

# Antagonizacija učinka intramuskularne aplikacije sukcinilkolina u štakora primjenom pentadekapeptida BPC 157

---

**Stambolija, Vasilije**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:587731>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vasilije Stambolija**

**Antagonizacija učinka intramuskularne  
aplikacije sukcinilkolina u štakora  
primjenom pentadekapeptida BPC 157**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2016.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vasilije Stambolija**

**Antagonizacija učinka intramuskularne  
aplikacije sukcinilkolina u štakora  
primjenom pentadekapeptida BPC 157**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2016.

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Zahvale

Velika čast, dužnost i zadovoljstvo mi je zahvaliti:

Dragim mentorima i učiteljima, prof dr sci. Predragu Sikiriću, dr med, i prim.dr. Miroslavu Ščapu na stručnom vodstvu, znanju i predanom iskustvu tijekom realizacije rada, supruzi Tamari, na trudu, strpljenju i zajednički provedenom vremenu tijekom izvedbe rada, majci , ocu i bratu, na podršci i poticanju za izradu rada.

# SADRŽAJ

<b>1.0. Uvod i svrha rada</b>	1
<b>1.1. Definicija problema</b>	1
<b>1.2. Pregled dosadašnjih spoznaja</b>	5
1.2.1. Povijest	5
1.2.2. Mehanizmi djelovanja neuromuskularnih blokatora	8
1.2.3. Farmakologija sukcinilkolina	12
1.2.4. Monitoring neuromuskularne funkcije	22
1.2.5. Pentadekapeptid BPC 157	24
<b>2.0. Hipoteza</b>	28
<b>3.0. Ciljevi rada</b>	29
<b>4.0. Materijali i metode</b>	30
<b>5.0. Rezultati</b>	36
<b>6.0. Rasprava</b>	54
<b>7.0. Zaključci</b>	58
<b>8.0. Popis citirane literature</b>	59
<b>9.0. Sažetak</b>	66
<b>10.0. Abstract</b>	67
<b>11.0. Kratka biografija</b>	68

## 1. Uvod i svrha rada

### 1.1. Definicija problema

Sukcinilkolin, depolarizirajući neuromuskularni blokator, koji je od ulaska u kliničku primjenu donio mnoge kontroverze, diskusije i u današnje vrijeme ima svoje protivnike i pobornike. Obzirom da je od istraživanja provedenih u XX stoljeću koje su dovele do sinteze sukcinilkolina 1946. i kasnijeg objavljivanja rezultata ((Bovet, Bovet-Nitti, Longo, and Marotta, 1949; Fusco, Pahzzo, and Knüsli, 1949) objavljeno u „Numero speciale sui Curari di Sintesi, *Rend. Ist. Super. Sanità*, -12 (1949) 1-264.“ te Nobelove nagrade D.Bovetu 1957. godine objavljeno preko 7000 članaka (vezano uz sukcinilkolin) bez pozitivnog otkrića antagonizacije ili barem smanjivanja toksičnog učinka smatram da je nedvojbeno korist ovog istraživanja u utvrđenoj ulozi i učinku pentadekapeptida BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) u antagonizaciji lokalnog i sistemskog djelovanja intramuskularno apliciranog sukcinilkolina. Ono što je nedvojbeno je njegov brzi nastup djelovanja i duboki neuromišični blok no s druge strane ima cijeli niz nuspojava. Većina ih je minorna no neke mogu dovesti do posljedica opasnih po život. Upravo zbog tih nuspojava je potrebna antagonizacija djelovanja koja trenutno ne postoji.

Koristeći dozu lijeka koja odgovara ED95 dozi na žvakači mišić kod djece (1), pokušao sam antagonizirati akutni učinak sukcinilkolina i lokalni produženi paralitički učinak na mišiće u koje je injiciran(2), mišičnu paralizu i oštećenje mišića(3), hiperkalemiju(4) te aritmije(5).

