon 10. tjedna počinje sazrijevanje fibroznog tkiva u ožiljkasto tetivno tkivo, a cijeli proces može se protegnuti do godine dana (35).

Kako kod mišića tako i kod tetiva nema prave regeneracije, već kao posljedica traume, u manjoj ili većoj mjeri, dio prekinutog tkiva zamjenjuje se, funkcionalno manje kvalitetnim, vezivnim tkivom. Da bi se to spriječilo, prilikom liječenja, osnovo je pravilo smanjiti hematoma nastao nakon laceracije. Ukoliko se to ne postiže neoperativnim metodama (eng: *RICE protocol : rest, ice, compression and elevation*) u obzir dolaze invazivne tj. kirurške

metode kao što je punkcija hematoma pod kontrolom UZV-a ili pak operativna evakuacija i spajanje prekinutog spoja (36). Ti postupci daju uglavnom dobre kliničke rezultate, ali na mikro razini pružaju manje dobar funkcionalni rezultat jer ostavljaju mišić i tetivu s ožiljcima (36). U posljednje vrijeme rade se i brojne studije koje istražuju kako na bazičnoj, molekularnoj razini pospješiti regeneraciju i zaustaviti fibrozu. Veliki naglasak daje se na stimulaciju pojedinim faktorima rasta. Tako je u centru istraživanja Inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1) koji je prepoznat kao važan aktivator mioblasta. On primjenjivan sistemski, direktno na mjesto ozljede ili pak virusnim vektorima, dovodi do hipertrofije mišića ili pak smanjuje degradaciju mišićne mase u modelima s imobilizacijom ili sa starenjem (37)(38)(39). Predmet istraživanja su i svojstva pojedinih faktora rasta (faktor rasta hepatocita (HGF), inhibitorni faktor leukemije (LIF)) na aktivaciju satelitskih stanica i njihovu daljnju diferencijaciju (40) (41). I neki drugi faktori kao što je vaskularni endotelski faktor rasta (VEGF), može potaknuti cijeljenje ishemijskog mišića stimulirajući angiogenezu (42).

S druge strane TGF- $\beta$ 1 ima centralnu ulogu u stvaranju fibroze tako što potiče aktivaciju ekstracelularnog matriksa i proliferaciju vezivnog tkiva. Ta njegova uloga jasno je vidljiva u mišićnim distrofijama gdje je on visoko zastupljen (43). Teoretski, njegovom supresijom moglo bi se smanjiti stvaranje vezivnog tkiva i omogućiti bolju regeneraciju izvornog mišićnog tkiva. Ta svojstva mogli bi imati gama interferon i suramin (44).

## **1.6. Pentadekapeptid BPC 157 – važan promotor cijeljenja**

U našem istraživanju koristit ćemo pentadekapeptid BPC 157 (BPC 157) koji je dobiven sintezom i koji se sastoji od 15 aminokiselina (Gly-Glu-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val, Mw 1419; Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija) (45). Očituje se stabilnošću čak i u izrazito nepovoljnim uvjetima kao što je želučani sok gdje dolazi do dezintegracije ostalih proteina (46). Nadalje, njegova prednost pred različitim proteinima i faktorima rasta koji se koriste u iste svrhe, je ta što se može primjenjivati bez nosača i na različite načine (subkutano, peroralno, lokalno), a ne pokazuje toksičnost. Pokazano je kako daje koristan učinak na mnoga tkiva međudjelovanjem s ključnim homeostatskim sistemima u organizmu poput primjerice dušičnog monoksida (NO), inhibicijskim sustavom perifernih osjetilnih neurona čiji neurotransmiter nije ni acetilkolin ni noradrenalin, kao i s centralnim

sustavima dopaminskih i gama aminomaslačne kiseline (GABA) neurona gdje umanjuje smetnje vezane za te sustave (47).

Pozitivan učinak BPC 157 daje zbog snažnog angiogenog i antiinflamatornog učinka. Stvaranjem novih krvnih žila u početnoj fazi cijeljenja omogućava se kvalitetna doprema kisika i hranidbenih tvari na mjesto oštećenja (48). Također, njegova primjena dovodi i do kasnije, jačeg stvaranja retikulina i kolagena koji daju krvnoj žili završni oblik i čvrstoću. Primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje stvaranje upalnih medijatora (leukotriena B4-LTB4, te tromboksana B2-TxB2) (49)(50)(51)(52)(53)(54) u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze u području ozljede (55). Tako dolazi do značajno manje eksudacije polimorfonukleara, ali veće eksudacije mononukleara u područje ozljede. Time je smanjena količina medijatora koje luče polimorfonukleari, a koji djeluju kao kolagenaze čime se razgrađuje okolni neozlijeđeni kolagen i odgađa se sinteza novog kolagena, dok mononukleari imaju značajnu fagocitnu sposobnost(56).

Poticanjem sinteze NO-a, BPC 157 djeluje stimulativno na proces cijeljenja i to u ranom razdoblju svojim snažnim vazodilatacijskim učinkom dok kasnije i sintezom kolagena (57). Sinteza NO ostvaruje se blokiranjem N-nitro-L-arginin metil-estera (L-NAME) koji je inhibitor enzima NO-sintaze (NOS).

Povezanost BPC 157 i NO sustava pokazana je u više različitih modela i različitim vrstama, posebice u njegovoj participaciji u Moncadinom homeostatskom reparativnom odgovoru NO-sustava na ozljedu (58). BPC 157 utječe na sve događaje nakon gubitka vaskularnog integriteta (BPC 157 smanjuje trombozu (anastomoza abdominalne aorte) i krvarenje / trombocitopeniju (amputacija, heparin, varfarin, aspirin)), nadalje konzistentno unapređuje cijeljenje kod različitih modela ozljeda, akutnih i kroničnih čak i kod različitih tkiva koja inače spontano ne cijele nakon teških ozljeda. U tome kontekstu, početna kasnije i potvrđena hipoteza bila je da BPC 157, posljedično svome stvaranju u želučanoj sluznici, posebnom značenju sintetaze NO-a i bazalno većem stvaranju NO-a u želučanoj sluznici u odnosu na druga tkiva, pokazuje generalni kompetitivni učinak i prema L-argininu i prema njegovim analogima (npr. L-NAME) što ima veliko fiziološko značenje na stvaranje NO-a (59). Stoga su kasnija istraživanja praktički pokazala njegove korisne učinke ilustrirajući uzajamne odnose BPC 157 i sustava NO-a i s L-NAME-om i s L-argininom (pojedinačno ili zajedno) u:

1.) zaštititi želučane sluznice i zaštititi sluznice, nakon alkoholne lezije, putem citoprotekcije, stvaranja NO-a, i regulacije krvnog tlaka (60)

2.) akutnoj/kroničnoj alkoholnoj intoksikaciji i sindromu ustezanja (61)

3.) kardiovaskularnim poremećajima, infarktu miokarda, kroničnom zatajenju srca, plućnoj hipertenziji i aritmijama (62)(63)

4.) poremećajima nakon hipokalijemije i hiperkalijemije kao i u disfunkciji stanične membrane izazvane kalijem (63)

5.) kompleksnom poremećaju necijeljenja, kao kod necijeljenja ezofagokutane (64), (65) i kolokutane fistule (66).

Prethodno je već spomenuto kako pentadekapeptid BPC 157 sudjeluje u interakciji s NO sustavom. NO sustav ima esencijalnu važnost u mnogim različitim procesima, uključujući odlučujuću ulogu u procesu cijeljenja rane (67). Za mnoge agense se pretpostavljalo, kako su na neki način povezani sa NO sustavom, ali samo mali broj znanstvenih studija je promatrao utjecaj NO-prekursora, NOS-blokatora i učinak njihove kombinacije (NO-prekursor + NOS-blokator) zajedno sa testiranim agensom na cijeljenje različitih tkiva i organa. Za razliku od drugih agensa, pentadekapeptid BPC 157 je testiran upravo s pozornosti usmjerenom na djelovanje NO sustava. Tako je ispitivan njegov učinak u interakciji s NO-prekursorom ili NOS-blokatorom zasebno, kao i s NO-prekursorom i NOS-blokatorom u kombinaciji. U brojnim objavljenim člancima je pokazano, da u različitim tkivima i kod različitih eksperimentalnih životinjskih vrsta BPC 157 utječe na otpuštanje NO-a te može poništiti učinak i NOS-blokatora L-NAME i NO-prekursora L-arginina. Ova interakcija BPC 157 i NO sustava može objasniti široki raspon blagotvornih učinaka dobivenih primjenom pentadekapeptida BPC 157 u različitim istraživanjima (49)(59)(60).

Istraživanja su pokazala kako u *in vivo* i u *in vitro* pokusima BPC 157 može nadvladati učinak L-NAME, kompetitivnog inhibitora endotelnog NO-a, što govori u prilog njegove posebne interakcije s NO sustavom (blokadom sinteze kod primjene L-NAME i hiperstimulacijom kod primjene prekursora L-arginina.). Ove složene interakcije mogu se objasniti pretpostavkom da agensi kao L-NAME inhibiraju NO sintetazu (NOS) u kompeticiji s L-argininom te je jednako tako moguća kompeticija i sa BPC-om 157. Stvaranje NO bilo je smanjeno u kombinaciji pentadekapeptida BPC 157 i L-arginina iako kod samostalne odnosno pojedinačne primjene oba iniciraju sintezu NO-a. Pokus s akoholnim lezijama želuca i s krvnim tlakom (60) govori u prilog dodatne inhibicije aktivnosti BPC-a 157 kada je L-argininu dodan L-NAME, vjerojatno zbog ograničene raspoloživosti NO-sintetaze. Sposobnost pentadekapeptida BPC 157 u induciranju sinteze NO-a nije bila inhibirana dodatkom L-NAME u čak pet ili deset puta većoj dozi od one potrebne za zaustavljanje učinka L-arginina što govori u prilog kako BPC 157 ipak ima nešto drugačiji učinak na NO od učinka L-arginina. Isto je dokazano na modelu supernatanta homogenata sluznice želuca

štakora gdje BPC 157 ima učinak na stvaranje NO na izraženiji i/ili različit način u odnosu na L-arginin (60). Na animalnom modelu pilića učinjena su daljnja ispitivanja gdje su ascites ili plućna hipertenzija inducirani kroničnom primjenom L-NAME, što je prevenirano simultanom primjenom L-arginin-a i BPC 157 (68). Na istom modelu promatrani su i fenomeni akutne i kronične toksičnosti gdje je L-NAME uzrokovao teška oštećenja različitih tkiva (miokard, jetra, slezena), dok je L-arginin predominantno uzrokovao kongestiju, edem i hemoragiju u različitim organima (68). Učinak L-NAME je uspješno inhibiran aplikacijom L-arginina i BPC 157 uz napomenu da BPC 157 nije uzrokovao nikakvo oštećenje tkiva ili organa (68). BPC 157 značajno prevenira pojavu lezija u različitim organima, a posebice je bitan u održavanju integriteta sluznice želuca. Učinak L-arginina kod alkohonih ozljeda štakora bio je u potpunosti inhibiran nakon primjene L-NAME dok je učinak BPC-a 157 nakon primjene L-NAME bio samo oslabljen (61). Obzirom da je pentadekapeptid BPC 157 po svojim karakteristikama drugačiji od ostalih poznatih peptida te je izrazito stabilan u želučanom okruženju, može se objasniti njegova složena interakcija s NO sustavom, koji ima važnu signalnu ulogu u održavanju integriteta sluznice želuca i vrijednosti krvnog tlaka (60). BPC 157 je također pokazao značajan profilaktički i terapijski učinak u inhibiciji aritmija induciranih metildigoksinom, a dodatno je i u ovom istraživanju istražena interakcija s NO sustavom (69). Primjena L-NAME je dovela do pogoršanja metildigoksinom induciranih aritmija, L-arginin sam nije imao učinka dok je antagonizam L-NAME i BPC 157 doveo do sličnog učinka učinku samog BPC 157. Iz svega navedenog može se zaključiti kako digitalisom inducirane aritmije mogu biti spriječene ili im se može suprotstaviti primjenom pentadekapeptida BPC 157 i to uglavnom djelovanjem preko interakcije sa NO sustavom (69). Značajnu ulogu u prevenciji alkoholom induciranih lezija želuca ima zaštita endotela, jer endotel krvnih žila može modulirati tonus krvnih žila stvaranjem tvari koja je znana kao čimbenik rasta porijeklom iz endotela (EDGF). BPC 157 štiti endotel (70) kod etanolom induciranih lezija želuca, a značajna je i njegova posebna citoprotektivna uloga (71). *In vivo* je jasno vidljiv angiogenetski odgovor BPC 157 uključujući i povećanje broja pozitivnih vaskularnih elemenata: faktor rasta endotelnih stanica (VEGF), transmembranski fosfoglikoprotein (CD 34) i faktor VIII (FVIII) (49). NO sustav je izuzetno bitan i u cijeljenju kolokutanih fistula (66).

Istraživan je i učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje prijeloma kostiju pri čemu je korišten model pseudartroze radijusa u kunića (72). Jasno je dokazano da 6 tjedana po intramuskularnoj i lokalnoj primjeni pentadekapeptida BPC 157 dolazi do značajnog ubrzanja premoštenja segmentalnog koštanog defekta radijusa u kunića u usporedbi s kontrolnim

skupinama kunića koje su liječene uobičajenim postupcima. I sljedeća studija koja je koristila štakorski model cijeljenja prerezane Ahilove tetive također je pokazala pozitivan učinak BPC 157 (73). Tetive tako tretiranih životinja jasno su pokazivale povećanu čvrstoću, a histološki je bila vidljiva veća eksudacija mononukleara i manja eksudacija polimorfonukleara. Povećan je bio broj fibroblasta sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana, a količinu kolagena desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana. Pozitivan utjecaj pokazala je i studija koja je za model koristila transekciju mišića kvadricepsa (74).

Nakon jasnog pozitivnog utjecaja na cijeljenje istovrsnog tkiva pokušalo se pokazati i utjecaj na cijeljenje spoja dva raznovrsna tkiva kao što je model s ozljedom na mjestu tetivno-koštanog spoja. Odabran je štakorski model s transekcijom Ahilove tetive na petnu kost (75). I ovdje je bilo očito pozitivno djelovanje BPC 157 na cijeljenje tetivno-koštanoga spoja. Skupine tako tretiranih životinja pokazale su brži funkcionalni oporavak naročito u prvim danima cijeljenja. Vrijednosti sile pucanja, krutosti i elastičnosti statistički su bile puno bolje negu u kontrolnim životinjama. Histološka analiza verificirala je formiranje direktnog tetivno-koštanoga spoja bez okoštavanja okolnog vezivnog tkiva, a imunohistokemijska analiza pokazala značajan porast gustoće kolagenih vlakana tipa I.

Do sada smo vidjeli polivalentnost djelovanja BPC 157. Unatoč brojnim istraživanjima, svi detalji njegovog učinka još uvijek nisu razjašnjeni. Brojne studije pokazuju stimulacije različitih gena i pokretanje različitih puteva u pojedinim tkivima, a ovdje ćemo spomenuti neke od njih.

Angiogeneza je dinamičan proces koji ovisi o medijatorima koji potiču aktivaciju endotelnih stanica nakon čega slijedi stvaranje proteaza, degradacija bazalne membrane, proliferacija endotelnih stanica, njihova migracija u međustanični prostor, formiranje lumena i spajanje novoformiranih žila. Među različitim molekulama koje značajno pridonose procesu angiogeneze su vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i njegov receptor (VEGFR) koji reguliraju vaskulogenezu i angiogenezu (76). VEGFR-2, kao najznačajniji receptor VEGF-a, najčešće se izražava na endotelnoj površini i generira glavne i izravne angiogene signale. Nakon aktiviranja VEGF-a, VEGFR-2 se autofosforilizira i ulazi u citosol endocitozom. Internalizacija VEGFR-2 u endotel stanice aktivira kaskade regulacije nadolje (eng. *down*) Akt-endotelne nitrit oksid sintaze (eNOS) što dovodi do napredovanja angiogeneze (77). Također po aktivaciji istog puta regulacijom „up“ stvara se autokrini petlja koja sprečava apoptozu endotelnih stanica (78). Angiogeni naviše (eng. *up*) učinak BPC 157 ispitivan je *in vivo* na pilećim korioalantoičnim membranama (CAM) i *in vitro* na kulturama humanih endotelnih stanica iz umbilikalne vene (HUVECs) (79). Istraživanje je pokazalo da BPC 157

ne utječe na povećanje VEGF-a i time ne potiče loše efekte koje njegova indukcija može imati. S druge strane, uz to što povećava VEGFR-2 ekspresiju u vaskularnim endotelnim stanicama nekoliko sati nakon tretmana, također potiče internalizaciju VEGFR-2 u nekoliko minuta i potom aktivira fosforilaciju VEGFR-2- Akt-eNOS signalnog puta.

Nadalje, u studiji Chung-Hsun Changa i sur. dokazano je kako BPC 157 aktivira fosforilaciju fokalne adhezije kinaze (FAK) i paksilina u tetivnim fibroblastima i na taj način potiče njihovu migraciju (80). FAK je nerekceptorska proteinska tirozinska kinaza (PTK) koja je lokalizirana na staničnim spojevima. Funkcionira kao dio citoskeletnih, unutarstaničnih signalnih proteina koji potiču stvaranje integrinskih signala prema down regulaciji, a koja ima važan utjecaj na migraciju stanica (81). Nakon fosforilacije, FAK se može kombinirati s koaktivatorom steroidnog receptora (Src) i zatim izazvati fosforilaciju paksilina (82). Fosforilacija paksilina može dalje aktivirati molekule na nižoj razini kao što su CRK i CAS, a dalje proizvedeni signali će se razmnožavati fokalnim adhezijama na aktin citoskeleta. Aktivacija FAK-a i paksilina korelira dobro s povećanom migracijom tetivnih fibroblasta nakon 24-satne inkubacije s BPC 157.

Uz utjecaj na angiogenezu i poticanje migracije fibroblasta, u fazi cijeljena značajnu ulogu sigurno ima njegov utjecaj na stvaranje i sazrijevanje granulacijskog tkiva. Uspoređivan je utjecaj PDGF-BB i BPC 157 na mogućnost moduliranja rasta granulacijskog tkiva na modelu dijabetičkih miševa nakon incizijske rane (81). U tom procesu naglasak je stavljen na protein ranog odgovora rasta 1 (EGR-1) koji inducira aktiviranje mnogih ciljnih gena u cijeljenju tkiva uključujući one za kolagen II i PDGF (83) te različite čimbenike rasta i citokine (84). Djelovanje EGR-1 regulirano je njegovim ko-represorima (85) i inducira ekspresiju NAB2 ko-represora (86). BPC 157 je u koncentracijskom rasponu od 10-50  $\mu$ M izazvao ekspresiju EGR-1 te je ona ostala povišena kroz 60min. Ovaj signalni put u različitim stanicama također može biti potaknut brojnim podražajima: forbol-miristinski acetat, VEGF - faktor rasta vaskularnog endotela (86). Ekspresija EGR-1 mRNA popraćena je pojačanom ekspresijom mRNA za represor NAB2, 30 min nakon stimulacije stanica s peptidom BPC 157 i sekundarnim povećanjem između 60 i 120 min, što pridonosi sniženoj ekspresiji EGR-1 u tom kasnijem trenutku. Smanjenje ekspresije EGR-1 i NAB-2 na 100  $\mu$ M također vjerojatno odražava negativnu povratnu petlju uspostavljenu između EGR-1 i NAB2 (86). Odaziv NAB2 mRNA po primjeni BPC 157 bio je brži od onog koji je primijećen s forbol-miristinskim acetatom (maksimum u 1. h) u HeLa stanicama (86) ili VEGF (maksimum u 2. h) u ljudskim endotelnim stanicama (87) što ukazuje na razlike u povezivanju između EGR-1 i NAB2 kao odgovor na različite podražaje. Zaključno, istraživanja pokazuju da, iako PDGF-BB i BPC



157 imaju sličnu selektivnost za stimulaciju granulacijskog tkiva u procesu cijeljenja, BPC je aktivniji u stimuliranju rane faze stvaranja i organizacije kolagena. Ovaj brži odgovor također se odražava u vremenskim sljedovima promatranim u Caco-2 stanica *in vitro*, BPC 157 koji eksprimira EGR-1 mRNA nakon 15 minuta, nakon čega slijedi gotovo neposredna ekspresija NAB2 mRNA. Nasuprot tome, ekspresija EGR-1 i NAB2 mRNA kao odgovor na PDGF-BB pojavljuje se kasnije. Mogući mehanizam djelovanja peptida može uključivati stimulaciju EGR-1 ekspresije u različitim stanicama, čvrsto regulirano pomoću NAB2 ekspresije, što zauzvrat inducira stvaranje citokina i faktora rasta i stvaranje ranog ekstracelularnog matriksa.

Prema najnovijoj studiji promatrano je djelovanje BPC 157 na tumorsku kaheksiju. Utvrđeno je kako on, smanjujući povećanje proupalnih citokina kao što su IL-6 i TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , neutralizira gubitak mišića, značajno korigira poremećenu mišićnu proliferaciju kao i miogenezu. To osvaruje mijenjajući ekspresiju različitih gena: FoxO3a, p-AKT, p-mTOR, and P-GSK-3 $\beta$  (88). Opisani mehanizam može biti izuzeto važan u prevenciji atrofije mišića i u našem modelu.

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Hipoteza**

Hipoteza ovog istraživanja je da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški učinjenog prekida mišićno-tetivne sveze četveroglavog mišića natkoljenice štakora.

### **2.2. Ciljevi istraživanja**

Glavni cilj ovog rada jest potvrditi djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje kirurški učinjenog prekida mišićno-tetivne sveze četveroglavog mišića natkoljenice štakora. Za potvrdu koristit će se rezultati funkcionalnih testiranja, opservacije morfoloških (makroskopskih i histoloških) i laboratorijskih promjena te razlikama biomehaničkih svojstava tkiva BPC 157 tretiranih i kontrolnih skupina eksperimentalnih životinja.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Preoperativna priprema i operativni postupak

Istraživanje se odvijalo u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/99) i bilo je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (MEF). Koristili smo muške Wistar štakore tjelesne mase 300-350 grama iz vlastitog uzgoja Zavoda za farmakologiju MEF-a u čijem je laboratoriju (REG: HR-POK-007) provedeno istraživanje. Životinje su bile smještene u standardnim kavezima te tretirane u laboratorijskim uvjetima na sobnoj temperaturi s cikličkim izmjenama svjetla i tame uz slobodan pristup hrani i vodi.

