

Učinak pentadekapeptida BPC 157 na plućno srce u štakora inducirano monokrotalinom

Udovičić, Mario

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:362090>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mario Udovičić

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 na
plućno srce u štakora inducirano
monokrotalinom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mario Udovičić

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 na
plućno srce u štakora inducirano
monokrotalinom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

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

Voditelji rada: prof. dr. sc. Sven Seiwertth i prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Najiskrenije zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Svenu Seiwertthu i prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, svojim prijateljima i kolegama dr. sc. Marku Severu, dr. sc. Ivanu Barišiću, dr. sc. Mislavu Čavki, dr. Lovri Kavuru, dr. Kristini Lončarić i dr. Boži Radiću na svesrdnoj pomoći, potpori i savjetima tijekom izrade ovog rada, te djelatnicima histološkog laboratorija Zavoda za patologiju i djelatnicima Zavoda za farmakologiju koji su izradili histološke preparate te vodili brigu o eksperimentalnim životinjama.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. POVIJESNI PREGLED.....	1
1.2. PLUĆNA HIPERTENZIJA – DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA	2
1.3. PATOFIZIOLOGIJA I DIJAGNOSTIKA PLUĆNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE	5
1.4. TERAPIJA PLUĆNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE	13
1.4.1. Antagonisti endotelinskih receptora	14
1.4.2. Inhibitori fosfodiesteraze 5 i NO sustav.....	15
1.4.3. Prostaciklini.....	16
1.4.4. Ostali terapijski pristupi i eksperimentalne terapije	17
1.5. PENTADEKAPEPTID BPC 157.....	18
1.5.1. Pentadekapeptid BPC 157 u kardiologiji	23
1.6. MODELI PLUĆNE HIPERTENZIJE	27
1.6.1. Model plućne hipertenzije izazvan monokrotalinom	27
2. HIPOTEZA	31
3. CILJEVI RADA.....	32
3.1. OPĆI CILJ	32
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI	32
4. METODE.....	33
4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	33
4.2. LIJEKOVI.....	33
4.3. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL.....	34
4.3.1. Klinički izgled životinja	37
4.3.2. Elektrokardiogram.....	38
4.3.3. Ehokardiografija	39
4.3.4. Patohistologija.....	41
4.3.5. Statistika	43
5. REZULTATI	44
5.1. KLINIČKA PREZENTACIJA	44
5.2. ELEKTROKARDIOGRAM	51

5.3. EHOKARDIOGRAFIJA.....	55
5.4. PATOHISTOLOGIJA.....	59
6. RASPRAVA	64
7. ZAKLJUČAK	71
8. SAŽETAK.....	72
9. SUMMARY.....	73
10. POPIS LITERATURE	74
11. ŽIVOTOPIS.....	111

1. UVOD

1.1. POVIJESNI PREGLED

Moderno razdoblje kardiopulmonalne medicine započinje oko 1940. godine s Courandom i Richardsom kao začetnicima desnostrane kateterizacije srca, zbog čega su zajedno s Forssmannom 1965. dobili Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju (1). Kateterizacija desnog srca je od polovice 20. stoljeća omogućila izravno mjerenje povišenih tlakova u desnom srcu te je postalo moguće dovesti ih u vezu s cijelim nizom do tada opisanih promjena na srcu i plućnom krvožilju. Prvi opis plućne hipertenzije i plućnog srca potječe iz godine 1865, kada je Julius Klob, profesor patološke anatomije u Beču objavio nalaz obdukcije jednog 59-godišnjeg bolesnika koji je prije smrti razvio znakove perifernih edema, zaduhe i cijanoze. Umjesto očekivane kardijalne patologije, Klob je našao neobično suženje bifurkacije plućne arterije s lokaliziranom arteriosklerozom (2). Na ovo se izvješće 1891. godine nadovezao ugledni njemački liječnik i kliničar Ernst von Romberg, kada je na obdukciji 24-godišnjeg bolesnika s desnostranim srčanim zatajenjem, našao sličan nalaz kao i Klob (3). Potom je od kasnog 19. stoljeća sve do sredine 20. objavljen cijeli niz kliničko-patoloških izvješća ovoga sindroma koji je uključivao karakteristične opstruktivne lezije u malim plućnim arterijama s posljedičnom hipertrofijom desne klijetke bez jasnog uzroka (4). Godine 1951. David Dresdale je u svom izvješću prvi uporabio izraz primarna plućna hipertenzija (5) za stanje koje se danas naziva idiopatskom plućnom arterijskom hipertenzijom (6).

1.2. PLUĆNA HIPERTENZIJA – DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA

Svjetska zdravstvena organizacija definira plućno srce kao hipertrofiju desne klijetke nastalu kao posljedicu bolesti koja mijenja funkciju i/ili strukturu pluća (7). Ova definicija jest u biti patološka te je od strane kliničara predlagana zamjena pojma „hipertrofija“ s „promjenom strukture i funkcije desne klijetke“. No, budući da je plućna hipertenzija (PH) „conditio sine qua non“ za nastanak plućnog srca (8), najbolja definicija prema suvremenom shvaćanju jest: PH proizašla iz bolesti koje zahvaćaju strukturu i/ili funkciju pluća; PH rezultira povećanjem desne klijetke (hipertrofija i dilatacija) te može nakon nekog vremena dovesti do desnostranog srčanog popuštanja (9). U plućno srce se ne ubrajaju hipertrofije desne klijetke nastale uslijed primarnih bolesti lijeve klijetke ili uslijed prirođenih srčanih greški i posljedične recirkulacije.

Klasifikacija PH Svjetske zdravstvene organizacije, koja je danas u uporabi, zadnji je put revidirana 2013. godine (Tablica 1) (6, 10) prihvaćena je od strane Europskog kardiološkog društva (11, 12), te dijeli PH u pet etioloških skupina: 1. plućna arterijska hipertenzija, 2. plućna venska hipertenzija (uslijed poremećaja lijevog srca), 3. PH u sklopu poremećaja dišnog sustava i/ili hipoksemije, 4. PH izazvana kroničnom trombotskom i/ili embolijskom bolešću i 5. koja uključuje ostale. PH je definirana kao prisutnost srednjeg tlaka u plućnoj arteriji (mPAP) > 25 mm Hg. Plućno je srce česta bolest srca, što je dobrim dijelom i posljedica njene povezanosti s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću, koja je danas jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta (13).

Tablica 1 Revidirana klasifikacija plućne hipertenzije s 5. Svjetskog simpozija o plućnoj hipertenziji u Nizzi 2013.

1. PLUĆNA ARTERIJSKA HIPERTENZIJA (PAH)	
1.1.	Idiopatska
1.2.	Nasljedna <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. <i>KMPR2 (receptor koštanog morfogenetskog proteina)</i> 1.2.2. <i>ALK 1 (gen aktivne receptor-slične kinaze 1)</i> 1.2.3. <i>Nepoznata</i>
1.3.	Inducirana lijekovima i toksinima
1.4.	Povezana s drugim oboljenjima: <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. <i>Bolestima vezivnog tkiva</i> 1.4.2. <i>HIV infekcijom</i> 1.4.3. <i>Portalnom hipertenzijom</i> 1.4.4. <i>Kongenitalnom srčanom bolešću</i> 1.4.5. <i>Šistostomijazom</i> 1.4.6. <i>Kroničnom hemolitičkom anemijom</i>
1'	Plućna veno-okluzivna bolest i/ili plućna kapilarna hemangiomatoza
1''	Perzistirajuća plućna hipertenzija novorođenčeta
2. PLUĆNA HIPERTENZIJA ZBOG BOLESTI LIJEVOG SRCA	
2.1.	Sistolická disfunkcija
2.2.	Dijastolička disfunkcija
2.3.	Valvularna bolest
3. PLUĆNA HIPERTENZIJA ZBOG PLUĆNE BOLESTI I/ILI HIPOKSEMIJE	
3.1.	Kronična opstruktivna plućna bolest
3.2.	Intersticijska plućna bolest
3.3.	Druge plućne bolesti s miješanim restriktivnim i opstruktivnim obrascem
3.4.	Poremećaji disanja uslijed spavanja
3.5.	Poremećaji alveolarne hipoventilacije
3.6.	Kronično izlaganje većim nadmorskim visinama
3.7.	Razvojne abnormalnosti
4. KRONIČNA TROMBOEMBOLIJSKA PLUĆNA HIPERTENZIJA	
4.1.	Kronična tromboembolijska plućna hipertenzija
4.2.	Druge plućne arterijske opstrukcije
5. PLUĆNA HIPERTENZIJA S NEJASNIM I/ILI MULTIFAKTORIJALNIM MEHANIZMIMA	
5.1.	Hematološki poremećaji: mijeloproliferativne bolesti, splenektomija
5.2.	Sustavne bolesti: sarkoidoza, histiocitoza, neurofibromatoza, vaskulitis
5.3.	Metabolički poremećaji: bolest odlaganja glikogena, poremećaji štitne žlijezde
5.4.	Druge: opstrukcije tumorom, fibrozni medijastinitis, kronično bubrežno zatajivanje na dijalizi

Iako bilo koji oblik PH pridonosi morbiditetu i mortalitetu u bolesnika, plućna arterijska hipertenzija (PAH) (skupina 1) posebno je težak i progresivan oblik koji često dovodi do desnostranog srčanog zatajivanja i prerane smrti (14-17). PAH je rijetka i teška kronična bolest krvnih žila pluća karakterizirana progresivnim porastom vaskularne rezistencije (18). Neliječena uzrokuje zatajenje desnog srca i preranu smrt (11), a osim transplantacije pluća, ne postoji kauzalno liječenje (19, 20). PAH se klasificira kao idiopatska (iPAH) ili uz neka druga stanja, poput one u bolestima vezivnog tkiva, kongenitalnoj srčanoj bolesti ili u bolesnika s HIV-infekcijom. Prosječno preživljenje neliječenog uznapredovalog iPAH-a prema podacima iz literature iznosi 2,8 godina nakon postavljanja dijagnoze, što je usporedivo s prognozom uznapredovalih malignih bolesti (18, 21). Kada se postavlja dijagnoza, u bolesnika mora postojati cijeli niz prethodno definiranih kliničkih parametara, koji nadilaze puko povišenje plućnog arterijskog tlaka. Stanja koja potpadaju pod PAH dijele zajedničke značajke poput prekapilarne PH, hipertenzivnu plućnu arteriopatiju (obično s tzv. pleksiformnim lezijama), spori klinički početak i kronični tijek (u godinama), karakteriziran progresivnim pogoršanjem (18).

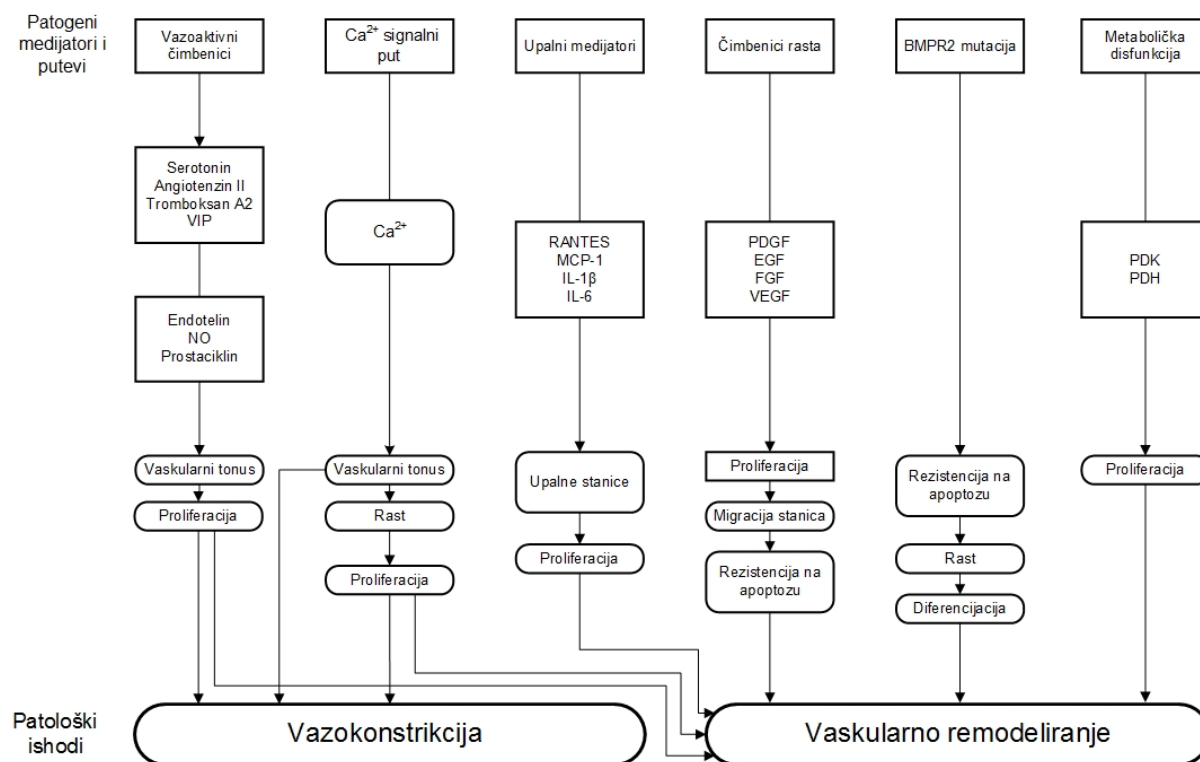
Bolesnici se sukladno NYHA (*New York Heart Association*) klasifikaciji razvrstavaju u četiri funkcionalna stadija prema kliničkom stanju, odnosno stupnju bolesti (Tablica 2) (12). Ovakva je procjena subjektivna i ne bi trebala biti jedino mjerilo za donošenje odluka o liječenju.

Tablica 2 Funkcionalni stadiji plućne hipertenzije

NYHA Stadij	Opis
I	Bolesnici s plućnom hipertenzijom u kojih nema ograničenja uobičajenih fizičkih aktivnosti. Obična fizička aktivnost ne uzrokuje otežano disanje (dispneju), umor, bol u prsima ili presinkopalno stanje.
II	Bolesnici s plućnom hipertenzijom koji imaju blago ograničenje fizičke aktivnosti. Bez smetnji u mirovanju, ali normalna fizička aktivnost uzrokuje otežano disanje, umor, bol u prsima ili presinkopalno stanje.
III	Bolesnici s plućnom hipertenzijom i značajnim ograničenjem fizičke aktivnosti. Bez smetnji u mirovanju, ali fizička aktivnost nižeg stupnja od uobičajene uzrokuje otežano disanje, umor, bol u prsima ili presinkopalno stanje.
IV	Bolesnici s plućnom hipertenzijom koji ne mogu izvršiti nikakvu fizičku aktivnost bez simptoma i imaju znakove zatajivanja desnog srca. Otežano disanje (dispneja) i/ili umor mogu biti prisutni i u mirovanju, a smetnje se pojačavaju u bilo kakvoj fizičkoj aktivnosti.

1.3. PATOFIZIOLOGIJA I DIJAGNOSTIKA PLUĆNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE

Patogeneza povećanog plućnog arterijskog tlaka i plućne vaskularne rezistencije (PVR) u PAH se općenito pripisuje različitim mehanizmima (Slika 1) (22). Ono što razlikuje PAH od ostalih oblika PH je težina arteriopatije (16). Za podgrupe PAH-a karakterističan je nastanak plućne arterijske vazokonstrikcije te pregradnja u plućnim arterijama.



Slika 1. Utvrđeni i prednijevani etiopatogenetski putevi u patogenezi plućne arterijske hipertenzije NO: dušikov monoksid, RANTES: regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted, MCP: monocyte chemoattractant protein, IL: Interleukin, PDGF: platelet-derived growth factor; EGF: epidermal growth factor, FGF: fibroblast growth factor, VEGF: vascular epidermal growth factor, PDK: piruvat dehidrogenaza kinaza, PDH: piruvat dehidrogenaza. Prema (22)

Plućno vaskularno remodeliranje zahvaća sva tri sloja plućnih arterija: endotelne stanice intime, glatko mišićne stanice tunike medije i fibroblaste tunike adventicije. Također dolazi do povećanog odlaganja proteina ekstracelularnog matriksa kao što su kolagen, elastin i fibronektin (23). Histološki dolazi do muskularizacije prethodno nemuskulariziranih perifernih arterija. Pretpostavlja se da se periciti diferenciraju u glatke mišićne stanice te proliferiraju (24), no neki smatraju da te stanice nastaju iz matičnih stanica (25), fibrocita (26) ili endotelnih stanica (27). Tipična je značajka PAH-a hipertrofija medije, koja nastaje kako u velikim plućnim arterijama, tako i u malim distalnim arterijama (28).

Kasnije uznapredovale faze uključuju formiranje kompleksnih staničnih i fibroznih neointimalnih i pleksiformnih lezija koje opstruiraju i obliteriraju srednje i male plućne arterije i arteriole, čime protok krvi kroz pluća biva ograničen (29). Na osnovu promatranja progresivne intimalne fibroze i formiranja pleksiformnih lezija u djece i odraslih s PAH-om, pojedini autori smatraju da PAH ima ranu reverzibilnu fazu i kasnu ireverzibilnu progresivnu fazu (30). Nadalje, iako neki autori tvrde da su pleksiformne lezije uvijek prisutne, drugi pak smatraju da to ne mora uvijek biti slučaj (31). Smatra se da stanična i fibrotična obliteracija lumena dovodi do oslabljene osjetljivosti na konvencionalne plućne vazodilatatore u većine bolesnika s PAH-om (32, 33). Neki autori naglašavaju heterogenost lezija u PAH-u te smatraju da je nepoznato koja lezija u kojem vaskularnom segmentu najviše doprinosi 80% smanjenju ukupne površine plućnog vaskularnog lumena, koliko se smatra potrebnim za uzrokovanje hipertenzije (34).

Vaskularna opstrukcija nastaje pored vazokonstriktivnog remodeliranja i uslijed vazokonstriktivnih medijatora. Dolazi do poremećaja ravnoteže s jedne strane uslijed smanjene proizvodnje i povećane razgradnje vazodilatacijskih i antiagregacijskih medijatora kao što su prostaglandin I₂ (PGI₂) (35), duškov monoksid (*nitric oxide*, NO) te ciklički gvanozinmonofosfat (cGMP) (36), dok s druge strane dolazi do povećanja stvaranja vazokonstriktivnih medijatora kao što su tromboksan A₂ (35), endotelin-1 (37) i 5-hidroksitriptamin (5-HT) (38), što dovodi do vazokonstrukcije plućnih arterija.

NO ima nisku molekularnu težinu, lipofilan je, brzo reagirajući endogeni slobodni radikal, kojeg u endotelnim stanicama vaskularnog sustava proizvode NO sintaze (NOS) (39). Otkriće NO 1980. godine (40) objasnilo je učinke „relaksirajućeg čimbenika podrijetlom iz endotela“ te je ostanovljeno da je njegov prekursor aminokiselina L-arginin. NO difundira u glatke mišiće gdje aktivira hem gvanilat ciklazu, koja povisuje

unutarstaničnu koncentraciju cGMP-a, koji pak sa svoje strane inducira vazodilataciju preko cijelog niza mehanizama. Dokazano je da bolesnici s kroničnim upalnim bolestima pluća, kojima je kompromitirana vazodilatacijska sposobnost u plućnoj cirkulaciji, imaju snižene vrijednosti endotelne NOS i NO (41).

Istraživanja također ukazuju da primjena NO sprječava vaskularno remodeliranje prekapilarnog žilja koje stvara otpor i time nastanak PH te posljedičnu hipertrofiju desnog srca (42, 43). Ova zbivanja su karakteristična za mnoge plućne vaskularne poremećaje i modulirani su cijelim nizom vazoreaktivnih posrednika podrijetlom iz endotela te ionskim kanalima osjetljivim na kisik (44). Signalni put NO/cGMP je kompenzatorni odgovor koji se suprotstavlja vazokonstrukciji izazvanoj endotelinom i hipoksijom u eksperimentalnih životinja. Tako je pokazano da intravenska primjena L-arginina akutno snižava plućni arterijski tlak u bolesnika s plućnom hipertenzijom povećavajući endogenu proizvodnju NO (45). L-arginin je poboljšao kroničnu plućnu hipertenziju i smanjio plućno vaskularno remodeliranje pojačavajući endogenu proizvodnju NO.

Nadalje, i promjene K^+ i Ca^{2+} -kanala doprinose pojačavanju krvožilnog tonusa, čime se objašnjava nastanak endotelne disfunkcije (46, 47). Smanjena ekspresija K^+ -kanala i povećan utok Ca^{2+} u stanice, dovode do povećanja koncentracije citoplazmatskog Ca^{2+} te kontrakcije i proliferacije glatko mišićnih stanica (48). Zajedno s endotelnom disfunkcijom i suženjima malih plućnih arterija, učestalo je i formiranje tromba, što je uobičajen nalaz u bolesnika s PAH-om (49).

Proliferacija plućnih arterijskih glatko mišićnih stanica je izazvana čimbenicima rasta (GF), što podsjeća na mehanizam nastanka neoplazmi (50). Signalne molekule TGF- β superobitelji, uključivo i BMP obitelj, reguliraju proliferaciju, migraciju i diferencijaciju

stanica. Od genetskih poremećaja koji su povezani s PAH, najčešće su mutacije gena za receptor 2 koštanog morfogenetskog proteina (BMP2) (51). Isto tako, čimbenici rasta iz PDGF obitelji igraju ulogu u nastanku PAH. PDGF stimulira proliferaciju plućnih arterijskih glatko mišićnih stanica (52) te je u životinjskom modelu plućne hipertenzije inducirane MCT-om u štakora već dokazana učinkovitost antagonista PDGF-receptora (50). Nadalje nastanku PAH doprinose i vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) koji također pripada u PDGF obitelj te VEGF receptor 2 (53), fibroblastni GF-2 podrijetlom iz endotelnih stanica (54) i epidermalni GF (55). Čimbenici rasta vežu se za svoje receptore i preko tirozin kinaza utječu na proliferaciju i migraciju glatko mišićnih i endotelnih stanica te aktivaciju upalnih stanica pojačavajući vaskularno remodeliranje (56).

Razmatraju se i mehanički podražaji kao uzrok PAH. Mehanički stimuli poput vlaka i širenja mogu potaknuti i podupirati sintezu proteina ekstracelularnog matriksa (57) te proliferaciju glatkih mišićnih stanica u krvnim žilama (58).

Nadalje, važnu ulogu igraju i upalni procesi te su kod vaskularnog remodeliranja uvijek prisutne i upalne stanice: monociti, makrofazi, dendritičke stanice, T i B limfociti (59). PAH je vezana i s bolestima vezivnog tkiva, koje su sistemske upalne bolesti, npr. sistemska skleroza i sistemski eritemski lupus (60). Postoje forme vezane uz virusne infekcije (HIV, EBV) te parazitske bolesti (šistostomijaza) (61), a opisani su i oblici s cirkulirajućim autoprotutijelima (62). Nakon početnog oštećenja krvnih žila, vaskularne stanice secerniraju citokine i regrutiraju cirkulirajuće upalne stanice. U plazmi bolesnika s PAH-om redovito su povišene vrijednosti koncentracija upalnih citokina interleukin-1 β (IL-1 β) i interleukin-6 (IL-6) (63). Stoga se predmnijeva da u nekim slučajevima upalni okidač (virus, parazit ili sustavna upalna bolest) može poslužiti kao početna ozljeda koja inicira vaskularno remodeliranje.

Patohistološke analize tkiva pluća kao i studije ekspresije gena ukazuju i na važnost oksidativnog stresa u PAH (64). U oksidativnom stresu povećana je proizvodnja oksidanata, među koje se ubraja i NO, dok je smanjena koncentracija antioksidanata poput glutationa i melatonina. Smatra se da je u PAH oksidativni stres izazvan hipoksijom tkiva, koja s jedne strane smanjuje sintezu NO i prostaciklina kao i vazodilatacijski odgovor endotela na NO, dok s druge strane pojačava upalu inducirajući iNOS (65). Općenito NO ima dvojaku ulogu u PAH. S jedne strane dovodi do vazodilatacije plućnih arterija i ima vazoprotektivni učinak, no s druge strane ovisno o stanju u tkivu, može potaknuti stvaranje kisikovih radikala i oštećenje endotela (65). Odlučujući su količina formiranog NO te raspoloživost kofaktora i supstrata. U ljudi ključnu ulogu ima eNOS, koja se normalno sastoji od dva monomera koja su spojena i proizvode NO. U slučaju nedostatka tetrahidrobiopterina ili L-arginina, dolazi do raspada eNOS na monomere, koji tada umjesto NO, počinju proizvoditi O_2^- (66). Zaključno je u bolesnika s PAH dokazano smanjenje eNOS i uslijed toga manja proizvodnja i koncentracija NO te koncentracija prostaciklina, dok su koncentracije endotelina-1 i tromboksana povišene (67). NO ne regulira samo vaskularni tonus, već može smanjiti opseg vaskularnog oštećenja i proliferaciju glatkih mišićnih stanica, dok prekomjerno stvaranje kisikovih radikala iste potpomaže (68).