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) pospješuje zacjeljivanje mišića ( nakon potpune transekcije ili nagnječenja) te ima neuroprotektivna svojstva (6-10). Temeljem toga smo testirali BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) protuučinak na intramuskularnoj primjeni sukcinilkolina.

Istraživana je problematika sukcinilkolina koji djeluje kao depolarizirajući neuromuskularni blokator, no još uvijek nema odgovarajućeg antagonista bilo na lokalnoj ili sistemskoj razini. Sukcinilkolin je po svojoj strukturi biskvarternarni amonijski spoj kojeg morfološki čine dvije zrcalno povezane molekule acetilkolina. Po vremenskom trajanju djelovanja pripada u ultrakratke depolarizirajuće mišićne relaksanse. Od uvođenja u praksu polovinom XX stoljeća kada su ga kao čisti pripravak prezentirali Löw i Tammelin u svom radu lijek je u

kliničkoj praksi doživio svoje uspone i padove (11). Razlog tome su nuspojave koje izaziva na srčanom (aritmije), skeletnom mišiću (rabdomioliza, hiperkaliemija) i "sistemskom" (okidač maligne hipertermije, povećanje intrakranijalnog, intraokularnog i intraabdominalnog tlaka te postoperativne mialgije). Zbog kratkoće djelovanja i vrlo opasnih nuspojava kod ponavljanja doze (srčane aritmije) potaknuo je nastanak i razvoj novih molekula mišićnih relaksansa koji su imali vrlo težak cilj, a to je brzina nastupa djelovanja sukcinilkolina koja je od presudne važnosti u hitnim stanjima (12-25). U recentnoj literaturi postoji vrlo živahna diskusija o opravdanosti upotrebe sukcinilkolina u kliničkoj praksi koji time opravdava svoju vrlo problematičnu ulogu u anesteziološkoj praksi, potiče diskusiju i opstaje u vremenu unatoč svemu(26,27). Intramuskularni (IM) sukcinilkolin ima dugotrajni lokalni učinak u injiciranom mišiću(2,28). Sukcinilkolin imitira djelovanje acetilkolina na neuromuskularnoj spojnici, u smislu dugotrajne depolarizacije membrane putem djelovanja na nikotinske receptore i sprečavanja širenja novih impulsa čime nastaje mišićna relaksacija na sistemskoj razini poprečno-prugastih skeletnih mišića (29). Dok su u praksi poznati agensi koji mogu poništiti nedepolarizirajuću neuromuskularnu blokadu, reverzija depolarizirajuće neuromuskularne blokade bilo na lokalnoj ili sistemskoj razini je nepotpuna jer nedostaje odgovarajući antagonist (29). Da bi se uveo agens koji će biti odgovarajući antagonist sukcinilkolinu kao depolarizirajućem neuromuskularnom blokatoru te time korisnim u praksi, usmjerili smo se na stabilan želučani pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) korištenom u pokusima za upalne bolesti crijeva i cijeljenju rana, bez poznate toksičnosti, učinkovitim bez nosača(30). BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) ima značajan učinak u obnavljanju mišića u različitim uvjetima ozljede (6,7,8). Terapija BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) kao sustavni peptidni tretman potiče promptno obnavljanje presječenog kvadricepsa te zatim održava reparaciju uz funkcionalnu obnovu (7). Konkretno, brzi oporavak nakon presijecanja je opsežan te uključuje poboljšanje biomehanike (povećanje mogućnosti opterećenja); funkcije (oporavak hoda i povratak motornih funkcija u normalne vrijednosti); mikroskopske/imunokemijske parametre (povezanost mišićnih vlakana u mišićne segmente, izostanak rascjepa, značajna pozitivnost dezmina u regeneraciji mišića u tijeku, veliki promjer miofibrila na obje strane te uz postignute normalne zdrave vrijednosti za štakore); makroskopske značajke (povezani batrljci, slijedom toga izrazito smanjena atrofija;