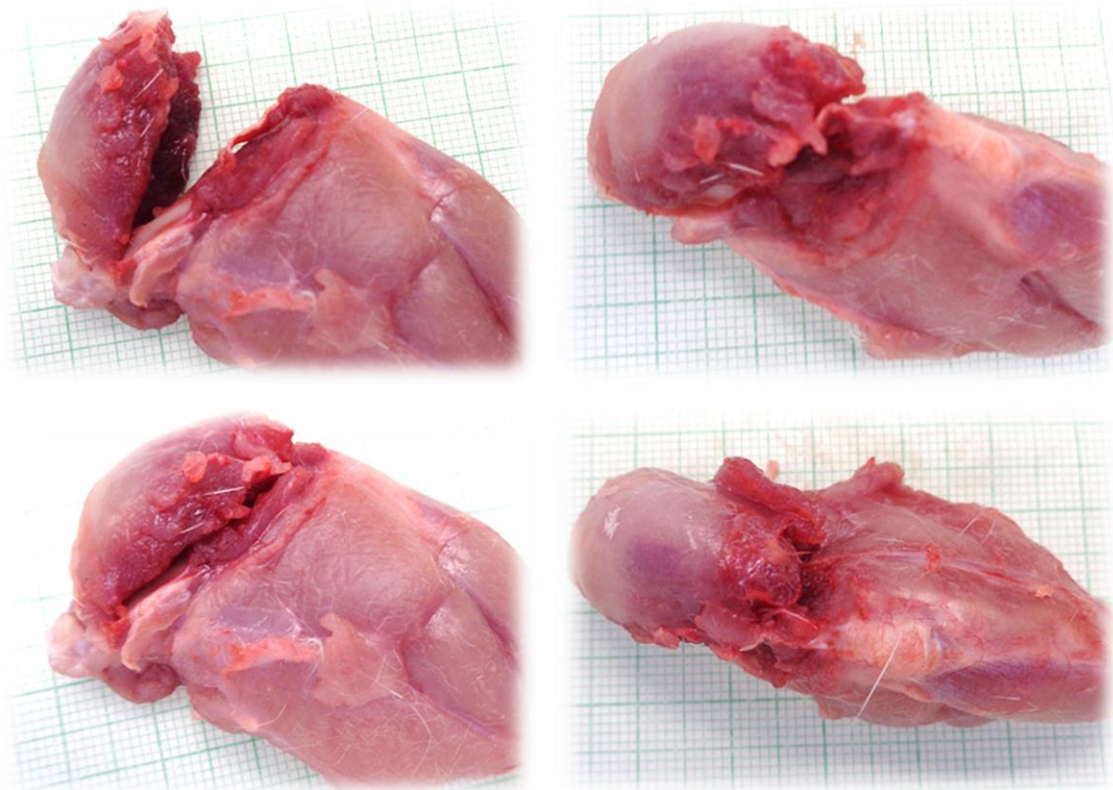
Za anesteziju eksperimentalnih životinja upotrijebljen je sodium thiopental u dozi od 50 mg/kg (Thiopental, Intresa, Freiburg Njemačka) i diazepam u dozi od 6 mg/kg tjelesne težine (Normabel, Belupo, Ludbreg, Hrvatska). Oba lijeka aplicirana su intraperitonealno, nakon čega su životinje vraćane u kavez dok se ne postigne anestezija. Operaciji se pristupalo kada je životinja bila potpuno uspavana tj. nije postojala reakcija na dodir kapaka, disanje joj je bilo duboko, a tijelo mlohavo. Tako pripremljenu životinju postavljalo se u supinacijski položaj na operativni stolić gdje su gumene trake nategnute preko ekstremiteta osiguravale stabilan položaj za operativni postupak.

U maksimalno mogućim aseptičkim uvjetima pristupalo se operaciji (Slika 1.). Koristio se klasičan kirurški instrumentarij steriliziran prije svakog postupka. Operacija se odvijala tako da se svakoj pojedinoj životinji pristupalo samo na stražnju desnu nogu. Nad koljenim zglobovom s ventralne strane učinila se uzdužna rezna rana kože i potkože dužine 2cm te se pristupalo na natkoljenu muskulaturu. Na tom dijelu tijela muskulatura je pristupačna te se već uz fleksiju koljena i nakon spontane retrakcije rubova rane, lako prikazivo četveroglavi mišić natkoljenice (*m.quadriceps femoris*) koji je bio objekt našeg eksperimenta. Nakon uzdužnog razdvajanja mišićne fasije pažljivom tupom disekcijom odvojila su se tetivna vlakna od mišićnih niti pazeći pri tome da se ne ošteti tetivno-koštani spoj na pateli kao niti mišićno-koštani spoj na femuru. Tim postupkom nije se učinila transekcija mišića već su se tetivne niti makroskopski vidljivim dijelom potpuno izdvojile iz mišića (Slika 1.2). Pri tome je jasno bilo uočljivo kako tetivne niti duboko ulaze u trbuh mišića i po odvajanju činile su lepezastu formaciju (Slika 1.3). Ona je svojim uskim dijelom širine u prosjeku 3mm vezana za patelu i time tvori tetivu četveroglavog mišića, a širokim slobodnim trokutastim dijelom dužine u prosjeku 15mm ( 12-20mm) i širine prosječno 11mm ( 8-13mm) u najširem dijelu tvorila MTS. Jasno je bila vidljiva velika površina tog spoja koja je, ukoliko se oduzme kranji

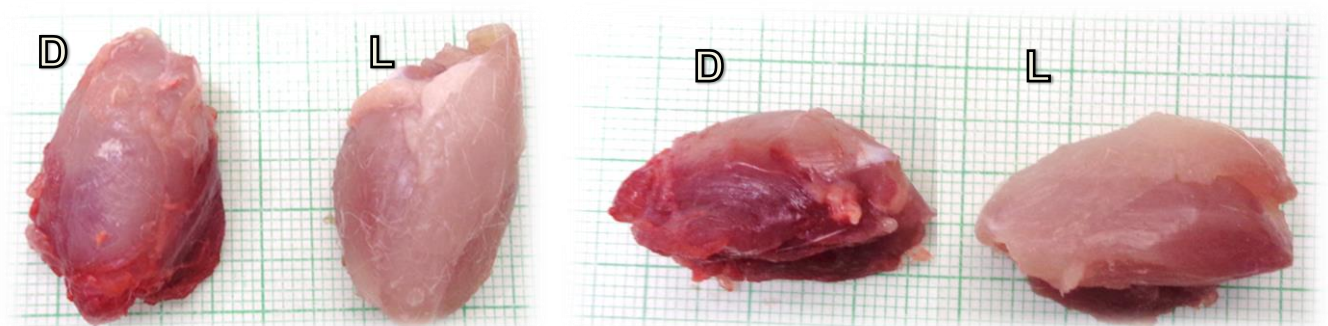
distalni dio čistih tetivnih niti u prosjeku iznosila 150 mm<sup>2</sup> (135-170 mm<sup>2</sup>). Po odvajanju krajevi tetive i mišića su se postaviti u anatomsku poziciju, ali se nisu fiksirali (Slika 1.4). Na kraju rana se zatvorila u jednom sloju produžnim, sporo resorptivnim šavom (PDS 3-0, Ethicon Inc., Johnson and Johnson, Somerville, SAD). Trajanje kirurškog zahvata je iznosilo u prosjeku 9 minuta (8-10,5min).



**Slika 1.** Operativni postupak: **1.1)** Operativni rez nad ventralnom stranom natkoljenice. Vidljiva natkoljena muskulatura i koljeno. **1.2)** Disekcija tetivnih vlakana iz mišića. **1.3)** Tetivne niti duboko ulaze u trbuh mišića i tvore lepezastu formaciju. **1.4)** Krajevi tetive i mišića postavljeni u anatomsku poziciju bez međusobne fiksacije.



**Slika 2.** Preparat detaljnije prikazuje desnu natkoljenicu operirane životinje. Jasno se vidi mjesto mišićno tetivne disekcije. Po odvajanju krajevi tetive i mišića nisu bili fiksirani te su bili podložni spontanoj retrakciji uslijed kretanja životinja.



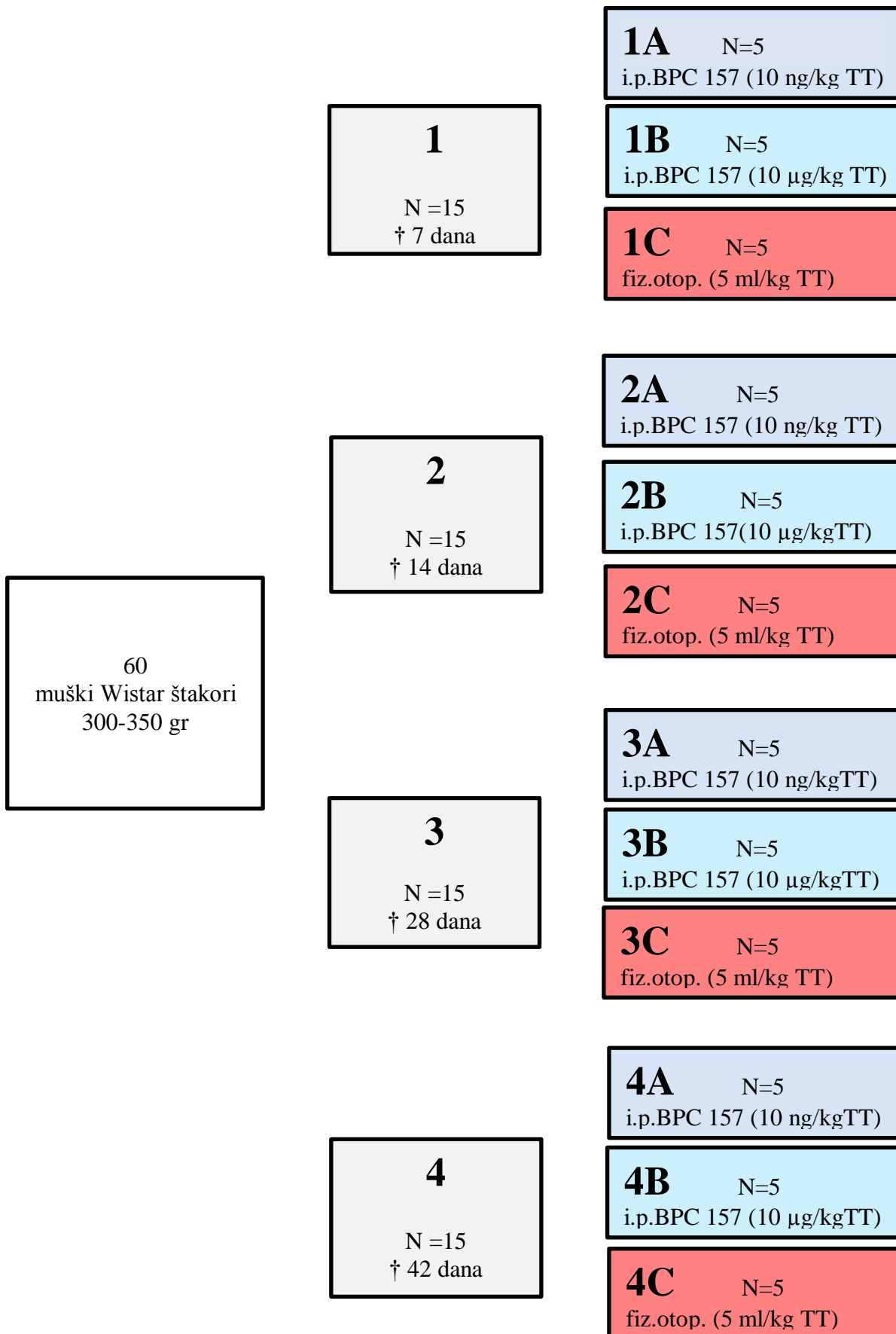
**Slika 3.** Prikazuje četveroglave mišiće desne (D) i lijeve (L) natkoljenice životinje žrtvovane odmah po operaciji. Na mišiću desne natkoljenice prije odstranjenja učinjena je mišićno-tetivna disekcija po ranije opisanom protokolu. Jasno je vidljiva istovjetna širina odnosno veličina oba mišića.

### 3.2. Postoperativni postupak i primjena pentadekapeptida BPC 157

Istraživanje je sadržavalo četiri serije pokusa zavisno o različitim dužinama promatranja s ukupno 60 životinja (Slika 4.). Svaka serija pokusa sadržavala je 15 životinja koje su bile operirane u cjelini tokom jednog dana. Razdoblje između izvršenja pojedinih serija nije bilo vremenski uvjetovano.

Nakon svake serije operacija, metodom slučajnog izbora, 15 operiranih eksperimentalnih životinja podijeljeno je u tri skupine od po 5 jedinki. Kao ispitivana supstanca koristio se pentadekapeptid BPC 157 bez nosača ili inhibitora peptidaze otopljen u fiziološkoj otopini. (Peptid je proizveden u Diagen, Ljubljana, Slovenija, GEPPPGKPADDAGLV, M.W.1419, a fiziološka otopina u Pliva, Zagreb). Odmah po učinjenom kirurškom zahvatu prva skupina životinja dobila je intraperitonealnom primjenom (i.p.) pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 ng/kg TT (nBPC 157), što se potom ponavljalo, i to na isti način i u istoj dozi svaka 24 sata do žrtvovanja koje se činiti zavisno o protokolu istraživanja. Na isti način druga skupina dobivala je BPC 157 u dozi od 10 µg/kg TT (µBPC 157), a treća skupina fiziološku otopinu 5ml/kg TT (KONT)

U svrhu postoperativne analgezije životinje su bile tretirane buprenorfinom 0,5mg/kg svakih 12h *per os*. Tokom istraživanja radile su se funkcionalne procjene, a po žrtvovanju biomehanička ispitivanja te makroskopska i histološka analiza. Žrtvovanje se učinilo po serijama 7, 14, 28 i 42. postoperativnog dana predoziranje anestheticima (dvostruke doze Ketamine-HCl+ Xylazine-HCl i.p.). Uzimale su se obje stražnje noge kirurški odvojene u kuku te odstranjene kože i potkože. Po makroskopskoj dokumentaciji (snimanje digitalnim fotoaparatom) nasumičnim odabirom po skupini 2/5 preparata koristilo se se za biomehanička istraživanja, a 3/5 za histološku analizu.



**Slika 4.** Shematski prikaz istraživačkog postupka.  
†-žrtvovanje

### 3.3. Funkcionalna testiranja

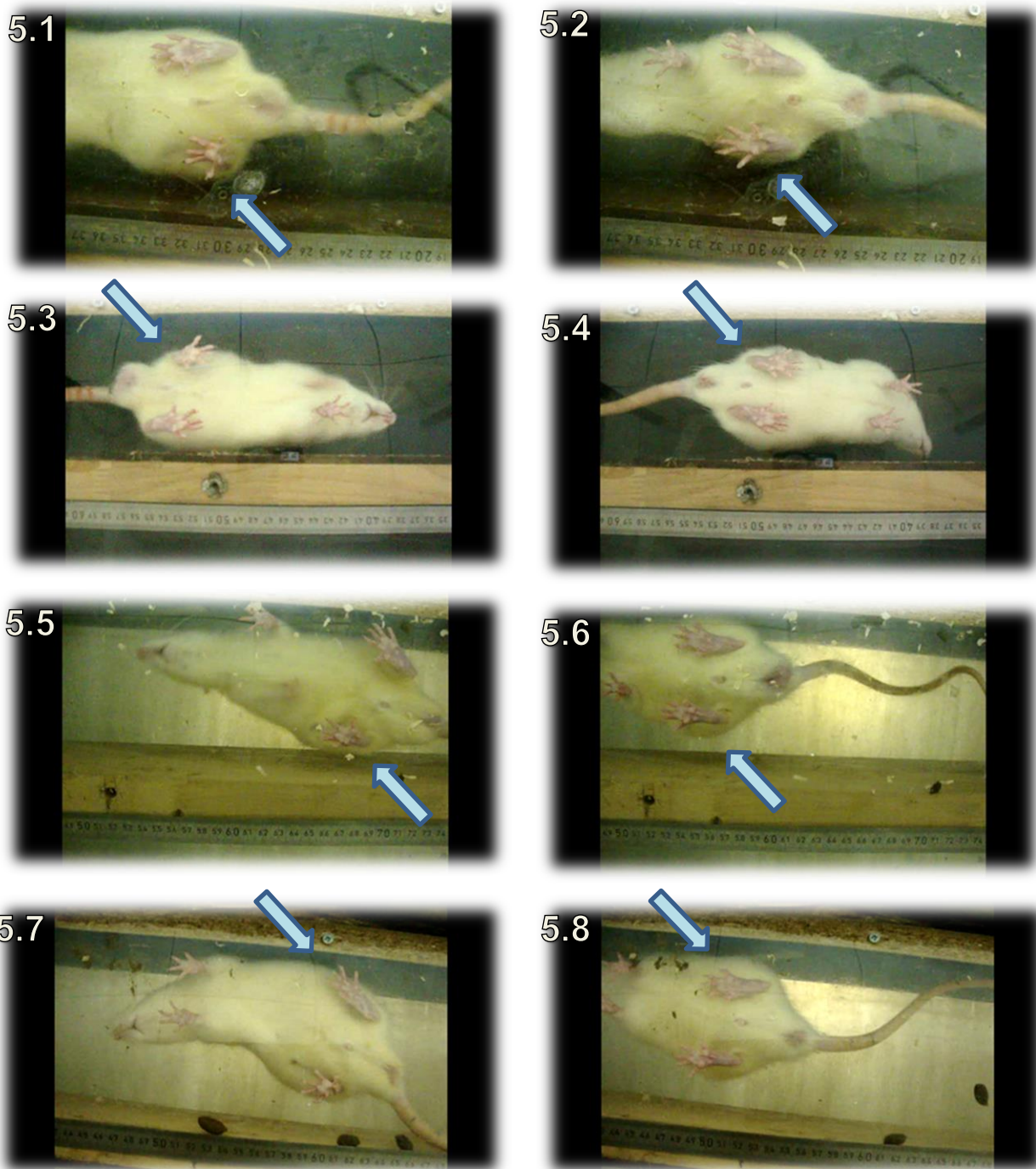
Funkcionalna testiranja provodila su se redom 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 i 42. dana odnosno kraće u skupinama koje su ranije žrtvovane. Ona su se sastojala od: testa mišićne snage donjih ekstremiteta (motor function index- MFI) opisanog od strane Thalhammer i sur (89), indeksa oporavka hoda i dužine otiska stopala bilježenih s digitalnom kamerom (74) i procjene kontarktore noge (90).

Test mišićne snage donjih ekstremiteta (MFI) vršio se pritiskom obje stražnje noge životinje pojedinačno na preciznu digitalnu vagu s 0,1g točnosti. Za točno mjerenje nužno je bilo postaviti ispitivanu životinju u pravilan položaj. Jednom rukom uspravno se držalo tijelo te bi se ekstenzirane stražnje noge prislanjale na vagu. U trenutku kontakta stopala s mjernom površinom vage štakor se spontano odgurivao od plohe uporabljajući silu ekstenzornih mišića potkoljenice. Rezultat toga pritiska očitavao se u obliku mase na skali vage. Test se izvodio tri puta za svaku stražnju nožicu, a bilježila se srednja vrijednost. Dvije vrijednosti koje označuju pritisak neoperirane (NEPT) i pritisak operirane (EEPT) noge uvrstile su se u formulu na način  $EPT=(NEPT-EEPT)/NEPT$ . Rezultat se kretao između 0 i 1 gdje je deficit funkcije manji, odnosno rezultat bolji što je vrijednost bila bliže nuli.

Naredni test bio je indeks oporavka hoda. Provodio se na hodnoj pruži tj. prozirnom tunelu dužine 1m i širine 10cm. Ispod staze bila je postavljena digitalna kamera koja je bilježila kretanje životinje (Slka 5.). Prema ranije određenoj ljestvici koju su opisali Starešinić i sur. (74) hod je klasificiran brojevima od 1 do 4, gdje broj 1 označava normalan hod, optimalne brzine i usklađenih pokreta, broj 2 usporen, ali normalan hod, broj 3 teturav hod sa zanašanjem i padovima i broj 4 životinje koje ne mogu hodati, niti se osoviti na stražnje noge. Hod se analizirao na temelju videozapisa, a provodio ga je objektivni promatrač koji nije imao saznanja kojoj skupini pripada ispitivana životinja. Također pomoću snimaka utvrđivali su se otisci, tj. dužina stopala prilikom oslanjanja životinje na podlogu. Mjerila se dužina između najisturenijeg prsta i kranje stražnje strane tabana na koju se životinja oslanjala, a rezultat je činio razliku između zdrave i operirane noge (Slika 5.).

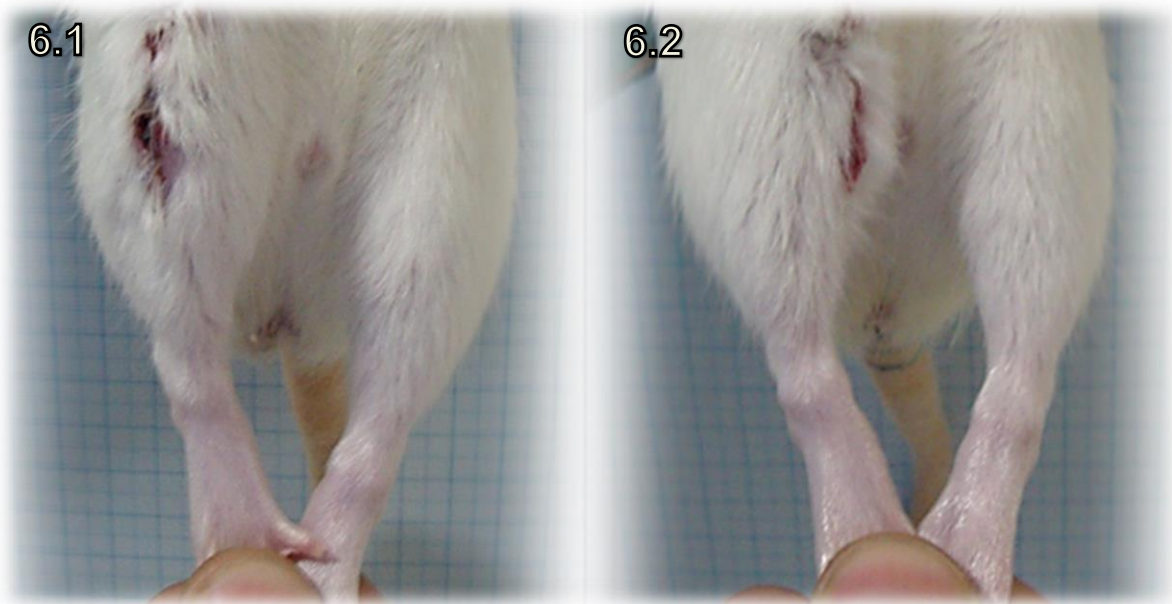
Nadalje, funkcionalna testiranja sastojala su se i od mjerenja kontraktore noge (Slika 6.). Usljed različitog cijeljenja mišićno-tetivnog spoja i posljedične (ne)upotrebe noge, dolazilo je do razvoja kontraktore. Ista se mjerila na način da su dva nezavisna promatrača zajedno vršila testiranje. Ono se vršilo tako da je prvi ispitivač jednom rukom uspravno držao tijelo životinje, a drugom istovremeno ekstenzirao obje stražnje noge. Drugi je ispitivač milimetarskim mjerilom mjerio razliku koja je nastajala između referentnih točaka tj. patele obje noge.