Danas se smatra da svi prethodno opisani procesi sudjeluju u vaskularnoj pregradnji plućnog krvožilja kod PAH. Remodeliranje krvnih žila dovodi do smanjenja lumena, što zajedno s postojanom konstrikcijom plućnih arterija ima za posljedicu povećanje plućnog vaskularnog otpora. Uslijed nastalog naprezanja dolazi do dodatnog stvaranja ekstracelularnog matriksa, proliferacije glatko mišićnih stanica u stijenkama arterija te fibroblasta, kao i do povećanja intracelularne koncentracije kalcija (23). Desna klijetka na povećano naknadno opterećenje reagira u početku kompenzacijskom hipertrofijom

i blagom dilatacijom. Na desnom srcu, uslijed povišenog tlačnog opterećenja plućne cirkulacije, nastaju promjene remodeliranja miokarda: hipertrofija, fibroza te intersticijska upala (69). U daljnjem tijeku bolesti, međutim, postupno nastaje dekompenzacija i zatajenje desnog srca (70). Smrt u bolesnika s kroničnom PH (uključujući i one s PAH) je rezultat visokog tlačnog opterećenja desne klijetke i u konačnici desnostranog srčanog popuštanja. Danas se smatra da je tlačno opterećenje desne klijetke određeno promjenama rezistencije kao i promjenama dinamične popustljivosti velikih proksimalnih krvnih žila.

Dijagnoza PH i PAH se često postavlja kasno jer su simptomi nespecifični (18). U ranim stadijima bolesti bolesnici su najčešće bez simptoma ili imaju blage netipične simptome. Zaduha u naporu je najčešći simptom koji se javlja gotovo u svih bolesnika, usporedno s napredovanjem bolesti. Ostali česti simptomi su zamor te bol u prsima, dok se nešto rjeđe susreću sinkopa, nesvjestica i palpitacije. Simptomi uznepredovale bolesti uključuju iskašljavanje krvi i periferne edeme. Istovremeno diferencijalna dijagnoza uključuje neka vrlo česta kronična stanja, kao što su: kronična opstruktivna plućna bolest, astma, anemija te lijevostrano srčano popuštanje. Zbog povećanog pobola i smrtnosti izuzetno je značajno što ranije postaviti dijagnozu i započeti liječenje.

Dijagnostika i terapija plućne hipertenzije vodi se preporukama sadržanim u zajedničkim smjernicama Europskog kardiološkog društva i Europskog respiratornog društva, potvrđenih i od Međunarodnog društva za transplantaciju srca i pluća (11).

Kod sumnje na PAH prvi je korak transtorakalni ehokardiografski pregled, jer omogućuje uvid u stanje desnog srca i određivanje plućnog arterijskog tlaka (71, 72).

Njegova je osnovna snaga u tome što omogućava neinvazivnu potvrdu kliničke sumnje u postojanje PH, pri čemu prilično pouzdano definira i njezinu težinu. Ima i prognostičku

dimenziju, a omogućuje evaluaciju učinkovitosti medikamentne terapije (73). Glavno je ograničenje ove metode nepostojanje pojedinačnih dovoljno čvrstih kriterija za sigurno donošenje kliničkih zaključaka. Kod definiranja težine PH, morfološki se analizira proširenje desnih srčanih šupljina te šupljih i jetrenih vena, uz stješnjenje lijevih srčanih šupljina, koje se prilično dobro kvantificira indeksom deformacije lijeve klijetke (71). U analizi hemodinamike i funkcijske sposobnosti desne klijetke, pored brzine, u prvom redu trikuspidne pa pulmonalne regurgitacije, od koristi je i akceleracijsko vrijeme na pulmonalnoj valvuli, kao i oblik Dopplerskog signala na pulmonalnoj valvuli i u gornjoj šupljoj veni (71).

Funkcija desne klijetke najčešće se kvantificira longitudinalnim sistoličkim pomakom trikuspidnog prstena (TAPSE) - analogno ejekcijskoj frakciji desne klijetke. Obzirom da je lako dostupna i reproducibilna, ova je metoda osnova kliničkog pristupa PH, kako za dijagnozu i procjenu težine bolesti, tako i za praćenje liječenja (74).

Pored plućnog arterijskog tlaka (PAP), kod kateterizacije desnog srca mjere se, radi postavljanja dijagnoze PH, i srčani minutni volumen te tlakovi u desnoj klijetki i desnom atriju (RAP). Prognoza bolesnika ovisi o tome koliko desna klijetka može kompenzirati opterećenje uslijed povećanog naknadnog opterećenja (21). Pri tome je RAP vrlo dobar hemodinamski prognostički parametar za bolesnike s PAH-om (75)

Kateterizacija desnog srca i dalje predstavlja zlatni standard u dijagnozi PH, utvrđivanju stupnja težine bolesti i hemodinamskih poremećaja te u testu vazoreaktivnosti plućne cirkulacije, a može se utvrditi i njezina etiologija te dati prognoza (76). Desnostranom kateterizacijom mjere se direktne vrijednosti plućnog kapilarnog tlaka (PCWP) te tlakova u PA desnoj klijetki i pretklijetki (77). Minutni srčani

volumen se određuje najbolje Fick-ovom metodom za što je potrebno izmjeriti saturaciju krvi kisikom iz uzoraka u venskom sustavu (srednja venska saturacija), u plućnoj arteriji te u arterijskoj cirkulaciji. To omogućava izračun vrijednost kardijalnog indeksa (CI) te plućne vaskularne rezistencije (PVR). Desnostranom je kateterizacijom moguće razlučiti tip 2 PH nastalu kao posljedicu bolesti lijeve klijetke s PCWP >15 mmHg. U slučaju potrebe, moguće je učiniti i test vazoreaktivnosti, radi identifikacije potencijalnih bolesnika koji dobro reagiraju na blokatore kalcijevih kanala. Za to se koristi NO, infuzija epoprostenola ili adenzina, a test se smatra pozitivnim kod sniženja srednje vrijednosti PA za >10 mmHg ili apsolutne vrijednosti tlaka u PA < 40 mmHg uz povišenje ili konstantan srčani minutni volumen (11).

1.4. TERAPIJA PLUĆNE ARTERIJSKE HIPERTENZIJE

Do 1990.-ih godina postojale su male terapijske mogućnosti za bolesnike s PAH-om, a vrijeme preživljavanja maksimalno je iznosilo 2-4 godine. Liječenje PAH-a u novijem razdoblju je doživjelo veliki napredak. Ranije usmjereno na bolesnike u terminalnim i uznapredovalim stadijima, danas se primjenjuje i u ranijim stadijima bolesti (18). Terapijski ciljevi liječenja PAH usmjereni su prema smanjenju plućne vaskularne rezistencije i plućnog arterijskog tlaka i time tlačnom rasterećenju desne klijetke kako bi se spriječila progresija bolesti.

Primjena novih lijekova značajno smanjuje simptome, poboljšava kvalitetu života te usporava progresiju bolesti (2, 9-11). Prije uvođenja novih, specifičnih lijekova za liječenje PAH-a korištena je isključivo potporna terapija poput primjene kisika, peroralnih vazodilatatora i antikoagulantnih lijekova kako bi se prevenirale tromboze in situ, a u bolesnika sa znakovima popuštanja desnog srca dodaju se diuretici i digoksin

(3, 12). Takvim načinom liječenja omogućeno je simptomatsko poboljšanje, ali s minimalnim ili bez ikakvog učinka na progresiju bolesti (2).

Zbog vazodilatacijskog učinka od sredine 80-ih godina, liječenje PAH-a započinje se blokatorima kalcijevih kanala (BKK) (19, 78). Ti bolesnici obično imaju odličnu prognozu, no preporučuju se samo u bolesnika s pozitivnim vazoreaktivnim testom, pa je stoga manje od 10% bolesnika prikladno za terapiju BKK (11, 33).

Od selektivnih plućnih vazodilatatora najčešće se koristi kontinuirana kućna primjena kisika. To je djelotvorna terapija koja značajno poboljšava hipoksemiju, snižava povećanu plućnu vaskularnu rezistenciju, produžuje preživljavanje i poboljšava kvalitetu života.

Danas su poznata tri sustava koji moduliraju staničnu proliferaciju i vazokonstrukciju plućnih arterija: endotelinski, prostaciklinski te sustav dušikovog monoksida (NO) (79). Upravo su ta tri sustava glavni terapijski ciljevi u liječenju plućne hipertenzije.

Plućni endotel igra važnu modulatornu ulogu u održavanju niskog bazalnog vaskularnog tonusa otpuštanjem uravnoteženih količina vazodilatatora (uključujući NO i prostaciklin) te vazokonstriktora (endotelin 1). U bolesnika s PH dokazana je neravnoteža u korist otpuštanja vazokonstriktora (80).

1.4.1. Antagonisti endotelinskih receptora

Endotelin-1 (ET-1) vrlo je jaki vazokonstriktor s proliferativnim učinkom na vaskularne glatke mišićne stanice, kojeg secerniraju uglavnom stanice endotela i koji se veže na receptore ET_A i ET_B (81). ET_A se nalaze na vaskularnim glatko mišićnim stanicama, a ET_B na endotelnim i glatko mišićnim stanicama. Hipoksija, slobodni radikali i čimbenici rasta pojačavaju lučenje ET-1 u endotelnim stanicama. Vežanje ET-1 na ET_A i ET_B na

glatko mišićnim stanicama izaziva njihovu proliferaciju te vazokonstrukciju. Vežanje na ET_B na endotelnim stanicama inducira sintezu NO i drugih vazodilatatora, kao i razgradnju ET-1 (82). Trenutno su registrirani selektivni i neselektivni antagonisti ET receptora (ERA). Teoretski bi selektivni ET_A-ERA trebali biti učinkovitiji nego neselektivni ERA, obzirom na ulogu koji fiziološki igraju ET_B receptori, međutim dosadašnje kliničke studije nisu uspjele pokazati takav učinak (83). Stoga, kod izbora lijeka, drugi čimbenici igraju ulogu kao što su interakcije između lijekova, jednostavnost doziranja te nuspojave.

Prvi registrirani neselektivni antagonist endotelinskih receptora je bosentan (Tracleer; Actelion), koji je u prvoj studiji BREATHE-1 pokazao značajno poboljšanje NYHA razreda. Dokazano je i značajno poboljšanje vrijednosti PVR (84), kao i hemodinamike u bolesnika koji boluju od Eisenmengerovog sindroma (85), PAH uzrokovane HIV-om (86) te portopulmonalne hipertenzije (86). Preporučan je u terapiji bolesnika funkcionalnih stadija II i III. U usporedbi s bosentanom, ambrisentan (Volibris; GlaxoSmithKline, Brentford, UK) je oralni selektivni ET_A-ERA s nižom učestalošću jetrene lezije, te je također registriran za primjenu u II, III i IV stadiju. Najnoviji je macitentan, koji je neselektivni ERA (87), s pojačanom učinkovitošću uslijed postojanog vezivanja za receptore i bolje tkivne penetracije (87-89). Sitaksentan, selektivni ERA s umjerenom učinkovitošću povučen je s tržišta 2010. godine zbog pripisanih slučajeva akutnog jetrenog zatajenja (90, 91).

1.4.2. Inhibitori fosfodiesteraze 5 i NO sustav

Fosfodiesteraze (PDE) su enzimi koji razgrađuju druge glasnike poput cGMP-a, od kojih se PDE-5 većinom nalazi u glatko mišićnoj muskulaturi pluća. Pokazano je, međutim, da učinak inhibitora PDE-5 nadilazi onaj direktno apliciranog NO, što

vjerojatno ima veze s činjenicom da inhibitori PDE-5 pojačavaju i NO-neovisne učinke cGMP, kao na primjer one natriuretskih peptida (92). Za PAH su registrirani inhibitori PDE-5 sildenafil, taladafil i varedanfil. Inhibitor fosfodiesteraze sildenafil (Revatio; Pfizer, New York, NY, USA), se zbog svoje učinkovitosti, jednostavnosti uporabe (tablete, koji se primjenjuje 3 puta na dan) te cijene, koristi kao prva linija liječenja. Sildenafil značajno poboljšava simptome te funkcijski kapacitet u bolesnika s plućnom arterijskom hipertenzijom, što se pokazalo u SUPER-1 studiji (93), čiji su učinci postojani i nakon godinu dana uporabe. Produljenje terapije na 3 godine, SUPER-2 studija, pokazala je postojanost učinka te 3-godišnje preživljenje od 79% (94). Ovdje je za spomenuti i riociguat (Adempas, Bayer) koji je aktivator gvanilatciklaze nedavno registriran od strane EMA i FDA za liječenje PAH u II i III stadiju, koji je u studijama PATENT-1 i -2 pokazao značajan i postojan učinak na poboljšanje funkcionalnog stadija, smanjenje PVR-a te produljenje vremena do nastupa kliničkog pogoršanja (95-97).

1.4.3. Prostaciklini

Signalni put prostaglandina I₂ (prostaciklin) važan je u patofiziologiji PAH-a, a u bolesnika s PAH-om njegova je sinteza smanjena (35). PGI₂ većinom proizvode endotelne stanice. Djeluje parakrino s vrlo kratkim poluvremenom života kao potentan plućni vazodilatator (83). Istovremeno pokazuje i jaka antitrombotska, antiproliferativna te imunomodulirajuća svojstva (98, 99). Danas na tržištu postoje različiti stabilni analozi prostaciklina koji su registrirani za liječenje PAH-a. Epoprostenol, s kratkim poluvremenom života manjim od 5 minuta, primjenjuje se u kontinuiranoj infuziji preko centralnog venskog katetera i registriran je za primjenu u stadijima III i IV. Novija

formulacija Veletri (Actelion, Allschwil, Švicarska) koja je stabilna do 24 h, nedavno je registrirana. Osim intravenske i inhalacijske primjene, prostaglandini se mogu primjenjivati i supkutano (trepostinil) te oralnim putem (beraprost). Terprostinil je stabilniji i ima duže poluvrijeme života (do 4 h) te se može primjenjivati supkutano mikroinfuzijskom pumpom, intravenski, peroralno te inhalacijom (100). Iloprost je još jedan stabilniji analog prostaciklina registriran za inhalacijsku primjenu u stadiju III, a beraprost za sada nije registriran u Europskoj uniji (12).

1.4.4. Ostali terapijski pristupi i eksperimentalne terapije

U slučaju pogoršanja bolesti uz jedan od lijekova kojima je započeto liječenje, može se primijeniti i kombinirana terapija dva ili tri lijeka različitih mehanizama djelovanja, ali je stupanj preporuke i razina dokaza u tom slučaju niža (11).

Među tvari koje su također u istraživanju kao potencijalni lijekovi za PAH spadaju i inhibitori tirozin kinaze (npr. imatinib), blokatori serotoninских receptora, vazoaktivni intestinalni peptid te fasudil i statini kao inhibitori Rho signalnog puta (83).

U bolesnika s teškom plućnom hipertenzijom, koji ne reagiraju na navedene terapijske mogućnosti, a klinički se manifestiraju kao NYHA III ili IV, indicirana je transplantacija pluća ili rjeđe transplantacija srca i pluća (11). Unatoč tome, dvije nedavne metaanalize randomiziranih studija usprkos specifičnoj terapiji PAH, pokazale su da su terapijske strategije i dalje nedovoljne, iako je u jednoj metaanalizi pokazano smanjenje mortaliteta (101), on i dalje ostaje neprihvatljivo visok (101, 102).

1.5. PENTADEKAPEPTID BPC 157

Stabilni gastrični pentadekapeptid BPC 157 je dobiven sintezom (Patent Sikirić P i sur, EP0572688) i sastoji se od 15 aminokiselina (Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val), (M.W. 1419, PL 14736) s primarno otkrivenim anti-ulkusnim djelovanjem. Ispitan je i sigurne je primjene u kliničkim studijama upalnih bolesti crijeva i cijeljenja rana, stabilnih je fizikalno-kemijskih osobina u humanom želučanom soku. Do sada nije registrirana toksičnost, LD1 doza se nije mogla postići u studijama toksičnosti. Imunohistokemijskom metodom dokazano je njegovo izvorište u želucu i mozgu. Djelotvoran je i pri vrlo niskim dozama (ng- μ g/kg tjelesne mase), dok pri vrlo visokim dozama ne uzrokuje štetne popratne pojave. Aktivnost pokazuje nakon intravenske, intraperitonealne, intragastrične i lokalne primjene. Karakterizira ga stabilnost i postojanost molekule - inkubacija u ljudskom želučanom soku i vodi ne uzrokuje razgradnju molekule pentadekapeptida BPC 157 niti nakon 24 sata. Suprotno tome, drugi peptidi poput h-EGF i h-TGF postojani su u vodi, ali se u želučanom soku razgrađuju već nakon 15 min.

Sinteza pentadekapeptida provodi se stupnjevitom kondenzacijom pomoću Fmoc zaštićenih aminokiselina. Kondenzacija započinje prvom aminokiselinom, valinom, vezanom uz polimerni nosač (benzildrilaminorezin). Kao vezivajući reagens koristi se diisopropilkarodimid. Svakim stupnjem kondenzacije jedna protektivna Fmoc grupa zamijeni se piperidinom, a jedna se aminokiselina nadoveže. Isti postupak primjenjuje se za svaku sljedeću aminokiselinu dok se sinteza ne završi. Razdvajanje se obavlja pomoću trifluorooctene kiseline/trifluormetansulfonske kiseline/anizola u omjeru 2:17:52. Sirova mješavina pentadekapeptida pročisti se u HPLC stupcu 5 mm i.d., duljine 150 mm, silicaRP-18, s gradijentom elucije u sustavu otapanja: 0,1

trifluorooctena kiselina u vodi/acetoni-trilu. U svim se pokusima koristi pentadekapeptid 99-postotne čistoće (103).

Smatra se da pentadekapeptid BPC 157 ima važnu ulogu u održavanju homeostaze u organizmu, te da je ovaj peptid novi medijator Robertove citoprotekcije (104). Teoretski, prisutnost pentadekapeptida BPC 157 u želučanom soku i njegovo vodstvo u kreiranju korisnih efekata daje tom polipeptidu vodeću ulogu duž gastrointestinalnog trakta i abdomena, kao neuroendokrinog organa u organizaciji odgovora na stres oponašajuće nokse (105, 106). Prema dobro utemeljenoj Selyevoj teoriji stresa u trenucima kada je organizam pogođen stresnim događajem, ovaj pentadekapeptid bi mogao imati fiziološki značaj kao medijator usmjeren protiv prijetećeg fenomena. Općenito, ovo bi trebalo voditi ponovnoj uspostavi homeostaze i/ili prevenciji razvoja lezije i pojačanom zarastanju svakog prisutnog oštećenja. Dokazano je da ovaj sintetizirani pentadekapeptid BPC 157 u učinjenim pokusima nema učinka na mnoge fiziološke parametre (kao što su diureza, krvni tlak, temperatura, gastrointestinalni motilitet i sekrecija) u normalnim ili in vitro uvjetima. U slučajevima poremećaja homeostaze, tretiranje pentadekapeptidom BPC157 rezultira znatnim učinkom i promjenom navedenih parametara (104-111).

Do sada je ovaj peptid i njegov pentadekapeptid u eksperimentalnim uvjetima pokazao vrlo široki spektar organoprotektivnog djelovanja na razne organske sustave i na oštećenja izazvana različitim mehanizmima u eksperimentalnim modelima na štakorima, miševima, zamorčićima, zečevima i pilićima, u rasponu doze od 10 µg/kg do 10 ng/kg tjelesne mase. Prva istraživanja provedena su na modelima želučanih lezija u štakora (105, 107) i pilića (112), a pentadekapeptid BPC 157 je u svim modelima pokazao izrazitu gastroprotekciju (107, 108, 113-119). Nadalje, i u modelu izazivanja upale debelog crijeva 2,4-dinitroflorobenzenom, koja nastaje po tipu kasne

hipersenzitivne reakcije također ima protektivni učinak kao i u sličnom pokusu s trinitrobenzensulfonskom kiselinom (120).

Tako je uočeno da primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje eksudaciju upalnih medijatora (leukotriena B₄-LTB₄, te tromboksana B₂-TxB₂) u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze (MPO) u području ozljede (103, 121). Na taj način dolazi do značajno manje eksudacije polimorfonukleara (PMN), ali veće eksudacije mononukleara u područje ozljede. Poznato je da polimorfonukleari izlučuju medijatore koji djeluju kao kolagenaze čime se razgrađuje okolni neozlijeđeni kolagen i odgađa se sinteza novog kolagena, dok mononukleari imaju značajnu fagocitnu sposobnost.

Pentadekapeptid BPC 157 pokazao je i sposobnost poticanja sinteze NO blokiranjem N-nitro-L-arginin metil-estera (L-NAME), inhibitora enzima NOS, što djeluje stimulatивно na proces cijeljenja, i to u ranom razdoblju snažnim vazodilatacijskim učinkom, dok kasnije aktivacija NO sustava potiče i sintezu kolagena (111, 122). Istraživani su pozitivni učinci pentadekapeptida BPC 157 na alkoholom induciranu leziju želučane sluznice i na održavanje krvnog tlaka i to u kombinaciji s L-NAME, kompetitivnim inhibitorom generiranja endotelnog NO i NO prekursorom L-argininom. Pokazano je da pentadekapeptid BPC 157 uspješno antagonizira neželjene promjene inducirane L-NAME-om ili L-argininom. Kada su L-NAME i L-arginin bili davani zajedno, njihov je učinak bio oslabljen. U homogeniziranom supernatantu želučane sluznice štakora, kao i L-arginin, pentadekapeptid BPC 157 inducira formiranje NO, ali njegov učinak nije oslabljen kada se daje zajedno s L-NAME. Sintaza NO je bila oslabljena kada su upotrebljeni pentadekapeptid BPC 157 i L-arginin zajedno. Od kada je dokazano u eksperimentima in vitro i in vivo da pentadekapeptid BPC 157 može poništiti učinak L-NAME, prihvatljivom se počela činiti mogućnost interakcije s NO sustavom (116, 123). Dokazano je da pentadekapeptid BPC 157 sprječava L-NAME

induciranu hipertenziju kao i hipotenziju induciranu primjenom L-arginina (116). Gledano iz perspektive pentadekapeptida BPC 157/L-arginin/NO sustav, nalaz ograničene kompeticije prema dosadašnjim stavovima može se tumačiti samo kao blizak međuodnos s NO sustavom. Tako je jasno pokazano da pentadekapeptid BPC 157 može na specifičan način interferirati s učincima NO agensa i u slučaju integriteta sluznice želuca i u slučaju regulacije krvnog tlaka. Također se pokazalo da sposobnost pentadekapeptida BPC 157 da se suprotstavlja blokadi NOS, konkretno primjeni L-NAME, nadilazi kontrirajući potencijal L-arginina (112, 122-128)

Osim protuupalnih, pentadekapeptid BPC 157 posjeduje i antioksidativna svojstva, antagonizira jetrena i moždana oštećenja putem slobodnih radikala (CCl₄, paracetamol, diklofenak) (105, 129, 130). Osim neuroprotekcije u modelu oštećenja slobodnim radikalima, pentadekapeptid BPC 157 pozitivno utječe i na poremećaj funkcije dopaminskog i serotoninskog sustava u mozgu (131-135). Pored već ranije napomenutog anti-ulkusnog efekta, ovaj agens snažno potiče proces cijeljenja u različitim tkivima (mišić, živac, kost) te ostvaruje i čitav niz pozitivnih učinaka unutar gastrointestinalnog sustava (105, 110, 129, 133, 136). Pentadekapeptid BPC 157 potiče cijeljenje ozljeda i tkiva koje inače ne bi, ili bi vrlo teško cijelilo, kao u modelima cijeljenja opekline kože (103, 137, 138), mišića (139-141), tetiva (142-146), ligamenata (147), perifernih živaca (148), mozga (149), kosti (150, 151) te krvnih žila (152). Oporavlja funkciju donjnjeg ezofagealnog i piloričnog sfinktera u modelu ezofagitisa (153, 154), potiče cijeljenje intestinalnih anastomoza (155) te dovodi do ubrzanog cijeljenja različitih fistula (gastrokutanih, kolonokutanih, duodenokutanih) (125, 126, 156-158). Pozitivan učinak na cijeljenje fistula se ostvaruje i nakon mjesec dana odgode početka terapije. Pored ranije napomenutog jetrenog oštećenja paracetamolom i NSAR (diklofenak) pentadekapeptid BPC 157 također umanjuje i

alkoholno jetreno oštećenje, kako akutno tako i kronično, te alkoholne želučane lezije (119, 123, 159). Zanimljivo je da uz protekciju jetrenog i drugih organskih oštećenja potaknutih terapijom NSAR (ulcerogeno djelovanje, nefropatija) pentadekapeptid BPC 157 pokazuje istovremeno i anti-inflamatorni učinak, prevenira i umanjuje oštećenja u adjuvantom artritisu (160). U modelu kratkog crijeva također je registriran oporavak funkcije probavne cijevi što se manifestira smanjenjem gubitka tjelesne mase, a morfološki je zabilježeno održanje visine crijevnih resica i dubine kripte kao i održanje debljine unutarnjeg mišićnog sloja crijeva (161). Vezano uz mehanizam cijeljenja, za ovaj peptid je također dokazano da potiče ekspresiju erg-1 gena i njegovog produkta represorskog faktora rasta živaca 1-A vezujućeg proteina -2 (nab2) u nediferenciranim Caco-2 stanicama što ima za posljedicu indukciju proizvodnje citokina i faktora rasta i rano stvaranje izvanstaničnog matriksa (kolagena). Moguće je pretpostaviti i da utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na ekspresiju navedenog gena (erg-1), koji je potentni transkripcijski aktivator različitih trombotičkih i inflamatornih kaskada, može prekinuti djelovanje proinflamatornih i protrombotičkih medijatora i na taj način ostvariti protektivni učinak u ishemijsko/ reperfuzijskoj ili hipoksično/reoksigencijskoj ozljedi miokarda koja je patofiziološka podloga nastanka infarkta (162).

Isto tako treba naglasiti i da primjena pentadekapeptida BPC 157 ne izaziva osifikaciju i metaplaziju okolnih tkiva kao što je uočeno pri primjeni nekih faktora rasta (163).