normalan prikaz blizak mišićima koji nisu ozlijeđeni te smanjena kontraktura noge poslije operacije) (7). Regeneracija mišićnog tkiva je također kod teških nagnječenja znatno poboljšana (6), čak i u uvjetima teških oštećenja obnavljanja potaknutih sistemskim kortikosteroidima (8). Stoga, obnavljanje mišića nakon presjecanja te na drugi način oštećenih mišića čija se funkcija oporavlja mogu sugerirati terapijsku primjenu ovog peptida u bolestima mišića (6,7,8). Vrlo nedavno je pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736), dan intraperitonealno i u jednakom rasponu doze, pokazao da direktno smanjuje neposredna i odgođena oštećenja izazvana traumom mozga te poboljšava regeneraciju ishijadičnog živca nakon transekcije kada je dan bilo intraperitonealno, intragastrično ili lokalno, na mjestu anastomoze ili nakon neanastomozirajuće reparacije živca (7mm presječenog živčanog segmenta) (9,10). Stoga bi pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) mogao također imati neuroprotektivne karakteristike (9,10). Reparacija mišića i neuroprotektivne karakteristike bi zajedno mogli ukazivati da bi ovaj pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) mogao poboljšati funkciju neuromuskularne ploče te slijedom toga antagonizirati učinak sukcinilkolina na poprečno prugasto mišićno tkivo uz pozitivno djelovanje na opterećenje kalijem (6,7,8,9,10,30,31,32,33). Sukcinilkolin (1mg/kg) je dan štakorima intramuskularno u musculus tibialis anterior desno te na taj način doveo do lokalne i sistemske disfunkcije mišića. Navedena doza je izazivala parcijalnu neuromuskularnu blokadu čime je eksperimentalnim životinjama bilo moguće disati bez primjene mehaničke ventilacije. Da bi antagonizirao učinke sukcinilkolina, pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) je dan intraperitonealno ili peroralno ( u vodi za piće) koristeći uobičajenu dozu i način primjene, prije ili poslije intramuskularne aplikacije sukcinilkolina.

Posebni učinak peptid BPC157 ima na NO-sustav, istraživani u različitim modelima (uključujući predoziranje kalijem) i životinjskim vrstama(36,38,39,40,41), implementiran u upalnim bolestima crijeva(33-38), multiploj sklerozi (42) i zacjeljivanju rana uključujući lezije mišića(37,6,7,8,43). Putem stimulacije egr-1 gena i njegovog co-repressor nerve growth factor 1-A binding protein-2 (naB2) koji je također odgovoran za stvaranje citokina i faktora rasta, te stoga rano stvaranje ekstracelularnog matriksa (kolagena)(44).



LD1 doza nije dostignuta u niti jednom od istraživanja(33-38).

Uzevši u obzir hiperkalemiju u nuspojavama koje izaziva sukcinilkolin(4), važno je naglasiti spasonosnu ulogu BPC157 kod hiperkalemije. Unatoč laboratorijskom nalazu hiperkalemije iznad 12mmol/l, kod svih načina aplikacije BPC157 (pretretman ili posttretman) dolazi do povrtka u sinus ritam, manjeg širenja QRS kompleksa, kraćih asistoličkih pauza(39). U vezi s time antagonizirana je bila mišićna slabost, hipertenzija, niski pritisak u donjem ezofagealnom i piloričkom sfinkteru(39). U in vitro pokusima, kod teške hiperkalemije, tretiranje BPC157 umanjuje deplarizaciju uzrokovanu kalijem(36).

U prijašnjim istraživanjima je BPC157 antagonizirao aritmije uzrokovane digitalisom, koje su povezane s hiperkalemijom(33).