**Slika 5.** Prolazak životinje bilježen video kamerom na hodnoj pruzi. Na osnovu videozapisa analizirao se i kvalificirao hod te otisci pri oslanjanju obje stražnje noge na podlogu. Mjerena je dužina između najjisturenijeg prsta i kranje stražnje strane tabana na koju se životinja oslanjala, a rezultat je činio razliku između zdrave i operirane noge. Operirana, stražnja desna noga označena je plavobijelom strelicom. **Slika 5.1, 5.3, 5.5, 5.7** prikazuje skupinu 3C (kontrola) gledanu redom 5, 10, 21 i 28. dana . Jasno je vidljivo da je otisak operirane, stražnje desne, noge značajno manji nego zdrave, stražnje lijeve, noge. Životinja se oslanja

samo na prste dok je peta u zraku. **Slika 5.2, 5.4, 5.6, 5.8** prikazuju skupinu 3A (nBPC 157) gledanu redom 5,10, 21 i 28. dana. Vidimo znatno duži otisak operirane, desne noge u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 6.** Test procjene kontrakture noge. Mjerila se razlika između patela obje noge. Primjer: testiranje provedeno 7. postoperativnog dana u seriji 1. životinja **Slika 6.1** prikazuje kontrolnu skupinu (1C), **Slika 6.2** prikazuje  $\mu$ BPC 157 tretiranu skupinu (1B). Vidljiva izrazito kraća noga, tj. kontraktura operirane noge u kontrolnoj skupini za razliku od gotovo jednakih nogu u životinje tretirane BPC 157 u dozi od 10  $\mu$ g/kg TT.

### **3.4. Makroskopska i patohistološka analiza**

Makroskopska procjena vršila se nakon žrtvovanja životinja. Promatrane su 4 serije životinja od po 15 jedinki te su žrtvovana redom 7, 14, 28. i 42. dana. Promatrala se obje stražnje noge koje su bile prethodno odvojene u zglobu kuka. Analizirale su se razlike operirane i neoperirane natkoljenice (Slika 7.) i to relativna atrofija mišića mjereći debljinu kvadricepsa pomičnom mjerkom 2 cm proksimalno od patele. Dobivena mjera uspoređivala se sa širinom mišića na kontralateralnom ekstremitetu, a dobivena razlika se uzimala za statističku analizu. Veličina defekta nastalog na mjestu razdvajanja tetivnih od mišićnih niti dobivala se obradom slike preparata u laterolateralnom namještaju u semifleksiji s AutoCAD programom i njegovom opcijom za izracunavanje površina nepravilnih tijela (AutoCAD 2016 for Windows by Autodesk). Vrijednost površine koristila se za statističke analize.

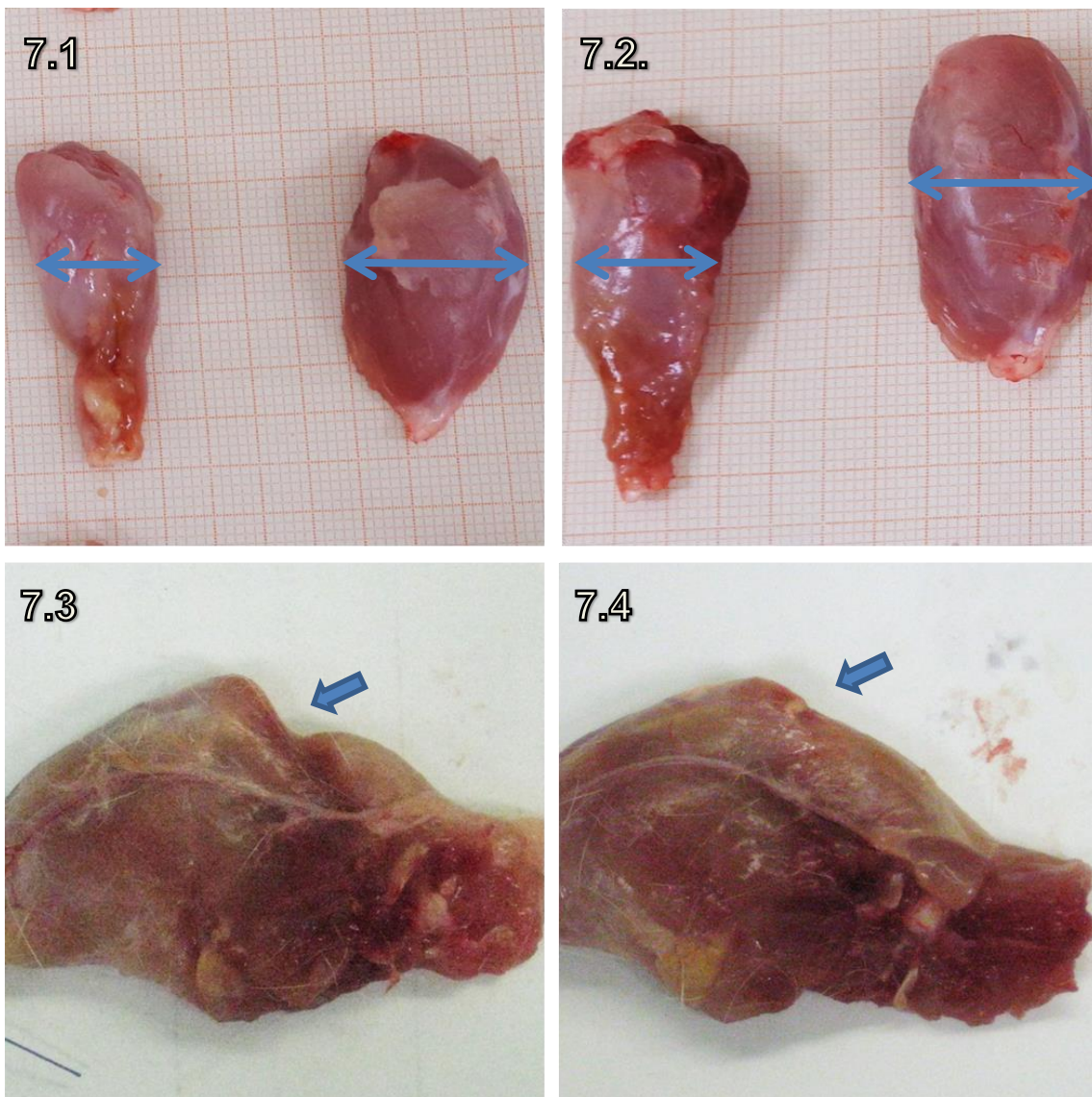
Nakon makroskopske procjene preparata, kretalo se s pripremom preparata za patohistološku analizu. Ona je bila provedena od strane nepristranih stručnjaka Zavodu za patologiju MEF-a. Slučajnim odabirom u svakoj seriji ispitivanja odabiralo se po 3 životinje iz svake skupine, tako da je postojalo 9 preparata uzetih s operiranih ekstermiteta. Zdrava noga nije ulazala u analizu. Preparat se pripremio tako da se četveroglavi mišić precizno odvojio od koštanih hvatišta. Uzorci tkiva fiksirani su u 10% puferiranoj otopini formaldehida, dehidrirani i uklopljeni u parafinske blokove. Uzoci su obojeni hemalaun-eozinom (HE). Patohistološka analiza učinjena je na mikroskopu tipa Olympus BX51, a slike su slikane kamerom Olympus DP71. Analizirane su promjene na mjestu mišićno-tetivne disekcije.

### **3.5. Biomehanička testiranja**

Biomehanička svojstva u vidu izdržljivosti na istezanje vršila su se na vlastitom aparatu Lineomat (MLW Medizinische Geräte, Chemnitz, Germany) koji može mjeriti istezanje s preciznošću od 0,01mm. Snaga istezanja nije se mjerila. Nakon makroskopske analize i nasumičnog odvajanja 3/5 preparata za histološku analizu, preostala 2/5 preparata odnosno 6 preparata po seriji bila su biomehanički testirana. Također testiranja su izvršena i s njihovim kontralateralnim, zdravim ekstremitetom, a podaci su međusobno uspoređeni. Ranije studije pokazale su da je izuzetno važan integritet mišića kako za njegovu čvrstoću i otpor na pasivno

istezanje tako i za njegovu aktivnu funkciju. Transekcijom ili rupturom gubi se pravilan odnos između mišićnih vlakana, tetive i okolnog vezivnog tkiva što rezultira smanjenom kontraktilnom funkcijom i smanjenom čvrstoćom odnosno povećanjem elastičnosti mišićno tetivnog aparata na pasivna istezanja (91)(92).

Nakon preciznog odvajanja mišića u cijelosti od proksimalnog i distalnog koštanog hvatišta, na oba kraja preparata šavima (#2 Fiberwire® - Arthrex U.S.) bile su formirane omče koje su služile kao prihvaćanje za fiksaciju na mjerni dio aparata. Šavi su na preparat bili fiksirani Krackow metodom (93) tako da su osiguravali dovoljno čvrsti spoj koji je ostao postojan na svim preparatima tokom ispitivanja. Bilježila se dužina istezanja do pucanja preparata kao i samo mjesto na kojem je nastao prekid.



**Slika 7.** U procjeni atrofije promatrali su se istovremeno mišići obje stražnje noge. Mjerila se debljina kvadricepsa 2 cm proksimalno od patele. Dobivena mjera uspoređivala se sa širinom mišića na kontralateralnom ekstremitetu **Slika 7.1** pokazuje četveroglave mišiće kontrolne skupine (2C) žrtvovane 14. dana pri čemu se vidi atrofija lijevog tj. operiranog mišića u odnosu na kontralateralni par. **Slika 7.2** pokazuje mišiće nBPC 157 skupine (2A) žrtvovane 14. dana gdje se također zamjećuje atrofija operiranog mišića, ali manja nego kod kontrolne skupine. **Slika 7.3** prikazuje nastali defekta na mjestu razdvajanja mišićno tetivne sveze kod kontrolne skupine (3C) žrtvovane 28. dana, dok na **Slici 7.4** vidimo dobro formirano tkivo na mjestu razdvajanja MTS kod nBPC 157 skupine (3A) žrtvovane 28. dana. Veličina defekta nastalog na mjestu razdvajanja tetivnih od mišićnih niti dobivala se obradom slike preparata u laterolateralnom namještaju u semifleksiji s AutoCAD programom i njegovom opcijom za izracunavanje površina nepravilnih tijela.

### 3.6. Analiza ekspresije gena

Nakon žrtvovanja, od preparata namijenjenih patohistološkoj analizi odmah se odvajao mali uzorak tkiva koji je sadržavao tkivo mišićno-tetivnog spoja i predodredio se za analizu ekspresije gena eNOS, iNOS i COX-2. Uzorak se stavljao u mikroeprevetu koja se skladištila u prijenosni spremnik hlađen tekućim dušikom i prenosio u laboratorij.

Uzorci tkiva su homogenizirani (Tissue Ruptor, Qiagen) te dodatno obrađeni u ultrazvučnoj kupelji. Ukupna stanična ribonukleinska kiselina (RNA) iz homogenata izolirana je korištenjem TRIzol reagensa (TRIzol, Applied Biosystems) prema uputi proizvođača. U homogenat je dodano 1000 µl TRIzola te inkubirano pri sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Nakon toga dodano je 200 µl kloroforma i inkubirano pri sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Uzorci su zatim centrifugirani pri 4°C, tijekom 15 minuta na 12000 x g. Centrifugiranjem se u uzorku razdvoje tri faze: vodena faza, interfaza i organska faza. U vodenoj fazi, koja je najpovršnija, nalazi se RNA te se ta faza prebaci u čistu mikroeprevetu. Kako bi bile precipitirane ukupne ribonukleinske kiseline u uzorak je dodano 500 µl 100%-tnog izopropanola. Ovu smjesu je važno dobro promiješati, nakon čega se inkubira pri sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani pri 4°C tijekom 10 minuta pri brzini od 12000×g. Nakon centrifugiranja RNA je ostala u talogu na dnu epruvete. Dobiveni talog RNA ispran je s 1000 µl 75%-tnog etanola, kratko promiješan i centrifugiran pri 4°C na 7500 x g tijekom 5 minuta. Nakon odlijevanja supernatanta, mikroepreveta je ostavljena otvorenom 5-10 min, kako bi zaostali etanol ishlapio. Talog RNA je naposljetku otopljen u 30 µl sterilne vode i pohranjen pri -80°C.

Koncentracija RNA mjerena je spektrofotometrom (BioSpec-Nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu).

**Tablica 1.** Nukleotidne sekvence korištenih početnica

Gen	Početnice	Umnoženi odsječak (pb)	GenBank pristupni broj
GAPDH	F: TGGCAAGTTCAACGGCACAGT	193	XM_221353
	R: TTTGGCCTCACCTTCAGGT		
eNOS	CTGGCAAGACCGATTACACGA	206	NM_021838
	TCAGGAGGTCTTGCACATAGG		
COX-2	TCAGGAGGTCTTGCACATAGG	157	AF233596
	CTGTATCCCGCCCTGCTGGTG		

**Tablica 2.** Kemikalije i enzimi za izvođenje RT-PCR reakcije

KEMIKALIJE I ENZIMI ZA IZVOĐENJE RT-PCR REAKCIJE
10×Taq pufer: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3 pri 25°C), 15 mM MgCl <sub>2</sub>
Taq DNA polimeraza (Promega)
inhibitor RNaza (Roche)
mM DTT (Invitrogen)
5×RT pufer: 250 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 30 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM ditiotreitola (DTT); pH 8.3 pri 37°C (Invitrogen)
SuperScript reverzna transkriptaza (Invitrogen)
mješavina PCR nukleotida: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP (Roche)
(N) <sub>6</sub> početnice (Roche)
početnice (Invitrogen)

**Tablica 3.** Puferi za elektroforezu DNA u gelu agaroze

PUFERI ZA ELEKTROFOREZU DNA U GELU AGAROZE
pufer za elektroforezu (1×TAE): 40 mM tris-acetat, 1 mM EDTA (pH 8.0)
pufer za nanošenje (6×): 0.05 % (w/v) bromfenol modrilo, 40 % (w/v) saharoza, 0.1 M EDTA, 0.5 % (w/v) SDS; pH 8.0

Reakcija reverzne transkripcije je enzimatska metoda kojom se informacija sadržana u RNA prevodi pomoću enzima reverzne transkriptaze u informaciju na razini komplementarne DNA (cDNA), a odvija se u dva koraka. Reakcija počinje vezivanjem početnica na lanac RNA, nakon čega se na lanac veže enzim reverzna transkriptaza i sintetizira prvi lanac cDNA. Drugi lanac cDNA sintetizira se pomoću Taq DNA polimeraze za vrijeme prvog ciklusa PCR reakcije. Kao početnice korištene su smjesa heksanukleotida koji prepoznaju različite sekvence unutar molekula RNA. Tako dobivena populacija cDNA različitih je duljina i podrijetla različitih molekula RNA (ribosomska, transportna, glasnička i mala nuklearna RNA).

Uzorak koji je sadržavao ukupnu staničnu RNA, heksanukleotidne početnice i 20 U inhibitora RNaze ( $V=12 \mu\text{l}$ ) inkubiran je 5 minuta pri  $65^{\circ}\text{C}$  kako bi bile denaturirane sekundarne strukture i omogućeno slobodno vezanje početnica. Nakon dodatka preostalih komponenti (pufer, DTT, 20 U inhibitora RNaze) i preinkubacije u trajanju od 2 minute pri  $25^{\circ}\text{C}$  dodatkom reverzne transkriptaze SuperScript II počinje sama reakcija transkripcije. Ona se odvija pri  $25^{\circ}\text{C}$  tijekom 10 minuta da bi se omogućilo vezivanje početnica, a zatim se pri temperaturi od  $42^{\circ}\text{C}$  tijekom 50 minuta odvija sinteza DNA lanca. Zagrijavanjem uzorka ( $70^{\circ}\text{C}$  kroz 15 minuta) inaktivira se enzim reverzna transkriptaza i prekida reakcija. Dobivena cDNA ( $V=20 \mu\text{l}$ ) za izvođenje lančane reakcije polimerazom bila je razrijeđena 10 puta s ultra-čistom vodom (razrjeđenje 1:10) i stavljena na čuvanje pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Tablica 4.** Sastojci za reakciju reverzne transkripcije

SASTOJCI ZA REAKCIJU REVERZNE TRANSKRIPCIJE	KONAČNA KONCENTRACIJA
ukupna stanična RNA	1 µg
5×reakcijski pufer	1×
dNTP mješavina	1 mM
(N) <sub>6</sub> početnice	2.5 µl
inhibitor RNAze	40 U
reverzna transkriptaza	200 U
DTT	10 mM
	ukupni volumen 20 µl

Pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) *in vitro* umnažamo cDNA dobivenu reverznom transkripcijom. Reakcija uključuje tri osnovna koraka: denaturaciju dvolančane DNA, vezivanje početnica na razdvojene lance DNA i njihovu elongaciju na principu komplementarnosti baza. Početnice se vežu na suprotne lance DNA, a orijentirane su tako da se DNA sinteza odvija u regiji između njih. Specifičnost reakcije ovisi o odabiru početnica. Poželjna su svojstva početnica: duljina 15-30 nukleotida, sadržaj G-C baza ~50 %, sekvenca bez uzastopnog ponavljanja 3C ili 3G baze, bez sadržavanja sekundarne strukture kao i da početnice nisu međusobno komplementarne, posebice na 3'-kraju. Temperatura pri kojoj se početnice vežu na razdvojene lance (eng. *annealing temperature*) treba biti slična za sve početnice, jer je važna za uspješnost same PCR reakcije, jednako kao i izbor početnica. Temperatura vezivanja početnica ovisi o temperaturi mekšanja (engl. *melting temperature*); temperatura pri kojoj je 50 % početnica i komplementarne sekvence u formi dupleksa koja se izračuna iz veličine i sastava baza svake početnice. Niti preniska (pojava nespecifičnog vezanja) niti previsoka temperatura (ne dolazi do umnažanja specifičnog fragmenta) nisu dobre za vezivanje početnica na razdvojene lance.

**Tablica 5.** Sastojci za lančanu reakciju polimerazom (PCR)

SASTOJCI LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM	
OTOPINA A	
cDNA	2 $\mu$ l; razrjeđenje 1:5 iz RT reakcije
mješavina dNTP-a	200 $\mu$ l
"forward" početnica	0.2 $\mu$ l
"reverse" početnica	0.2 $\mu$ l
Q H <sub>2</sub> O	do volumena 10 $\mu$ l
OTOPINA B	
10 $\times$ Taq pufer 1 $\times$ (uključen 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> )	
Tag DNA polimeraza	1 U
Q H <sub>2</sub> O	do volumena 10 $\mu$ l
	Ukupni volumen: 20 $\mu$ l

Semikvantitativna RT-PCR metoda korištena je za usporedbu ekspresije eNOS i COX 2 mRNA između kontrolne i tretiranih skupina životinja, tako da smo promjene u ekspresiji mRNA navedenih gena normalizirali na promjene u ekspresiji mRNA za GAPDH koji nam je poslužio kao interni standard .

Sama reakcija RT-PCR podložna je varijacijama, prije svega u odnosu na razlike u kvaliteti i količini RNA između pojedinih uzoraka, ali i na učinkovitost transkripcije RNA u cDNA. Kad se uzme u obzir eksponencijalna priroda PCR-a, čak i male razlike među uzorcima mogu stvoriti velike razlike u konačnom iskorištenju DNA što se korigira i

kontrolira normaliziranjem podataka s ekspresijom internih standarda, pri čemu se najčešće koriste *house keeping* geni. Temeljem probnih eksperimenata na svim skupinama (kontrolnoj i tretiranoj) provjerili smo razinu ekspresije mRNA za HPRT1 i GAPDH te smo odabrali GAPDH. Ovakvom korekcijom ispravljaju se i varijacije nastale spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije RNA, nanošenjem i kvalitetom RNA (94).

Tijekom lančane reakcije polimerazom reakcijski produkti se akumuliraju brzinom koja je ovisna o efikasnosti umnažanja. Linearna faza reakcije definira se kao period u kojem je učinkovitost umnažanja maksimalna i konstantna kroz više uzastopnih ciklusa. Kada krene smanjenje učinkovitosti umnažanja, brzina nakupljanja produkta ulazi u fazu platoa. Linearna faza se određuje tako da se maksimalna optička gustoća uzoraka dobivenih iz nekoliko uzastopnih PCR ciklusa grafički prikaže u ovisnosti o broju ciklusa. Da bi semikvantitativna RT-PCR pokazala stvarne razlike u ekspresiji gena, a ne razlike nastale zbog različite učinkovitosti umnažanja, produkti reakcije specifičnih i kontrolnih gena se trebaju uspoređivati unutar linearne faze lančane reakcije polimerazom.

Nakon što je za odabrane gene određena linearnu fazu lančane reakcije polimerazom, za svaki gen su odabrana dva uzastopna ciklusa iz sredine linearnog dijela reakcije te su produkti umnažani kroz tako određen broj ciklusa. Budući da se napredovanjem reakcije početnice i dNTP nukleotidi iskorištavaju i da broj kalupa nadmašuje dostupnu polimerazu, sinteza DNA postaje manje učinkovita. Da bi povećali iskorištenje, napravljena je završna ekstenzija lanca (72°C tijekom 7 minuta) kako bi bilo omogućeno dovršavanje eventualno nepotpune sinteze.

Uzorci su nakon izvođenja lančane reakcije polimerazom razdvojeni horizontalnom elektroforezom u 1.5 %-tnom gelu agaroze u  $1\times$ TAE puferu, kroz 30 minuta uz napon od 85 V. Naime, molekule DNA su negativno nabijene i u električnom polju putuju prema pozitivnoj elektrodi čime se razdvajaju, ovisno o veličini i konformaciji molekule. Nakon elektroforeze gel je bojan 30 minuta otopinom etidij-bromida (0.5  $\mu$ g/ml) kako bi se obojale razdvojene odsječke DNA te potom bile isprane u destiliranoj vodi. Uzorci su vizualizirani pomoću UV-transluminatora (Pharmacia Biotech-Image Master), a maksimalna optička gustoća DNA vrpca za iNOS, eNOS i COX 2 gene i referentni GAPDH određena je pomoću programa Image Master VDS.

### 3.7. Mjerenje razine lipidne peroksidacije u tkivu

Razina lipidne peroksidacije (LPO) u tkivu je određena mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) (95) i to uglavnom malondialdehida (MDA). Uzorak tkiva je homogeniziran (u 0.05%-tnom butiliranom hidroksitoluenu) koristeći Tissue Ruptor (Qiagen) te ultrazvučnu kupelj. Dobivenom homogenatu tkiva dodana je 10%-tna trikloroetena kiselina te je smjesa inkubirana na ledu tijekom 15 minuta kako bi precipitali proteine. Nakon centrifugiranja ( $2200 \times g$ , 15 min) preselili smo 200  $\mu$ L homogenata te dodali 0.67%-tnu tiobarbiturnu kiselinu. Reakcijsku smjesu smo inkubirali tijekom 60 min u vodenoj kupelji pri 95 °C, nakon čega smo reakciju zaustavili hlađenjem (10-15 min na ledu). Nakon centrifugiranja ( $10000 \times g$ , 10 min) supernatantu smo izmjerili apsorbanciju pri 532 nm. Standardna krivulja je napravljena serijskim razrjeđenjem 1,1,3,3-tetrametoksipropana

### 3.8. Određivanje razine nitrit oksida u tkivu

Razina NO u tkivu je određena mjerenjem razine nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) klasičnom kolorimetrijskom reakcijom po Grissu (96). Naime, nitrit oksid je važan sekundarni glasnik i efektorna molekula te se reakcija u kojoj se određuje njegova razina temelji na diazotizaciji odnosno djelovanju sulfanilamida i N-1-naftiletilediamin dihidroklorida u kiselim uvjetima. Nakon homogenizacije tkiva u izotoničkoj otopini PS-a s dodanim 10 mM N-etilmaleimidom i 2.5 mM EDTA, u homogenizirano tkivo je dodan jednak volumen sulfanilamida (50  $\mu$ L). Nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, zaštićeno od svjetlosti, u inkubacijsku smjesu smo dodali N-1-naftiletilediamin dihidroklorid (50  $\mu$ L). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju 30 minuta mjerili smo apsorbanciju pri 532 nm (MicroPlate reader, Amersham). Standardna krivulja je napravljena korištenjem nitritnog standarda (Griess Reagent System, Promega)

## 4. REZULTATI

### 4.1. Statistička analiza

Analiza podataka i njihova statistička evaluacija učinjena je od strane statističkog tima. Za odabir odgovarajuće metode podaci su inicijalno prošli Kolmogorov-Smirnoff test za procjenu distribucije podataka. U slučaju normalne distribucije bio je primjenjen one-way ANOVA test sa Tukey HSD post hoc testom, dok je u slučaju nenormalne distribucije bio primjenjen Kruskal-Wallis test s Mann-Whitney post hoc testom. Razina značajnosti bila je zadana za sve parametre  $p < 0.01$ .