Pozitivni učinci ovog agensa na procese cijeljenja različitih tkiva, kao i pozitivne učinke u probavnom sustavu, mogu se povezati s Robertovim konceptom adaptivne citoprotekcije koji se u osnovi zasniva na postavci da manja tkivna oštećenja primjenom malih doza različitih iritansa ostvaruju zaštitu odnosno organoprotekciju u slučaju izlaganja puno jačim iritansima u velikim dozama. Kao medijatori citoprotekcije su izvorno opisani prostaglandini, ali naknadnim istraživanjima se pokazalo da

navedene osobine pokazuju i drugi antiulkusni lijekovi (H₂ blokaatori, IPP) pa i pentadekapeptid BPC 157 (110). Navedeni mehanizam citoprotekcije, iako izvorno pokazan na želučanoj sluznici, zapravo vrijedi generalno u organizmu.

1.5.1. Pentadekapeptid BPC 157 u kardiologiji

U više eksperimentalnih modela pokazan je kardioprotektivni i antiaritmički učinak pentadekapeptida BPC 157 (122, 124, 127, 128, 133, 136, 164, 165).

Pentadekapeptid BPC 157 je pokazao učinkovitost kod izazivanja aritmija ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom na modelu izoliranog srca zamorca. Iako sam pentadekapeptid BPC 157 nije pokazao učinak na frekvenciju srca i tlak u lijevom ventrikulu prije i nakon ishemije, pokazano je da terapija s pentadekapeptidom BPC 157 reducira pojavu i trajanje ventrikulske fibrilacije i atrioventrikulske disocijacije. Trajanje fibrilacije ventrikula je smanjeno s prosječno 4 minute na 15 sekundi, a pojava AV disocijacije je reducirana za 40% tijekom reperfuzije. Trajanje sinusnog ritma produljeno je tijekom reperfuzije sa 7 na 18 minuta (179).

U studiji doksorubicinske kardiotoksičnosti i posljedičnog zatajivanja srca primjena pentadekapeptida BPC 157 je u obje ispitivane doze (10 ng/kg i 10 µg/kg) dovela do značajnog smanjenja oštećenja miokarda što je bilo praćeno redukcijom vrijednosti laboratorijskog parametra srčane dekompenzacije big-endotelin 1 (BET-1) čija produkcija ovisi o sintezi NO (166-168). ET-1 regulira cijeli niz fizioloških procesa, uključujući vazokonstrikciju, angiogenezu, nocicepciju i staničnu proliferaciju. Cijeli niz bolesti kao što su arterijska hipertenzija, ateroskleroza, kronično srčano zatajivanje, dilatativna kardiomiopatija, plućna hipertenzija i bubrežno zatajivanje, praćene su

aktivacijom endotelinskog sustava (169-171). Stoga se mjerenjem BET-1, biološki manje aktivnog prekursora endotelina-1 (ET-1), mogao pratiti stupanj srčanog popuštanja, učinkovitost terapije kao i stupnja sinteze ET-1 (172). Dokazano je da je pentadekapeptid BPC 157 u dozi od 10 µg/kg smanjio povišene koncentracije BET-1, dok je u dozi od 10 ng/kg spriječio njihov daljnji porast. Pentadekapeptid BPC 157 je u monoterapiji značajnije reducirao progresiju kliničkih manifestacija kongestivnog srčanog popuštanja kao što su porast srčane frekvencije i frekvencije disanja te pad arterijskog tlaka u odnosu na terapijske skupine životinja, koje su bile tretirane amlodipinom i losartanom (173). Obzirom na ranije dokazanu direktnu povezanost produkcije BET-1 kao markera sistoličke funkcije LV s padom koncentracije NO kao kardioprotektivnog agensa, navedenim radom je ujedno indirektno potvrđen pozitivan učinak pentadekapeptida BPC 157 na produkciju NO u srcu (173). Zaštitni učinak BPC 157 u doksorubicinskoj kardiotoksičnosti bio je značajno veći naspram konvencionalnoj terapiji losartanom i amlodipinom (124).

U eksperimentalnom modelu izoprenalinom uzrokovanog infarkta srca na štakorima, pentadekapeptid BPC 157 je pokazao zaštitni učinak što je bilo vidljivo po manjem porastu specifičnog srčanog enzima troponina T (TnT), manje izraženim promjenama u EKG-u i histološkoj slici u usporedbi s kontrolnom skupinom (174).

U modelu intoksikacije digitalisom, primjena pentadekapeptida BPC 157 dovela je do značajne redukcije pojave i trajanja totalnog AV bloka, ventrikularne tahikardije te fibrilacije ventrikla uz posljedično značajno više stope preživljenja u odnosu na kontrolnu skupinu. Antiaritmički je učinak pentadekapeptida BPC 157 u modelu intoksikacije digitalisom bio izražen i kod blokade aktivnosti NO sustava nespecifičnim inhibitorom NO sintetaze, L-NAME (127).

Antiaritmički učinak ovog agensa potvrđen je također i u modelu hiperkalijemijskih odnosno hipokalijemijskih aritmija gdje je profilaktička i terapijska primjena pentadekapeptida BPC 157 peptida (30 min prije ili 5 min nakon aplikacije visoke doze otopine KCl (9mEq/kg), odnosno indukcije hipokalijemije primjenom visokih doza furosemida (100mg/kg i.p.), dovela do prevencije tipičnih elektrokardiografskih promjena i aritmija induciranih hiperkalijemijom odnosno hipokalijemijom (hiperkalijemija: pojava visokih T valova, širenje QRS kompleksa, signifikantna bradikardija i asistolija, odnosno hipokalijemija: smanjenje amplitude R i S zubca, T vala, prolongacija P, T valova, QRS kompleksa, PQ i QT interval, pojava AV bloka i ventrikularne tahikardije) ili do njihovog vrlo brzog nestanka (unutar 10-30 min od primjene). Navedeni učinak je potvrđen i elektrofiziološkim ispitivanjem patch clamp tehnikom na HEK 293 stanicama gdje je pokazano smanjenje depolarizacijskog učinka otopine KCl odnosno smanjenja koncentracije kalija u ekstracelularnoj tekućini na membranski potencijal HEK 293 stanica primjenom pentadekapeptida BPC 157. Također je dokazano da je ovaj učinak posljedica modulacijskog učinka pentadekapeptida BPC 157 na kalijску vodljivost membrane HEK 293 stanica (128, 175) . Pored učinka na kalijску vodljivost, pokazan je i NO-vezani antiaritmijski učinak B pentadekapeptida PC 157 u hiperkalijemiji odnosno hipokalijemiji putem modulacije aktivnosti NO sustava primjenom L-NAME/L-arginina. Naime, blokada NO sintetaze nespecifičnim inhibitorom (L-NAME) dovođila je do pogoršanja aritmija, dok je primjena L-arginina bila djelomično učinkovita jedino u profilaktičkoj shemi davanja. Primjena pentadekapeptida BPC 157 je u potpunosti antagonizirala aritmije u uvjetima blokade NO sintetaze s L-NAME, dok istodobna primjena L-arginina nije dovela do pozitivnog sinergističkog djelovanja (128).

Uz ove učinke uočeno je da pentadekapeptid BPC 157 može imati pozitivan učinak na poremećaj vrijednosti arterijskog tlaka, i to bez utjecaja na normalne bazalne vrijednosti. To je jasno pokazano u studijama s NO sustavom (116) gdje je primjenjen pentadekapeptid BPC 157 sam ili zajedno s L-argininom i L-NAME. Davanje L-NAME izazvala je neposredno postizanje maksimuma već nakon 10 min te kontinuirani rast krvnog tlaka tijekom cijelog 90-minutnog trajanja pokusa. Kada bi pentadekapeptid BPC 157 bio primjenjen 15 minuta prije L-NAME, porast krvnog tlaka bio je značajno manji. Kada bi pentadekapeptid BPC 157 bio davan u posttretmanu, u trenucima maksimalnog porasta tlaka izazvanog L-NAME-om, uočen je jasan pad krvnog tlaka. Primjenom L-arginina 10 minuta nakon aplikacije L-NAME, uočen je također jasan pad tlaka. Sam L-arginin uzrokovao je umjereni pad tlaka, dok je pad tlaka izazvan uporabom BPC 157 u pretretmanu bio još izraženiji (106, 116).

Pentadekapeptid BPC 157 djeluje i na koagulacijski sustav, što je također pokazano u nekoliko pokusa (164, 165). Jedan od prvih događaja nakon ozljede tkiva je aktivacija koagualcijske kaskade te formiranje tromba, nakon čega ubrzo dolazi do akutnog upalnog odgovora koji rezultira edemom te otpuštanjem citokina i čimbenika rasta (176). Neke lezije poput gastrointestinalnih ulkusa proizlaze iz prekomjernog formiranja tromba, što dovodi do tromboze (177), koja je često praćena vazokonstrikcijom. To rezultira ishemijom mukoze te konačno nekrozom tkiva. S jedne strane pentadekapeptid BPC 157 je pokazao trombolitički učinak u modelu transekcije aorte (152), dok je s druge strane sustavno sprječavao produljenje vremena krvarenja izazvano acetilaslicilnom kiselinom, varfarinom te heparinom, a prevenirao je i nastanak trombocitopenije (164).

1.6. MODELI PLUĆNE HIPERTENZIJE

Radi boljeg razumijevanja patofizioloških mehanizama PH, kao i za testiranje novih oblika terapija, koriste se eksperimentalni životinjski modeli. Iako bilo koji oblik PH može pridonijeti povećanju morbiditeta i mortaliteta u bolesnika, PAH je posebno težak i progresivan oblik koji često vodi do desnostranog srčanog zatajivanja i prerane smrti (14, 16, 178). Stoga, kada se govori da bolesnik ima PAH, dijagnoza mora uključivati cijeli niz definiranih kliničkih parametara, koji nadilaze samo povećanje tlaka u plućnoj cirkulaciji (16).

U literaturi se spominje cijeli niz eksperimentalnih modela plućne hipertenzije koji koristi velike životinje, uključujući primata (179), goveda (180), ovce (181) i svinje (182). Te su velike životinje možda bolji modeli ljudske bolesti nego glodavci, no značajno su skuplji i razvoj bolesti je neprihvatljivo spor (183). Najčešće korišteni modeli plućne hipertenzije u štakora su model hipoksije i monokrotalinski model (16).

1.6.1. Model plućne hipertenzije izazvan monokrotalinom

Model plućne hipertenzije u štakora izazvane monokrotalinom je najčešće korišteni životinjski in vivo model za proučavanje plućne hipertenzije (16, 184). Bras i suradnici su još 1954. godine posumnjali na monokrotalin (MCT) kao uzročnika plućne vazookluzivne bolesti u studiji Jamaikanaca koji su koristili biljne preparate sa sjemenkama *Crotalaria specatbilis* (185). Nakon unosa u organizam MCT biva, pretežito u hepatocitima preko citokrom P-450 enzimskog sustava, metaboliziran u svoj toksični oblik dehidromonokrotalin (186, 187). Lalich je 1961. prvi opisao plućni vaskulitis u štakora hranjenih monokrotalinom (188, 189), te je pokazao da ti štakori

razvijaju hipertrofiju desne klijetke (190), a Kay i suradnici su 1967. dokazali prisutnost plućne hipertenzije (191).

Usporedne eksperimentalne studije su pokazale da jednokratna injekcija pirolizidin-alkaloida MCT (60-100 mg/kg TT supkutano) unutar 14 dana pouzdano izaziva tešku plućnu hipertenziju u svih izloženih štakora koja, preko kompenzatornog razvitka desnostrane srčane hipertrofije uz aktivaciju adrenergičkog sustava, dugoročno rezultira desnostranom srčanom dekompenzacijom (192-197), a unutar 6-8 tjedana u većine štakora dovodi do smrtnog ishoda (183, 198). Tako brza progresija fulminantnija je od ljudske PAH i isključuje mogućnost razvoja kompenzacijskog mehanizma.

Žarište toksičnog djelovanja leži, osim u jetri, najviše u endotelnim stanicama pluća, do kojih dolazi krvotokom (199). Nastaje oštećenje DNA stvaranjem kovalentnih veza i unakrsnog vezanja DNA lanaca (200, 201), bubrenjem mitohondrija (202) i stvaranja slobodnih radikala (183). Kao i u ljudskoj PAH, MCT u štakorskom modelu proizvodi apoptozu endotelnih stanica, koja se prati oko 4. dana nakon injekcije. Oštećenje endotela dovodi do upale, povećanja vaskularne permeabilnosti, agregacije trombocita, stvaranja intravaskularnih tromba (203) i pojačane ekspresije adhezijskih molekula. Nadalje nastaje pregradnja stijenki krvnih žila, proliferacija endotela, i hipertrofija lamine medije. Ovaj model etiopatogenetski oponaša, te bi sukladno etiološkoj klasifikaciji PH Svjetske zdravstvene organizacije, bio životinjski model za skupinu 1 plućne hipertenzije u ljudi – plućnu arterijsku hipertenziju (183).

Učinci navedenih pregradbenih procesa rezultiraju povećanom obliteracijom u prvoj liniji arteriola (202, 204), koja dovodi do kroničnog povišenja tlaka u plućnoj cirkulaciji (205, 206). Postupni razvoj vaskularnog remodeliranja nameće zaključak da se ne radi

samo o izravnom učinku aktivnog alkaloida, koji u prvih 24 h gotovo u cijelosti bude izlučen, već su uključeni i različiti biološki patološki mehanizmi, koji se aktiviraju inicijalnim toksičnim podražajem. Budući da desna klijetka pod takvim uvjetima mora raditi uz visoke tlakove u plućnoj cirkulaciji, kompenzatorno se razvija hipertrofija desne klijetke te njezina disfunkcija, što je važna karika u proučavanju PH (16). Postupno nastaje desnostrano, a na kraju i globalno srčano popuštanje (191, 193-195, 205). Hipertrofija srca zahvaća samo desnu klijetku i korelira s vaskularnim promjenama. Isto tako dolazi i do nakupljanja mastocita u medijastinalnim limfnim čvorovima te oko bronha i plućnih arterija (207, 208). U prethodnim studijama su u štakora opisane vrijednosti sistoličkih tlakova u plućnoj arteriji i do 80 mmHg 5 tjedana nakon primjene MCT-a, što je povezano s niskim preživljenjem i od 35% (209-211).

Međutim, MCT uzrokuje i prolazni akutni miokarditis lijeve i desne klijetke, što donekle komplicira proučavanje hipertrofije i zatajivanja desne klijetke s teškom PH (212). Postoje dokazi da MCT, iako u višim dozama, uzrokuje i akutno oštećenje jetre (213) te bubrega (211). Stoga model PH inducirane MCT-om neki smatraju modelom subakutnog oštećenja periferne vaskulature pluća i drugih organa (bubrega, jetre i srca) (16). Također treba naglasiti da je do sada više od 30 različitih supstanci pokazalo protektivni učinak u MCT-om modelu plućne hipertenzije (16). MCT model plućne hipertenzije u štakora i dalje ostaje najčešće korišteni životinjski model plućne hipertenzije, obzirom da nudi jednostavnost, reproducibilnost i niske troškove u usporedbi s drugim modelima (214). Kao takav, monokrotalin reproducira najvažnije elemente ljudske PH: vaskularno remodeliranje, proliferaciju glatko mišićnih stanica, endotelnu disfunkciju, upalu i pojačanu ekspresiju upalnih citokina te zatajivanje desne klijetke (Tablica 3).

Tablica 3 Usporedba patoloških značajki ljudske PAH i modela PAH inducirane monokrotalinom u štakora (215)

Promjena	MCT model PAH u štakora	Ljudska PAH
Oštećenje endotela	Oštećenje endotela kao inicijalni mehanizam (199)	Disfunkcija plućnih endotelnih stanica (47)
Tromboza	Intravaskularni trombi (203, 216)	In-situ tromboze kod PH lezija (49)
Fragmentacija laminae elasticae internaе	Promijenjena sinteza elastina i kolgena (217)	Kod PAH uslijed kongenitalnih srčanih grešaka (218)
Upala	Pretežito mononuklearna intersticijska i perivaskularna infiltracija (219)	Pretežito mononuklearna, većinom perivaskularna te u području pleksiformnih lezija (220)
Pleksiformne lezije	Ne (niti u jednom drugom životinjskom modelu)	Kod IPAH u 80% teških slučajeva
Hipertrofija medije	patognomonično	patognomonično
Cor pulmonale	patognomonično	patognomonično

2. HIPOTEZA

Primijenjen u kotretmanu pentadekapeptid BPC 157 će spriječiti razvoj hipertrofije medije plućnih arterija i hipertrofiju desne klijetke u štakora izloženih monokrotalinu, dok će u posttretmanu kod štakora ukloniti postojeću hipertrofiju medije plućnih arterija i hipertrofiju desne klijetke izazvane monokrotalinom.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ

U ovom istraživanju plućne hipertenzije i plućnog srca te oštećenja plućne vaskulature monokrotalinom u štakora cilj je primjenom pentadekapeptida BPC 157 peroralno i intraperitonealno spriječiti razvoj oštećenja plućne vaskulature i plućnog srca ili ukloniti već postojeća oštećenja plućne vaskulature i hipertrofiju desne klijetke (191, 221).

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

Specifični cilj je bio proučiti učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 primijenjenog u dvije različite doze, na dva različita načina primjene (peroralno i intraperitonealno) u dva različita režima primjene (kotretman i posttretman nakon razvoja plućne hipertenzije).

4. METODE

4.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U istraživanju su korišteni muški Wistar štakori tjelesne mase (TT) od 150 do 200 g smješteni u kaveze sa slobodnim pristupom vodi i hrani u kontroliranim laboratorijskim uvjetima temperature i vlažnosti zraka te 12-satnim ciklusom svjetla i tame. Prvog dana ispitivanja životinje su randomizirane u pokusne skupine.

4.2. LIJEKOVI

Za izazivanje plućne hipertenzije korišten je etablirani monokrotalinski (MCT) štakorski model (191, 221). Monokrotalin kupljen kod Sigma Chemical Co (St.Louis, MO, USA), primijenjen je supkutano prvoga dana otopljen u fosfatnoj puferiranoj fiziološkoj otopini (Analitički laboratorij, Gradske ljekarne Zagreb) (221), u dozi od 80 mg/kg TT (221). Poslije toga životinje su randomizirane u jednu od 13 pokusnih skupina.

Sintetski pentadekapeptid BPC 157 (Diagen, Ljubljana, Slovenia) 99% (HPLC) čistoće korišten je u eksperimentu također otopljen u fiziološkoj otopini prema ranije etabliranim protokolima (107, 108, 111, 112, 116, 131-133, 162, 173, 222-231). Pentadekapeptid BPC 157 dio je sekvence aminokiselina proteina BPC izoliranog iz ljudskog želučanog soka i topljiv je u vodi i F.O. pri pH 7. Navedene doze pentadekapeptida BPC 157 (10 ng/kg te 10 µg/kg) koje su ispitivane u ovom istraživanju, korištene su i u prethodnim radovima o pentadekapeptidu BPC 157 (106-108, 112, 116, 131-133, 173, 222-228).

Životinje su tretirane pentadekapeptidom BPC 157 otopljenim u fiziološkoj otopini NaCl-a) po već od prije korištenom protokolu intraperitonealnog tretiranja (232) u dozama 10 µg/kg TT i 10 ng/kg TT, dok su kontrolne životinje bile tretirane s 0.9% otopinom NaCl-a 5.0 ml/kg TT jednom dnevno. U grupama s peroralnim tretmanom životinje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 u vodi za piće (0,16 µg/ml i 0,16 ng/ml što pri prosječnom peroralnom unosu vode za piće po životinji odgovara dnevnom unosu od 10 µg/kg i 10 ng/kg TT), a kontrolne skupine samo vodu za piće (12 ml/dan po štakoru) do žrtvovanja.

4.3. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Istraživanje je provedeno na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. U istraživanju je uključeno 13 skupina po 6 životinja, dakle ukupno 78 životinja. Ispitivane su dvije doze pentadekapeptida BPC-a od 10 µg/kg i 10 ng/kg, primjenjene intraperitonealno ili peroralno, u kotretmanu (233, 234) ili posttretmanu (235). Nakon inicijalne primjene monokrotalina životinje su nasumično raspoređene u jednu od 13 skupina. U prvih šest skupina započeto je s tretiranjem odmah po randomizaciji, u četiri skupine s pentadekapeptidom BPC 157 (BPC 157 10 µg/kg i.p., BPC 157 10 ng/kg i.p., BPC 157 10 µg/kg p.o. i BPC 157 10 ng/kg p.o.), te u petoj kontrolnoj s fiziološkom otopinom intraperitonealno a šesta kontrolna je dobivala samo vodu za piće. U ostalih je pet skupina tretman započet 15. dana radi razvoja plućne hipertenzije. Sedma skupina životinja je bila žrtvovana 15. dana radi patohistološke verifikacije plućne hipertenzije, dok je u preostalih skupina započeto s tretmanom 15 dana, u četiri skupine s pentadekapeptidom BPC 157 (BPC 157 10 µg/kg i.p, BPC 157

10 ng/kg i.p., BPC 157 10 µg/kg p.o. i BPC 157 10 ng/kg p.o.), te u zadnje dvije skupine s fiziološkom otopinom intraperitonealno ili vodom za piće peroralno.

Pokusne životinje su bile svakodnevno tretirane od strane osoba koje nisu bile upoznate s administriranom tvari po skupinama. Zadnji tretman je bio 24 h prije žrtvovanja. Životinje su žrtvovane 30. dana od početka pokusa dekapitacijom u anesteziji, kombinacijom ketamina u dozi 40 mg/kg TT i diazepama 10 mg/kg TT intraperitonealno. Podjela skupina je prikazana u sljedećoj tablici.

Tablica 4 Tablearni prikaz eksperimentalnih grupa

	Ime skupine	Monokrotalin	Terapija	Početak tretmana	Kraj tretmana	Žrtvovanje
1	Kotretman BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT i.p.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT i.p.	1. dan	29. dan	30. dan
2	Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	1. dan	29. dan	30. dan
3	Kotretman BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT p.o.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT p.o.	1. dan	29. dan	30. dan
4	Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	1. dan	29. dan	30. dan
5	Kotretman kontrola 1	1. dana 80 mg/kg TT	0.9% NaCl-a 5,0 ml/kg TT i.p.	1. dan	29. dan	30. dan
6	Kotretman kontrola 2	1. dana 80 mg/kg TT	voda za piće p.o.	1. dan	29. dan	30. dan
7	Posttretman kontrola 1	1. dana 80 mg/kg TT	nihil	-	-	15. dan
8	Posttretman BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT i.p.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT i.p.	15. dan	29. dan	30. dan
9	Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	15. dan	29. dan	30. dan
10	Posttretman BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT p.o.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT p.o.	15. dan	29. dan	30. dan
11	Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	1. dana 80 mg/kg TT	BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	15. dan	29. dan	30. dan
12	Posttretman kontrola 2	1. dana 80 mg/kg TT	0.9% NaCl-a 5,0 ml/kg TT i.p.	15. dan	29. dan	30. dan
13	Posttretman kontrola 3	1. dana 80 mg/kg TT	voda za piće p.o.	15. dan	29. dan	30. dan

4.3.1. Klinički izgled životinja

Tijekom ispitivanja svakodnevno je praćena aktivnost i izgled životinja što je dokumentirano slikanjem životinja iz različitih terapijskih skupina. Praćeni su klinički parametri kao što su frekvencija rada srca i disanja, boja njuškica te periferni edemi 1., 7., 14., 21. i 30. dana pokusa. Evaluaciju su provodila dva iskusna, nepristrana promatrača, koji su pratili i ocjenjivali promjenu kliničkog statusa. Boja njuškice ocjenjivana je bodovanjem s jedan ili nula, tako da je nula označavala ružičastu ili crvenkastu boju njuškice, a jedan plavkastu, cijanotičnu boju. Bodovanje su svaki put neovisno obavile dvije osobe, a zabilježena je prosječna ocjena. Stupanj otečenosti je ocjenjivan kroz procjenu edema različitih anatomskih struktura po sustavu 0 ili 1 (0 – nema edema, 1 – prisutan edem). Procjenjivan je edem njuške (nosa, usana, submandibularni edem: 0 – nema edema, 1 – prisutan edem), edem skrotuma (od 0 – nema edema, 1 – prisutan edem) te edem prednje desne šapice životinje (od 0 – nema edema, 1 – prisutan edem). Ocjenjivanje su izvodile dvije neovisne osobe, a kao konačni rezultat uzeta je srednja vrijednost. Vrijednosti bodova svake od promatranih struktura su zbrajane i ukupan zbroj je uspoređivan. Također je praćena promjena tjelesne mase kao pokazatelj nutritivnog statusa redovitim dnevnim mjerenjima tjelesne mase vagom.

Prvog te 7., 14., 21. i 30. dana pokusa su mjereni i sustavni arterijski tlakovi.