Uz navedeno, kao specifično polje, BPC157 utječe na oporavak mišića nakon različitih vrsta ozljeda(6,7,8,39,42). BPC157 inducira promptni oporavak mišića, nakon teške traume (presjecanja(7), teške crush ozljede(6,8), u stanjima otežane regeneracije inducirane sistemskim kortikosteroidima(8) kao i kod mišićne slabosti zbog hiperkalemije(39). Dodatno, u istim dozama, izravno umanjuje trenutnu i odgođenu ozljedu zbog traume mozga te značajno djeluje na opravak ishijadičnog živca nakon presjecanja(9,10). U eksperimentalnom modelu multiple skleroze (multiple sclerosis matched toxic rat model) kod aplikacije cuprizone-neurotoksina u dozama nekoliko puta većim od standardnih, BPC157 anagonizira cerebelarnu ataksiju i poboljšava funkciju prednjeg ekstremiteta(42).

Slijedom navedenog, pentadekapeptid BPC157 je apliciran intraperitonealno ili per os (u vodi za piće), koristeći uobičajene puteve aplikacije(39) prije ili nakon intramuskularne primjene sukcinilkolina.

## 1.2. Pregled dosadašnjih spoznaja

### 1.2.1. Povijest

Šuljajući se kroz guste prašume, sredinom 16st, Alonso Peres de Tolosa i Conquestadoresi nisu ni slutili što se krije u strijelicama kojima su ih domoroci miroljubivog plemena Boburesa gađali radi bjega te bi većinom nakon nekog vremena došlo do oporavka no ponekad bi ih i letalno svladavali unatoč činjenici da vrlo često nisu pogodili nikakav vitalni organ odnosno strijelica bi bila naočigled daleko od vitalnih struktura. Otrovnii koktel, kojima su ih domorodci obogaćivali je vrlo često bio tajna plemena i sastavljen je ponekad i od više od 30 "tajnih" sastojaka, čuvan je u boćicama u koje su umakali strijelice koje su koristili radi lova, a naravno i u svrhu obrane. Tajna koja je tjerala u očaj osvajače, koji su sada znamo svijesni i paralizirani ležali nekoliko sati a ponekad i umirali zbog nemogućnosti disanja, je u curareu i tubokurarinu (tubo – cijev bambusa iz kojeg su izpuhivali te otrovne strelice) kojega su ekstrahirali iz biljke *Chondrodendron tomentosum*. Tadašnji očaj je nakon mnogo godina postao nada za mnoge bolesnike jer je otrov postao lijek koji je drastično promijenio povijest medicine, utjecaj na anesteziološku praksu je uslijedio sredinom XX stoljeća, 1942 godine su Griffith i Johnson(45) uvode d-tubokurarin kao siguran lijek radi postizanja skeletne mišićne relaksacije tijekom kirurških zahvata. Jedno desetljeće kasnije, 1954. Beecher i Todd izvješćuju o šesterostrukom porastu mortaliteta kod pacijenata koji su dobili d-tubokurarin u odnosu na pacijente koji nisu dobili relaksans. Objašnjenje povećanog mortaliteta leži u činjenici da u to vrijeme nije bilo poznata farmakologija neuromuskularnih blokatora i anatanizacija djelovanja istih. Razumjevanje farmakologije neuromuskularnih blokatora je bilo vrlo oskudno, naime nije se uočavala važnost pstoperativnog rezidualnog neuromuskularnog bloka, nisu postojale smjernice o monitoringu jačine mišićne snage također nije se uočavala važnost antagonizacije rezidualnog bloka. Tijekom nadolazećih godina ubrzano se širilo znanje o farmakologiji neuromuskularnih blokatora, relaksansi su postajali sve važnija komponenta u anesteziji te su razvojem inovativnih tehnika omogućili širenje kirurgije u nova polja kao što su neurokirurgija, torakokardijalna kirurgija, abdominalna i transplantacijska kirurgija.