### 4.2. Test mišićne snage donjih ekstremiteta

Za procjenu funkcionalnog oporavka jedan od testova bio je test mišićne snage donjih ekstremiteta tj. motor function index (MFI). Kao i ostali funkcionalni testovi provodio se redom 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28. i 42. dana, odnosno završavao je s danom žrtvovanja životinje. Kako je postojala nerealna raspodjela rezultata analiza je izvršena Kruskal–Wallisovim testom s razinom značajnosti od  $p < 0.001$  za sve osim usporedbe u 42. danu gdje je  $p < 0.01$ . Rezultati su ukazali da u svim parametrima promatranja postoji statistički značajna razlika između skupina A i B, tj. onih tretiranih BPC 157 bez obzira na primijenjenu dozu, u odnosu na C skupine tj. kontrolne skupine. Nadalje, gledajući samo A i B skupinu, među njima u svim vremenima promatranja nije postojala statistička značajna razlika.

Detaljnije gledajući dobivene vrijednosti, uočavamo da je gubitak snage najveći odmah nakon operacije sa značajno većom razlikom u kontrolnoj skupini (C). U prvom danu po operaciji prosječni indeks u skupini A i B iznose 0.25, a u C 0.64. U prijevodu to označava smanjenje pritiska operirane noge u BPC 157 skupinama za 25 % u odnosu na kontralateralnu, neoperiranu stranu, za razliku od C skupine gdje je taj gubitak 64 %. Promjena vrijednosti tj. oporavak teče kontinuirano duž cijelog praćenja i to u svim skupinama s naglaskom bržeg oporavka u prva dva tjedna, tako da su sedmog dana indeksi sljedeći: A -  $0.14 \pm 0.04$ , B -  $0.18 \pm 0.06$ , C -  $0.48 \pm 0.13$  dok su četrnaestog postoperativnog dana ostvareni sljedeći indeksi: A -  $0.08 \pm 0.03$ , B -  $0.07 \pm 0.04$ , C -  $0.42 \pm 0.11$ . U 4A i 4B skupini oni odgovaraju gotovo potpunom oporavku funkcije za razliku od kontrolne skupine

gdje također kontinuirano teče oporavak, ali do isteka promatranog periodaa kontrolne skupine postizu vrijednost indeksa tek 0.35 i sa značajnom statističkom razlikom se odnose na jednu stranu, prema kontralateralnom zdravom ekstremitetu, a s druge strane prema objema 4A i 4B skupinama.

**Tablica 6.** Test mišićne snage donjih ekstremiteta tj. motor function index - MFI. Rezultat dobiven odnosom neoperirane (NEPT) i operirane (EEPT) 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 standarnom devijacijom po danima i skupinama. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između skupina tretiranih BPC 157 naspram kontrolne skupine.

MFI					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B (μBPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
1	20	0.26±0.05	0.27±0.06	0.64±0.11	< 0.001
3	20	0.22±0.05	0.21±0.07	0.58±0.12	< 0.001
5	20	0.18±0.06	0.17±0.06	0.53±0.13	< 0.001
7	20	0.14±0.04	0.18±0.06	0.48±0.13	< 0.001
14	15	0.08±0.03	0.07±0.04	0.42±0.11	< 0.001
21	10	0.02±0.03	0.04±0.03	0.41±0.09	< 0.001
28	10	0.01±0.01	0.01±0.01	0.39±0.10	< 0.001
42	5	0.03±0.01	0.01±0.01	0.35±0.10	< 0.01

## 4.2. Indeks oporavka hoda i veličina stopala

Navedena analiza radila se na osnovu videozapisa hoda svake životinje po hodnoj pruži dužine 1m. Hod je klasificiran brojevima od 1 do 4, gdje broj 1 označava normalan hod, broj 2 usporen, ali još normalan hod, broj 3 teturav hod, a broj 4 životinje koje ne mogu hodati.

Također bilježila se i dužina otiska stražnje operirane noge prilikom oslanjanja i uspoređivala s kontralateralnom stranom. Dužina je izražena u milimetrima. Indeks oporavka hoda kroz cijelo vrijeme praćenja, rezultatim prati, ranije spomenuti, indeks motorne funkcije (MFI). Indeksi mjereni 1. dana iznose A –  $1.5 \pm 0.5$ ; B –  $1.6 \pm 0.5$  i C –  $2.9 \pm 0.6$ . Statističkom analizom (Kruskal-Wallis test) dobiva se značajna razlika ( $p < 0.001$ ) između A (nBPC 157) i C (KONT) skupina kao i B ( $\mu$ BPC 157) i C skupina dok se A i B skupina nisu međusobno statistički razlikovale. Testiranjem po protokolu narednih dana indeksi oporavka hoda se smanjuju tj. životinje „bolje“ hodaju tako da 7. dana te vrijednosti iznose A –  $1.1 \pm 0.2$ ; B –  $1.23 \pm 0.4$  i C –  $2.3 \pm 0.5$ . Ponovno se zamjećuje značajna statistička razlika ( $p < 0.001$ ) između A i C skupina kao i B i C skupina u gotovo svim točkama promatranja osim one učinjene 42. dan, dok se A i B skupina nisu statistički razlikovale. Na sljedećim testiranjima tj. 14, 21, 28 i 42. dana sve životinje u skupinama A i B (BPC 157 tretirane skupine) uredno hodaju i imaju indeks hoda 1 za razliki od životinja u skupini C (kontrolna skupina) gdje se prosječni indeks na testiranjima iza 14. dana ne spušta ispod 2. Tako posljednjeg dana testiranja indeksi iznose A –  $1.0 \pm 0.0$ ; B –  $1.0 \pm 0.0$  i C –  $2 \pm 0.0$ .

Tokom hoda zamjetili smo da operirana noga daje drugačiji otisak pri oslanjanju, nego zdrava noga. Životinja se pri hodu zdravom nogom oslanja na puno stopalo, a operiranom na prste te više ili manje srednji dio stopala. Operirana noga, napose u kontrolnim skupinama, je slabija, atrofična i u kontrakturi. Time dolazi do odizanja stražnjeg dijala stopala tako da oslonac o podlogu daju samo prsti, a sam otisak postaje kraći.

Testiranje prvog dana daje sljedeće rezultate A –  $1.4 \pm 0.5$ ; B –  $1.5 \pm 0.5$ ; C –  $3.5 \pm 0.6$ . Statističkom analizom (Kruskal-Wallis test) dobivamo značajnu razliku ( $p < 0.001$ ) između skupina A i C te B i C u većini serija, dok između A i B nije postojala statistička razlika. Jačanjem operirane noge, polako se smanjuje razlika između zdrave i operirane noge u svim skupinama, ali cijelo vrijeme testiranja ostaje značajna razlika između skupina tretiranih BPC 157 i kontrolne skupine. Tako 7. dana dobijemo rezultate A –  $1.2 \pm 0.4$ ; B –  $1.3 \pm 0.6$ ; C –  $3.1 \pm 0.7$ . Rezultati 28. dana su A –  $1.1 \pm 0.3$ ; B –  $1.0 \pm 0.4$ ; C –  $2.5 \pm 0.5$  te 42. dana A –  $0.8 \pm 0.4$ ; B –  $1.0 \pm 0.5$ ; C –  $2.4 \pm 0.5$ .

**Tablica 7.** Indeks oporavka hoda. Hod se analizirao na temelju videozapisa i kvalificiran je klasificiran od 1 do 4. Broj 1 označava normalan hod, optimalne brzine i usklađenih pokreta, broj 2 usporen, ali normalan hod, broj 3 teturav hod sa zanašanjem i padovima, te broj 4 životinje koje ne mogu hodati, niti se osoviti na stražnje noge. Rezultat čini indeks kao prosječna vrijednost sa standarnom devijacijom po danima i skupinama. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između skupina tretiranih BPC 157 naspram kontrolne skupine.

INDEKS OPORAVKA HODA					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B ( $\mu$ BPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
1.	20	1.5 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.6	< 0.001
3.	20	1.4 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.5	< 0.001
5.	20	1.3 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.5	< 0.001
7.	20	1.1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.4	< 0.001
14.	15	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.3	< 0.001
21.	10	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	< 0.001
28.	10	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	< 0.001
42.	5	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	< 0.01



**Tablica 8.** Razlika veličine otiska stopala. Mjerila se dužina između najjisturenijeg prsta i krajnje stražnje strane tabana na koju se životinja oslanjala, a rezultat je činio razliku između zdrave i operirane noge izražen u mm kao prosječna vrijednost sa standarnom devijacijom po danima i skupinama. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između BPC 157 tretiranih skupina naspram kontrolne skupine.

RAZLIKA VELIČINE OTISKA STOPALA					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B ( $\mu$ BPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
1.	20	1.4 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.6	< 0.001
3.	20	1.3 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.7	< 0.001
5.	20	1.3 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.7	< 0.001
7.	20	1.2 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.7	< 0.001
14.	15	1.2 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.6	< 0.001
21.	10	1.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.5	< 0.001
28.	10	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.5	< 0.001
42.	5	0.8 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.5	< 0.01

### 4.3. Kontraktura operiranog ekstremiteta

Nakon kirurškog zahvata razdvajanja mišićno-tetivne sveze u skupinama C (KONT) odnosno onim koje nisu dobivale pentadekapeptid BPC 157 javlja se kontraktura na operiranom koljenu i to takva da se niti pasivnim ispružanjem nogu ne može dobiti jednaka duljina operirane i neoperirane noge. Testiranjem koja su provedena 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 42. poslijeoperacijski dan i gledala se razlika između operirane, stražnje desne noge i neoperirane, stražnje lijeve noge. Na svim stanicama promatranja, vidljiva je bila statistički značajna razlika (prema Kruskal–Wallisov testu;  $p < 0.001$ ) između skupina A i C te B i C, odnosno skupina koje su dobivale BPC 157 i kontrolne skupine. Skupine A (nBPC 157) i B ( $\mu$ BPC 157) u svim serijama nisu se statistički međusobno razlikovale. Kao što smo naveli skupine A i C imale su vrlo malu ili nikakvu kontrakturu u svim točkama promatranja, za razliku od skupine C u kojoj je ona iznosila u prosjeku između  $9.5 \pm 0.8$  mm na prvom mjerenju i  $7.4 \pm 1.1$  mm na posljednjem. I na ostalim mjerenjima vidljive su gore spomenute razlike. Tako rezultati kontrakture sedmog dana iznose: A –  $0.2 \pm 0.4$ ; B –  $0.3 \pm 0.5$ ; C –  $8.4 \pm 1.3$ , a četrnaestog dana A –  $0.1 \pm 0.4$ ; B –  $0.1 \pm 0.4$ ; C –  $8.0 \pm 1.1$  te 28. dana A –  $0.0 \pm 0.0$ ; B –  $0.0 \pm 0.0$ ; C –  $7.4 \pm 1.1$

**Tablica 9.** Kontraktura operirane noge. Rezultat čini udaljenost u vertikalnoj ravnini između patela na obje stražnje noge. U isto vrijeme označava skraćenost operirane noge. Izražen je u milimetrima kao prosječna vrijednost sa standarnom devijacijom po danima i skupinama. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između skupina tretiranih BPC 157 naspram kontrolne skupine.

KONTRAKTURA					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B ( $\mu$ BPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
1.	20	0.7 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.9	9.6 $\pm$ 1.1	< 0.001
3.	20	0.6 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.7	9.4 $\pm$ 1.1	< 0.001
5.	20	0.4 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.6	8.9 $\pm$ 1.3	< 0.001
7.	20	0.2 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 1.3	< 0.001
14.	15	0.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.4	8.0 $\pm$ 1.1	< 0.001
21.	10	0.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.3	8.0 $\pm$ 1.1	< 0.001
28.	10	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	7.7 $\pm$ 1.3	< 0.001
42.	5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	7.4 $\pm$ 1.1	< 0.01

#### 4.4. Makroskopska analiza preparata

Makroskopska procjena vršila se nakon žrtvovanja životinja. Promatrane su 4 serije životinja od po 15 jedinki te su žrtvovana redom 7, 14, 28. i 42. dana. Promatrala su se obje stražnje noge koje su bile prethodno odvojene u zglobu kuka. Uspoređivala su se dva niza podataka. Atrofija natkoljene muskulature na način da se gledala razlika u širini operirane i neoperirane noge kod svake životinje te površina defekta na mjestu razdvajanja mišićno-tetivne sveze dobivene programskom obradom slike preparata u laterolateralnom namještaju.

Dobiveni podaci su imali pravilnu raspodjelu te je za analizu primjenjen one-way ANOVA test sa Tukey HSD post hoc testom.

Podaci o površini oštećenja jasno ukazuju na stvaranje tkiva na mjestu razdvojene mišićno-tetivne sveze. Da se podsjetimo, nakon kirurškog razdvajanja mišićno i tetivno tkivo nisu bili refiksirani nego su ostavljeni slobodni i na taj način podložni međusobnoj retrakciji u suprotnim smjerovima. Prema podacima jasno možemo zamijetiti kako je u skupinama A (nBPC 157) i B ( $\mu$ BPC 157) statistički značajnije ( $p < 0.01$ ) stvaranje spoja na mjestu razdvajanja mišića i tetive u odnosu na skupinu C (KONT). Skupine A i B međusobno se nisu bitnije razlikovale. Sličan rezultat vidimo u svim točkama promatranja. Također možemo zamijetiti kako se, uslijed retrakcije mišića, defekt razvio već na prvoj točki promatranja, a kasnije se u skupini C osjetno povećavao dok BPC 157 tretirane skupine su održavale veličinu defekta više, manje na istoj razini. Površina oštećenja izraženog u  $\text{mm}^2$  sedmog dana iznosila je u prosjeku A –  $9.0 \pm 4.7$ ; B –  $10.8 \pm 7.8$ ; C –  $40.0 \pm 13.3$ , a 28. dana A –  $12.8 \pm 9.6$ ; B –  $12.4 \pm 6.7$ ; C –  $60.0 \pm 18.5$ . Analizirajući podatke 14. i 42. dana možemo vidjeti kako se površina oštećenja u skupinama A i B nije znatnije mijenjala i u prosjeku je iznosila  $13.7 \text{ mm}^2$ , za razliku od skupine C gdje je zamjetno povećanje defekta sa  $40 \text{ mm}^2$  kod 1C do  $60 \text{ mm}^2$  u 3C skupini.

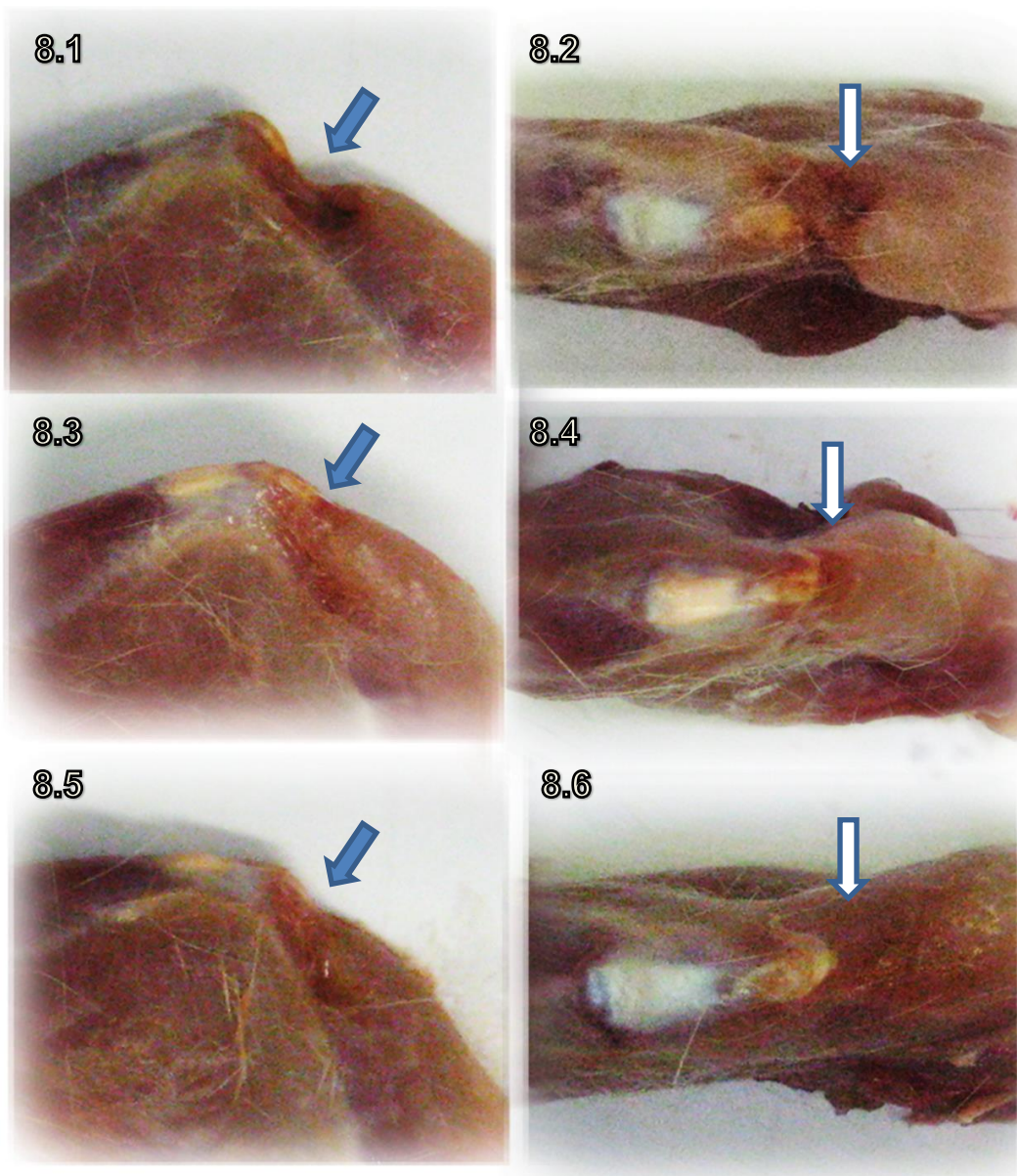
Sličnu statističku razliku ( $p < 0.01$ ) pokazuje i razlika širine desnog i lijevog mišića kvadricepsa, odnosno atrofiji operirane noge uspoređujući skupine tretirane BPC 157 (A i B) u odnosu na kontrolne skupine (C) u svim parametrima promatranja. Atrofija je vidljiva na svim operiranim mišićima već nakon mjerenja 7. dana, ali sa značajnom razlikom BPC 157 tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Skupina A i B se nisu statistički međusobno razlikovale. Mjerila se razlika operirane i neoperirane noge na istoj životinji, a rezultat je bolji što je ta razlika bila manja. Mjerenja sedmog dana dala su sljedeće rezultate: A –  $1.4 \pm 0.3$ ; B –  $1.2 \pm 0.4$ ; C –  $3.4 \pm 0.9$ . Na narednom mjerenju kod svih životinja atrofija se povećavala, ali se zadržala bitna razlika između A i B skupine prema C skupini. Analiza na daljnjem vremenskom intervalu pokazalo je daljnje povećanje obima atrofije u kontrolnoj skupini, za razliku od BPC 157 tretiranih skupina gdje su završna mjerenja pokazala čak i manje smanjenje razlike između obje stražnje noge. Tako su 28. dana rezultati sljedeći: A –  $1.7 \pm 1.2$ ; B –  $1.7 \pm 1.3$ ; C –  $4.5 \pm 1.2$ , a 42. dana: A –  $1.5 \pm 0.8$ ; B –  $1.5 \pm 0.6$ ; C –  $4.5 \pm 1.3$

**Tablica 10.** Površina defekta na laterolateralnom namještaju preparata. Rezultat izražen u mm<sup>2</sup> kao prosječna vrijednost sa standarnom devijacijom po danima i skupinama. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između skupina tretiranih BPC 157 naspram kontrolne skupine.

POVRŠINA DEFEKTA					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B ( $\mu$ BPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
7.	5	9.0 $\pm$ 4.7	10.8 $\pm$ 7.8	40.0 $\pm$ 13.3	< 0.01
14.	5	13.2 $\pm$ 5.4	14.6 $\pm$ 5.5	59.0 $\pm$ 16.2	< 0.01
28.	5	12.8 $\pm$ 9.7	12.4 $\pm$ 6.6	60.0 $\pm$ 18.5	< 0.01
42.	5	11.0 $\pm$ 6.9	10.7 $\pm$ 8.7	55.0 $\pm$ 12.0	< 0.01

**Tablica 11.** Atrofija mišića kvadricepsa. Rezultat čini razliku širine neoperiranog i operiranog mišića kvadricepsa iste životinje mjenog na preparatima 2 cm nad patelom. Izražen je u milimetrima kao prosječna vrijednost sa standarnom devijacijom po danima i skupinama. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između skupina tretiranih BPC 157 naspram kontrolne skupine.

ATROFIJA					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B ( $\mu$ BPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
7.	5	1.4 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.9	< 0.01
14.	5	2.0 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 1.3	< 0.01
28.	5	1.7 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 1.3	4.5 $\pm$ 1.2	< 0.01
42.	5	1.5 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 1.3	< 0.01

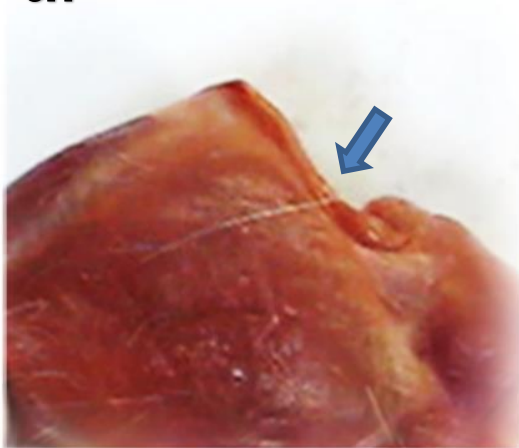


**Slika 8.** Prikaz nastalog oštećenja na mjestu razdvajanja mišićno tetivne sveze životinja žrtvovanih sedmog postoperativnog dana (serija 1). Kontrola (gornji red); BPC 157 ng (srednji red), BPC 157 µg tretman (donji red), laterolateralni prikaz u semifleksiji (lijevi stupac), anteroposteriorni prikaz (desni stupac).