4.3.2. Elektrokardiogram

Svi elektrokardiografski zapisi zabilježeni su na trokanalnom uređaju (tri standardna odvoda ekstremiteta) brzinom 50mm/s, EKG monitor 2090 Medtronic (Minneapolis, MN, USA). Aparat je baždaren na visinu potencijala 1mV/cm. Prilikom snimanja elektrokardiograma životinje su bile anestetizirane intraperitonealnom aplikacijom kombinacije ketamina u dozi 40 mg/kg TT i diazepamom 10mg/kg TT. Elektrokardiogram je sniman svim životinjama na početku pokusa te 7., 14., 21. i 30. dana, a praćeni su slijedeći parametri: ritam, frekvencija te promjene STT segmenta (prvenstveno promjene ST spojnice u smislu patološke elevacije i denivelacije kao znaka ishemijske ozljede miokarda), veličina R zupca, pojava patološkog Q zupca te promjene osi QRS kompleksa u frontalnoj ravnini kao pokazatelja hipertrofije desne klijetke (236). QT interval je mjeran tako da bi se na aparatu digitalno zamrznuo zapis, koji bi se potom raširio na 200 mm/s, te je na 5 pojedinačnih QRS kompleksa digitalnim kaliperima mjeran QT interval. Na isti način je preko RR intervala određivana i frekvencija srca. Bazettovom formulom modificiranom za štakore potom je izračunavan QT_c interval (237).

4.3.3. Ehokardiografija

Ehokardiografska ispitivanja su provođena ultrazvučnim aparatima Philips ClearVue 550 i Philips SD800, u oba slučaja s linearnim sondama od 7,5 MHz, nakon snimanja EKG-a 1., 7., 14., 21. i 30. dana od strane jednog promatrača. Prethodno su životinje bile obrijane u području lijevog hemitoraksa sprijeda. Ultrazvučna mjerenja su izvođena tako da bi prikazali srce u kratkoj parasternalnoj osi. Pulsni Doppler je korišten za mjerenje akceleracijskog vremena u plućnoj arteriji (PAAT). Pri tome je uzorak volumena bio centralno pozicioniran unutar plućne arterije netom distalno od plućnog zaliska, usmjerene paralelno niz protok (198). Za svaku životinju u svakom navratu su rađena 3 neovisna mjerenja.

Nakon mjerenja PAAT u istoj osi bi se prikazao lijevi ventrikul u razini papilarnih mišića, a za procjenu porasta tlaka u desnoj klijetki mjereno je indeks deformacije lijeve klijetke: odnos kratkog promjera naspram dugog promjera lijeve klijetke u endsistoličkoj fazi (Slika 2) (238). Za svaku životinju u svakom navratu su rađena tri neovisna mjerenja.

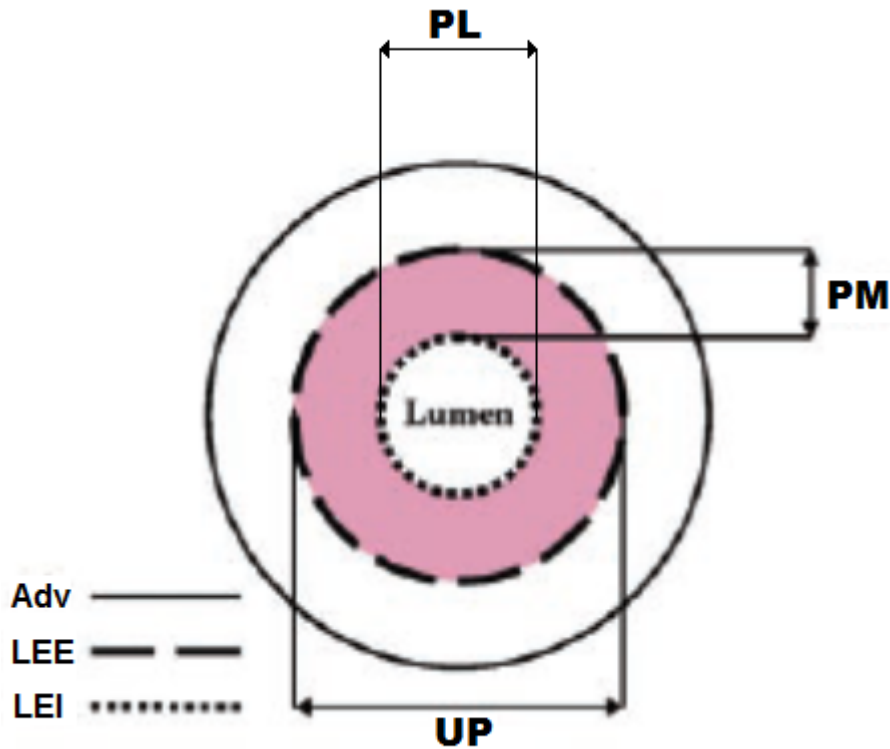
Razvoj plućne hipertenzije je praćen neinvazivno ehokardiografski što je poštenije za pokusne životinje. Ehokardiografija kao metoda praćenja razvoja plućne hipertenzije u štakorskom modelu s monokrotalinom je pokazala vrlo visoki stupanj korelacije i pouzdanosti u usporedbi s magnetnom rezonancom i direktnim mjerenjem kateterizacijom plućne arterije (198, 239).



Slika 2 Za ehokardiografsko praćenje plućne hipertenzije pored akceleracijskog vremena u plućnoj arteriji pratit će se i tzv. indeks deformacije lijeve klijetke, koji je definiran kao odnos kratke osi (b) naspram velikoj osi (a) prikazan u parasternalnoj kratkoj osi u endsistolčkoj fazi (238)

4.3.4. Patohistologija

Tridesetog dana od početka pokusa životinje su anestetizirane i žrtvovane. Srce i pluća su disecirani zajedno, a jetra odvojeno. Zatim su organi izvagani. Pluća su priređena za patohistološku analizu sukladno etabliranom modelu. Oba plućna krila su izuzeta zajedno s trahejom, koja su tada (*ex vivo*) kanulirana i potom je u pluća instilirana 10% formalin pod tlakom od 20 cm H₂O, kao što je ranije opisano (240-242). Nakon toga su pluća fiksirana u 10% formalinu, uklopljena u parafin, te su učinjeni 3-4 µm rezovi koji su obojeni složenom metodom orcein - van Gieson (243). Remodeliranje plućnih arterija analizirano je svjetlosnim mikroskopom od strane neovisnog promatrača. Na patohistološkim presjecima je kao pokazatelj hipertrofije plućnih arterija uspoređivan stupanj njihove muskularizacije mjeren kompjuteriziranim morfometrijskim sustavom ISSA (VAMSTECH, Zagreb) na poprečnim presjecima krvnih žila. Ukupna površina (UP) krvne žile je definirana kao površina unutar vanjske elastične lamine, dok je površina lumena (PL) žile definirana kao površina unutar unutarnje elastične lamine, a površina medije kao površina između vanjske i unutarnje elastične lamine. Stupanj muskularizacije je izražen kao udio površine medije u ukupnoj površini krvne žile ili kao (UP-PL) / UP (Slika 3). Analizirane su muskularizirane plućne arterije promjera 25-100 µm kao što je ranije opisano (244, 245). Za svakog pojedinačnog štakora je analizirano po 10 arterija na tri presjeka iz različitih dijelova pluća.



Slika 3 Shematski prikaz načina patohistološke kvantifikacije hipertrofije medije plućnih arterija: Stupanj muskularizacije je izražen kao udio površine medije u ukupnoj površini presjeka krvne žile PM/UP ili kao $(UP-PL)/UP$; (Adv – adventicija, LEE – lamina elastica externa, LEI – lamina elastica interna, UP – ukupna površina arterije, PM – površina medije arterije, PL – površina lumena arterije)

Potom je na preparatu srca odvojena desna klijetka, lijeva klijetka i interventrikularni septum. Hipertrofija desne klijetke je iskazana Fultonovim indeksom: odnosom mase desne klijetke prema zbroju težina lijeve klijetke i interventrikularnog septuma (246). Također je mjeren odnos mase desne klijetke prema tjelesnoj masi. Jetrena kongestija je procjenjivana odnosom mokre mase jetre naspram tjelesnoj masi (221).

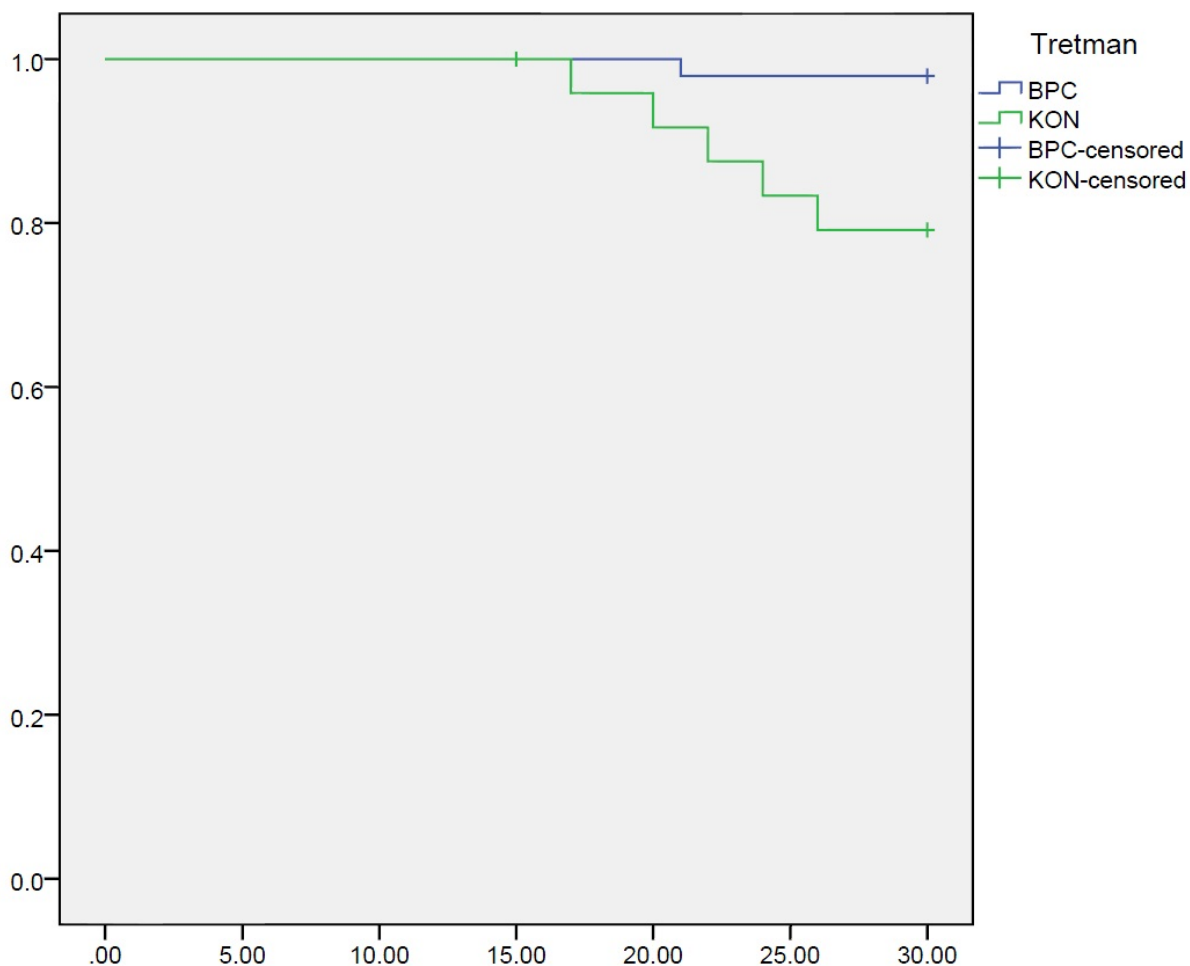
4.3.5. Statistika

Za analizu je korišten program Statistica 7.0. Korišten je Kruskal-Wallis test s Mann-Whitney U testom za post hoc analizu, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost-standardna pogreška ili kao medijan-raspon (razlika maksimalne i minimalne vrijednosti). Za usporedbu proporcija među grupama korišten je Fisher exact test. Razina značajnosti je postavljena na razinu $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. KLINIČKA PREZENTACIJA

Tijekom praćenja zamijećena je veća smrtnost životinja koje nisu tretirane pentadekapeptidom BPC 157. U promatranom razdoblju umrla je samo jedna životinja iz pentadekapeptidom BPC 157 tretiranih skupina, dok je kumulativna smrtnost u svim kontrolnim skupinama bila signifikantno veća (Slika 4). Većina smrtnih ishoda je nastupila od trećeg tjedna nadalje



Slika 4 Kaplan-Meierova krivulja preživljenja

Eksperimentalne životinje u kontrolnim skupinama su se od trećeg tjedna pokusa prezentirale opsežnim perifernim edemima (njuškica, lice, skrotalna regija) i značajno povišenom frekvencijom disanja (Tablica 5). Primjena pentadekapeptida BPC 157, bilo u posttremanu ili u kotretmanu, spriječila je nastup perifernih edema ili značajnih promjena frekvencije disanja. Cijanoza je zamijećena samo u životinja u kontrolnim skupinama pred sam kraj promatranja (Tablica 6).

Tablica 5 Tabela prikaz bodovanja perifernih edema (min/med/max)

	Dan 1	Dan 7	Dan 14	Dan 21	Dan 30
Kotretman BPC 157 10 µg/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman BPC 157 10 µg/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman kontrola 1	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1,0/2,0/2,0	2,5/3,0/3,0
Kotretman kontrola 2	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1,5/2,0/2,0	2,5/3,0/3,0
Posttretman kontrola 1	0/0/0	0/0/0	0/0/0		
Posttretman BPC 157 10 µg/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman BPC 157 10 µg/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman kontrola 2	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1,5/2,0/2,0	2,5/3,0/3,0
Posttretman kontrola 3	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1,0/2,0/2,0	2,5/3,0/3,0

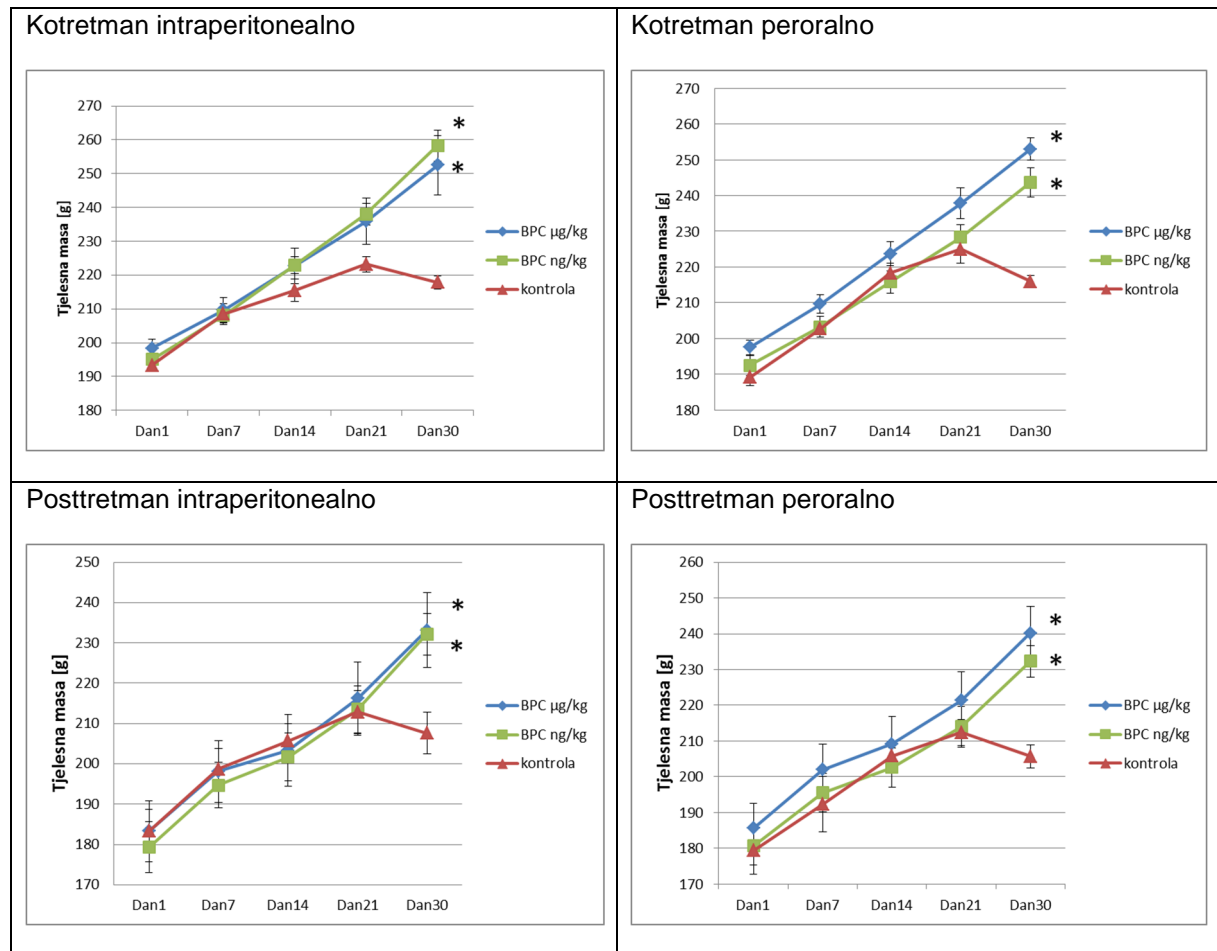
Tablica 6 Tabelarni prikaz bodovanja stupnja cijanoze njuškice (min/med/max)

	Dan1	Dan7	Dan14	Da 21	Dan30
Kotretman BPC 157 10 µg/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman BPC 157 10 µg/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Kotretman kontrola 1	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0,5/1,0/1,0
Kotretman kontrola 2	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1,0/1,0/1,0
Posttretman kontrola 1	0/0/0	0/0/0	0/0/0		
Posttretman BPC 157 10 µg/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman BPC 157 10 µg/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Posttretman kontrola 2	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0,5/1,0/1,0
Posttretman kontrola 3	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0,5/1,0/1,0

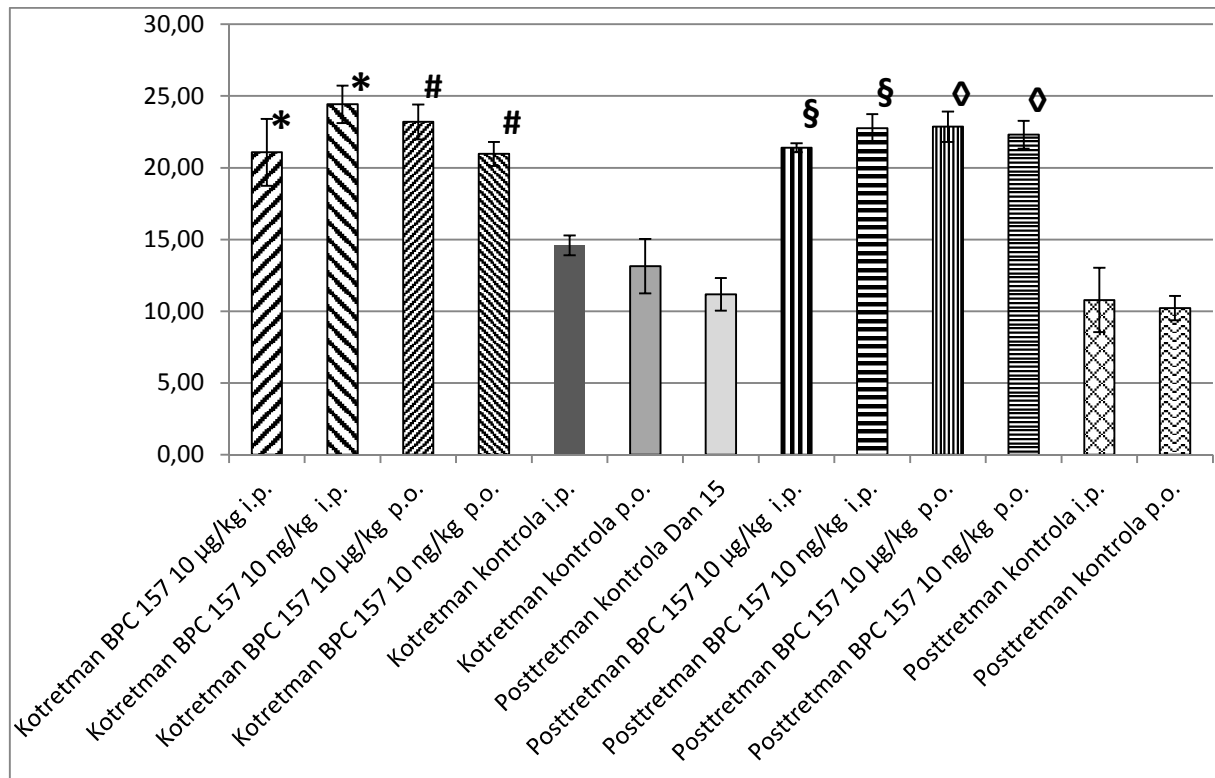
Životinje u svim kontrolnim skupinama razvile su u zadnjem tjednu pokusa znakove kardijalne kaheksije što se u svim kontrolnim skupinama iskazalo izraženim padom tjelesne mase, dok su sve tretirane skupine u kotretmenu i posttretmanu imale uredne krivulje porasta tjelesne mase i 30. dana statistički značajnu razliku u tjelesnoj masi u odnosu na kontrole (Tablica 7, Slika 5 i Slika 6). Pad tjelesne težine bio je toliko izražen, da niti porast mase uslijed retencije tekućine i kongestije nije značajno spriječio redukciju ukupne tjelesne mase.

Tablica 7 Tablerani prikaz tjelesne mase pokusnih životinja u g (prosjek \pm SE)

	Dan1	Dan7	Dan14	Dan21	Dan30
Kotretman BPC 157 10 μ g/kg TT i.p.	198,3 \pm 2,8	209,6 \pm 3,8	222,7 \pm 5,3	236,0 \pm 6,8	252,5 \pm 8,7
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	195,0 \pm 1,8	208,1 \pm 2,0	223,0 \pm 2,5	238,0 \pm 3,3	258,3 \pm 4,6
Kotretman BPC 157 10 μ g/kg TT p.o.	197,5 \pm 2,8	209,6 \pm 2,6	223,7 \pm 3,4	237,7 \pm 4,3	253,0 \pm 3,1
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	192,5 \pm 2,8	203,3 \pm 3,0	215,7 \pm 3,2	228,3 \pm 3,5	243,7 \pm 4,2
Kotretman kontrola 1	193,3 \pm 1,7	208,5 \pm 3,1	215,5 \pm 3,3	223,2 \pm 2,3	224,5 \pm 3,5
Kotretman kontrola 2	189,2 \pm 2,4	202,7 \pm 1,4	218,3 \pm 2,7	225,0 \pm 4,0	226,8 \pm 4,4
Posttretman kontrola 1	178,8 \pm 6,5	195,2 \pm 6,4	201,3 \pm 6,4	0	0
Posttretman BPC 157 10 μ g/kg TT i.p.	183,3 \pm 7,6	198,2 \pm 7,7	203,3 \pm 8,9	216,7 \pm 9,1	233,2 \pm 9,2
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	179,3 \pm 6,3	194,7 \pm 5,6	201,7 \pm 5,9	213,5 \pm 5,9	232,2 \pm 5,2
Posttretman BPC 157 10 μ g/kg TT p.o.	185,7 \pm 7,0	202,0 \pm 7,2	209,2 \pm 7,7	221,3 \pm 8,1	240,2 \pm 7,4
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	180,7 \pm 5,3	195,5 \pm 5,4	202,7 \pm 5,5	214,0 \pm 5,7	232,3 \pm 4,5
Posttretman kontrola 2	183,3 \pm 5,3	198,7 \pm 5,1	205,8 \pm 5,3	212,8 \pm 5,4	207,6 \pm 5,2
Posttretman kontrola 3	179,3 \pm 6,7	192,3 \pm 7,8	205,7 \pm 4,1	212,4 \pm 3,7	205,8 \pm 3,2



Slika 5 Grafički prikaz razvoja tjelesne mase pokusnih životinja (prosjeak ± SE); * p < 0,001 u usporedbi s kontrolnom skupinom

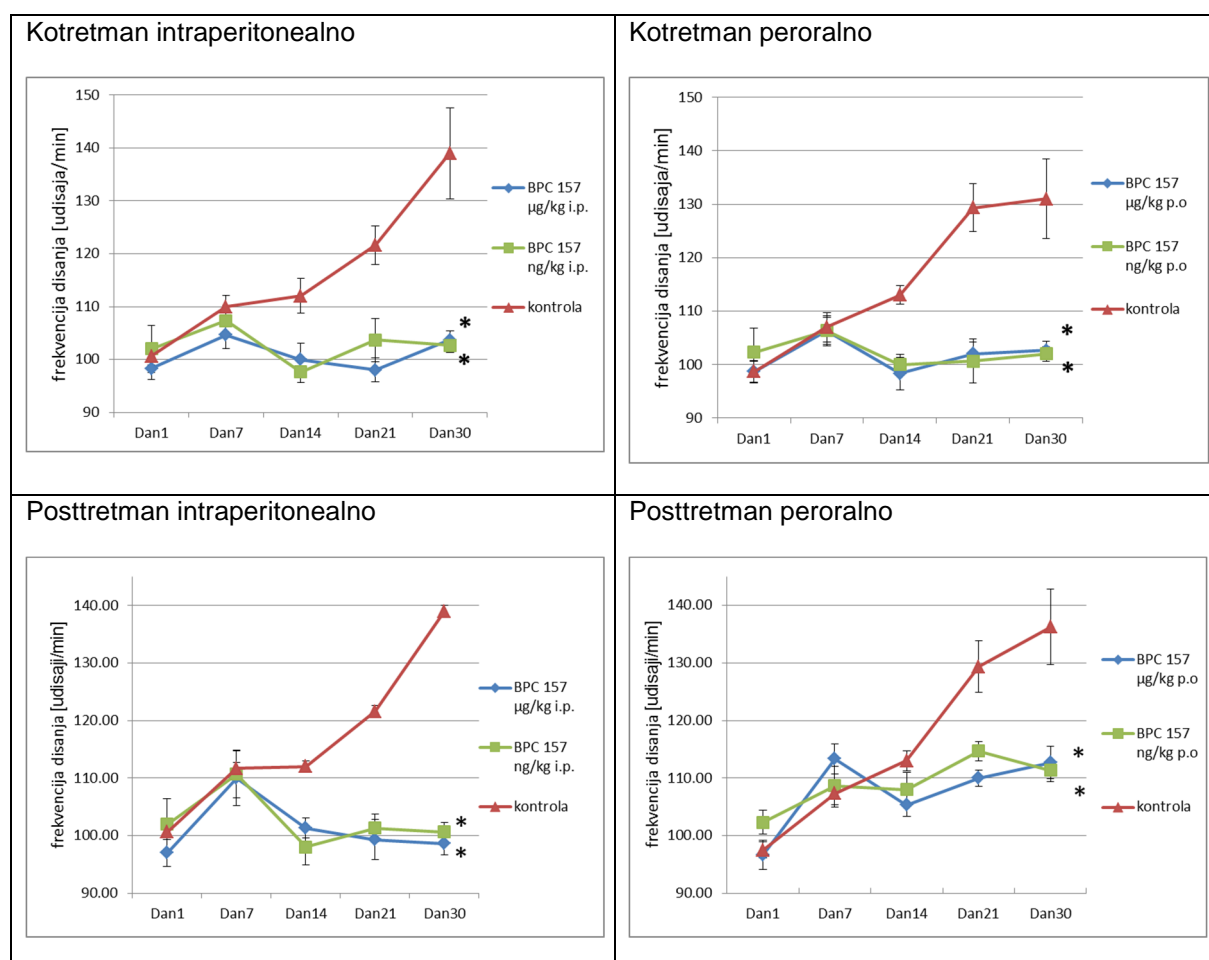


Slika 6

Promjena mase tijela u % od početka (prosjeak ± SE); * $p < 0,001$ prema Kotretman kontrola i.p.; # $p < 0,001$ prema Kotretman kontrola p.o.; § $p < 0,001$ prema Posttretman kontrola i.p.; ◇ $p < 0,001$ prema Posttretman kontrola p.o.