Sukcinilkolin, sintetiziran 1946. i kasnije objavljen u rezultatima ((Bovet, Bovet-Nitti, Longo, and Marotta, 1949; Fusco, Pahzzo, and Knüsli, 1949) objavljeno u „Numero speciale sui Curari di Sintesi, *Rend. Ist. Super. Sanità, -12 (1949) 1-264.*“ te zaslužio dodjelu

Nobelove nagrade D. Bovetu 1957. godine, je prikazan u radu Thesleff(46) i Foldesa i sur. 1952 godine, uveden je kao vrlo brzo djelujući i kratko djelujući relaksans, omogućavao je vrlo brzu intubaciju te drastično promjenio anesteziološku praksu.

Baird i Reid 1967. prvi put spominju pancuronium, sintetski aminosteroid, sličnog djelovanja po dužini kao d-tubocurarin no s bitnim razlikama u smislu poboljšane kardiovaskularne stabilnosti. Imao je blago vagolitička svojstva uz nepostojanje blokade ganglionskog prijenosa i nije oslobađao histamin. Njegov farmakološki profil, koji je donosio povećanje frekvencije rada srca i povećanje krvnog tlaka, ima poboljšane karakteristike u odnosu na svoje prethodnike. Za razliku od d-tubocurarina ili bilo kojeg od ostalih nedepolarizirajućih relaksansa do tada u upotrebi, koji nisu u niti jednom slučaju bili metabolizirani, pancuronium je bio podložan razgradnji u jetri putem deacetilacije njegove acetoksi grupe.

Potreba za srednjedjelujućim mišićnim relaksansima je dovela do daljnjih istraživanja te se tijekom 1980-tih godina u praksu uvode vecuronium, aminosteroid nastao razvojem metabolita pancuroniuma te atracurium. Navedeni relaksansi nisu imali nikakve ovisnosti o bubrežnoj funkciji radi izlučivanja. Dodatna pozitivna karakteristika vecuroniuma je nedostatak kardiovaskularnih efekata te se upravo vecuronium smatra referencom za sigurnost kojom se uspoređuju novi relaksansi. S druge strane atracurium ima važnu karakteristiku u razgradnji radi koje je u potpunosti neovisan o funkciji organa (jetra i bubreg), dobi ili zatajenju organa, naime razgradnja ide putem Hoffnmanovog puta eliminacije.

Daljni razvoj kraće djelujućih relaksansa je tijekom 1990-tih godina predstavio mivacurium i rocuronium, posljednji je srednje djelujući nedepolarizirajući blokator s brzim nastupom djelovanja. Mivacurium je jako podložan metabolizmu, proces ide putem butyrylcholinesteraze enzima koji je zaslužan i za razgradnju sukcinilkolina. S aspekta olakšavanja brze endotrahealne intubacije, rocuronium je prvi neuromuskularni blokator koji se može smatrati zamjenom za sukcinilkolin.

Tijekom razvoja neuromuskularnih blokatora uvedene su i neke druge molekule, to su pipecuronium, doxacurium, cisartacurium i rapacuronium. Pojedinačno nisu ušle u široku praksu no važan su korak u poboljšavanju farmakoloških profila vlastitih prethodnika. U daljnjem istraživanju su neki drugi neuromuskularni blokatori, TAAC3 i 340A.