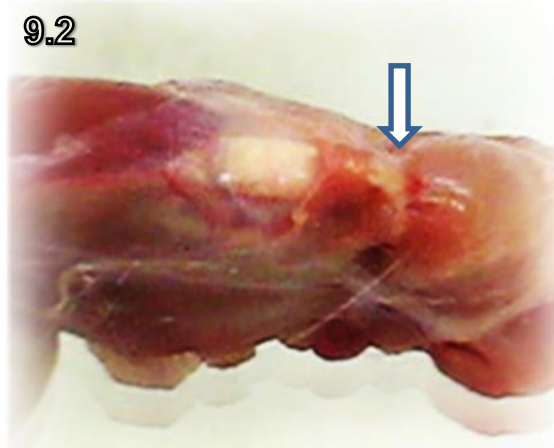
Kontrola: Na laterolateralnoj slici kontrolne skupine (**Slika 8.1**) jasno vidljivo duboko oštećenje na mjestu mišićno-tetivne disekcije (plava strelica). Poviše njega opuštenu i skraćenu tetivu četveroglavog mišića (žuta površinska struktura) na koju se dalje nastavlja patela (bijela površinska struktura) koja je spuštenu na potkoljenu. Desno od oznake vidljiv retrahirani i opuštenu mišić. Na anteroposteriornom prikazu kontrolne skupine (**Slika 8.2**) bijeloplavom strelicom označeni široki defekt koji razdvaja tetivu kvadricepsa od mišića. BPC 157. Za razliku od toga na laterolateralnim prikazima nBPC skupine (**Slika 8.3**) i µBPC skupine (**Slika 8.5**) vidljiv kontinuitet između mišića i tetive s tek manjim defektom na mjestu

disekcije (plava strelica). Obje strukture se doimaju čvrste i napete u pravilnijoj anatomskoj poziciji. Na anteroposteriornim prikazima nBPC skupine (slika 8.5) i  $\mu$ BPC skupine (slika 8.6) također vidljiva mišićno-tetivna konekcija s tek uskom i kratkom zonom defekta na mjestu ranije operativno razdvojene obje strukture (plavobijela strelica).

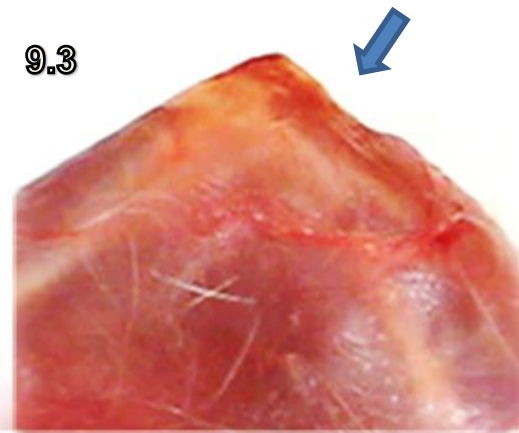
9.1



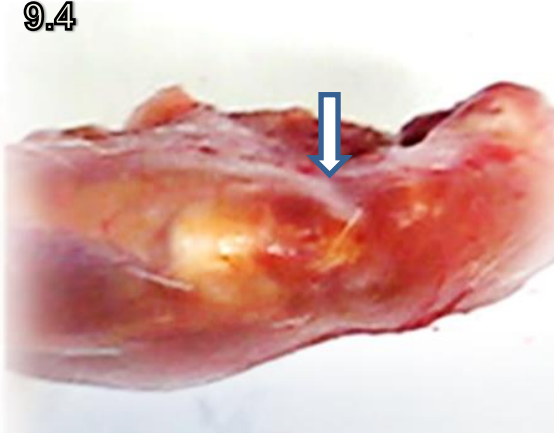
9.2



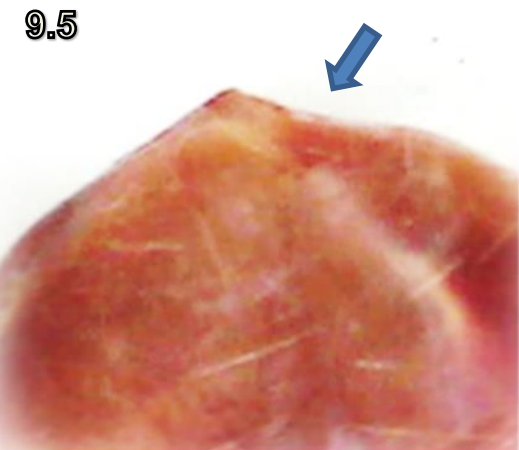
9.3



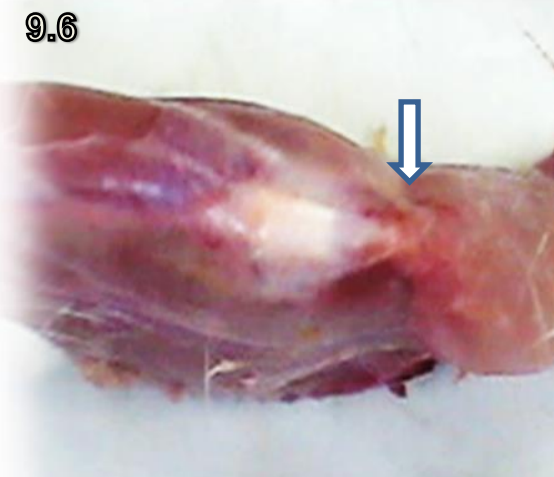
9.4



9.5



9.6

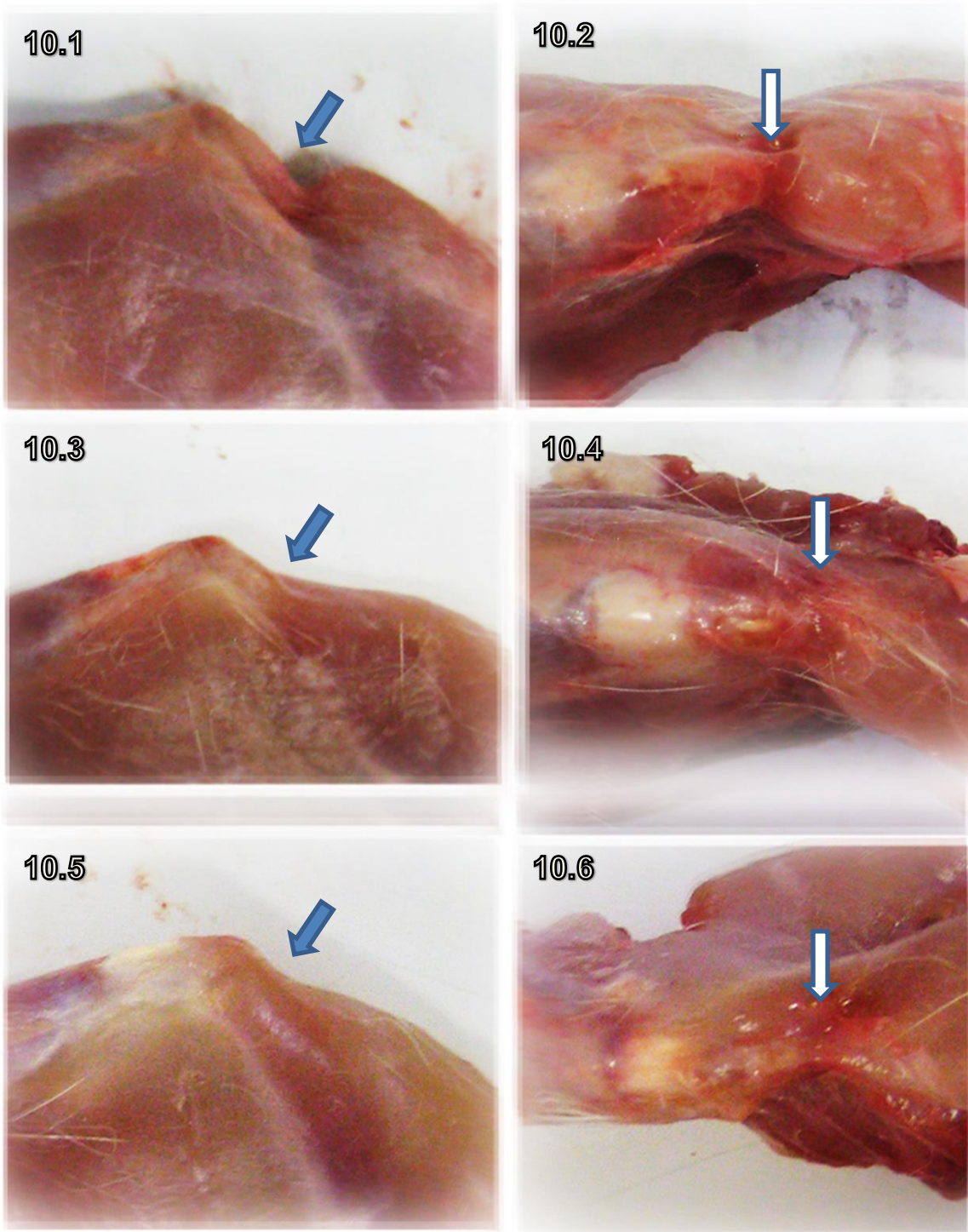


**Slika 9.** Prikaz nastalog defekta na mjestu razdvajanja mišićno tetivne sveze životinja žrtvovanih 14. postoperativnog dana (serija 2). Kontrola (gornji red); BPC 157 ng (srednji red), BPC 157 µg tretman (donji red), laterolateralni prikaz u semifleksiji (lijevi stupac), anteroposteriorni prikaz (desni stupac).

Kontrola: Na laterolateralnoj slici kontrolne skupine (**Slika 9.1**) vidljiv dubok defekt na mjestu mišićno-tetivne disekcije (plava strelica). Poviše njega na femorotibijalnom prijelazu strši jako retrahirana tetiva četveroglavog mišića (žuta površinska struktura) na koju se dalje nastavlja patela (bijela površinska struktura) koja je potpuno spuštена na potkoljenu. Desno od oznake vidljiv skvrčen i opušten mišić. Na anteroposteriornom prikazu kontrolne skupine (**Slika 9.2**) bijeloplavom strelicom označeni defekt koji razdvaja tetivu kvadricepsa od mišića. Ispunjen je vezivnim tkivom.

BPC 157. Na laterolateralnim prikazima nBPC skupine (**Slika 9.3**) i µBPC skupine (**Slika 9.5**) vidljiv kontinuitet između mišića i tetive s tek plićim defektom na mjestu disekcije (plava strelica). Obje strukture se doimaju čvrste i napete u pravilnijoj anatomskej poziciji. Na anteroposteriornim prikazima nBPC skupine (**slika 9.5**) i µBPC skupine (**slika 9.6**) također vidljiva mišićno-tetivna konekcija s uskom i kratkom zonom defekta na mjestu ranije operativno razdvojene obje strukture (plavobijela strelica).

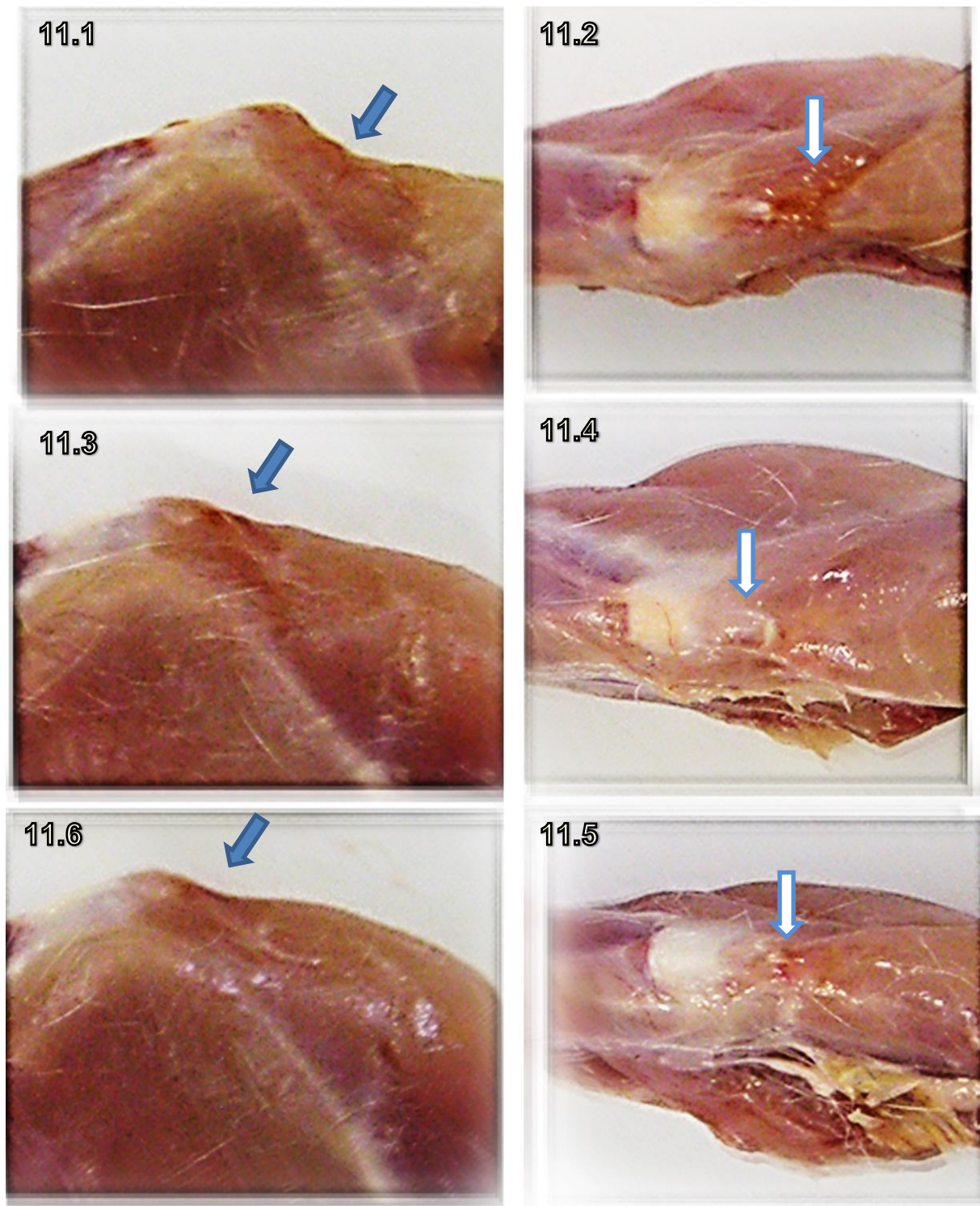




**Slika 10.** Prikaz nastalog defekta na mjestu razdvajanja mišićno tetivne sveze životinja žrtvovanih 28. postoperativnog dana (serija 3). Kontrola (gornji red); BPC 157 ng (srednji red), BPC 157 μg tretman (donji red), laterolateralni prikaz u semifleksiji (lijevi stupac), anteroposteriorni prikaz (desni stupac). Kontrola: Na laterolateralnoj slici kontrolne skupine (**Slika 10.1**) vidljiv duboki defekt na mjestu mišićno-tetivne disekcije (plava strelica). U toj

seriji veličina defekta dolazi do svoga maksimuma. Poviše oštećenja vidljiva jedva zamjetna tetiva četveroglavog mišića koja je izgubila ranije prikazivanu žutu boju. Desno od oznake zaobljenih rubova vidljiv skvrčen i opušten mišić. Na anteroposteriornom prikazu kontrolne skupine (**Slika 10.2**) bijeloplavom strelicom označeni defekt koji razdvaja zaobljene krajeve s jedne strane tetive kvadricepusa, a s druge mišića. Struktura tetive kvadricepusa zamjetna unutar vezivne degeneracije.

BPC 157. Na laterolateralnim prikazima nBPC skupine (**Slika 10.3**) i  $\mu$ BPC skupine (**Slika 10.5**) vidljiv kontinuitet između mišića i tetive s plićim defektom na mjestu disekcije (plava strelica). Obje strukture bez kranjeg zaobljenja rubova, a niti tetive napeto ulaze u čvrsti mišić. Obje strukture u pravilnijoj anatomskej poziciji. Na anteroposteriornim prikazima nBPC skupine (**slika 10.5**) i  $\mu$ BPC skupine (**slika 10.6**) također vidljiva mičićno-tetivna konekcija s uskom i kratkom zonom defekta na mjestu ranije operativno razdvojene obje strukture (plavobijela strelica).



**Slika 11.** Prikaz nastalog defekta na mjestu razdvajanja mišićno tetivne sveze životinja žrtvovanih 42. postoperativnog dana (serija 4). Kontrola (gornji red); BPC 157 ng (srednji red), BPC 157  $\mu$ g tretman (donji red), laterolateralni prikaz u semifleksiji (lijevi stupac), anteroposteriorni prikaz (desni stupac).

Kontrola: Na laterolateralnoj slici kontrolne skupine (**Slika 11.1**) vidljiv ranije dubok defekt na mjestu mišićno-tetivne disekcije (plava strelica) koji se lagano popunjava vezivnom i masnom degeneracijom. Bez jasno zamjetne forme mišićno-tetivnog spoja, a patela daleko udaljena od svoje pozicije i spuštена niz koljeni zglob (bijela površinska struktura). Desno od oznake vidljiv atoničan, retrahiran mišić. Na anteroposteriornom prikazu kontrolne skupine (**Slika 11.2**) bijeloplavom strelicom označeni defekt koji razdvaja tetivu kvadricepsa od mišića. Ispunjen je vezivnim i žučkastim masnim tkivom.

BPC 157. Na laterolateralnim prikazima nBPC skupine (**Slika 11.3**) i  $\mu$ BPC skupine (**Slika 11.5**) vidljiv kontinuitet između mišića i tetive s tek plićim defektom na mjestu disekcije (plava strelica). Obje strukture se doimaju čvrste i napete u pravilnijoj anatomskej poziciji. Na anteroposteriornim prikazima nBPC skupine (**slika 11.5**) i  $\mu$ BPC skupine (**slika 11.6**) također vidljiva dobro formirana mišićno-tetivna konekcija s uskom teže zamjetnom kratkom zonom defekta na mjestu ranije operativno razdvojene obje strukture (plavobijela strelica).

#### 4.5. Izdržljivost na istežanje

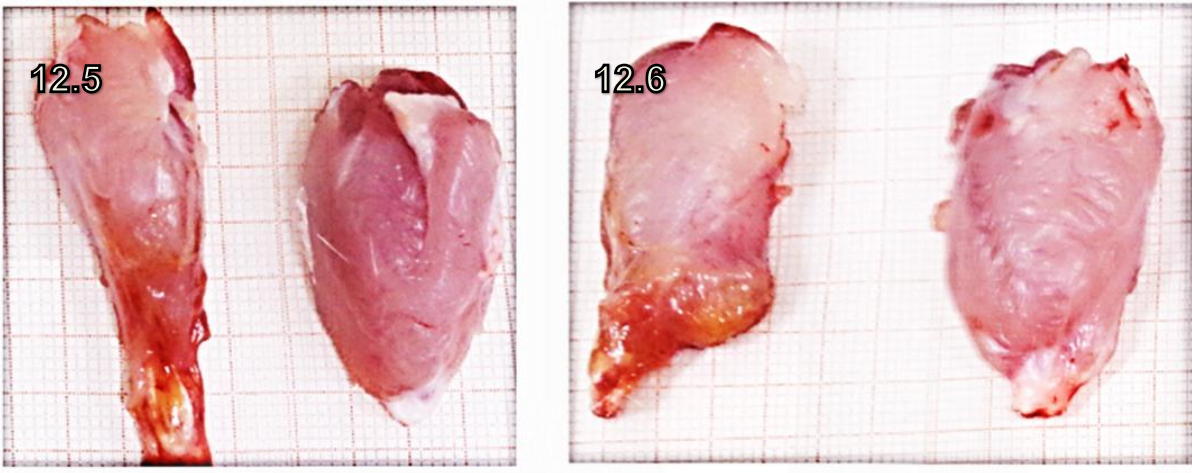
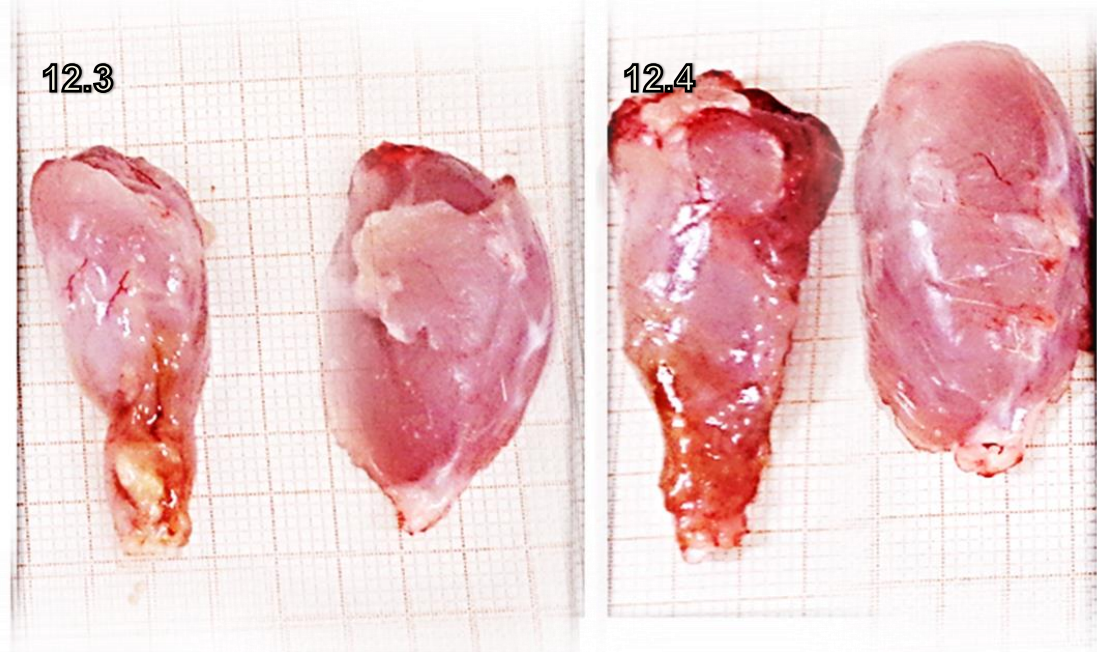
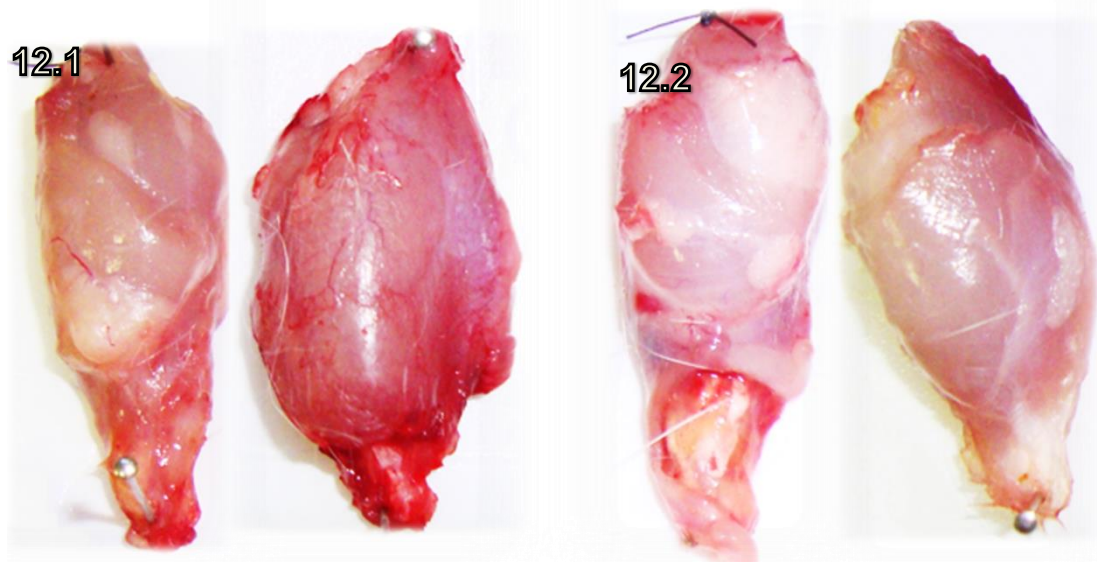
Prilikom svakog žrtvovanja, nakon nasumičnog odvajanja 3 životinje iz svake skupine (ukupno 9 životinja) i uzimanja preparata za patohistološku analizu preostale 2 životinje iz svake skupine (ukupno 6 životinja) bile su predviđeni za biomehaničko testiranje.