Što se tiče frekvencije disanja, ona je u tretiranih životinja bila unutar normalnog raspona za životinje te dobi, dok su životinje u kontrolnim skupinama bile izrazito dispnoične i tahipnoične sa statistički značajno povišenom respiratornom frekvencijom (Slika 7).

Sustavni arterijski tlakovi koji niti u jednoj skupini nisu pokazali značajnih odstupanja.



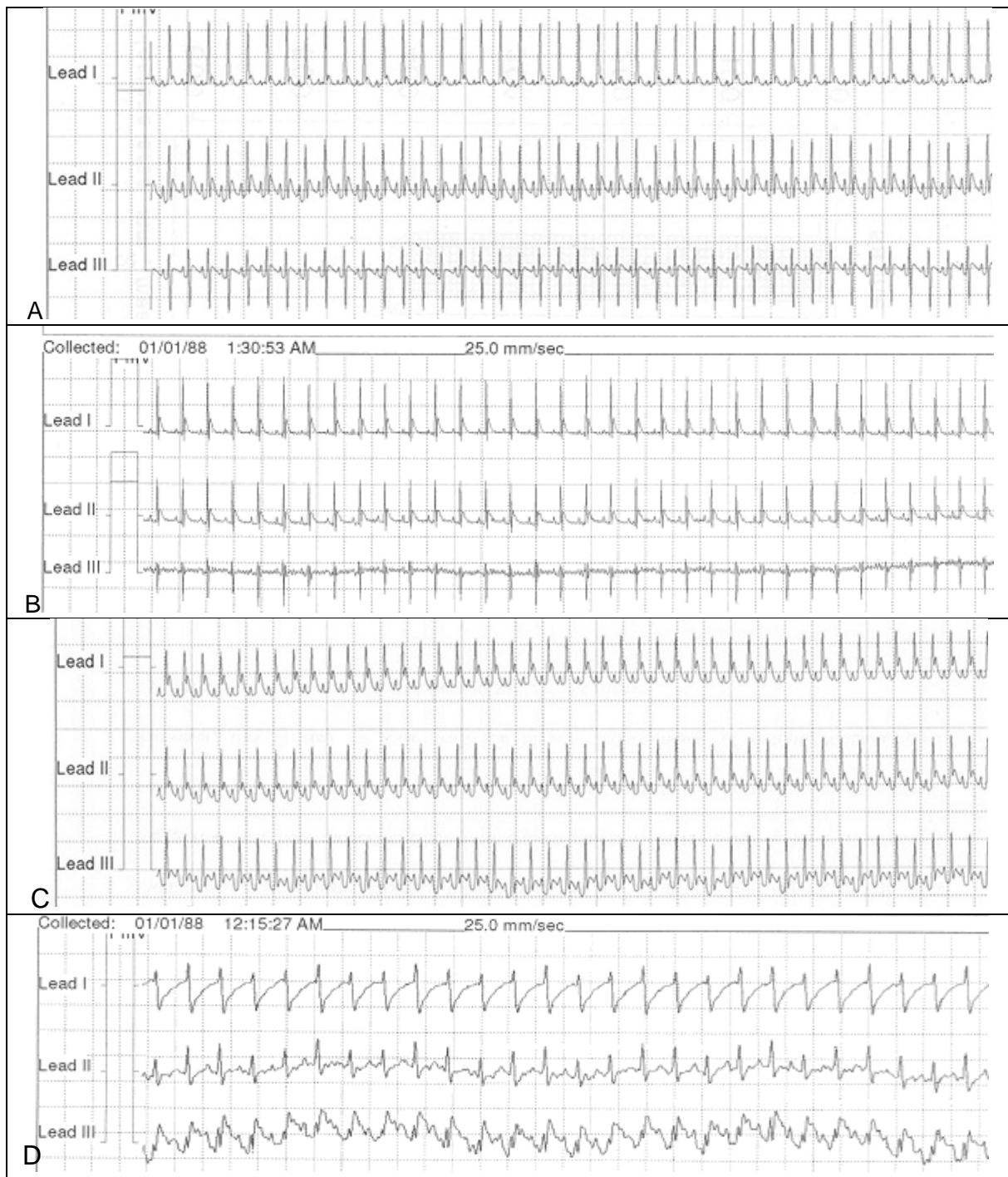
Slika 7

Grafički prikaz frekvencije disanja pokusnih životinja (prosjeak ± SE); * $p < 0,001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

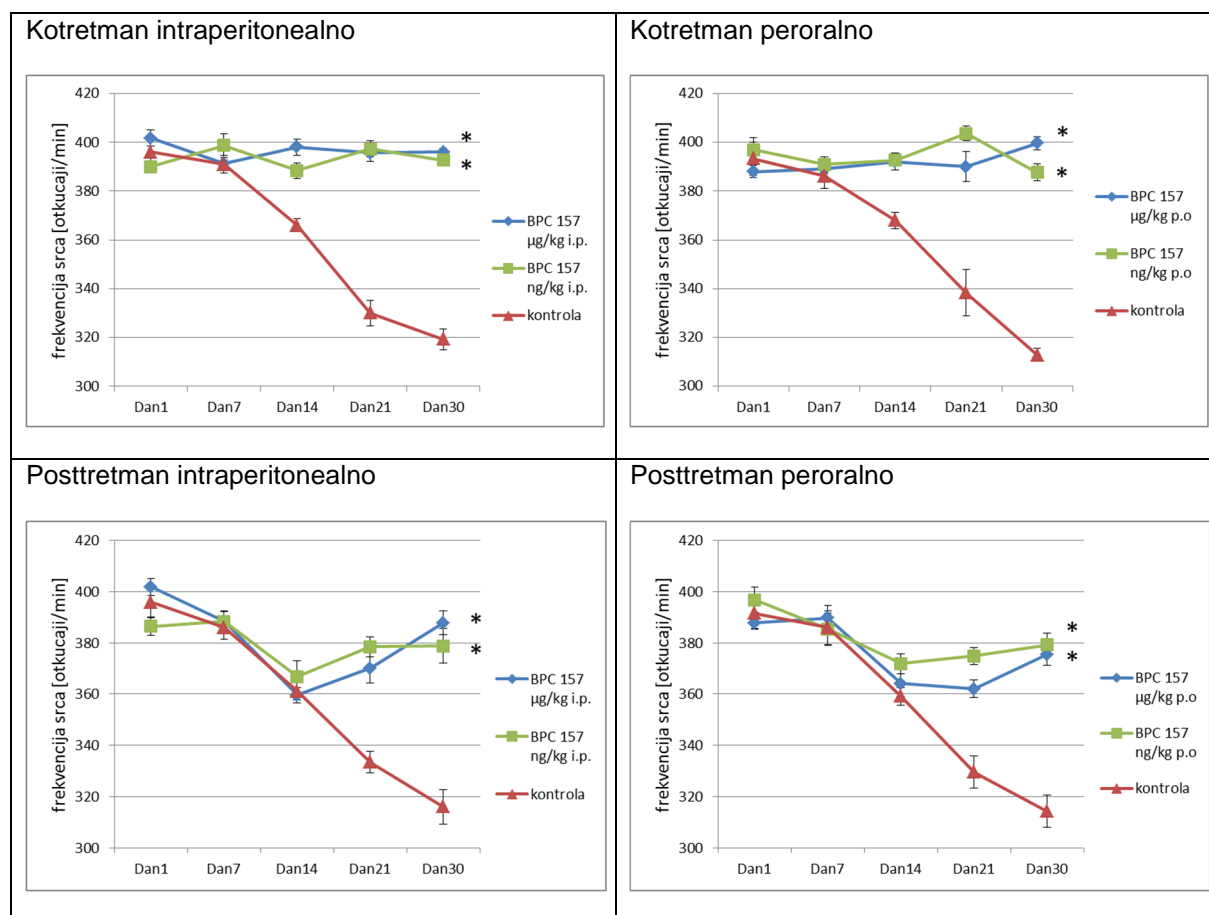
5.2. ELEKTROKARDIOGRAM

In vivo zapisi EKG-a nisu pokazali značajnih promjena bilo kojih parametara do dana 14. Od 14. dana prate se promjene u kontrolnim skupinama u tri promatrana parametra: frekvenciji srca, QT intervalu te osi QRS kompleksa (Slika 8).

Slika 8 Zapis EKG-a: Kotretman BPC 157 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. A – 1.dan i B – 30 dan
Kotretman kontrola 1 i.p. C – 1. dan i D – 30. dan



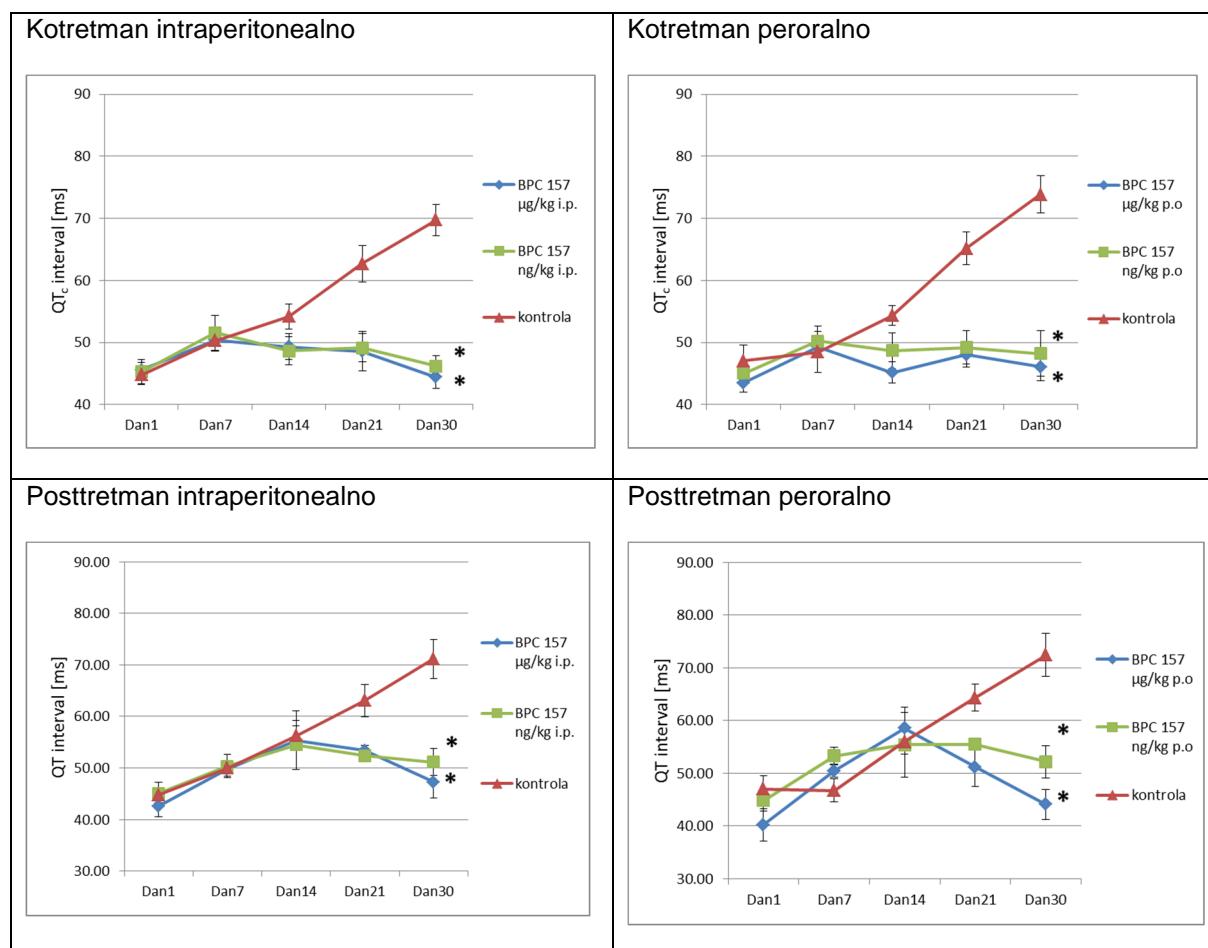
U životinja koje su tretirane s pentadekapeptidom BPC 157 u kotretmanu tijekom cijelog razdoblja frekvencija srca ostaje nepromijenjena, unutar skupina nema razlike neovisno o količini i načinu primjene (Slika 9). U posttretmanu bilježi se do dana 14 blagi pad frekvencije srca te potom stabilizacija prosječne frekvencije srca, promjene nisu statistički značajne niti u usporedbi s kotretmanskim skupinom.



Slika 9 Grafički prikaz frekvencije srca pokusnih životinja (prosjek \pm SE);* $p < 0,001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

U kontrolnih životinja od 14. dana bilježi se kontinuirani pad prosječne frekvencije srca koji je od 21. dana statistički signifikantan prema početnim vrijednostima i prema frekvencijama tretiranih skupina.

QT interval je bez značajne promjene u svim skupinama do dana 7. Dana 14. bilježi se blago nesignifikantno produljenje QT intervala u kontrolnim skupinama te u BPC 157 posttretmanskim skupinama koje do tada nisu primile pentadekapeptid BPC 157 (Slika 10).

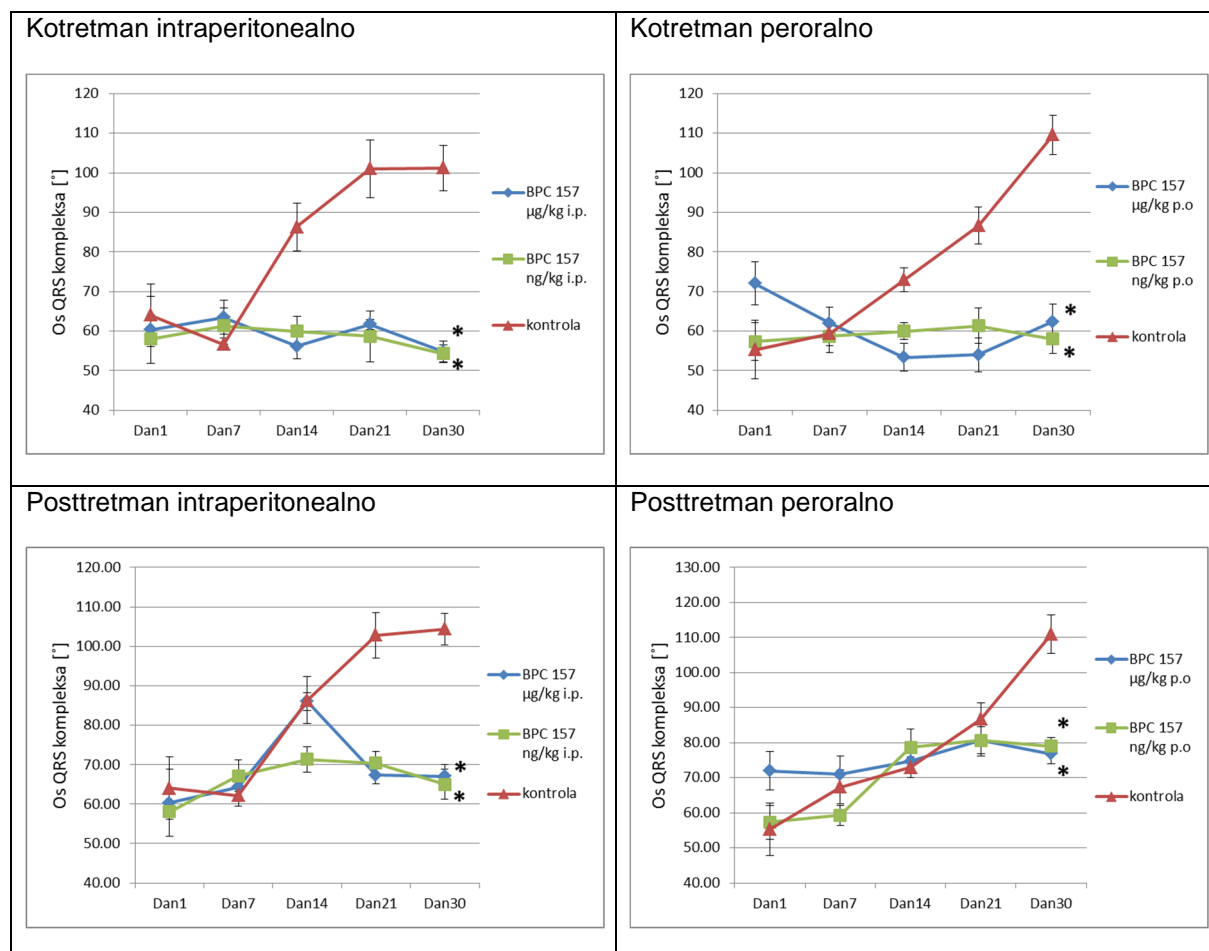


Slika 10 Grafički prikaz QT_c intervala pokusnih životinja (prosjeak ± SE); * p < 0,001 u usporedbi s kontrolnom skupinom

Dana 21. produljenje QT intervala je značajno u svim kontrolnim skupinama te raste do 28 dana, kada je još izraženije. U životinja tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 u kotretmanu od početka tijekom cijelog promatranog razdoblja, nema značajnog produljenja QT intervala. U s pentadekapeptidom BPC 157 tretiranih životinja u

posttretmanu, iako krivulja do 14. dana slijedi promjene kontrolne skupine, također na kraju nije zabilježena statistički značajno produljenje QT intervala.

Os QRS kompleksa također se mijenja u kontrolnim skupinama pokazujući značajnu devijaciju osi u desno kao odraz hipertrofije desne klijetke, dok u pentadekapeptidom BPC 157 tretiranim skupinama nisu zabilježene promjene (Slika 11).

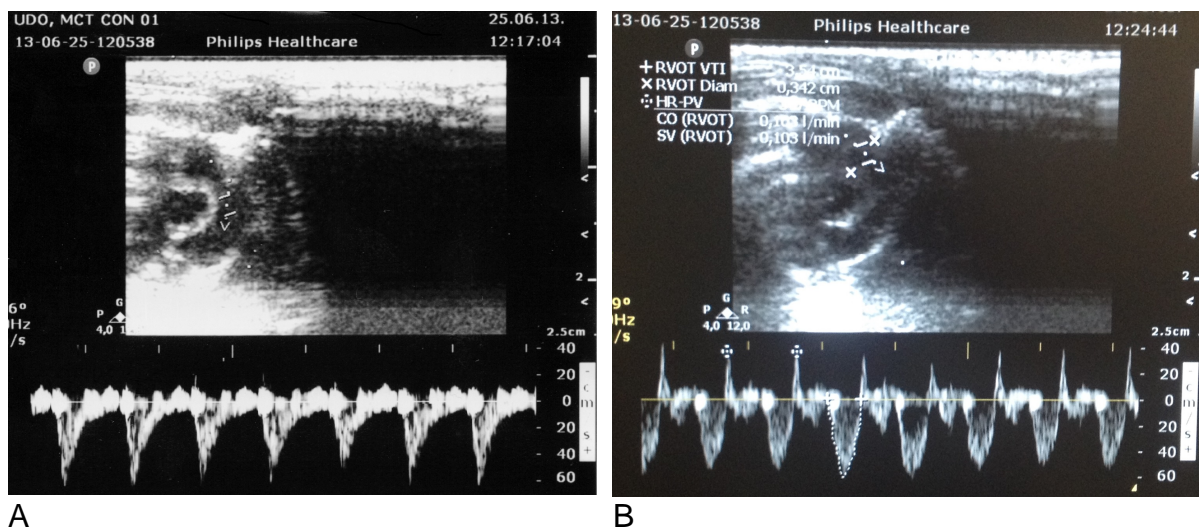


Slika 11 Grafički prikaz kuta osi QRS kompleksa pokusnih životinja (prosjeak ± SE); * p < 0,001 u usporedbi s kontrolnom skupinom

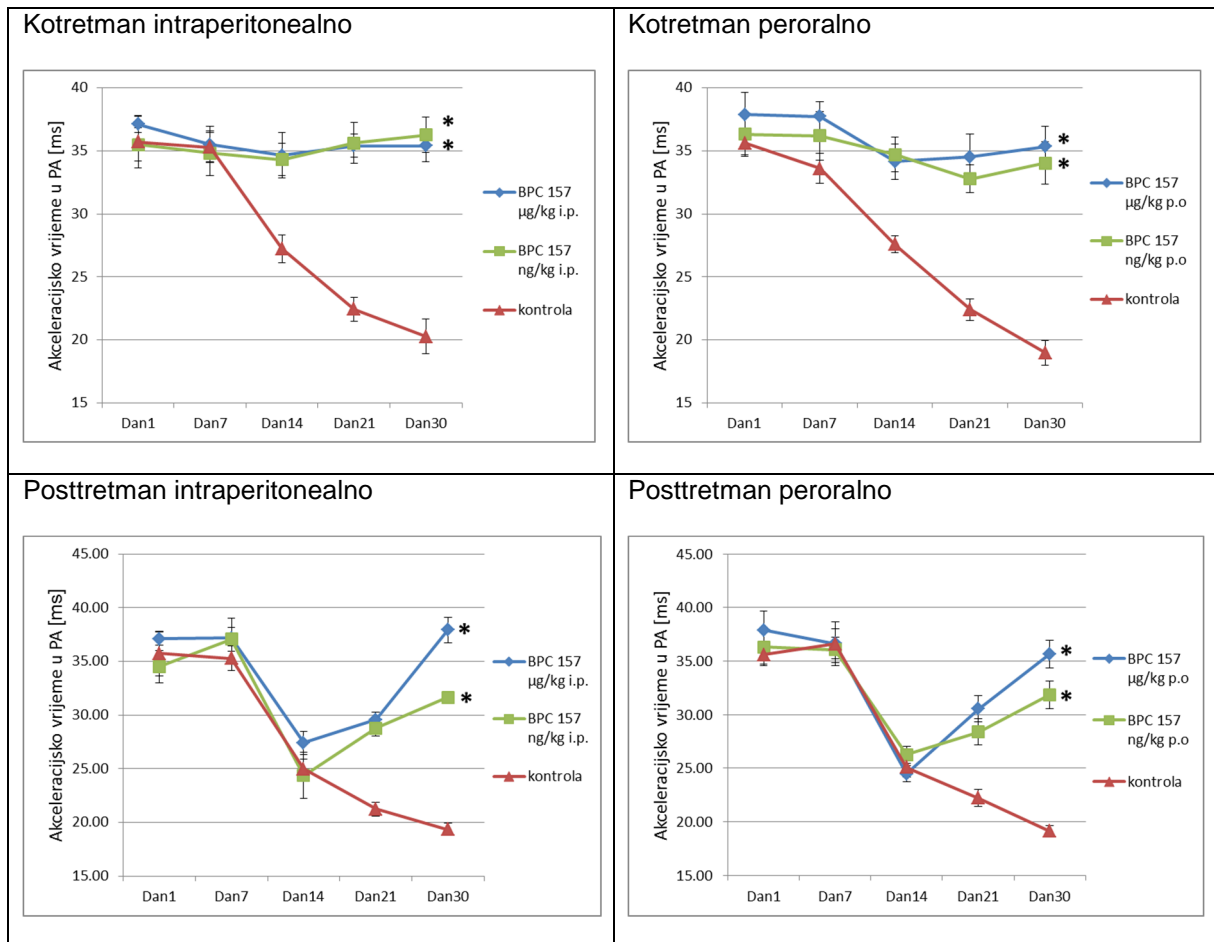
5.3. EHOKARDIOGRAFIJA

Od ehokardiografskih parametara su mjereni akceleracijsko vrijeme u plućnoj arteriji te indeks deformacije lijeve klijetke.