Pripremljeni mišić kvadriicepsa postavljao se na uređaj te se pratila izdržljivost na istežanje. Bilježilo se istegnuće tkiva prije prekida kontinuiteta, a vrijednosti su se uspoređivale s izdržljivošću kontralateralnog, neoperiranog, mišića. Rezultat je bio razlika koja je pokazivala koliko se operirani mišić može manje istegnuti prije puknuća. Također bilježilo se i mjesto prekida kontinuiteta mišića. Dobiveni podaci imali su pravilnu raspodjelu te je za analizu primjenjen one-way ANOVA test sa Tukey HSD post hoc testom.

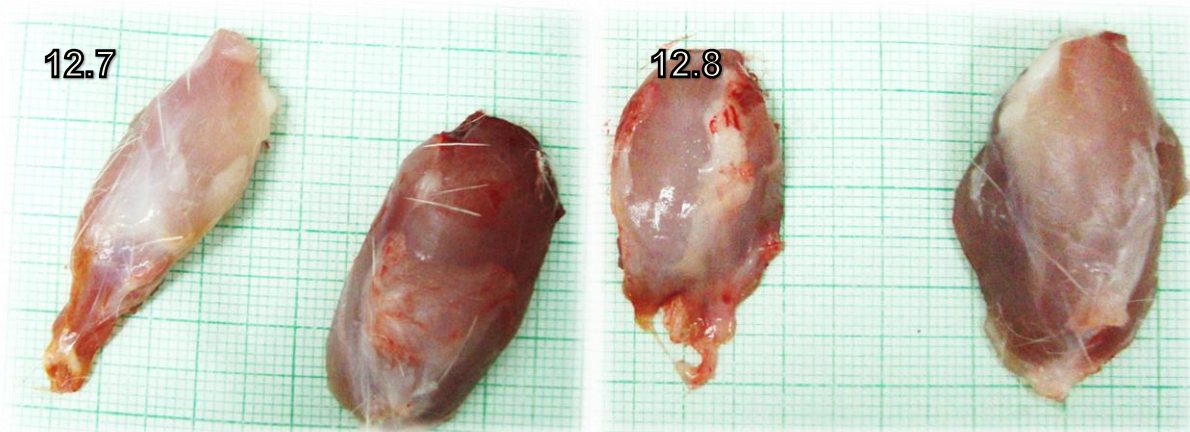
Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju benefični učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 na ispitivani biomehanički parametar izdržljivosti na istežanje. Naime, usporedba rezultata u skupinama A (nBPC 157) i B ( $\mu$ BPC 157) u svim serijama pokazuje značajno bolje rezultate sa statističkom razlikom ( $p < 0.01$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu C. Tako je vidljivo da se sedmi poslijeoperacijski dan kod životinja tretiranih BPC 157 (skupine 1A, 1B) mišić mogao elongirati  $7 \pm 0.0$  mm i  $6.5 \pm 0.7$  mm kraće nego kontrolni mišić za razliku od skupine C gdje je razlika bila  $11 \pm 0.7$  mm. I na ostalim mjerenjima postojala je slična signifikantna ( $p < 0.01$ ) razlika. Ti podaci jasno ukazuju na veću čvrstoću tkiva novog mišićno-tetivnog spoja u tretiranim skupinama eksperimentalnih životinja. Za spomenuti je da su istegnuti mišići na svim preparatima uvijek pucali na mjestu novonstalog spoja.

**Tablica 12.** Izdržljivost na istezanje. Uspoređivala se razlika između neoperirane i operirane noge. Rezultat predstavljan srednju vrijednost razlike u dužini operiranog i neoperiranog mišića (u milimetrima sa standardnom devijacijom) dobivenu pri kontinuiranom istezanju preparata do trenutka pucanja. Što je vrijednost bliža nuli to je i rezultat bolji. p vrijednost je izražena kao vrijednost statističke značajnosti između skupina tretiranih BPC 157 naspram kontrolne skupine.

IZDRŽLJIVOST NA ISTEZANJE					
Postop.dan	N po skup.	A (nBPC 157)	B ( $\mu$ BPC 157)	C (Kontrola)	p (BPC tretirane skupine naspram kontrole)
7.	2	7.0 $\pm$ 0.0	6.5 $\pm$ 0.7	11.5 $\pm$ 0.7	< 0.01
14.	2	4.5 $\pm$ 0.7	5.0 $\pm$ 0.0	10.5 $\pm$ 0.7	< 0.01
28.	2	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	8.5 $\pm$ 0.7	< 0.01
42.	2	3.0 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.7	7.5 $\pm$ 0.7	< 0.01



**Slika 12.** Usporedni prikaz četverglavih mišića s obje natkoljenice (u nastavku se nalazi opis)

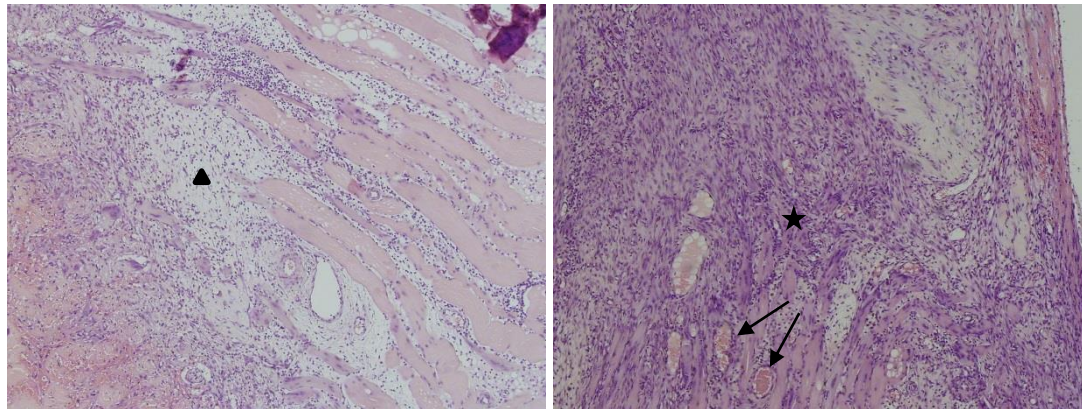


**Slika 12. - nastavak.** Usporedni prikaz četveroglavih mišića s obje natkoljenice, pri čemu je na desnom ekstremitetu učinjena mišićno-tetivna disekcija, dok je lijevi ekstremitet bio intaktan do dana žrtvovanja. Mjereći 2cm iznad patele i uspoređujući obje noge, procjenjivala se nastala atrofija operiranog mišića. Na svakoj slici desni ekstremitet je postavljen s lijeve strane, a lijevi s desne strane odgovarajućeg para. Stupac lijevih slika prikazuje kontrolne skupine, a desni stupac nBPC 157 tretirane skupine. **Slika 12.1** označava kontrolnu skupinu, a **Slika 12.2** skupinu nBPC 157 tretiranih životinja žrtvovanih 7. dan (serija 1). **Slika 12.3** označava kontrolnu skupinu, a **Slika 12.4** skupinu nBPC 157 tretiranih životinja žrtvovanih 14. dan (serija 2). **Slika 12.5** označava kontrolnu skupinu, a **Slika 12.6** skupinu nBPC 157 tretiranih životinja žrtvovanih 28. dan (serija 3). **Slika 12.7** označava kontrolnu skupinu, a **Slika 12.8** skupinu nBPC 157 tretiranih životinja žrtvovanih 42. dan (serija 4). U svakoj od pojedinih serija jasno vidimo da je operirani ekstremitet uži tj, atrofičniji nego neoperirani. Ta razlika je značajno naglašena u kontrolnim skupinama, za razliku od skupina tretiranih nBPC 157 gdje je ta razlika odnosno razvoj atrofije puno blaži.



## 4.6. Histologija

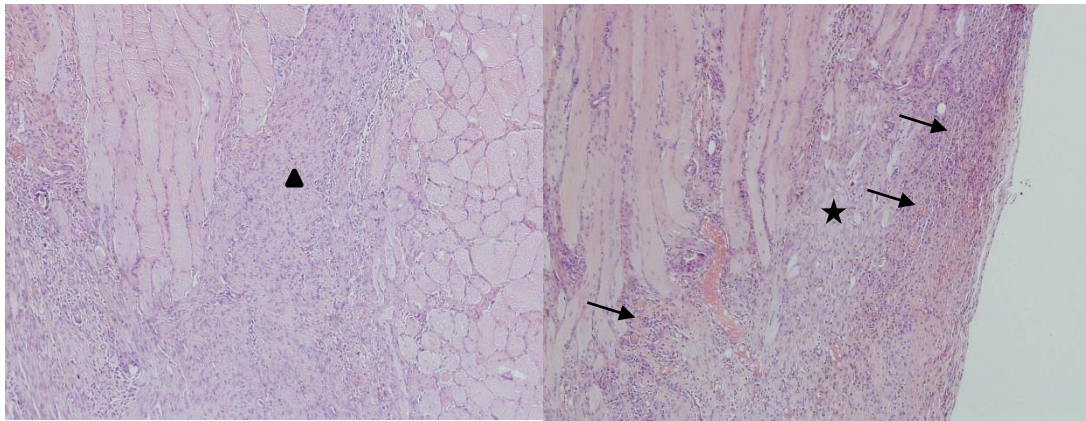
Histološki se u periodu 7 dana nakon disekcije u kontrolnoj skupini kao i u skupinama tretiranim BPC 157 nalazi edem tkiva u području disekcije mišićno-tetivne sveze. U kontrolnoj skupini, nadalje, vidljiv opsežan miješani upalni infiltrat kao i brojni novostvoreni kapilarni prostori uz početno formiranje granulacijskog tkiva (Slika 13.). U obje skupine tretirane BPC 157 identičan nalaz. Upala je puno blaža, a ne nalazi se formiranje granulacijskog tkiva (Slika 13). U sljedećim vremenskim intervalima: 14 dana (Slika 14.), 28 dana (Slika 15.), odnosno 42 dana (Slika 16.) nakon disekcije mišićno-tetivne sveze, u BPC157 tretiranim skupinama prisutna je redukcija upalnog infiltrata uz pravilne na novo formirane strukture mišićno-tetivne sveze i pravilno orijentirane tračke veziva bez prekida njihovog kontinuiteta ožiljkastim vezivom. U kontrolnoj skupini tijekom čitavog perioda prisutan je umjereno gust upalni infiltrat uz novostvorene kapilarne prostore i formiranje ožiljkastog veziva koje je uzrokovao prekid kontinuiteta mišićno-tetivne sveze.



nBPC157 tretirana grupa

Kontrolna grupa

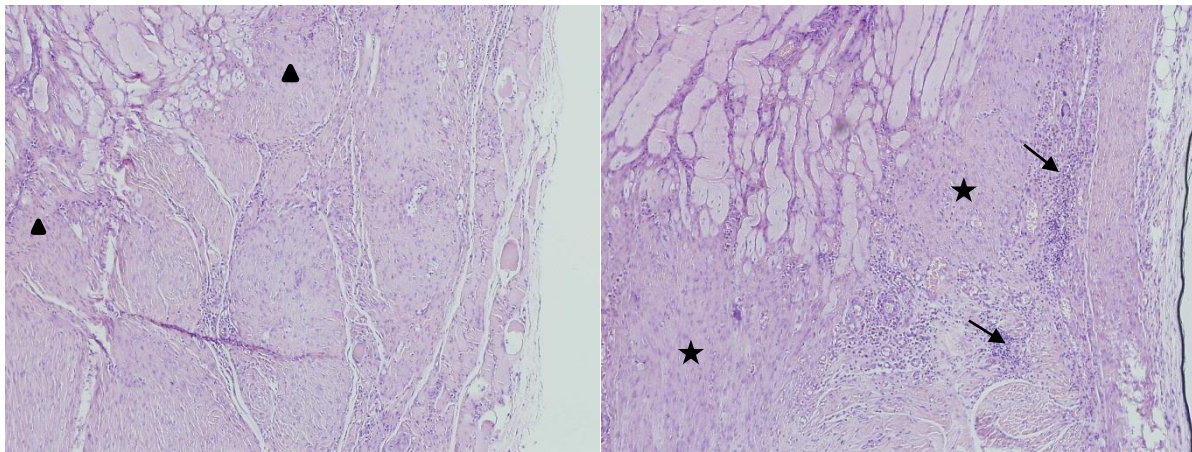
**Slika 13.** Cijeljenje mišićno-tetivne sveze 7 dana nakon disekcije, bojano HE. Povećanje 10x. U skupini tretiranoj nBPC157 u području disekcije mišićno-tetivne sveze nalazi edem tkiva te oskudan upalni infiltrat (trokut) za razliku od kontrolne skupine gdje je vidljiv opsežan miješani upalni infiltrate (zvijezda) kao i brojni novostvoreni kapilarni prostori (strelice) uz formiranje granulacijskog tkiva.



nBPC157 tretirana grupa

Kontrolna grupa

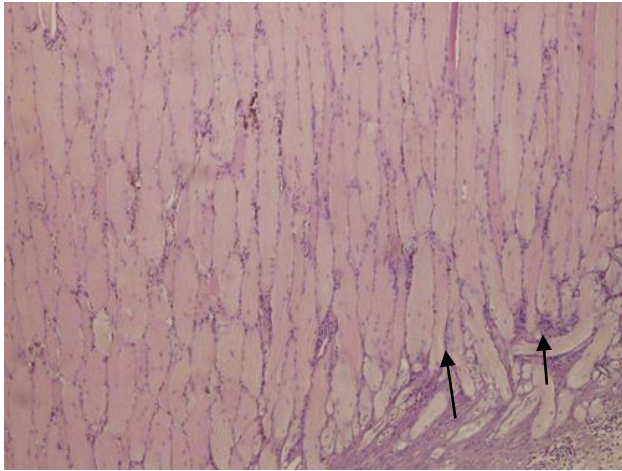
**Slika 14.** Cijeljenje mišićno-tetivne sveze 14 dana nakon disekcije, bojano HE. Povećanje 10x. U nBPC 157 skupini za razliku od kontrolne skupine vidljivo značajno manje upalnog infiltrata, vezivno tkivo u pravilnijoj strukturi (trokut) uz tek nešto ožiljkastog tkiva. Na preparatima kontrolne skupine nepravilnije formiranje vezivnog tkiva uz još brojne upalne stanice (strelice).



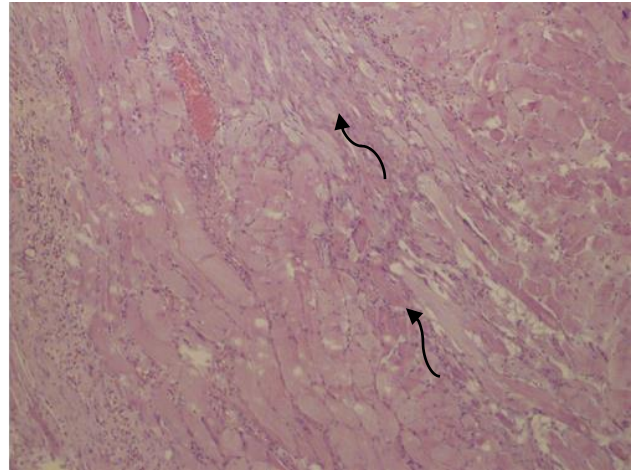
nBPC157 tretirana grupa

Kontrolna grupa

**Slika 15.** Cijeljenje mišićn-tetivne sveze 28 dana nakon disekcije, bojano HE. Povećanje 10x. U nBPC 157 skupini ne nalazi se više upalnog infiltrata. Vidljivo pravilno orijentirano novo nastalo tkivo mišićno-tetivnog spoja (trokut). Za razliku od toga, preparat kontrolne skupine sadrži nepravilno orijentirano tkivo mišićno-tetivnog spoja, obilno zrelo granulacijsko tkivo prožeto s još uvijek značajno dosta upalnih stanica (strelice).



nBPC157 tretirana grupa



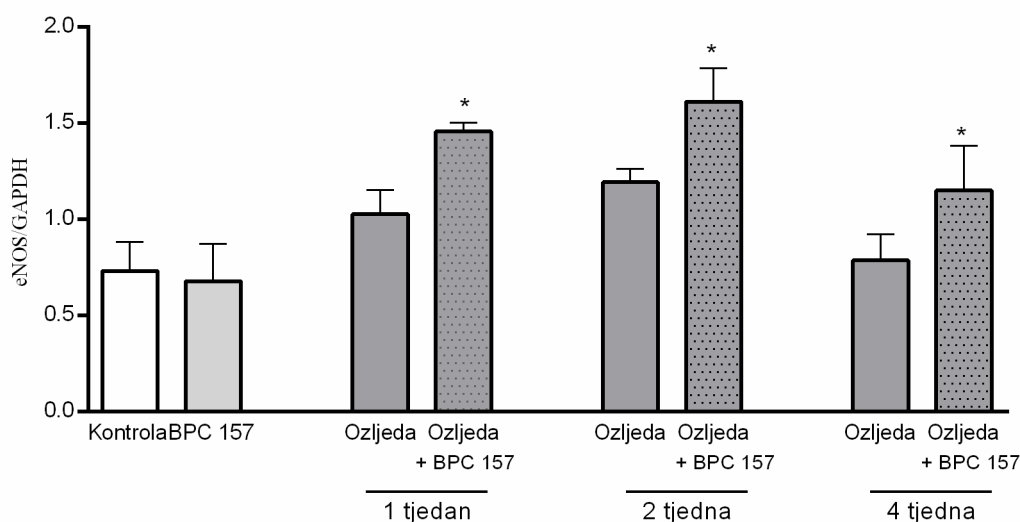
Kontrolna grupa

**Slika 16.** Cijeljenje mišićno-tetivno sveze 42 dana nakon disekcije, bojano HE. Povećanje 10x. U nBPC 157 skupini prisutno pravilno orijentirano tkivo mišićno-tetivnog spoja (ravne strelice). Kontrolna skupina sadrži nepravilno orijentirano tkivo mišićno-tetivnog spoja (neravne strelice), koje najvećim dijelom čini zrelo vezivno tkivo.

#### 4.7. Molekularne analize

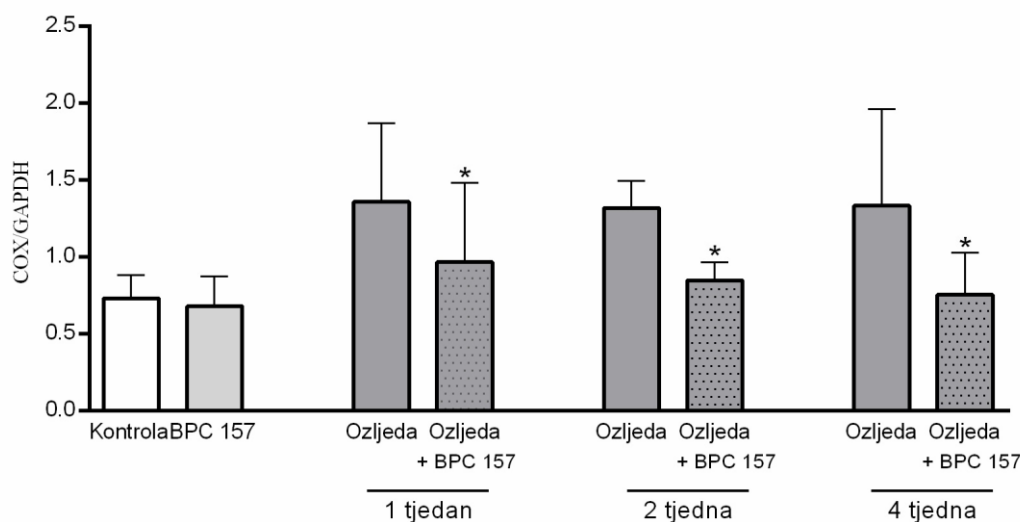
U odabranim preparatima analizirala se ekspresija gena eNOS, iNOS i COX-2. Također se određivala vrijednost nitrit oksida (NO) te malondialdehida kao mjere razine lipidne peroksidacije tkiva (MDA). Ekspresija mRNA za gen iNOS bila je ispod razine detekcije.

Rezultati pokazuju statistički značajno povećanje ekspresije mRNA za eNOS (Slika 17.) te smanjenje ekspresije COX2 mRNA (Slika 18.) u svim BPC 157 tretiranim skupinama u odnosu na kontrolne skupine s istovjetnom ozljedom. Naime, kako se može vidjeti na slikama 17. i 18. 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 COX 2 (skupina ozljeda) u odnosu na zdravu kontrolu (nije prikazano na slikama zbog jasnoće samog prikaza). Ono što je za naše istraživanje posebno važno te je isto prikazano na slici 17, je povećanje razine eNOS mRNA u skupini tretiranoj BPC 157 u odnosu ne samo na kontrolnu zdravu skupinu (nije prikazano) nego u odnosu na skupinu s istovjetnom ozljedom ( $p < 0.05$  naspram pozitivne kontrole) (Slika 17.). Ovakav trend ukazuje na povoljno djelovanje BPC 157 kod ozljede mišićno-tetivne sveze, koje je vidljivo na makroskopskim te funkcionalnim testovima i prikazano ranije u tekstu.



**Slika 17.** eNOS/GAPDH nakon disekcije mišićno-tetivne sveze. Značajno veće vrijednosti ekspresije mRNA za eNOS gen se nalaze kod životinja tretiranih s nBPC 157. \* $P < 0.05$  vs. pozitivna kontrola odnosno skupina koja je imala istovjetnu ozljedu no nije tretirana.

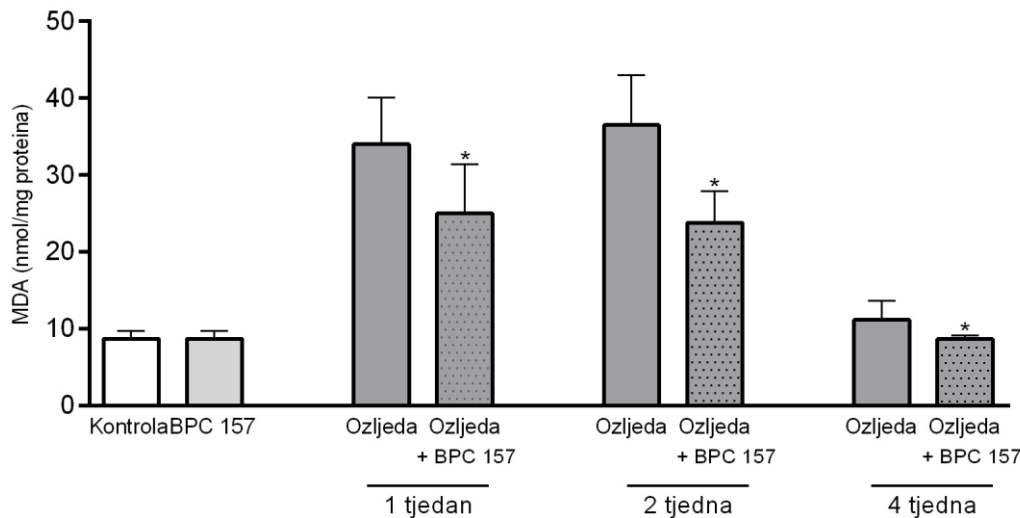
Naše istraživanje nadalje pokazuje da nakon disekcije mišićno-tetivne spojnice dolazi do povećanja razine ekspresije COX 2 mRNA te da BPC 157 dovodi do sličnih promjena (Slika 18). Na slici je također vidljivo kako BPC 157 kod zdravih jedinki ne dovodi do promjene u razini ekspresije mRNA za COX 2 gen (u odnosu na zdravu jedinku). Također je vidljivo kako je razlika u razini mRNA ekspresije COX 2 gena između ozljeđene 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 ozljeđenu životinju (Slika 18).



**Slika 18.** COX 2/GAPDH nakon disekcije mišićno-tetivne spojnice. Značajno manje vrijednosti se nalaze kod životinja tretiranih s BPC 157. \* $P < 0.05$  vs. pozitivna kontrola odnosno skupina s istovjetnom ozljedom bez liječenja.

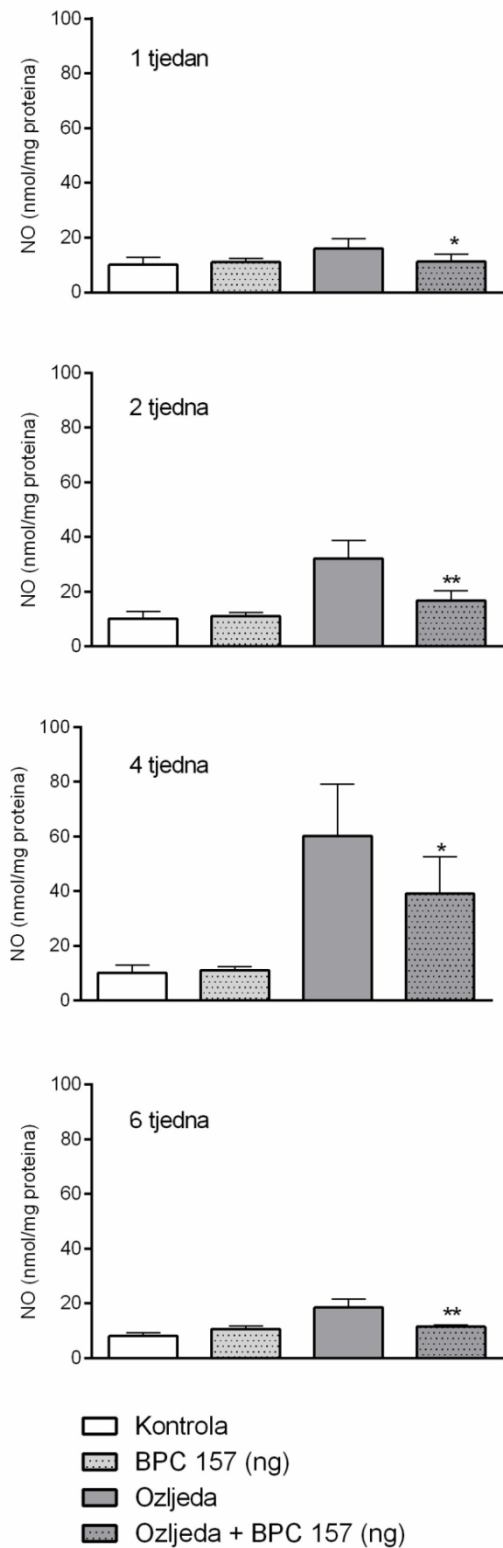
Nadalje vidljive su značajno veće vrijednosti MDA u kontrolnim skupinama u odnosu na BPC 157 (Slika 19.). Naime, kako je na slici pokazano sam BPC ne dovodi do promjene u razini lipidne peroksidacije tkiva mišića i tetiva kod zdravih jedinki. Budući da kod ozljede dolazi do oštećenja tkiva pa time i pokretanja oksidacijske kaskade promjena, među njima i lipidne peroksidacije, vidljivo je značajno povećanje razine MDA kod obje skupine ozljeđenih životinja (skupine ozljeda i ozljeda + BPC 157) u skupinama promatranim nakon 1 i 2 tjedna dok u skupini promatranjoj 4 tjedna nakon ozljede nalazimo vraćanje razine MDA

na kontrolne vrijednosti. Zbog jednostavnijeg prikaza značajnosti ovih promjena nisu upisane na Slici 18. Međutim, BPC 157 u svim vremenskim točkama (1, 2 i 4 tjedna) dovodi do statistički značajnog smanjenja razine MDA u odnosu na ozljeđenu jedinku ( $p < 0.05$  naspram pozitivne kontrole).



**Slika 19.** Vrijednosti MDA (mmol/mg proteina) u defektu koji nastaje nakon disekcije mišićno-tetivne spojnice. Značajno manje vrijednosti se nalaze kod životinja tretiranih s BPC 157. \* $P < 0.05$  vs. kontrola.

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 20.). na slici je također vidljivo kako BPC 157 kod neozljeđene životinje ne mijenja razinu NO u odnosu na zdravu životinju (kontrola naspram BPC 157 skupine).



**Slika 20.** Vrijednosti NO (mmol/mg proteina) u defektu koji nastaje nakon disekcije mišićno-tetivne spojnice. Značajno manje vrijednosti se nalaze kod životinja tretiranih s BPC 157 u dozi od 10 ng/kg . \*P<0.05 i \*\*P<0.01 vs. pozitivna kontrola.

## 5. RASPRAVA

Analizirajući rezultate dobivene praćenjem funkcionalnih parametara, biomehaničkih testiranja, makroskopskih, mikroskopskih i laboratorijskih analiza, jasno možemo vidjeti potvrdu postavljene hipoteze da primjena peptida BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški učinjenog prekida mišićno-tetivne sveze četveroglavog mišića natkoljenice štakora.

Usporedbe skupina pokazale su da se eksperimentalne skupine, tj. one koje su dobivale peptid BPC 157 intraperitonealno u dozi od 10 ng/kg TT (1A, 2A, 3A, 4A), odnosno peptid BPC 157 intraperitonealno u dozi od 10 µg/kg TT (1B, 2B, 3B, 4B) u svim parametrima promatranja imale su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne skupine (1C, 2C, 3C, 4C) tj. one koje su dobivale intraperitonealno fiziološku otopinu. Prateći funkcionalne rezultate, vidljivo je da su kontrolne skupine već ubrzo po operaciji razvile kontrakturu operirane noge kao rezultat neupotrebe. Kontraktura se neznatno smanjila kroz vremenski period promatranja što se vidi u skupinama žrtvovanim 28. odnosno 42. dana (3C i 4C), ali ostala je u statističkoj razlici u odnosu na BPC 157 skupine. Kontraktura nožice pojavila se i u ponekim životinjama tretirani BPC 157 u skupinama žrtvovanim 7. dana (1A i 1B), ali bila je manje zamjetna, mjereći do 2mm i također s tendencijom nestanka u skupinama koje su duže promatrane (3A, 3B, 4A, 4B).

Smanjena upotreba operiranog ekstremiteta i posljedična kontraktura i atrofija odrazila se i na hod eksperimentalnih životinja. Analizirajući hod životinja na temelju kretanja kroz 1 metar dugu hodnu stazu vidjelo se kako su kontrolne životinje imale usporen, teturav hod sa zanošenjem, a poneka i onemogućen hod prvenstveno u prvim postoperativnim danima. Za razliku od njih životinje tretirane BPC 157, bez obzira na dozu, imale su značajno manje smetnje u kretanju. Indeks njihovog oporavka hoda na testiranju 7. postoperativnog dana iznosio je 1,05 što znači da su gotovo sve životinje dobro hodale, za razliku od kontrolne skupine čiji se indeks oporavka hoda niti na skupini testiranoj na vremenski najudaljenijem testiranju tj. 42. dan (4C) nije spustio ispod 2, odnosno te životinje hodale su bez šepanja, ali usporeno.

Prekid mišićnih od tetivnih niti mišića kvadricepsa uvjetovao je kontrakturu noge uz relativno skraćanje ekstremiteta i posljedični poremećaj u oslanjanja stopala o podlogu. Zamjetna je bila razlika u otisaku tj. obliku stopala pri oslanjanju operirane noge i njene kontralateralne, zdrave strane. BPC 157 skupine zadržavale su sličan oblik otiska stopala za razliku od kontrolnih skupina gdje je dužina otiska pri oslanjanju bila kraća u prosjeku za 2



mm. Kontrolne životinje operiranim ekstremitetom oslanjale su se uglavnom samo na prste te manji dio stopala dok je peta ostajala u zraku.

Isto je tako tijekom čitavog razdoblja praćenja bio jasno vidljiv deficit motoričke funkcije u svim kontrolnim skupinama (1C, 2C, 3C, 4C) 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 obje BPC 157 tretiranih skupina (A i B) u odnosu na kontrolne skupine (C). Gubitak snage operirane noge, razumljivo, bio je najveći odmah nakon operacije. Promjena vrijednosti tj. oporavak teče kontinuirano duž cijelog praćenja i to u svim skupinama s naglaskom bržeg oporavka u prva 2 tj. U posljednje testiranim skupinama (4A, 4B) indeksi odgovaraju gotovo potpunom oporavku funkcije za razliku od kontrolne skupine gdje također kontinuirano teče oporavak, ali do kraja kontrolne skupine (4C) postižu vrijednost indeksa tek 0,35 i sa značajnom statističkom razlikom se odnose na jednu stranu, prema kontralateralnom zdravom ekstremitetu, a s druge strane prema objema BPC 157 skupinama.

Nadalje, makroskopska procjena kao i biomehanička testiranja mišića, učinjeni po žrtvovanju, jasno su pokazale signifikantne razlike BPC 157 tretiranih skupina u obje doze u odnosu na kontrolne skupine. Makroskopskom procjenom i mjereći širinu mišića obje stražnje noge životinje, jasno se vidi atrofija mišića kvadricepsa operirane noge u odnosu na neoperiranu nogu u svim skupinama, ali sa značano manjom razlikom u skupinama tretiranim BPC 157. Atrofija se postepeno povećavala kako su životinje bile duže praćene što naročito vrijedi u kontrolnoj skupini. U obje BPC skupine na posljednjem mjerenju zamjetili smo smanjenje napredovanja atrofije i lagani oporavak mišića. Mjereći veličinu defekta nastalog na mjestu prekida mišićno-tetivne sveze, skupine tretirane BPC 157 su imale statistički manji defekt u odnosu na kontrolne skupine. U procjeni defekta odlučili smo se za laterolateralni namještaj preparata jer je davao najbolji uvid na veličinu promjene budući da je sam defekt i nastao uzdužnim razmicanjem tkiva. Najočitija promjena bila je na prvom mjerenju jer usljed kontrakcije i postoperativnog kretanja štakora dolazilo je do razmicanje tkiva koja po odvajanju nisu bila refiksirana. U nekoliko kontrolnih preparata zamjetili smo i razvoj seroma koji je davao dojam uredno formiranog spoja, ali po evakuaciji tekućine defekt je postao jasno vidljiv. Serom nismo našli niti u jednoj BPC 157 tretiranoj životinji. Na daljim točkama promatranja u obje skupine BPC 157 defekt se ustalio na početnoj razini s vrlo laganim porastom do 28. dana, a potom i smanjenju do 42. dana. Za razliku od njih u kontrolnoj skupini od 7. do 14. dana površina defekta se povećala za 50% te se tada ustalila s vrlo laganim oporavkom na testiranju 42. dana.

Na testovima izdržljivosti mjerenih na aparatu za istezanje (Linemat) mišić kvadricepsa životinja tretiranih BPC 157 pokazao se značajno jačim. Zdravi mišić u prosjeku se mogao istegnuti  $20.6 \pm 1.2$ . Unatoč tom što je prepatelarni dio anatomski najtanji dio mišića, on se u svim slučajevima razdvojio na distalnom dijelu trbuha mišića tj. na proksimalnom začetku tetivnih niti koje distalno formiraju tetivu kvadricepsa. I ranije studije su pokazale da je konekcija tetive i mišića naslabije mjesto mišića, odnosno mjesto gdje nastaju rupture (24)(25). Nakon razdvajanja jasno vidimo da se mišićno-tetivni spoj nastaje na velikoj površini i duboko ulazi u trbuh mišića. Našom analizom pratila se razlika mogućnosti istezanja mišića prije pucanja. U svim točkama gledišta mišići skupina tretiranih BPC 157 bez obzira na koncentraciju pokazali su se značajno jačim u odnosu na kontrolne skupine. Kao i na kontrolama ruptur su se događale na najslabijem dijelu tj. mišićno-tetivnoj svezi koja je ovog puta bila i dodatno oslabljena ranijim kirurškim odvajanjem te je stoga i postojala razlika prema zdravom ekstremitetu. Zarastanjem tkiva jačala je i novonastala sveza što možemo vidjeti i većom izdržljivošću skupina koje su kasnije žrtvovane kako tretiranih tako i kontrolnih. Među njima cijelo vrijeme postojala je statistička razlika dok se BPC 157 skupine (A i B) međusobno nisu statistički razlikovale. U ranom stadiju zacjeljenja tj. u skupinama žrtvovanim 7. dana (1A i 1B) preparati su izdržali u prosjeku 65% vrijednosti kontralateralne zdrave strane odnosno 7 mm su se manje istegli, dok u skupinama koje su promatrane 42 dana (4A i 4B) ona je iznosila i do 95% vrijednosti zdrave noge, tj. istezanje je bilo manje samo za 3,5mm. Za razliku od njih izdržljivost u kontrolnim skupinama kretala se od svega 25% kod 1C skupine do 70% u 4C skupine promatrane 42 dana.

Histološka analiza kroz cijelo vrijeme praćenja u kontrolnim skupinama pokazuje puno veću upalu s nakupljanjem granulocita. Isti su u manjim količinama prisutni i do zadnjeg stadija praćenja. Mjesto disekcije se popunjava granulacijskim tkivom, a potom i zonom vezivnog tkiva koji razdvaja mišić i tetivu ograničavajući stvaranje njihovog kvalitetnog spoja. Za razliku od toga u svim skupinama tretiranim BPC157 u početku upala je puno blaža, bez jasnog formiranja granulacijskog tkiva. U sljedećim vremenskim intervalima prisutna je redukcija upalnog infiltrata uz pravilne na novo formirane strukture mišićno-tetivne sveze i bez znatnijeg prekida njihovog kontinuiteta ožiljkastim vezivom.

Analiza ekspresije gena, usoređujući kontrolne i BPC 157 tretirane skupine pokazuje statistički značajne razlike u vrijednosti eNOS, COX2, NO, te malondialdehida (MDA) dok je vrijednosti iNOS ostala ispod razine detektabilnosti te nije razmatrana. Sve BPC 157 skupine za razliku od kontrolnih prati statistički značajno povećanje eNOS mRNA u tkivu i smanjenje NO-a koji se pojačano troši u procesima cijeljenja, na uštrb smanjene upalne reakcije

vidljive preko smanjenog stvaranja COX2 i malondialdehida (MDA) odnosno slobodnih radikala.

### **5.1. BPC 157 i drugi faktori rasta u složenim procesima cijeljenja**

Složeni mehanizmi regeneracije i reparacije polako se razumijevaju razvojem molekularne biologije i imunocitokemije (97)(98), a samim time raste mogućnost liječenja različitih ozljeda. One mogu nastati na razne načine i to kao posljedica ekstrinzičkih i intrinzičkih utjecaja, bilo da nastaju kao akutni ili kronični procesi. Ozljeđeno tkivo ima kompleksne, ali uglavnom ustaljene puteve cijeljenja. Na taj složeni proces dodatno mogu utjecati različita stanja i čimbenici kao što su ishemija, pojava hematoma, nekroza tkiva i infekcije, malnutricija, hipovitaminoza (osobito A i C), nedostatak minerala (osobito Zn i Fe), nedovoljno mirovanje i prevelika aktivnost (2). U liječenju neophodno je što prije riješiti ozljedu i vratiti vitalnost tkivu, ali farmakološke i kirurške mogućnosti često su ograničene te stoga su potrebna daljnja znanstvena istraživanja i pronalaženje farmakoterapeutika i metoda koje bi bile sigurne u svojoj primjeni i djelotvorne u liječenju.

Peptid BPC 157 inicijalo je definiran kao snažan antiulkusni peptid, čija su terapijska svojstva ekstenzivno istraživana u gastrointestinalnom traktu. Kao temeljni protektant u slini i želučanom soku (59)(99)(100) pokazao je široki antiulkusni potencijal superioran standardnim lijekovima s iznimno visokim terapijskim indeksom dokazanim u studijama o sigurnosti lijeka gdje nije postignuta letalna doza (101). 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 kao što su epidermalni faktor rasta (h-EGF) i transformirajući faktor rasta (h-TGF) koji se u istom mediju raspadaju unutar 15 min (56) 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, faktor rasta fibroblasta (bFGF), faktor rasta hepatocita (HGF) , faktor rasta endotelnih stanica (VEGF)) također pokazuju utjecaj na cijeljenje tkiva, ali nigdje ovako jedinstveno konstantno i uniformno. Kao ilustraciju toga možemo spomenuti bFGF-W, bFGF-CS23 i trombocitni faktor rasta (PDGF-BB) koji su

intragastričnom primjenom izliječili kronični, cisteaminom izazvani, uklus dvanaesterca kod štakora, a nisu imali zaštitnu ulogu prema kroničnim želučanim ulkusima, erozivnom gastritisu i ulceroznom kolitisu (102). S druge strane, rektalno ispiranje crijeva otopinama koje su sadržavale bFGF ili PDGF ubrzalo je zacjeljivanje kemijski izazvanog ulceroznog kolitisa kod štakora (102). 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 (103). Povećana ekspresija VEGF je pozitivno korelirana s ulkusom dvanaesnika (104), ali i negativno s ulceroznim kolitisom gdje izaziva patološku angiogenezu (103).

Za razliku od peptida BPC 157 koji dokazano nema toksično ili protumorsko djelovanje, štoviše inhibira rast nekoliko tumorskih staničnih linija (105), neki faktori rasta, a naročito oni koji se koriste na dugoročnoj osnovi (106) imaju upravo takav neželjeni efekt. Na primjer, EGF je pokazao da promiče rast nekoliko tumorskih staničnih linija (107) kao i primjena peptida sličnog glikogenu 2 (GLP-2) koja je u duljim vremenskim razdobljima izaziva razvoj hiperplastične promjene u kolonu (108).

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 dosegili 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 zatvaranja fistule (65)(66) pa čak i u teškim uvjetima kao što je bila studija gdje je istovremeno primjenivan kortikosteroid (64). Suprotno tom rezultatu, studije s faktorima rasta nisu tako jasne. Koncentracija EGF i TGF $\beta$  u plazmi variraju od povišene koncentracije pri zarastanju fistula do stagnacije u bolesnika bez poboljšanja (109). Tako da studije koje pokazuju moguće liječenje različitih fistula probavnog sustava s 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(45)(52)(64)(66)(110)(111), mišići (74)(112), tetive (63)(73)(80), ligamenti(90), živčano tkivo (72)(113)(114), gastrointestinalni sustav (70)(115)(116)(117)(118)(119)(120)(121)(122) i krvne žile (123). Osim toga, zanimljivo je njegovo međudjelovanje s brojnim sustavima u organizmu, osobito interakcija s NO sustavom, koji ima dokazanu ulogu u procesu cijeljenja (67). Istraživanja su pokazala kako pentadekapeptid BPC 157 može u *in vivo* i *in vitro* pokusima nadvladati učinak L-NAME, kompetitivnog inhibitora endotelnog NO-a. To govori u prilog njegove posebne interakcije s 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 (49)(51)(60)(61)(62)(65)(68)(69). Osim potencijalnog terapijskog učinka u cijelom gastrointestinalnom sustavu (50) 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 (124), ali na kraju sazriju u hipovaskularno, hiponeuralno i hipocelularno tkivo (48)(58)(119)(125) koje nakon ozljede teško cijeli.

U *in vivo* studijama, FGF-2 vezan fibrinskim ljepilom (126) odnosno bFGF i PDGF-BB vezani heparinsko-fibrinskim nosačem (127), korišteni su za cijeljenje lezije tetive na modelu psa te su rezultirali kliničkim poboljšanjem u vidu povećanog opsega pokreta ekstremiteta, 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 (128), kao i GDFs 5 (129), 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 peritonelano ili peroralno izazvala istaknuto povećanje angiogeneze u štakorskom modelu s presječenom Ahilovom tetivom ili mišića kvadricepsa (125). 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) (125). Općenito, BPC 157 povećao je broj VEGF, CD34 i FVIII pozitivnih vaskularnih

elemenata, a angiogeni odgovor redovito je povećan. Najvažnije je spomenuti da je 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) 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 (130).

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 (131), bFGF -2 (132), bFGF -2 i TGF-beta1 (133), a prilikom vježbanja VEGF-A (134). Zanimljivo je da imunološka neutralizacija bFGF pokazuje smanjenje broja kapilara, makrofaga i mastocita te odgađa fagocitozu nekrotičnih miocita dok neutralizacija IGF1 ili TGF beta 1 ubrzava te iste procese (135). Koristeći različite načine sustavne primjene bFGF (injekcije ili produljeno oslobađanje iz polimera) u različitim životinjskim modelima nije se uspio postići oporavak mišića (136). 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 (137). Zbog relativne (ne)učinkovitost takvih načina primjene predloženi su za daljnja razmatranja i drugi načini primjene kako bi se mogao iskoristiti terapijski potencijal tih proteina. U tom pogledu razmatrana 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 (137)(138). Također, predložena je i upotreba antifibrotičkih sredstava kao protuteža fibroze koja se javlja usporedno s regenerativnim procesom (139). Kod velikih ozljeda mišića, proliferacija fibroblasta brzo može dovesti do prekomjernog formiranja gustog ožiljnog tkiva, što ometa regeneraciju mišića i rezultate u nepotpunom oporavku (135), a time iziskuje korištenje antifibrotička sredstva, odnosno suramina, koji inhibira angiogenezu (140).