U kotretmanu se u kontrolnim skupinama od 14. dana prati skraćenje akceleracijskog vremena koje je na kraju pokusa statistički značajno, dok u svim skupinama tretiranim s pentadekapeptidom BPC 157 nema promjene (Slika 12). U posttretmanu se prati u tretiranih životinja 14. dana skraćenje akceleracijskih vremena, da bi s početkom aplikacije pentadekapeptida BPC 157 u svim skupinama došlo do produljenja akceleracijskih vremena, i njihovog oporavka na ishodišne vrijednosti, što je 30. dana statistički značajno naspram kontrolnih skupina (Slika 13).

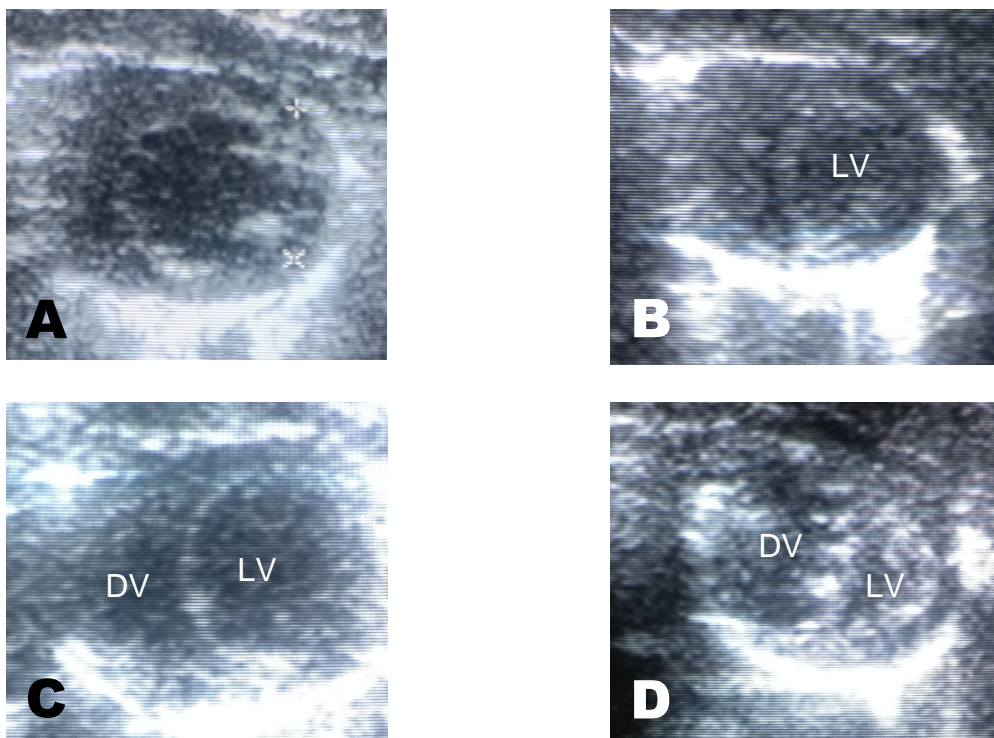


Slika 12 Protok kroz plućnu arteriju snimljen 30. dana uporabom pulsog dopplera: A - Kotretman kontrola 1 i.p. B – Kotretman BPC 157 10 µg/kg i.p.;



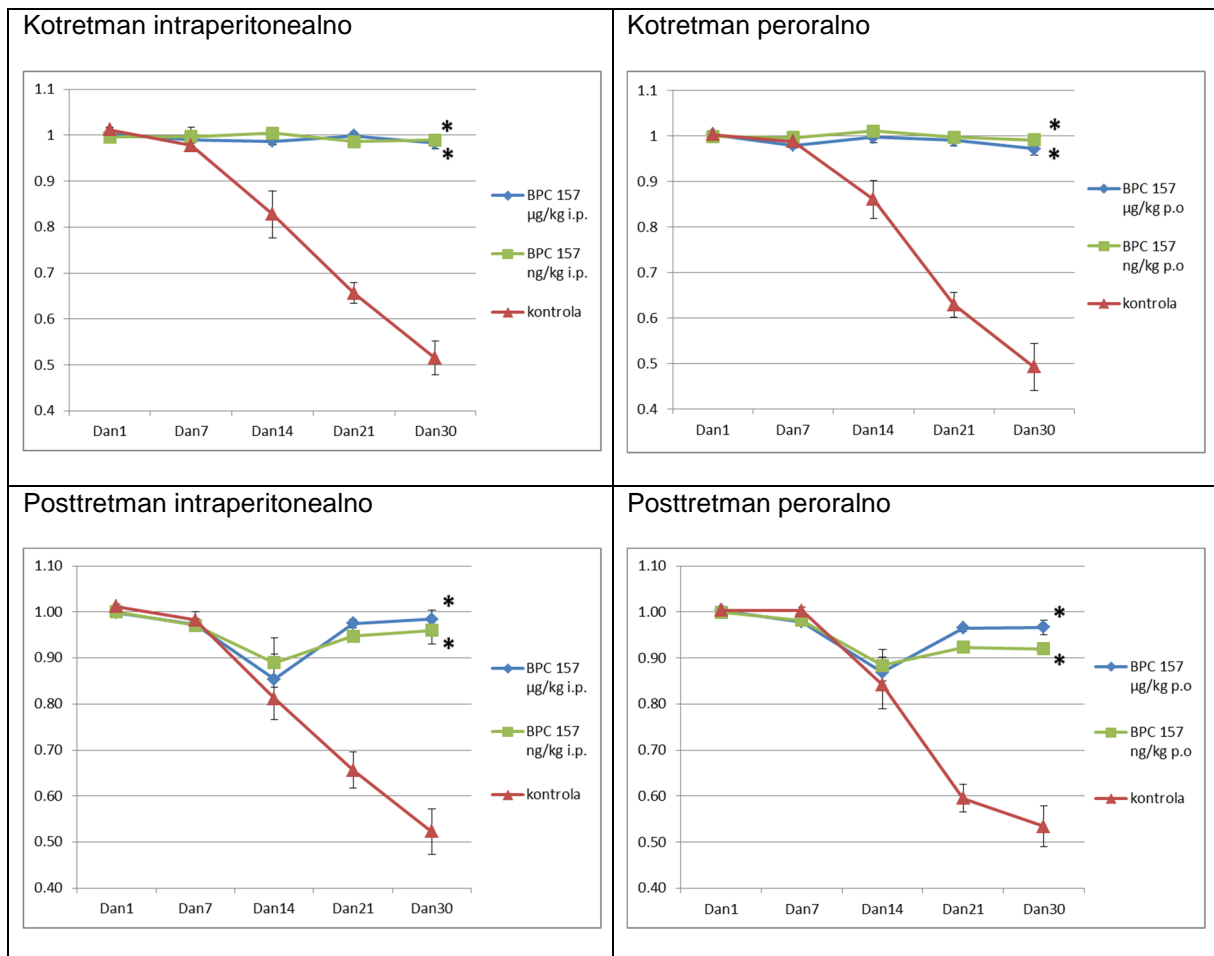
Slika 13 Grafički prikaz akceleracijskog vremena plućne arterije (prosjek \pm SE); * $p < 0,001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Indeks deformacije lijeve klijetke dobiven je odnosom male prema velikoj osi lijeve klijetke (Slika 14). Prema krivuljama je vidljivo da u životinja tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 u kotretmanu tijekom cijele studije nije zabilježena deformacija lijeve klijetke. U kontrolnim skupinama od 14. dana je zabilježena promjena koja je 21. te 30. dana bila sve izraženija i statistički značajna. U životinja tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 od 15 dana u posttretmanu, prati se 21. i 30. dana oporavak oblika lijeve klijetke, što ukazuje na smanjenje tlakova u desnoj klijetki.



Slika 14

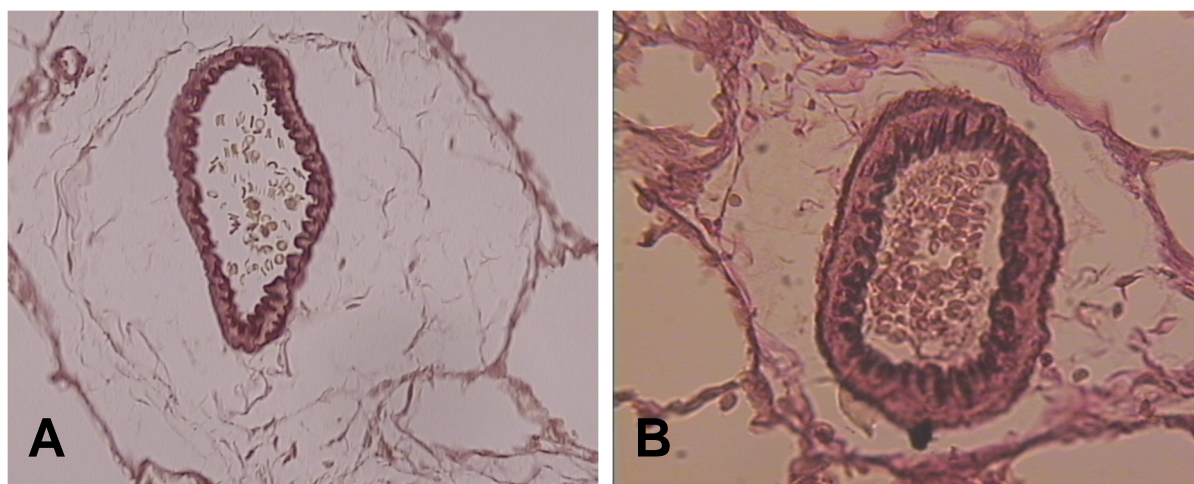
Za procjenu porasta tlaka u desnoj klijetki mjereno je u parasternalnoj kratkoj osi u razini papilarnih mišića indeks deformacije lijeve klijetke: odnos kratkog promjera naspram dugog promjera lijeve klijetke u endsistoloidnoj fazi: A - Posttretman BPC 157 10 µg/kg i.p. 1. dana; B - Posttretman kontrola 1 15. dana; C - Posttretman BPC 157 10 µg/kg i.p. 30. dana; D - Posttretman kontrola 2 30. dana; (Philips SD800, vaskularna sonda 7,5 MHz)



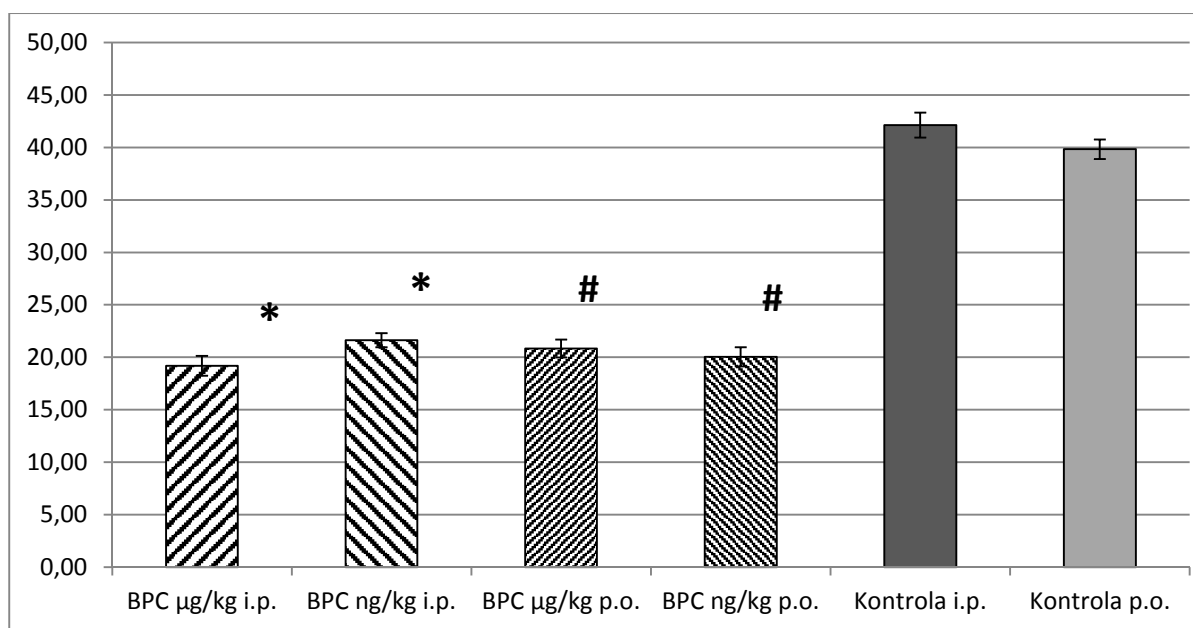
Slika 15 Grafički prikaz deformacijskog indeksa lijeve klijetke (prosjeak \pm SE); * $p < 0,001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

5.4. PATOHISTOLOGIJA

Tablica 8 donosi prikaz rezultata patohistološke analize. Na presjecima plućnih arterija u životinja u skupinama tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 u kotretmanu nije zabilježena hipertrofija medije, za razliku od kontrolnih skupina s izrađenom i statistički značajno uvećanim udjelom površine medije u ukupnoj površini arterije (Slika 16 i Slika 17).

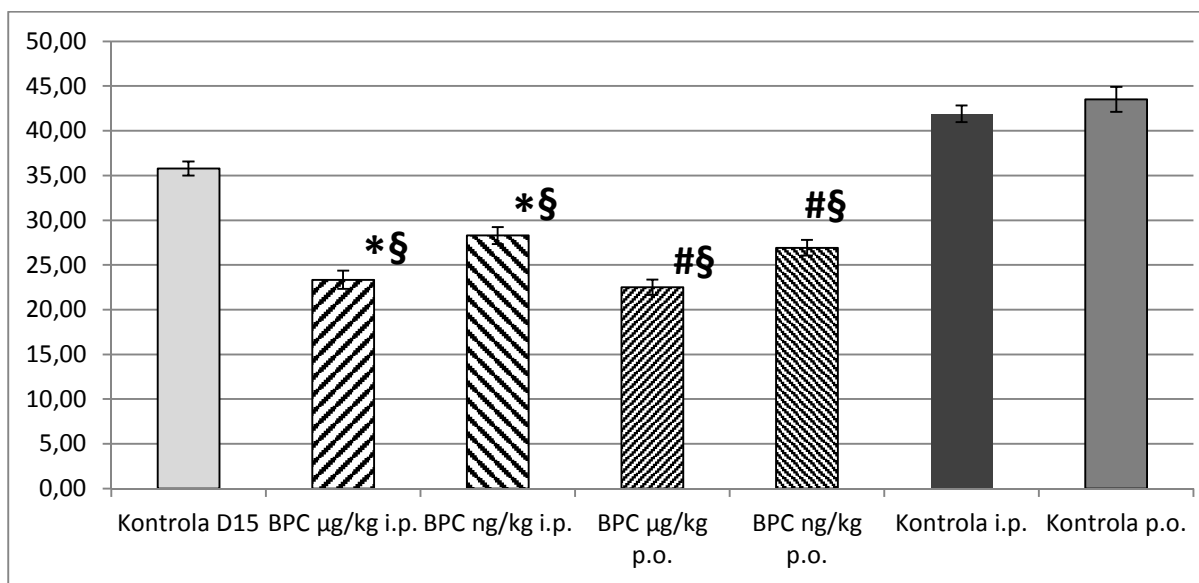


Slika 16 Snimak (40x) plućnih arterija štakora obojenih po metodi orcein - van Gieson: A – Posttretman BPC 157 10 µg/kg i.p.; B – Posttretman kontrola i.p.



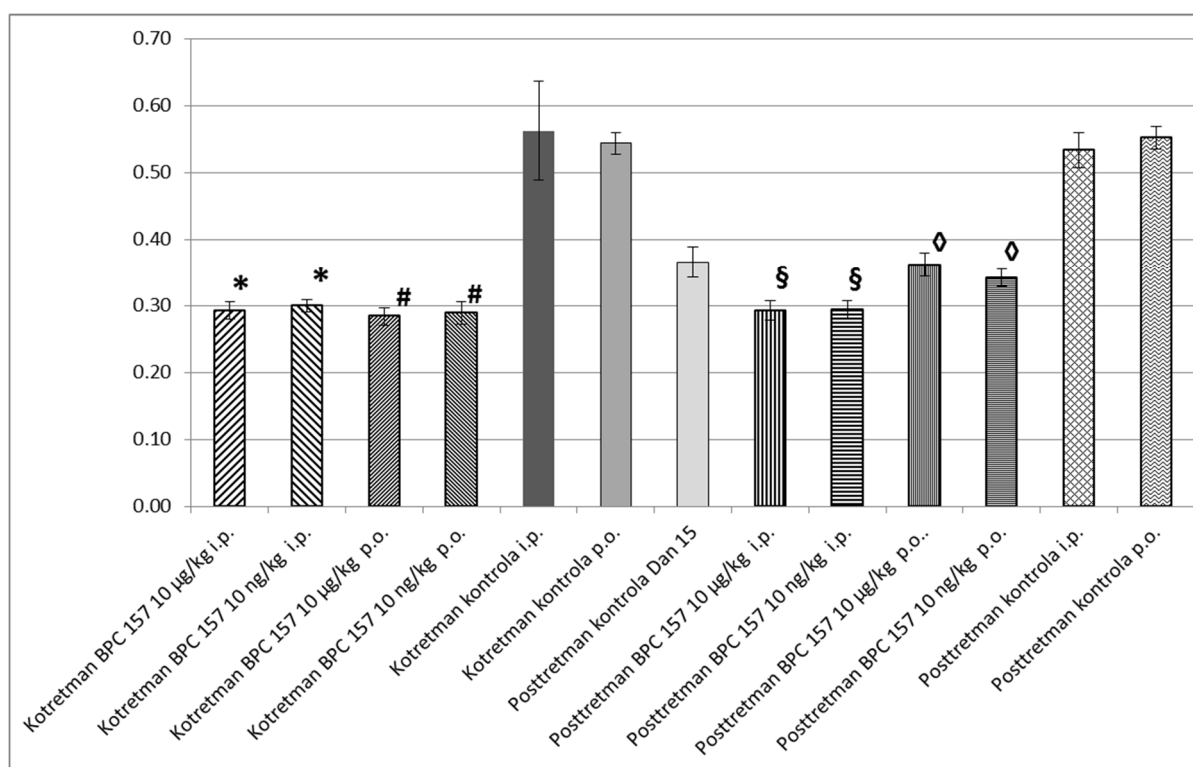
Slika 17 Kotretman: hipertrofija medije izražena kao MP/UP u %, (prosjeak ± SE); * $p < 0,001$ prema Kontrola i.p.; # $p < 0,001$ prema Kontrola p.o

U životinja u posttretmanu je isto tako vidljiva statistički značajna razlika između životinja tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 i kontrolnih skupina. Hipertrofija medije je vidljiva već i u skupini žrtvovanoj 15. dana, prije početka tretmana. Obzirom da je debljina medije u tretiranih životinja statistički značajno manja, to ukazuje na regresiju hipertrofije medije uslijed tretmana s pentadekapeptidom BPC 157 (Slika 18).

**Slika 18**

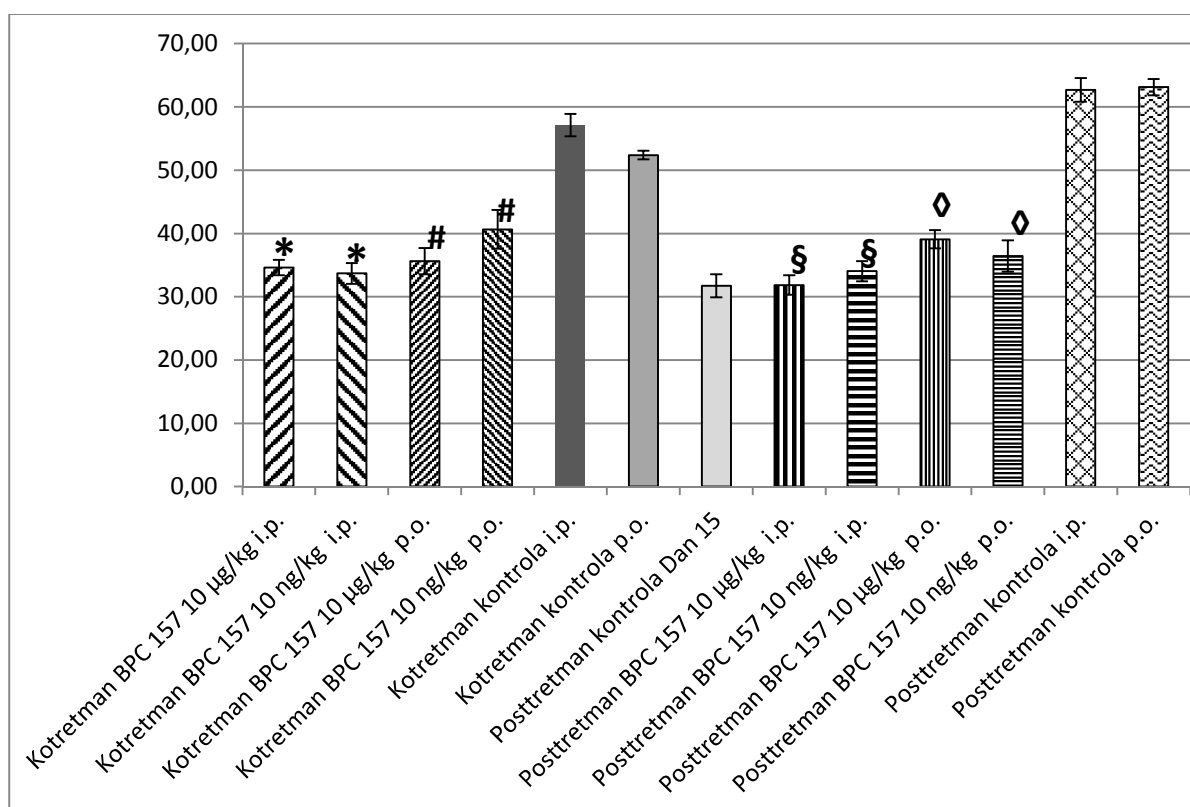
Posttretman: hipertrofija medije izražena kao MP/UP u %, (prosjeak ± SE); * $p < 0,001$ prema Kontrola i.p.; # $p < 0,001$ prema Kontrola p.o.; § $p < 0,001$ prema Kontrola D15

Mase slobodnih stijenki desne klijetke su bile uredne u svih životinja tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157, neovisno o dozi i režimu tretmana. Istovremeno su sve životinje u kontrolnim skupinama imale značajnu hipertrofiju slobodnih stijenki što je dovelo do porasta mase slobodne stijenke desne klijetke. Statistički značajna razlika je vidljiva i kod Fultonovog indeksa: odnosa mase desne klijetke prema zbroju težina lijeve klijetke i interventrikularnog septuma (Slika 19). U posttretmanu isto tako nije bilo statistički signifikantne razlike između tretiranih skupina i kontrolne skupine žrtvovane 15. dana.



Slika 19 Fultonov indeks (prosjeak ± SE); * $p < 0,001$ prema Kotretman kontrola i.p.; # $p < 0,001$ prema Kotretman kontrola p.o.; § $p < 0,001$ prema Posttretman kontrola i.p.; ◊ $p < 0,001$ prema Posttretman kontrola p.o.

Odmah po žrtvovanju izvagane su i jetre resecirane in toto. Ovdje su također dobivene statistički značajne razlike između tretiranih životinja i odgovarajućih kontrolnih skupina. U kontrolnim skupinama jetre su imale značajno veću masu kao i veći udio u ukupnoj tjelesnoj masi, kao posljedica kongestije uslijed srčanog popuštanja (Slika 20). U životinja u posttretmanu žrtvovanih 15. dana nije zabilježeno uvećanje jetrene mase.



Slika 20 Relativna masa jetre u mg/g tjelesne mase (prosjeak ± SE); * $p < 0,001$ prema Kotretman kontrola i.p.; # $p < 0,001$ prema Kotretman kontrola p.o.; § $p < 0,001$ prema Posttretman kontrola i.p.; ◇ $p < 0,001$ prema Posttretman kontrola p.o.