Naprotiv, koristeći isti protokol kao i kod gastrointestinalnih studija, BPC 157 je pokazao poboljšano cijeljenje teško ozlijeđenog mišića na različitim modelima životinja: kompletno presjecanje (74), nagnječenje (112), denervacija (141) odnosno sistemska primjena kortikosteroida nakon nagnječenja (142). Peptid BPC 157 je poticao brže zacjeljivanje presječnog mišića kvadricepsa s funkcionalnom restauracijom (74). 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) (74). Cijeljenje mišića nakon teškog nagnječenja značajno je poboljšano pri davanju peptida u obliku kreme lokalno (112) čak i u uvjetima kada su se istovremeno sistemski primjenjivali kortikosteroidi (141).

U prilog pozitivnog utjecaja 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) (113). Na taj način spriječena je veća atrofija mišića koja se javlja zbog njegove denervacije (143).

Također pozitivan utjecaj na oporavak mišića ima i njegova regulativna uloga na dopaminergične receptore koji su važni za mišićno funkcioniranje (144). Svoju regulativnu ulogu jasno pokazuje u studijama gdje blokirajući utjecaj različitih neuroleptika (haloperidolom, flufenazinom, sulpiridom, klozapinom), sprečava blokadu, ukočenost i somatosenzorne poremećaje (145). 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 (146). 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 (147). Isto tako, kada se kod štakorima primjeni BPC 157 on ima specifičan utjecaj na pojedine regije mozga (npr. sinteza 5-HT značajno raste u strukturi substancije nigra i antagonizira nepokretljivost štakora u serotoninском sindromu) (148). Na taj način vidljivo je da je BPC 157 peptid koji djeluje i na periferni i središnji živčani sustav.

Na osnovi svega prethodno navedenog, postavili smo hipotezu, kako bi pentadekapeptid BPC 157 mogao imati pozitivan učinak na cijeljenje ozljede mišićno-tetivne sveze. Istraživanje je pokazalo kako pentadekapeptid BPC 157 dovodi do ubrzanog i boljeg cijeljenja navedene ozljede čak i u otežanim uvjetima gdje su oba tkiva operativno razdvojena i nisu fiksirana već su podložna retrakciji usljed pokreta i atrofije. Pentadekapeptid dovodi do povećanja angiogeneze i bržeg povezivanja razdvojenih tkiva i tako smanjuje afunkciju stražnjeg ekstremiteta, sprečava razvoj atrofije i kontrakture te omogućuje funkciju približno onoj na kontralateralnom ekstremitetu.

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 (EGR-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 EGR-1, također je odgovorna za stvaranje citokina i čimbenika rasta te posredno stvaranje ekstracelularnog matriksa (kolagena) i formiranje krvnih žila (angiogeneza) (81) . Druga znanstvena istraživanja, na modelu cijeljenja tetive, povezuju pozitivne učinke BPC 157 s aktivacijom staničnog signalnog puta fokalne athezivne 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 (80)(149). 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, (60)(61)(73)(90)(115)(121)(125)(150) izravnu zaštitu endotela (53)(123)(151), učinak na NO sustav, koji uključuje protudjelovanje na pretjeranu ekspresiju endotelina (62) te ulogu u interakciji s eNOS-ekspresijom, osobito viđenu u procesu cijeljenja vanjskih fistula(63)(64)(112). Pozitivan učinak, koji BPC 157 ostvaruje na različita tkiva, tijekom procesa cijeljenja je i protuupalni i sastoji se od sljedećeg: povećava aktivnost makrofaga (55), smanjuje razinu mijeloperoksidaze (MPO) u serumu i inflamiranim tkivima (56) te smanjuje broj upalnih stanica, leukotriena B4 (LTB4) i tromboksana B2 (TXB2)(49)(50)(51)(52)(53).

Prema svemu spomenutom, a jasno vidljivom i ovom studijom, za cijeljenje mišićno-tetivnog spoja zaslužan je BPC 157 i njegov utjecaj na različita tkiva, a u ovom slučaju prvenstveno na tetivu i mišić. Na mjestu mišićno tetivne disekcije, komparabilno na kontrolu, stanje je s relativno manje upale gdje prevladavaju monociti, a granulociti su u deficitu, postoje dobri uvjeti za zacjeljenje. S tetivne strane retikulinska vlakna su gušća i pravilnije raspoređena, povećan je broj fibroblasta, a urednija distribucija brojnijih kolagenih vlakna, koja slijede retikulinsku mrežu vlakana pružaju se prema mišićnoj strani. S druge strane postoji regeneracija miofibrila kao ostova citostrukture koja pak stvara podlogu za nastajanje mišićnih vlaknaca. Brza reparacija prijeći stvaranje vezivnog tkiva koje je daleko više prisutno u zoni cijeljenja u kontrolnim skupinama. 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 (80)(149) i time potvrditi njegov pozitivni utjecaj i na cijeljenje mišićno-tetivne svez što će zasigurno imati svoje mjesto u budućoj terapijskoj primjeni kod cijeljenja mišića, tetiva i njihovog spoja.



## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i dokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški učinjenog prekida mišićno-tetivne sveze u štakora. Slijedom tih rezultata zaključuje se:

1. Dovodi do poboljšanja što se očituje na makroskopskoj i mikroskopskoj razini te tokom funkcionalnih i biomehaničkih testiranja
2. Učinak peptida BPC 157 se javlja prilikom primjene ng i  $\mu\text{g}$  doza bez statistički značajne razlike.
3. Njegov učinak vidljiv je u teškim uvjetima na modelu bez refiksacije razdvojenog tkiva i imobilizacije tretiranog ekstremiteta
4. Ovaj pozitivan rezultat može predstavljati dobar temelj za daljnja laboratorijska istraživanja i prelazak na kliničke studije.

## 7. POPIS LITERATURE

1. 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.
2. Stewart CEH, Rittweger J. Adaptive processes in skeletal muscle: Molecular regulators and genetic influences. Vol. 6, Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions. 2006; 6(1):73-86.
3. Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. Myology. B. Engel AG F-AC, editor. New York: McGraw-Hill; 1994. 97-118.
4. Kvist M, Józsa L, Järvinen M, Kvist H. Fine Structural Alterations in Chronic Achilles Paratenonitis in Athletes. Pathol Res Pract. 1985;180(4):416–23.
5. Vailas a C, Tipton CM, Laughlin HL, Tchong TK, Matthes RD. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. J Appl Physiol. 1978;44(4):542–6.
6. Józsa L, Bálint J, Réffy A, Demel Z. Histochemical and ultrastructural study of adult human tendon. Acta Histochem. 1979;65:250–7.
7. Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. Cells Tissues Organs. 1991;142(4):306–12.
8. O'Brien M. Functional anatomy and physiology of tendons. Clin Sports Med. 1992;11(3):505–20.
9. Åström M. Laser Doppler flowmetry in the assessment of tendon blood flow. Scand J Med Sci Sports. 2000;10:365–7.
10. Fitzgerald MJT. Neuroanatomy: basic and clinical. 2nd ed. Philadelphia: Balliere Tindall; 1992.
11. Kannus P, Jozsa L, Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kvist M, Natri A, et al. Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. Histochem J. 1998;30(11):799–810.
12. Tidball JG. Assembly of myotendinous junctions in the chick embryo: Deposition of P68 is an early event in myotendinous junction formation. Dev Biol. 1994;163(2):447–56.
13. Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. J Cell Biol. 1991;115(2):411–21.
14. Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg UT, Schittny J, et al.  $\beta$ 1

- integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. Vol. 4, *Developmental Cell*. 2003;4(5):673–85.
15. Mayer U. Integrins: Redundant or important players in skeletal muscle? Vol. 278, *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(17):14587–90.
  16. Law DJ, Tidball JG. Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in pre necrotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am J Pathol*. 1993;142(5):1513–23.
  17. Miosge N, Klenczar C, Herken R, Willem M, Mayer U. Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest*. 1999;79(12):1591–9.
  18. Curzi D, Ambrogini P, Falcieri E, Burattini S. Morphogenesis of rat myotendinous junction. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2013;3(4):275–80.
  19. Curzi D, Salucci S, Marini M, Esposito F, Agnello L, Veicsteinas A, et al. How physical exercise changes rat myotendinous junctions: An ultrastructural study. *Eur J Histochem*. 2012;56(2):117–22.
  20. Kannus P, Jozsa L, Kvist M, Lehto M, Jarvinen M. The effect of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. *Acta Physiol Scand*. 1992;144(3):387–94.
  21. Spierts II, Akster H, Vos II, Osse J. Local differences in myotendinous junctions in axial muscle fibres of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Exp Biol*. 1996;199(Pt):825–33.
  22. Lichtwark GA, Bougoulias K, Wilson AM. Muscle fascicle and series elastic element length changes along the length of the human gastrocnemius during walking and running. *J Biomech*. 2007;40(1):157–64.
  23. Katz B, Miledi R. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol*. 1967;189(3):535–44.
  24. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000;80(2):853–924.
  25. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745–64.
  26. Lehto MU, Jarvinen MJ. Muscle injuries, their healing process and treatment. *Ann Chir Gynaecol*. 1991;80(2):102–8.
  27. Curzi D, Sartini S, Guescini M, Lattanzi D, Di Palma M, Ambrogini P, et al. Effect of different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. *PLoS One*. 2016; 23;11(6).

28. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Day CS, Bosch P, Buranapanitkit B, Moreland MS, et al. Biologic intervention in muscle healing and regeneration. *Sports Med Arthrosc.* 1998;6(2):95–102.
29. Best TM, Fiebig R, Corr DT, Brickson S, Ji L. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J Appl Physiol.* 1999;87(1):74–82.
30. Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2000;11(2):251–66.
31. Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G. Overuse tendon injuries: Basic science and classification. *Oper Tech Sports Med.* 1997;5(3):110–7.
32. Bestwick CS, Maffulli N. Reactive Oxygen Species and Tendon Problems: Review and Hypothesis. *Sports Med Arthrosc.* 2000;8(1).
33. Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J Exp Biol.* 1997;200:1703–8.
34. Skutek M, Van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: Activation of JNK and modulation of apoptosis. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2003;11(2):122–9.
35. Oakes BW. Tissue healing and repair: tendons and ligaments. *Rehabilita.* WR F, editor. Oxford, UK: Blackwell Science; 2003;56-98.
36. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med.* 1999;27(2):222–9.
37. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. Vol. 16, *Endocrine Reviews.* 1995;16:3–34.
38. Coleman ME, Demayo F, Kuo Chang Yin, Heung Man Lee, Geske R, Montgomery C, et al. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1995;270(20):12109–16.
39. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro a, Rosenthal N, Sweeney HL. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15603–7.
40. Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve.* 2000;23(2):239–45.
41. Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. The role of

- leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):815–22.
42. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: Potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell*. 1998;2(5):549–58.
  43. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol*. 1994;144(2):221–6.
  44. 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.
  45. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, et al. BPC 157's effect on healing. In: *Journal of Physiology Paris*. 1997;91(3-5):173-8.
  46. Veljaca M, Chan K GA. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-15 in human gastric juice. *Gastroenterology*. 1995;108(A):761.
  47. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Ž, Ručman R, Petek M, Jagić 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.
  48. 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.
  49. 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.
  50. 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.
  51. 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.
  52. 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.
  53. 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):1121–5.
54. 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.
  55. 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.
  56. Orsolich N, Seiwerth S SP. BPC 157 enhances function of immunological effector cells in mice. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(2):69.
  57. Turkovic B, Sikiric P SS et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology*. 2006;126:287.
  58. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*. 1999;92:164–9.
  59. 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.
  60. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z 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;332:23–33.
  61. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romić Z et al. 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.
  62. 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.
  63. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I et al. 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.
  64. 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.
65. Klicek R., Sever M., Radic B et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocolocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci.* 2008;108:7–17.
  66. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujić D, Drmic D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur J Pharmacol.* 2013;701(1–3):203–12.
  67. 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.
  68. 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. In: *Journal of Physiology Paris.* 1997;91(3-5):139-49.
  69. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, et al. Inhibition of methyl digoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: A relation with NO-system. *Regul Pept.* 2009;156(1–3):83–9.
  70. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarevic Z et al. The beneficial effect of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci.* 1994;54:63–8.
  71. Sikirić P, 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.
  72. 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.
  73. 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.
  74. 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.
75. 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.
  76. 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.
  77. 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.
  78. 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.
  79. 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.
  80. 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.
  81. 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.
  82. Burridge K. Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between The Extracellular Matrix And The Cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1988;4:487-525.
  83. 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.
  84. Braddock M. The transcription factor Egr-1: A potential drug in wound healing and tissue repair. *Annals of Medicine.* 2001;33(5):313-8.
  85. Silverman ES, Collins T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *American Journal of Pathology.* 1999;154(3):665–70.
  86. 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.



87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. Krackow KA, Thomas SC JL. A new stitch for ligament-tendon fixation. Brief note. A new Stitch ligament-tendon Fixat Br note. 1986;68:764–6.
94. Kim HJ, Na JI, Min BW, Na JY, Lee KH, Lee JH, et al. Evaluation of protein expression in housekeeping genes across multiple tissues in rats. *Korean J Pathol*. 2014; 48(3):193-200.
95. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
96. Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft*. 1879;12(1):426–8.
97. Stanec S. Rana i cijeljenje rane. *Kirurgija*. Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z TI i sur, editor. Zagreb: Naklada Ljevak; 2007;197-212.
98. Ethridge RT, Leong M PL. Wound Healing. In: Townsend C.M, Beauchamp R.D, Evers B.M MKL, editor. *Sabiston Textbook of Surgery – The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 18ed ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.191–216.
99. Sikirić P, Petek M, Ručman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, et al. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection

- hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol - Paris*. 1993;87(5):313–27.
100. Bedekovic V, Mise S, Anic T, Staresinic M, Gjurasin M, Kopljar M, et al. Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacol*. 2003;477(1):73–80.
  101. Kalogjera L, Ries M, Baudoin T, Ferencic Z, Trotic R, Pegan B. Dose-dependent protective effect of BPC 157 on capsaicin-induced rhinitis in rats. In: *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 1997;254 Suppl 1:9-11.
  102. Szabo S, Kusstatscher S, Sakoulas G, Sandor Z, Vincze Á, Jadus M. Growth factors: New “endogenous drugs” for ulcer healing. *Scand J Gastroenterol*. 1995;30(S210):15–8.
  103. Szabo S, Deng X, Tolstanova G, Khomenko T, Paunovic B, Chen L, et al. Angiogenic and anti-angiogenic therapy for gastrointestinal ulcers: New challenges for rational therapeutic predictions and drug design. *Curr Pharm Des*. 2011;17(16):1633–42.
  104. Deng X, Szabo S, Khomenko T, Jadus MR, Yoshida M. Gene therapy with adenoviral plasmids or naked DNA of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor accelerates healing of duodenal ulcer in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(3):982–8.
  105. Radeljak S, Seiwert S SP. BPC 157 inhibits cell growth and VEGF signalling via the MAPK kinase pathway in the human melanoma cell line. *Melanoma Res*. 2004;14(A):14–5.
  106. Pereira PM, Bines JE. New growth factor therapies aimed at improving intestinal adaptation in short bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* . 2006;21(6):932–40.
  107. Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL, Biordi L, Millimaggi D, Muzi P, et al. Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost*. 2005;93(5):964–75.
  108. Drucker DJ. Gut adaptation and the glucagon-like peptides. Vol. 50, *Gut*. 2002;50:428–435.
  109. Fujita I, Kiyama T, Mizutani T, Okuda T, Yoshiyuki T, Tokunaga A, et al. Factor XIII therapy of anastomotic leak, and circulating growth factors. *J Nihon Med Sch = Nihon Ika Daigaku zasshi*. 2006;73:18–23.
  110. Sikiric P, Seiwert S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, et al. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. *Burns*. 2003;29(4):323–34.

111. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns*. 2001;27(8):817–27.
112. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, Jukic I, Radic B, Pevec D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today*. 2008;38(8):716–25.
113. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, et al. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept*. 2010;160(1–3):33–41.
114. Tudor M, Jandric I, Marovic A, Gjurasin M, Perovic D, Radic B, et al. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul Pept*. 2010;160(1–3):26–32.
115. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci*. 2009;54(10):2070–83.
116. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Chronic cytoprotection: Pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. In: *Journal of Physiology Paris*. 2001;95(1–6):295-301.
117. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, et al. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci*. 1996;41(8):1604–14.
118. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Balen I, Aralica G, Gjurasin M, et al. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. In: *Journal of Physiology Paris*. 2001;95(1–6):261–70.
119. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut*. 2003;51(3):309.
120. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M et al. Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL 14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2005;128:584.

121. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today*. 2007;37:768–77.
122. Bilic I, Zoricic I, Anic T et al. 108 Bilic. *Life Sci*, ,9;68(16). 2001;68(16):1905–12.
123. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko I, Seiwerth S, et al. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60 Suppl 7:161–5.
124. PEACOCK EE. A study of the circulation in normal tendons and healing grafts. *Ann Surg*. 1959;149(3):415–28.
125. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwerth S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60 Suppl 7:191–6.
126. Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K ichi, Sakamoto H, Fujimoto T, et al. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *J Shoulder Elb Surg*. 2009;18(3):391–8.
127. Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, Sakiyama-Elbert S, Harwood FL, Zampiakos E, et al. Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *J Orthop Res*. 2009;27(9):1209–15.
128. Tsuzaki M, Brigman BE, Yamamoto J, Lawrence WT, Simmons JG, Mohapatra NK, et al. Insulin-like growth factor-I is expressed by avian flexor tendon cells. *J Orthop Res*. 2000;18(4):546–56.
129. Aspenberg P, Forslund C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop Scand*. 1999;70(1):51–4.
130. Virag JAI, Rolle ML, Reece J, Hardouin S, Feigl EO, Murry CE. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: Effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am J Pathol*. 2007;171(5):1431–40.
131. Shin SY, Paik DJ. Expression of four growth factors in recessed extraocular muscles of rabbits. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2006;37(2):129–37.
132. Mehiri SN, Barreiro E, Hayot M, Voyer M, Comtois AS, Grassino AE, et al. Time-based gene expression programme following diaphragm injury in a rat model. *Eur Respir J*. 2005;25(3):422–30.
133. Pallua N, Ulrich D. Expression of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 in patients with fasciocutaneous and muscle flaps. *Plast Reconstr*

- Surg. 2003;111(1):79–82.
134. Kivelä R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H. Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol.* 2008;7:13.
  135. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebille A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol.* 1996;70(1):37–44.
  136. Gustafsson T, Kraus WE. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci.* 2001;6:D75-89.
  137. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Jt Surg - Ser B.* 2000;82(1):131–7.
  138. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, et al. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant.* 1998;7(6):585–98.
  139. Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med.* 2005;33(1):43–51.
  140. Bocci G, Danesi R, Benelli U, Innocenti F, Di Paolo A, Fogli S, et al. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43(3):205–12.
  141. Mihovil I, Radic B, Brcic I et al. Beneficial effect of pentadecapeptide BPC 157 on denervated muscle in rats. *Myology.* 2008;243:26–30.
  142. Pevec D, Novinscak T, Brcic L, Sipos K, Jukic I, Staresinic M, et al. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit.* 2010;16(3):81-88.
  143. Thomas CK, Zijdwind I. Fatigue of muscles weakened by death of motoneurons. Vol. 33, *Muscle and Nerve.* 2006;33(1):21-41.
  144. Korchounov A, Meyer MF, Krasnianski M. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. Vol. 117, *Journal of Neural Transmission.* 2010;117(12):1359–69.
  145. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Marovic A, Perovic D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: The effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol.* 1999;379(1):19–31.

146. Jelovac N, Sikirić P, Ručman R, Petek M, Perović D, Konjevoda P, et al. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry*. 1998;43(7):511–9.
147. Sotoyama H, Zheng Y, Iwakura Y, Mizuno M, Aizawa M, Shcherbakova K, et al. Pallidal hyperdopaminergic innervation underlying d2 receptor-dependent behavioral deficits in the schizophrenia animal model established by EGF. *PLoS One*. 2011;6(10).
148. Tohyama Y, Sikirić P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain:  $\alpha$ -Methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Sci*. 2004;76(3):345–57.
149. Chang CH, Tsai WC, Hsu YH, Pang JHS. Pentadecapeptide bpc 157 enhances the growth hormone receptor expression in tendon fibroblasts. *Molecules*. 2014;19(11):19066–77.
150. Bilic M, Bumber Z, Blagaic AB, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P. The stable gastric pentadecapeptide BPC 157, given locally, improves CO2laser healing in mice. *Burns*. 2005;31(3):310–5.
151. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, Hrelec M, Kolenc D, Radic B, et al. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb Res*. 2012;129(5):652–9.

## 8. ŽIVOTOPIS

Mladen Japjec rođen je u Zagrebu 31.12.1978. g. Nakon završene osnovne škole, 1993. g. krenuo je u srednjoškolsko obrazovanje u XI.Gimnaziju u Zagrebu. Tijekom školovanja odlikovao se dobrim poznavanjem prirodnih predmeta te je u više navrata sudjelovao na gradskim i županijskim natjecanjima iz kemije, fizike i matematike. Nakon odličnog uspjeha 1997.g. školovanje je nastavio na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Studij je završio u roku i diplomirao 2003.g. Nakon pripravničkog staža provedenog u OB Sveti Duh u Zagrebu 2004.g. položio je stručni ispit i stekao pravo za samostalan rad. Prvo radno iskustvo imao je početkom 2005. g. kao liječnik u službi hitne pomoći u DZ Novska. Iste godine kreće na specijalizaciju iz opće kirurgije u KB Merkur u Zagrebu, a 2009. polaže specijalistički ispit. Tokom specijalizacije pokazuje interes za traumatologiju tako da je i nastavak obrazovanja usmjeren u tom smjeru. 2013.g. završava subspecijalizaciju iz traumatologije, a od tada radi na Zavodu za Opću i sportsku traumatologiju KB Merkur.

Tokom cijelog svog stručnog obrazovanja vezan je uz sport. Od 2005. g. je licencirani liječnik Hrvatskog nogometnog saveza i sudjeluje u radu medicinskih ekipa više nogometnih klubova. Od 2005-2010.g. voditelj je liječničkog tima NK Hrvatski dragovoljac, Zagreb, a od 2011-2014 član medicinskog tima NK Lokomotive.

U sklopu trajnog usavršavanja 2008.g. upisao je znanstveni postdiplomski doktorski studij na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Također kao znanstveni suradnik aktivno sudjeluje u provođenju nastave u matičnoj ustanovi u sklopu malih izbornih predmeta Medicinskog fakulteta pod mentorstvom prof.dr.B.Šebečića.

Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog kirurškog društva, Hrvatskog traumatološkog društva i hrvatskog ogranka međunarodne traumatološke organizacije AO. Tokom svoje stručne edukacije 2012.g. boravio je na dvomjesečnom obrazovanju u Sveučilišnoj bolnici u Ljubljani te od 2008-2015 u više navrata na pojedinačnim tjednim tečajevima na Anatomskom institutu u Grazu, Austrija i AO edukacijskom centru u Davosu, Švicarska. Završivši nastavnički tečaj AO-a u Budimpešti, Mađarska 2011.g. stekao je zvanje nastavnika i postao je dio hrvatskog AO edukacijskog tima koji godišnje organizira međunarodne traumatološke tečajeve u Zagrebu.

Privatno je sretan suprug i otac troje djece.