Tablica 8. Prikaz rezultata parametara jetre, srca i patohistološke analize (prosjeak ± SE)

	TT kraj (g)	srce (g)	DV (g)	LV+IVS (g)	jetra (g)	DV / (LV+IVS)	DV / TT (mg/g)	jetra / TT (mg/g)	Površina medije %
Kotretman BPC 157 10 µg/kg TT i.p.	252,50 ± 8,73	0,88 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,53 ± 0,03	8,72 ± 0,35	0,29 ± 0,01	0,61 ± 0,02	34,60 ± 1,20	19,19 ± 0,94
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	258,33 ± 4,59	0,99 ± 0,06	0,18 ± 0,01	0,59 ± 0,05	8,68 ± 0,36	0,30 ± 0,01	0,68 ± 0,03	33,68 ± 1,63	21,63 ± 0,66
Kotretman BPC 157 10 µg/kg TT p.o.	257,50 ± 5,28	1,02 ± 0,09	0,17 ± 0,01	0,62 ± 0,06	9,14 ± 0,44	0,28 ± 0,01	0,67 ± 0,04	35,64 ± 2,07	20,83 ± 0,84
Kotretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	243,67 ± 4,18	0,95 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,58 ± 0,04	9,90 ± 0,74	0,29 ± 0,02	0,68 ± 0,04	40,66 ± 3,05	20,04 ± 0,92
Kotretman kontrola 1	224,50 ± 3,46	1,12 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,59 ± 0,03	12,82 ± 0,43	0,56 ± 0,07	1,44 ± 0,14	57,11 ± 3,76	42,13 ± 1,19
Kotretman kontrola 2	226,75 ± 4,39	1,19 ± 0,05	0,34 ± 0,02	0,62 ± 0,02	12,30 ± 0,04	0,54 ± 0,02	1,42 ± 0,08	52,37 ± 2,69	39,83 ± 0,92
Posttretman kontrola 1	201,33 ± 6,40	0,77 ± 0,05	0,15 ± 0,01	0,41 ± 0,03	6,39 ± 0,44	0,37 ± 0,02	0,75 ± 0,04	31,74 ± 1,83	35,79 ± 0,79
Posttretman BPC 157 10 µg/kg TT i.p.	233,17 ± 9,24	0,85 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,52 ± 0,04	7,47 ± 0,58	0,29 ± 0,01	0,64 ± 0,01	31,86 ± 1,54	23,33 ± 1,02
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT i.p.	232,17 ± 5,15	0,87 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,50 ± 0,02	9,06 ± 0,33	0,36 ± 0,02	0,77 ± 0,01	39,07 ± 1,44	30,15 ± 0,86
Posttretman BPC 157 10 µg/kg TT p.o.	240,17 ± 7,41	0,90 ± 0,05	0,16 ± 0,00	0,54 ± 0,03	8,19 ± 0,50	0,29 ± 0,01	0,66 ± 0,01	34,05 ± 1,59	22,58 ± 0,86
Posttretman BPC 157 10 ng/kg TT p.o.	232,33 ± 4,45	0,93 ± 0,03	0,19 ± 0,00	0,55 ± 0,02	8,47 ± 0,62	0,34 ± 0,01	0,80 ± 0,01	36,43 ± 2,47	28,50 ± 0,91
Posttretman kontrola 2	207,60 ± 5,19	1,02 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,49 ± 0,01	12,85 ± 0,31	0,53 ± 0,03	1,27 ± 0,07	62,07 ± 2,35	41,92 ± 0,93
Posttretman kontrola 3	205,75 ± 3,20	1,04 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,50 ± 0,02	13,19 ± 0,22	0,55 ± 0,02	1,39 ± 0,07	64,13 ± 0,99	43,51 ± 1,40

6. RASPRAVA

Model plućne hipertenzije korišten u ovoj studiji dobro je opisan u literaturi, i predstavlja standardni i najčešće korišteni životinjski model plućne hipertenzije (16, 184). Ovaj štakorski model unutar samo mjesec dana klinički i patohistološki reproducira kroničnu i progresivnu bolest s dugogodišnjim razvojem u čovjeka (247). Točan način na koji MCT izaziva plućnu hipertenziju je još uvijek predmet rasprava (248). Smatra se da se inicijalna lezija događa u endotelu arterija koji dovodi do upalnog odgovora (249). Supkutana injekcija MCT-a u štakora izaziva tešku progresivnu PH sličnu ljudskoj IPAH. Progresivna hipertrofija glatko mišićnih stanica medije započinje oko 4. dana te traje do dana 15 (250). Od drugog tjedna se prati porast tlaka u plućnoj cirkulaciji te nastanak hipertrofije desne klijetke, koja od 4. tjedna zbog progresivnog povećanja tlaka u plućnoj cirkulaciji prelazi u dekompenziranu fazu i dilataciju desne klijetke s kliničkim znakovima desnostranog srčanog popuštanja (250).

Endotelna ozljeda i disfunkcija su glavne značajke MCT inducirane PH (251). Poremećaj u odnosu između vazodilatatora i vazokonstriktora u PH vjerojatno je posljedica plućne endotelne ozljede. NO, prostaglandin I₂ (PGI₂) te endotelin 1 (ET-1) ključni su vazoaktivni medijatori i terapijski ciljevi u bolesnika s PH. Cijeli niz dosadašnji studija potvrdio je da su u MCT induciranoj PH u životinja snižene razine NO i eNOS, PGI₂ te COX-2, a povišene ET-1 i endotelin konvertirajućeg enzima (252-255). Dušikov monoksid (NO) najjednostavniji je dušikov oksid koji igra važnu ulogu u homeostazi (256, 257). Prema dosadašnjim studijama, upravo manjak raspoloživog NO igra važnu ulogu u nastanku monokrotalinom inducirane plućne hipertenzije u štakora (258, 259), čime NO sustav predstavlja važan potencijalni terapijski cilj (260).

U kotretmanu primjena pentadekapeptida BPC 157 počela je odmah nakon davanja monokrotalina. Tijekom trajanja cijelog pokusa u tretiranih životinja nije došlo do patoloških promjena promatranih parametara. U isto vrijeme su se u kontrolnim skupinama promjene događale i pratile u očekivanom vremenskom slijedu. Kao indirektni pokazatelj plućne hipertenzije - značajno smanjenje akceleracijskog vremena u plućnoj arteriji i smanjenje indeksa deformacije lijeve klijetke – prisutni su već od 14. dana, a do žrtvovanja životinja se pojačavaju. Od kliničkih pokazatelja se od 3. tjedna prati povećanje respiratorne frekvencije, dok se smanjenje tjelesne mase uslijed desnostranog srčanog popuštanja i kongestije te kardijalne kaheksije primjećuje tijekom 4. tjedna pokusa. Od promjena se u EKG-u od 14. dana pratio porast postupne devijacije osi u desno i redukcije frekvencije srca, što je već ranije opisano u MCT modelu PAH, dok se od 21. dana prati i značajno produljenje QT_c intervala, što je u skladu s razvojem hipertrofije desne klijetke.

Pentadekapeptid BPC 157 je nakon inicijalne lezije monokrotalinom u svim tretiranim skupinama, neovisno o dozi i načinu primjene, spriječio nastanak remodelirajućeg procesa i strukturnih promjena u plućnim arterijama i hipertrofije medije s posljedičnim razvojem plućne hipertenzije. Obzirom da je opće prihvaćeno da je endotelna lezija incijalni korak u patofiziološkom slijedu nastanka PH inducirane monokrotalinom (184, 251), za pretpostaviti je da je pentadekapeptid BPC 157 upravo ovdje ostvario svoj protektivni učinak. Protektivni učinak pentadekapeptida BPC 157 na endotel je opisan već 1997. kada je opisano sprječavanje difundiranja plavog Monastral pigmenta između endotelnih stanica u modelima želučanog i duodenalnog ulkusa na malim arterijama (113). Također, pentadekapeptid BPC 157 je na velikoj arteriji u modelu aortne termino-terminalne anastomoze spriječio formiranje tromba te je ponovno uz protekciju pokazao ubrzanje liječenja oštećenog endotela. Općenito je snažni

protuupalni učinak dobro dokazan i proučen za pentadekapeptid BPC 157 u prethodnim studijama (112, 137, 138). On uključuje inhibiciju kalcijskog kanala A23187, snižavanje leukotrijena (npr. LTB₄), drugih upalnih medijatora (npr., tromboksana B₂ (TXB) i mijeloperoksidaze (MPO)), u životinjskim tkivima i u ljudskoj krvi pentadekapeptid BPC 157 je u kotretmanu pokazao protektivni učinak na endotel. Obzirom da tijekom cijelog pokusa u tretiranih životinja u kotretmanu nije zabilježena niti jedna patološka promjena, za prepostaviti je da je u ovom režimu primjene do punog izražaja došao protuupalni učinak pentadekapeptida BPC 157 kao i njegov protektivni učinak na endotel.

U posttretmanu je terapijska intervencija s pentadekapeptidom BPC 157 inicirana nakon što se plućna hipertenzija već bila razvila. Usprkos relativno kasnoj primjeni pentadekapeptid BPC 157, u tretiranim skupinama zabilježeno je značajno smanjenje plućne hipertenzije koja se razvijala kao posljedica lezije izazvane MCT, što je dokazano normalizacijom indirektnih ehokardiografskih i elektrokardiografskih znakova plućne hipertenzije od 15. do 30. dana u svim tretiranim skupinama. Također, prati se značajno veći mortalitet među životinjama u kontrolnim skupinama. Znakovi srčanog popuštanja su isto tako primijećeni samo u kontrolnim skupinama u zadnjem tjednu pokusa.

Ta činjenica zajedno s profilom promjena - nije zabilježen pad sistemskog arterijskog tlaka - ukazuju da pentadekapeptid BPC 157 ima pored vazodilatacijskog učinka i antiremodelirajući učinak na plućnu cirkulaciju. Učinkom na smanjenje tlaka u plućnoj cirkulaciji, pentadekapeptid BPC 157 je spriječio tlačno opterećenje i hipertrofiju desne klijetke, što se očitovalo značajnom razlikom u Fultonovom indeksu.

Normalizacija elektrokardiografskih parametara, u prvom redu sprječavanje produljenja QTc intervala, korelira također s poboljšanjem funkcije desne klijetke, što je opisano kod plućne hipertenzije u ljudi, te kao neovisni prediktor korelira s preživljenjem (261).

Patohistološka analiza je pokazala da je debljina medije prekapilarnih plućnih arterija u tretiranih skupina u postretmanu bila značajno manja u usporedbi s kontrolnim skupinama, uključivši i nalaz hipertrofije medije životinja žrtvovanih 15. dana, što ukazuje na reverziju negativnog remodeliranja i nastanka hipertrofije medije arterija, ta na restituciju endovaskularnog lumena plućnih arterija. Činjenica da nije došlo do pada sistemskog tlaka, u skladu je s prethodnim istraživanjima (104). Tako je poznat antihipertenzivni učinak pentadekapeptida BPC 157 u modelu L-NAME inducirane arterijske hipertenzije (116) te antihipotenzivni učinak u modelu L-argininom inducirane arterijske hipotenzije. Iako je dokazano da pentadekapeptid BPC 157 nema izravni angiogeni učinak u staničnim kulturama, on pokazuje pozitivni angiomodulirajući učinak u životinjskim modelima cijeljenja mišića i tetive, što rezultira brzim i boljim cijeljenjem (262).

Mehanizmi putem kojih je pentadekapeptid BPC 157 u ovoj studiji ostvario protektivno i terapijsko djelovanje nisu razjašnjeni i nadilaze okvire ovog istraživanja. No, imajući u vidu da je patogeneza plućne hipertenzije, kako u čovjeka, tako i u monokrotalinskom štakorskom modelu nakon endotelne lezije, multifaktorsko zbivanje, u obzir dolazi nekoliko mehanizama, za koje se iz ranijih istraživanja zna da na njih djeluje pentadekapeptid BPC 157.

Tako se kao jedan od mogućih i vjerojatnih puteva djelovanja najprije nameće NO sustav. Pentadekapeptid BPC 157 sam inducira stvaranje NO-a koji se ne može inhibirati s L-NAME (116), Pokazujući oporavak NO-a potreban za oporavak u kongestivnom srčanom zatajenju i nefrotskom sindromu, BPC 157 prevenira i popravlja L-NAME hipertenziju zajedno sa suprotstavljanjem ulcerogenezi. BPC 157 je spriječio L-NAME izazvanu hipertenziju kao i L-argininom izazvanu hipotenziju u istim dozama u kojima je pokazao antiulkusni učinak i odnos s NO sustavom u zaštiti želučane sluznice (116, 257).

Kontrolirano stvaranje NO važno je za regulaciju cirkulacije i njenu homeostazu. Pentadekapeptid BPC 157 uzrokuje stvaranje NO u homogenatu želučanog tkiva štakora slično kao i L-arginin, ali, za razliku od L-arginina, njegov učinak se ne umanjuje djelovanjem L-NAME. Dalje je pokazano da pentadekapeptid BPC 157 može umanjiti promjene uzrokovane odvojenom primjenom L-NAME i L-arginina, iako njihovom kombiniranom primjenom učinak BPC 157 slabi (122). Sam BPC 157 nema utjecaj na bazalne vrijednosti krvnog tlaka, no učinkovito suzbija porast krvnog tlaka uzrokovanog primjenom L-NAME, kao i pad tlaka izazvan L-argininom (122). U modelima hipovolemije i hipotenzije primjena BPC 157 dovodi do brze i postojane resustitucije krvnog tlaka uz sprječavanje smrtnog ishoda (105).

Pored NO sustava, važnu ulogu i terapijski cilj u plućnoj hipertenziji igra i endotelin. Na životinjskom modelu doksorubicinom uzrokovanog zatajenja srca uspoređen je učinak pentadekapeptida BPC 157, amlodipina i losartana, a kao pokazatelj težine zatajenja srca određivan je bigendotelin-1, biološki manje aktivan prekursor endotelina-1, čiju je razinu pentadekapeptid BPC 157 učinkovito smanjio u sistemske cirkulaciji (173).

Prolongacija QT_c intervala je identificirana u ljudskim i životinjskim studijama kao neovisan prediktor mortaliteta. Uz to QT_c korelira s tlakovima u plućnoj cirkulaciji dilatacijom desne klijetke te obrnuto korelira s funkcijom desne klijetke. Studije na životinjskim modelima također pokazuju da produljenje QT intervala nastaje zbog redukcije repolarizirajućih K⁺ struja i prolongacije ventrikularnog akcijskog potencijala, što može omogućiti supstrat za ventrikularne aritmije. Povoljan antiaritmogeni učinak BPC-a 157 pri hiperkalemiji zapažen je na WT HEK293 stanicama. Taj se učinak pripisuje inhibiciji provodljivosti kalija na staničnoj membrani (128). Jasno poboljšanje QT i QT_c intervala u svim skupinama tretiranim s pentadekapeptidom BPC 157 pokazuje da pentadekapeptid BPC 157 značajno reducira rizik aritmija. Taj učinak pentadekapeptida BPC 157 pored izravnog povoljnog učinka na hemodinamske parametre, kao što su zaustavljanje negativnog remodeliranja plućne vaskulature i smanjenja plućnog arterijskog tlaka, vjerojatno ostvaruje i preko prethodno dokazanog antiaritmogenog učinka. To je u skladu s prethodnim istraživanjima (127, 128), koja su pokazala da pentadekapeptid BPC 157 sprječava prolongaciju QT intervala.

Na kraju, pentadekapeptid BPC 157 je pokazao i homeostatski učinak na koagulacijski sustav, pokazavši s jedne strane trombolitički učinak u modelu transekcije aorte (152), dok je s druge strane sustavno sprječavao produljenje vremena krvarenja izazvano acetilaslicilnom kiselinom, varfarinom te heparinom, a prevenirao je i nastanak trombocitopenije (164).

Zaključno se može pretpostaviti da su prethodno istraženi mehanizmi djelovanja pentadekapeptida BPC 157 (homeostatski učinak na tlak modulacijom sinteze NO, smanjenje ekspresije endotelina 1, antiaritmijski učinak te homeostatski učinak na koagulacijski sustav), vjerojatno rezultirali pozitivnim učinkom u posttretmanu, i to: prevencijom i reverzijom vaskularnog remodeliranja, čime je postignuto smanjenje

plućne vaskularne rezistencije i plućnog tlaka, te sprječavanje tlačnog opterećenja i razvoja hipertrofije desne klijetke. Koji su pojedini putevi i u kojoj mjeri bili aktivni, nadilazi okvire ove studije, i predstavlja izazov za buduća istraživanja.

Iako je ova studija provedena na životinjskom modelu plućne hipertenzije, koji ne mora biti prediktivan za terapijski odgovor u ljudi, rezultati sugeriraju da pentadekapeptid BPC 157 može biti zaštitni ili antiremodulirajući lijek u bolesnika s plućnom hipertenzijom. Pri tome se pozitivno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 postiže bez obzira na primijenjenu dozu (mikrogrami ili nanogrami), putu aplikacije, u preventivskom (kotretman) ili naknadnom terapijskom (posttretman) protokolu. Ipak stječe se dojam (koji nije statistički verificiran) da su rezultati dobiveni intraperitonealnom aplikacijom nešto bolji, što eventualno može proizlaziti i iz nešto teže standardizacije pri peroralnoj aplikaciji u vodi za piće. Pentadekapeptid BPC 157 ima sličan učinak, kao i u prijašnjim istraživanjima, te je praktična demonstracija koja ukazuje na fiziološki značaj stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 kod očuvanja endotela i krvožilnog sustava. Zaključno ova studija može ukazivati i na buduću primjenu pentadekapeptida BPC 157 u terapiji plućne hipertenzije te općenito endotelne disfunkcije.

7. ZAKLJUČAK

U zaključku, temeljem praćenja kliničkih, elektrokardiografskih, ehokardiografskih i patohistoloških promjena dokazani su protektivni i terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 u monokrotalinskom modelu plućne hipertenzije u štakora, u oba režima primjene (kotretman i posttretman), u obje ispitivane doze (10ng/kg i 10μg/kg) te u oba načina primjene (intraperitonealno i peroralno), pa se obzirom na konzistentan učinak, može ustvrditi da pentadekapeptid BPC 157 posjeduje terapijski potencijal baziran na ovom eksperimentalnom modelu.

8. SAŽETAK

Pentadekapeptid BPC 157 modulira sintezu NO, ima antiaritmijski učinak i protektivno djelovanje na endotel. U ovoj studiji cilj je bio ispitati njegov učinak u štakorskom modelu plućnog srca inducirano monokrotalinom. Ova studija je uključila 13 grupa po 6 životinja (mužjaci, tjelesne mase 150-200 g) .

Pentadekapeptid BPC 157 je davan svakodnevno, u vodi za piće ili per os ad libitum u dvjema dozama (10 µg/kg ili 10 ng/kg), u kotretmanu od 1. do 29. dana ili pak u posttretmanu, u kojem se za početak tretmana se čekao 15. dan i uspostava plućne hipertenzije, te su ga životinje primale od 15. dana do 29. dana.

U kontrolnim skupinama dokazana je izrazita hipertrofija desne klijetke, a histološki je bilo vidljivo masivno zadebljanje medije prekapilarnih arterija, uz kliničko pogoršanje zbog plućne hipertenzije tijekom 4. tjedna nakon injekcije MCT te smrtnošću među pokusnim životinjama uslijed desnostranog srčanog zatajivanja. U kotretmanu pentadekapeptid BPC 157 je u svim modalitetima primjene učinkovito spriječio nastanak plućne hipertenzije sa svim manifestacijama, dok je u posttretmanu pentadekapeptid BPC 157 isto tako u svim modalitetima primjene uspješno sanirao već razvijenu PAH. Zaključujemo da pentadekapeptid BPC 157 uspješno prevenira i terapira MCT induciranu plućnu hipertenziju i plućno srce u štakora.

Ključne riječi: monokrotalin, pentadekapeptid BPC 157, plućna hipertenzija, štakor

9. SUMMARY

Effect of Pentadecapeptide BPC 157 on Monocrotaline Induced Cor Pulmonale in Rat

Mario Udovičić (2015)

Pentadecapeptide BPC 157 modulates synthesis of NO, has antiarrhythmic effect and protective effect on endothelium. This study was designed to investigate its effects in monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats. It included 13 groups by 6 rats (body weight 150-200 g). Pentadecapeptide BPC 157 was given daily, either in drinking water or intraperitoneally, in two different dosages (10 µg/kg i 10 ng/kg), in cotreatment protocol day 1 - 29, while in posttreatment protocol therapeutic intervention with pentadecapeptide BPC 157 was started when the development of pulmonary hypertension had already commenced and was upheld day 15 - 29. In control groups a marked right heart hypertrophy was evident, and massive thickening of the precapillary artery smooth muscle layer was histologically apparent, with cilncal deterioration due to pulmonary hypertension during the 4. week after MCT injection, and some animals dying during this period because of right heart failure. In cotreatment protocol pentadecapeptide BPC 157 consistently prevented in all application modalities the development of pulmonary hypertension with all its manifestations, while in posttreatment therapeutic protocol BPC 157 reversed also in all application modalities the already established PAH. We conclude that pentadecapeptide BPC 157 prevents and attenuates MCT-induced pulmonary hypertension and cor pulmonale in rats.

Keywords: monocrotaline, pentadecapeptide BPC 157, rat, pulmonary hypertension

10. POPIS LITERATURE

1. Forssmann W. Die Sondierung des Rechten Herzens. *Klin Wochenschr.* 1929;8(45):2085-7.
2. Klob J. Endarteriitis pulmonalis deformans. *Wien Wochenblatt.* 1865;31:45.
3. von Romberg E. Über Sklerose der Lungenarterie. *Dtsch Arch Klin Med.* 1891;48:197-206.
4. Larrabee WF, Parker RL, Edwards JE. Pathology of intrapulmonary arteries and arterioles in mitral stenosis. *Proc Mayo Clin.* 1949;24:316-26.
5. Dresdale DT, Schultz M, Michtom RJ. Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. *The American journal of medicine.* 1951;11(6):686-705.
6. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013;62(25 Suppl):D34-41.
7. Chronic cor pulmonale. Report of an expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1961;213:35.
8. Fishman AP. State of the art: chronic cor pulmonale. *Am Rev Respir Dis.* 1976;114(4):775-94.
9. Weitzenblum E. Chronic cor pulmonale. *Heart.* 2003;89(2):225-30.
10. Rich S. Clinical insights into the pathogenesis of primary pulmonary hypertension. *Chest.* 1998;114(3 Suppl):237S-41S.
11. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society

- (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*. 2009;30(20):2493-537.
12. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal*. 2015.
 13. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(5):1256-76.
 14. Chin KM, Kim NH, Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis*. 2005;16(1):13-8.
 15. Hemnes AR, Champion HC. Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension. *International journal of clinical practice Supplement*. 2008(160):11-9.
 16. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297(6):L1013-32.
 17. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension

- a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(17):1573-619.
18. Tomulić V, Vitezić D, Zaputović L. Plućna arterijska hipertenzija - rijetka i teška bolest. *Medix*. 2010;87/88:172-6.
 19. Badesch DB, Abman SH, Ahearn GS, Barst RJ, McCrory DC, Simonneau G, et al. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2004;126(1 Suppl):35S-62S.
 20. Taichman DB, Ornelas J, Chung L, Klinger JR, Lewis S, Mandel J, et al. Pharmacologic therapy for pulmonary arterial hypertension in adults: CHEST guideline and expert panel report. *Chest*. 2014;146(2):449-75.
 21. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Annals of internal medicine*. 1991;115(5):343-9.
 22. Galie N, Ghofrani AH. New horizons in pulmonary arterial hypertension therapies. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2013;22(130):503-14.
 23. Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacology & therapeutics*. 2001;92(1):1-20.
 24. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*. 1997;150(4):1349-60.

25. Passman JN, Dong XR, Wu SP, Maguire CT, Hogan KA, Bautch VL, et al. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(27):9349-54.
26. Davie NJ, Crossno JT, Jr., Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, et al. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286(4):L668-78.
27. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circulation research*. 2002;90(11):1189-96.
28. Dingemans KP, Wagenvoort CA. Pulmonary arteries and veins in experimental hypoxia. An ultrastructural study. *Am J Pathol*. 1978;93(2):353-68.
29. Wang YX, Fitch RM. Vascular stiffness: measurements, mechanisms and implications. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2(4):379-84.
30. Heath D, Smith P, Gosney J, Mulcahy D, Fox K, Yacoub M, et al. The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension. *Br Heart J*. 1987;58(3):204-13.
31. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation*. 1989;80(5):1198-206.

32. Perros F, Dorfmuller P, Souza R, Durand-Gasselín I, Mussot S, Mazmanian M, et al. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2007;29(3):462-8.
33. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ios V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111(23):3105-11.
34. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(3):261-72.
35. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1992;327(2):70-5.
36. Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(1):105-13.
37. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of internal medicine*. 1991;114(6):464-9.
38. Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, et al. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nature medicine*. 2002;8(10):1129-35.
39. Sim JY. Nitric oxide and pulmonary hypertension. *Korean J Anesthesiol*. 58(1):4-14.

40. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
41. Barbera JA, Peinado VI, Santos S, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(4):709-13.
42. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension*. 2001;37(2):322-7.
43. Budts W, Pokreisz P, Nong Z, Van Pelt N, Gillijns H, Gerard R, et al. Aerosol gene transfer with inducible nitric oxide synthase reduces hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation*. 2000;102(23):2880-5.
44. Dumas JP, Bardou M, Goirand F, Dumas M. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *General pharmacology*. 1999;33(4):289-97.
45. Mitani Y, Maruyama K, Sakurai M. Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation*. 1997;96(2):689-97.
46. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol*. 1992;262(4 Pt 1):C882-90.
47. Voelkel NF, Tuder RM. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 1995;8(12):2129-38.

48. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca(2)(+) signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(8):H1546-62.
49. Lannan KL, Phipps RP, White RJ. Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. *Drug discovery today*. 2014;19(8):1230-5.
50. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(10):2811-21.
51. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, et al. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(5):590-8.
52. Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, et al. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):C316-30.
53. Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1 Suppl):S10-9.
54. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Ziadigie P, et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(3):512-23.
55. Dahal BK, Cornitescu T, Tretyn A, Pullamsetti SS, Kosanovic D, Dumitrascu R, et al. Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary

- hypertension. American journal of respiratory and critical care medicine. 2010;181(2):158-67.
56. Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, Gunther S, Girerd B, Jais X, et al. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. Pharmacology & therapeutics. 2014;141(2):172-91.
57. Tozzi CA, Poiani GJ, Harangozo AM, Boyd CD, Riley DJ. Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium. The Journal of clinical investigation. 1989;84(3):1005-12.
58. Kolpakov V, Rekhter MD, Gordon D, Wang WH, Kulik TJ. Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types. Circulation research. 1995;77(4):823-31.
59. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. Circulation research. 2014;115(1):165-75.
60. Fagan KA, Badesch DB. Pulmonary hypertension associated with connective tissue disease. Prog Cardiovasc Dis. 2002;45(3):225-34.
61. Papamatheakis DG, Mocumbi AO, Kim NH, Mandel J. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. Pulm Circ. 2014;4(4):596-611.
62. Pullamsetti SS, Savai R, Janssen W, Dahal BK, Seeger W, Grimminger F, et al. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;17(1):7-14.

63. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(5):1628-31.
64. Demarco VG, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Habibi J, Dellsperger KC. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World journal of cardiology*. 2010;2(10):316-24.
65. Dweik RA. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax*. 2005;60(4):265-7.
66. Kruzliak P, Maruyama J, Maruyama K. Role of nitric oxide in pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension. *Vitamins and hormones*. 2014;96:407-24.
67. Granton J, Moric J. Pulmonary vasodilators--treating the right ventricle. *Anesthesiology clinics*. 2008;26(2):337-53, vii.
68. Frazziano G, Al Ghouleh I, Baust J, Shiva S, Champion HC, Pagano PJ. Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox4. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;306(2):H197-205.
69. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation*. 2000;102(20 Suppl 4):IV14-23.
70. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;135(3):794-804.
71. Howard LS, Grapsa J, Dawson D, Bellamy M, Chambers JB, Masani ND, et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard

- operating procedure. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2012;21(125):239-48.
72. D'Alto M, Romeo E, Argiento P, Di Salvo G, Badagliacca R, Cirillo AP, et al. Pulmonary arterial hypertension: the key role of echocardiography. *Echocardiography*. 2015;32 Suppl 1:S23-37.
73. Bossone E, D'Andrea A, D'Alto M, Citro R, Argiento P, Ferrara F, et al. Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2013;26(1):1-14.
74. Lindqvist P, Calcuttea A, Henein M. Echocardiography in the assessment of right heart function. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology*. 2008;9(2):225-34.
75. Wensel R, Opitz CF, Anker SD, Winkler J, Hoffken G, Kleber FX, et al. Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension: importance of cardiopulmonary exercise testing. *Circulation*. 2002;106(3):319-24.
76. Guillinta P, Peterson KL, Ben-Yehuda O. Cardiac catheterization techniques in pulmonary hypertension. *Cardiology clinics*. 2004;22(3):401-15, vi.
77. Swan HJ, Ganz W, Forrester J, Marcus H, Diamond G, Chonette D. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *The New England journal of medicine*. 1970;283(9):447-51.
78. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1992;327(2):76-81.

79. O'Callaghan DS, Savale L, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G, et al. Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(9):526-38.
80. Ryan JJ, Marsboom G, Archer SL. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol.* 2013;218:105-49.
81. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994;46(3):325-415.
82. Abman SH. Role of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Annu Rev Med.* 2009;60:13-23.
83. Seferian A, Simonneau G. Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society.* 2013;22(129):217-26.
84. Galie N, Rubin L, Hoeper M, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer G, et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2008;371(9630):2093-100.
85. Galie N, Beghetti M, Gatzoulis MA, Granton J, Berger RM, Lauer A, et al. Bosentan therapy in patients with Eisenmenger syndrome: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Circulation.* 2006;114(1):48-54.
86. Sitbon O, Gressin V, Speich R, Macdonald PS, Opravil M, Cooper DA, et al. Bosentan for the treatment of human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2004;170(11):1212-7.

87. Iglarz M, Binkert C, Morrison K, Fischli W, Gatfield J, Treiber A, et al. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;327(3):736-45.
88. Gatfield J, Mueller Grandjean C, Sasse T, Clozel M, Nayler O. Slow receptor dissociation kinetics differentiate macitentan from other endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial smooth muscle cells. *PloS one*. 2012;7(10):e47662.
89. Dingemans J, Sidharta PN, Maddrey WC, Rubin LJ, Mickail H. Efficacy, safety and clinical pharmacology of macitentan in comparison to other endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert opinion on drug safety*. 2014;13(3):391-405.
90. Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn EM, Oudiz R, Shapiro S, et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(4):441-7.
91. Lavelle A, Sugrue R, Lawler G, Mulligan N, Kelleher B, Murphy DM, et al. Sitaxsentan-induced hepatic failure in two patients with pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;34(3):770-1.
92. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(1):39-45.
93. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2005;353(20):2148-57.

94. Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, Galie N, Simonneau G, Ghofrani HA, et al. Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest*. 2011;140(5):1274-83.
95. Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2013;369(4):330-40.
96. Narang BK, Roy S, Sharma R, Singh V, Rawal RK. Riociguat as a treatment regime for pulmonary arterial hypertension: a review. *Clinical and experimental hypertension*. 2015;37(4):323-31.
97. Rubin LJ, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a long-term extension study (PATENT-2). *The European respiratory journal*. 2015;45(5):1303-13.
98. Vane J, Corin RE. Prostacyclin: a vascular mediator. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2003;26(6):571-8.
99. Li RC, Cindrova-Davies T, Skepper JN, Sellers LA. Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circulation research*. 2004;94(6):759-67.
100. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized,

- placebo-controlled trial. American journal of respiratory and critical care medicine. 2002;165(6):800-4.
101. Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. European heart journal. 2009;30(4):394-403.
 102. Macchia A, Marchioli R, Marfisi R, Scarano M, Levantesi G, Tavazzi L, et al. A meta-analysis of trials of pulmonary hypertension: a clinical condition looking for drugs and research methodology. American heart journal. 2007;153(6):1037-47.
 103. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, et al. BPC 157's effect on healing. Journal of physiology, Paris. 1997;91(3-5):173-8.
 104. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. Current pharmaceutical design. 2014;20(7):1126-35.
 105. Sikiric P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rotkvic I, et al. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. Journal of physiology, Paris. 1993;87(5):313-27.
 106. Sikiric P. The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). Inflammopharmacology. 1999;7(1):1-14.
 107. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, et al. The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restraint stress, cysteamine and 96%

- ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life sciences*. 1994;54(5):PL63-8.
108. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Digestive diseases and sciences*. 1996;41(8):1604-14.
109. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Perovic 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. *Biological psychiatry*. 1998;43(7):511-9.
110. 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. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(10):1224-34.
111. Turkovic B, Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Ante T, Petek M. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology*. 2004;126.
112. 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. *Journal of physiology, Paris*. 1997;91(3-5):139-49.
113. Sandor Z, Vincze A, Jadus MR, Dohoczky C, Erceg D, Szabo S. The protective effect of newly isolated peptide PL-10 in the iodoacetamide colitis model in rats. *Gastroneterology*. 1997;112:A400.
114. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. Salutory and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute

- pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Digestive diseases and sciences*. 1996;41(7):1518-26.
115. Sikiric P, Mikus D, Seiwert S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, et al. Pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, bromocriptine, and atropine effect in cysteamine lesions in totally gastrectomized rats: a model for cytoprotective studies. *Digestive diseases and sciences*. 1997;42(5):1029-37.
116. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *European journal of pharmacology*. 1997;332(1):23-33.
117. Sikiric P, Separovic J, Buljat G, Anic T, Stancic-Rokotov D, Mikus D, et al. Gastric mucosal lesions induced by complete dopamine system failure in rats. The effects of dopamine agents, ranitidine, atropine, omeprazole and pentadecapeptide BPC 157. *Journal of physiology, Paris*. 2000;94(2):105-10.
118. Bilic I, Zoricic I, Anic T, Separovic J, Stancic-Rokotov D, Mikus D, et al. Haloperidol-stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC 157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. *Life sciences*. 2001;68(16):1905-12.
119. 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. *Journal of physiology, Paris*. 2001;95(1-6):295-301.

120. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1995;272(1):417-22.
121. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1995;272(1):417-22.
122. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *European journal of pharmacology*. 1997;332(1):23-33.
123. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, 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. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2006;12(1):BR36-45.
124. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwert S, Rogic D, Kusec V, et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *Journal of pharmacological sciences*. 2004;95(1):19-26.
125. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;108(1):7-17.

126. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujic D, Drmic D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *European journal of pharmacology*. 2013;701(1-3):203-12.
127. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, et al. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regulatory peptides*. 2009;156(1-3):83-9.
128. Barisic I, Balenovic D, Klicek R, Radic B, Nikitovic B, Drmic D, et al. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. *Regulatory peptides*. 2013;181:50-66.
129. Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life sciences*. 2011;88(11-12):535-42.
130. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Coric M, Brcic L, et al. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2010;61(2):241-50.
131. Sikiric P, Marovic A, Matoz W, Anic T, Buljat G, Mikus D, et al. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophyridine. *Journal of physiology, Paris*. 1999;93(6):505-12.
132. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, 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. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2006;12(1):BR36-45.
133. 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. *Inflammopharmacology*. 2006;14(5-6):214-21.
134. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Perovic D, Marovic A, et al. The effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on development of tolerance and physical dependence following repeated administration of diazepam. *The Chinese journal of physiology*. 1999;42(3):171-9.
135. Tohyama Y, Sikiric P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life sciences*. 2004;76(3):345-57.
136. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(16):1612-32.
137. 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 : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2001;27(8):817-27.
138. Sikiric P, Seiwerth 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 : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2003;29(4):323-34.

139. 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. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(5):1109-17.
140. 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. *Surgery today*. 2008;38(8):716-25.
141. 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. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2010;16(3):BR81-8.
142. 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. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003;21(6):976-83.
143. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Pang JH. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. *Journal of applied physiology*. 2011;110(3):774-80.
144. Chang CH, Tsai WC, Hsu YH, Pang JH. Pentadecapeptide BPC 157 enhances the growth hormone receptor expression in tendon fibroblasts. *Molecules*. 2014;19(11):19066-77.
145. Krivic A, Anic T, Seiwert S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing

- and opposed corticosteroid aggravation. *Journal of orthopaedic research* : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2006;24(5):982-9.
146. Krivic A, Majerovic M, Jelic I, Seiwerth S, Sikiric P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. *Inflammation research* : official journal of the European Histamine Research Society [et al]. 2008;57(5):205-10.
147. 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. *Journal of orthopaedic research* : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2010;28(9):1155-61.
148. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, et al. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regulatory peptides*. 2010;160(1–3):33-41.
149. Tudor M, Jandric I, Marovic A, Gjurasin M, Perovic D, Radic B, et al. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regulatory peptides*. 2010;160(1–3):26-32.
150. Sebecic B, Nikolic V, Sikiric P, Seiwerth S, Sosa 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.
151. Keremi B, Lohinai Z, Komora P, Duhaj S, Borsi K, Jobbagy-Ovari G, et al. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *Journal of physiology and pharmacology* : an official journal of the Polish Physiological Society. 2009;60 Suppl 7:115-22.

152. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko I, Seiwert S, et al. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2009;60 Suppl 7:161-5.
153. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, et al. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157. *Journal of pharmacological sciences*. 2007;104(1):7-18.
154. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, et al. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *Journal of pharmacological sciences*. 2006;102(3):269-77.
155. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colcutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;108(1):7-17.
156. 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. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(1):46-56.
157. Skorjanec S, Kokot A, Drmic D, Radic B, Sever M, Klicek R, et al. Duodenocutaneous fistula in rats as a model for "wound healing-therapy" in ulcer healing: the effect of pentadecapeptide BPC 157, L-nitro-arginine methyl

- ester and L-arginine. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2015;66(4):581-90.
158. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, 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. *Surgery today*. 2007;37(9):768-77.
159. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G, Perovic D, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *Journal of physiology, Paris*. 2001;95(1-6):315-24.
160. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *Journal of Physiology-Paris*. 1997;91(3-5):113-22.
161. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(10):2070-83.
162. Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situm K, et al. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *European journal of pharmacology*. 2007;570(1-3):212-21.
163. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports medicine*. 2003;33(5):381-94.

164. 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. *Thrombosis research*. 2012;129(5):652-9.
165. Stupnisek M, Kokot A, Drmic D, Hrelec Patrlj M, Zenko Sever A, Kolenc D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 Reduces Bleeding and Thrombocytopenia after Amputation in Rats Treated with Heparin, Warfarin, L-NAME and L-Arginine. *PloS one*. 2015;10(4):e0123454.
166. Lavallee M, Takamura M, Parent R, Thorin E. Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. *Heart failure reviews*. 2001;6(4):265-76.
167. Wagner FD, Buz S, Knosalla C, Hetzer R, Hoher B. Modulation of circulating endothelin-1 and big endothelin by nitric oxide inhalation following left ventricular assist device implantation. *Circulation*. 2003;108 Suppl 1:II278-84.
168. Ozaki K, Yamamoto T, Ishibashi T, Matsubara T, Nishio M, Aizawa Y. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 expression by fluvastatin in human vascular endothelial cells. *Japanese journal of pharmacology*. 2001;85(2):147-54.
169. Cannan CR, Mathew V, Lerman A. New insight into coronary endothelial dysfunction: role of endothelin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1998;131(4):300-5.
170. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, et al. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*. 1995;346(8977):732-6.

171. Berger R, Strecker K, Huelsmann M, Moser P, Frey B, Bojic A, et al. Prognostic power of neurohumoral parameters in chronic heart failure depends on clinical stage and observation period. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2003;22(9):1037-45.
172. Pacher R, Bergler-Klein J, Globits S, Teufelsbauer H, Schuller M, Krauter A, et al. Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *American Journal of Cardiology*. 71(15):1293-9.
173. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwerth S, Rogic D, Kusec V, et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *Journal of pharmacological sciences*. 2004;95(1):19-26.
174. Barišić I. Učinak pentadekapeptida BPC 157 na izoprenalinom inducirani infarkt miokarda u štakora. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2009.
175. Balenovic D, Barisic I. Mortal Furosemide-Hypokalemia-Disturbances in Rats NO-System Related Shorten Survival by L-NAME. Therapy Benefit with BPC 157 Peptide More Than With L-Arginine. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*. 2012;03(07):201.
176. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M, et al. BPC 157 and blood vessels. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(7):1121-5.
177. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.

178. Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol Int.* 2000;50(6):472-9.
179. Chesney CF, Allen JR. Animal model: pulmonary hypertension, cor pulmonale and endocardial fibroelastosis in monocrotaline-intoxicated nonhuman primates. *Am J Pathol.* 1973;70(3):489-92.
180. Lee SL, Fanburg BL. Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. II. Stimulation by hypoxia. *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 1):C766-70.
181. Villamor E, Le Cras TD, Horan MP, Halbower AC, Tuder RM, Abman SH. Chronic intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelial nitric oxide synthase in the ovine fetus. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 1):L1013-20.
182. Starling MB, Neutze JM, Elliott RL. Control of elevated pulmonary vascular resistance in neonatal swine with prostacyclin (PGI₂). *Prostaglandins Med.* 1979;3(2):105-17.
183. Ryan J, Bloch K, Archer SL. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *International journal of clinical practice Supplement.* 2011(172):15-34.
184. Rey M, Hess P, Clozel M. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension in Wistar rats. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna.* 2009;Chapter 5:Unit 5 56.
185. Bras G, Jelliffe DB, Stuart KL. Veno-occlusive disease of liver with nonportal type of cirrhosis, occurring in Jamaica. *AMA archives of pathology.* 1954;57(4):285-300.

186. Huxtable RJ. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmacology & therapeutics*. 1990;47(3):371-89.
187. Glowaz SL, Michnika M, Huxtable RJ. Detection of a reactive pyrrole in the hepatic metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. *Toxicology and applied pharmacology*. 1992;115(2):168-73.
188. Lalich JJ, Merkow L. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest*. 1961;10:744-50.
189. Lalich JJ, Ehrhart LA. Monocrotaline-induced pulmonary arteritis in rats. *J Atheroscler Res*. 1962;2:482-92.
190. Hayashi Y, Lalich JJ. Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967;124(2):392-6.
191. Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*. 1967;22(2):176-9.
192. Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2000;41(6):605-12.
193. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular research*. 1998;39(1):89-105.
194. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;31(1):108-15.
195. Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1989;256(5 Pt 2):H1328-36.

196. Ceconi C, Condorelli E, Quinzanini M, Rodella A, Ferrari R, Harris P. Noradrenaline, atrial natriuretic peptide, bombesin and neurotensin in myocardium and blood of rats in congestive cardiac failure. *Cardiovascular research*. 1989;23(8):674-82.
197. Schermuly RT, Inholte C, Ghofrani HA, Gall H, Weissmann N, Weidenbach A, et al. Lung vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension: amplification by different type phosphodiesterase inhibitors. *Respiratory research*. 2005;6:76.
198. Urboniene D, Haber I, Fang YH, Thenappan T, Archer SL. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;299(3):L401-12.
199. Pan LC, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ. Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. *Toxicology and applied pharmacology*. 1991;110(2):336-46.
200. Thomas HC, Lame MW, Wilson DW, Segall HJ. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. *Toxicology and applied pharmacology*. 1996;141(1):319-29.
201. Wagner JG, Petry TW, Roth RA. Characterization of monocrotaline pyrrole-induced DNA cross-linking in pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1993;264(5 Pt 1):L517-22.

202. Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):H1484-91.
203. Allen JR, Carstens LA. Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats. *Experimental and molecular pathology.* 1970;13(2):159-71.
204. Langleben D, Szarek JL, Coflesky JT, Jones RC, Reid LM, Evans JN. Altered artery mechanics and structure in monocrotaline pulmonary hypertension. *Journal of applied physiology.* 1988;65(5):2326-31.
205. Ghodsi F, Will JA. Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol.* 1981;240(2):H149-55.
206. Ito KM, Sato M, Ushijima K, Nakai M, Ito K. Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2000;279(4):H1786-95.
207. Miyata M, Sakuma F, Ito M, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration. *International archives of allergy and immunology.* 2000;121(3):246-52.
208. Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J. Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. *Arch Pathol.* 1967;84(1):64-76.
209. Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2001;103(2):314-8.

210. Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol.* 1980;239(5):H692-702.
211. Roth RA, Dotzlaf LA, Baranyi B, Kuo CH, Hook JB. Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. *Toxicology and applied pharmacology.* 1981;60(2):193-203.
212. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation research.* 1993;73(5):887-97.
213. Chen MY, Cai JT, Du Q, Wang LJ, Chen JM, Shao LM. Reliable experimental model of hepatic veno-occlusive disease caused by monocrotaline. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT.* 2008;7(4):395-400.
214. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2012;302(4):L363-9.
215. Dony E, Lai YJ, Dumitrascu R, Pullamsetti SS, Savai R, Ghofrani HA, et al. Partial reversal of experimental pulmonary hypertension by phosphodiesterase-3/4 inhibition. *The European respiratory journal.* 2008;31(3):599-610.
216. Lalich JL, Johnson WD, Raczniak TJ, Shumaker RC. Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 1977;101(2):69-73.

217. Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest.* 1988;58(2):184-95.
218. Rabinovitch M, Bothwell T, Hayakawa BN, Williams WG, Trusler GA, Rowe RD, et al. Pulmonary artery endothelial abnormalities in patients with congenital heart defects and pulmonary hypertension. A correlation of light with scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Lab Invest.* 1986;55(6):632-53.
219. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvascular research.* 1989;38(1):57-80.
220. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal.* 2003;22(2):358-63.
221. Hessel MH, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2006;291(5):H2424-30.
222. Bosnjak ZJ, Graf BM, Sikiric P, Stowe DF. Protective effects of newly isolated gastric peptide following hypoxic and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *FASEB J.* 1994;8.
223. Ruenzi M, Solte M, Veljaca M, Oreskovic K, Peterson J. 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.

224. Xue XC, Wu YJ, Gao MT, Li WG, Zhao N, Wang ZL, et al. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2004;10(7):1032-6.
225. Xue XC, Wu YJ, Gao MT. Study of the protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on wounds in small type pigs. *Chin New Drugs J*. 2004;12:602-4.
226. 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. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(5):1109-17.
227. Sikiric P, Separovic J, Anic T, Buljat G, Mikus D, Seiwert S, et al. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H2-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *Journal of physiology, Paris*. 1999;93(6):479-85.
228. Turkovic B, Sikiric P, Seiwert S, Mise S, Anic T, Petek M. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology*. 2004;126.
229. Blagaic AB, Blagaic V, Romc Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *European journal of pharmacology*. 2004;499(3):285-90.
230. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-42.
231. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G, Perovic D, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10,

- PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *Journal of physiology, Paris*. 2001;95(1-6):315-24.
232. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, 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. *Surgery today*. 2007;37(9):768-77.
233. Prie S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1312-8.
234. Kodama K, Adachi H. Improvement of mortality by long-term E4010 treatment in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(2):748-52.
235. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(1):39-45.
236. Bruner LH, Hilliker KS, Roth RA. Pulmonary hypertension and ECG changes from monocrotaline pyrrole in the rat. *Am J Physiol*. 1983;245(2):H300-6.
237. Kmecova J, Klimas J. Heart rate correction of the QT duration in rats. *Eur J Pharmacol*. 2010;641(2-3):187-92.
238. Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, Yamauchi-Kohno R, Goto K, Yamaguchi I. A combination of oral endothelin-A receptor antagonist and oral prostacyclin analogue is superior to each drug alone in ameliorating pulmonary

- hypertension in rats. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(1):175-81.
239. Koskenvuo JW, Mirsky R, Zhang Y, Angeli FS, Jahn S, Alastalo TP, et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. *The international journal of cardiovascular imaging*. 2010;26(5):509-18.
240. van Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(5 Pt 1):1423-8.
241. Colice GL, Hill N, Lee YJ, Du H, Klinger J, Leiter JC, et al. Exaggerated pulmonary hypertension with monocrotaline in rats susceptible to chronic mountain sickness. *Journal of applied physiology*. 1997;83(1):25-31.
242. van Suylen RJ, Aartsen WM, Smits JF, Daemen MJ. Dissociation of pulmonary vascular remodeling and right ventricular pressure in tissue angiotensin-converting enzyme-deficient mice under conditions of chronic alveolar hypoxia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(5):1241-5.
243. Li XQ, Wang HM, Yang CG, Zhang XH, Han DD, Wang HL. Fluoxetine inhibited extracellular matrix of pulmonary artery and inflammation of lungs in monocrotaline-treated rats. *Acta pharmacologica Sinica*. 2011;32(2):217-22.
244. Nagaya N, Okumura H, Uematsu M, Shimizu W, Ono F, Shirai M, et al. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(5):H2125-31.

245. Ono S, Voelkel NF. PAF antagonists inhibit monocrotaline-induced lung injury and pulmonary hypertension. *Journal of applied physiology*. 1991;71(6):2483-92.
246. Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou HA, Khalil RA. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;332(2):455-62.
247. Zopf DA, das Neves LA, Nikula KJ, Huang J, Senese PB, Gralinski MR. C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT_{2B}, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;670(1):195-203.
248. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004;61(2):227-37.
249. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*. 1989;38(1):57-80.
250. Huang J, Wolk JH, Gewitz MH, Mathew R. Caveolin-1 expression during the progression of pulmonary hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(8):956-65.
251. Lappin PB, Ross KL, King LE, Fraker PJ, Roth RA. The response of pulmonary vascular endothelial cells to monocrotaline pyrrole: cell proliferation and DNA synthesis in vitro and in vivo. *Toxicology and applied pharmacology*. 1998;150(1):37-48.
252. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of

- cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res.* 1993;73(5):887-97.
253. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res.* 2005;96(4):442-50.
254. Yuan P, Wu WH, Gao L, Zheng ZQ, Liu D, Mei HY, et al. Oestradiol ameliorates monocrotaline pulmonary hypertension via NO, prostacyclin and endothelin-1 pathways. *The European respiratory journal.* 2013;41(5):1116-25.
255. Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1999;276(2 Pt 1):L304-10.
256. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999;92(4):164-9.
257. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Des.* 2014;20(7):1126-35.
258. Mathew R, Gloster ES, Sundararajan T, Thompson CI, Zeballos GA, Gewitz MH. Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Appl Physiol.* 1997;82(5):1493-8.
259. Huang J, Wolk JH, Gewitz MH, Mathew R. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp Lung Res.* 2010;36(1):57-66.
260. Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther.* 2001;92(1):1-20.

261. Rich JD, Thenappan T, Freed B, Patel AR, Thisted RA, Childers R, et al. QTc prolongation is associated with impaired right ventricular function and predicts mortality in pulmonary hypertension. *International journal of cardiology*. 2013;167(3):669-76.
262. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwert S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2009;60 Suppl 7:191-6.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17.04.1979. godine u Travniku, BiH.

- | | |
|---------------|---|
| 1985-1991.g. | Osnovna škola u Travniku |
| 1991-1992.g. | Osnovna škola u Stansstadu, Nidwalden, Švicarska |
| 1992-1993.g. | Sekundarna škola u Stansstadu, Nidwalden, Švicarska |
| 1993-1999.g. | Klasična gimnazija Kollegium St. Fidelis, Stans, Švicarska |
| 1999-2005.g. | Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu |
| 2005-2006.g. | liječnički staž u KBC Zagreb |
| 2006-2014.g. | Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu |
| 2007-2011.g. | specijalizacija iz interne medicine u KB Dubrava |
| 2012-2013.g. | stručno usavršavanje iz transplantacijske kardiologije i na području terminalne srčane insuficijencije u Sveučilišnoj bolnici u Beču (AKH Wien) |
| 2013-2015. g. | uža specijalizacija iz kardiologije u KB Dubrava |
| Od 2011.g. | Odjelni liječnik na Odjelu za valvularne bolesti i transplantacijsku kardiologiju - Kardiologija 4, Zavod za bolesti srca i krvnih žila, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava |

Od 2001. radim u laboratoriju Prof.dr.sc.Predraga Sikirića na projektu BPC 157 te je dobar dio moga znanstvenog interesa vezana uz navedeni projekt.

Koautor sam u 5 znanstvenih članka objavljenih u CC časopisima od toga sam prvi autor na jednom članku.

Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog zbora liječnika, Hrvatskog kardiološkog društva, Hrvatskog katoličkog liječničkog društva i Švicarskog kluba u Hrvatskoj.