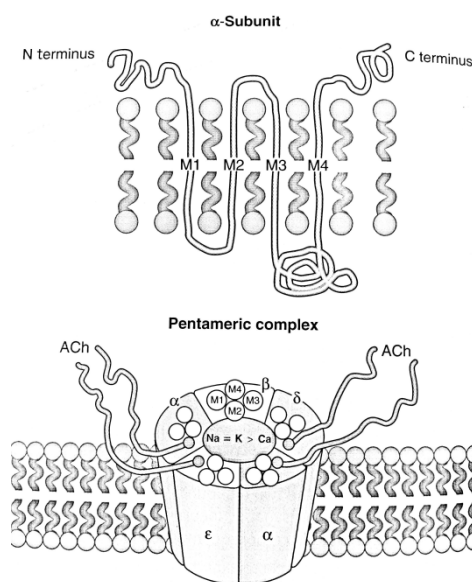
Važan preduvjet za primjenu neuromuskularnih blokatora je anestezirani pacijent, ne smiju se koristiti samo u svrhu onemogućavanja pokreta i mišićne relaksacije obzirom da nemaju analgetskih niti amnestičkih svojstava. U literaturi postoje brojni radovi koji opisuju budnost tijekom kirurškog zahvata i tijekom boravka u JIL-u. Blokatori neuromuskularnog prijenosa su važan dodatak u modernoj anesteziološkoj praksi i uporaba istih mora biti u skladu s time.

## 1.2.2 Mehanizmi djelovanja neuromuskularnih blokatora

Neuromuskularni blokatori djeluju na neuromišićnu spojnicu na presinaptičkom nivou i na postsinaptičkom nivou te na ekstrajunkcionalnim receptorima.

### Postsinaptičko djelovanje

U prijenosu signala na neuromuskularnoj spojnici skeletnog mišića sisavaca temeljnu ulogu ima nikotinski acetilkolinski receptor (nAChR), pentamerni kompleks koji tvori transmembranski kanal. Kompleks je izgrađen od dvije alfa podjedinice te po jedne beta, delta i epsilon podjedinice (Slika 1a).



Slika 1a – Transmembranski kanal - Prema Miller's Anaesthesia, 7<sup>th</sup> Edition, 2010, Churchill-Livingstone, str. 860

Transmembranski protein tako tvori kanal koji ima na ekstracelularnoj strani vezna mjesta za acetilkolin i druge agoniste te antagoniste(47). Alfa podjedinice su vezna mjesta za acetilkolin, svaka od njih je jedno vezno mjesto, radi se o proteinima koji su smješteni u džepovima ograničenima alfa<sub>H</sub>-epsilon i alfa<sub>L</sub>-delta podjedinicama i viši su od razine same membrane oko 3 nanometra. Alfa<sub>H</sub> i alfa<sub>L</sub> podjedinice su označene prema afinitetu (H-high te L-low), kao podjedinica visokog afiniteta(alfa<sub>H</sub>) i podjedinica niskog afiniteta(alfa<sub>L</sub>) za vezanje d-tubocurarina. Afinitet je vrlo vjerovatno vezan uz susjednu podjedinicu koja je uz

pojedinu alfa podjedinicu. Tako je, radi usporedbe, afinitet vezanja alfaH-epsilon podjedinice od 100 do 500 puta veći za vezanje d-tubocurarina od alfaL-delta veznog mjesta.

Važna razlika u građi receptora je u fetalnoj dobi. Tako da fetalni acetilkolinski receptor (fetalni nAChR) sadrži gama podjedinicu umjeto adultne epsilon podjedinice. Posljedica takve strukture je ta da adultni oblik ima kraće trajanje "burst" izbijanja te ima bolju provodljivost za ione  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  u usporedbi s fetalnim nAChR.

Sa funkcionalnog stajališta razlikujemo otvoreni i zatvoreni ionski kanal. U stanju mirovanja acetilkolinski receptor je zatvoren. U trenutku vezivanja dvije acetilkolinske molekule na alfa podjedinice dolazi do konformacijskih promjena zbog koje kanal prelazi u svoje otvoreno stanje. Za razliku od molekule acetilkolina, gdje su potrebne dvije, dovoljna je samo jedna molekula neuromuskularnog blokatora (kompetitivni agonist) kako bi vezivanjem na receptor(jedno mjesto) stvorio blok. Povezanost ED50 i snage nedepolarizirajućeg blokatora je opisana u radu Paula i suradnika. ED50 je doza neuromišičnog blokatora koja izaziva 50% smanjenje "twitch tension".

Sukcinnikolin, depolarizirajući neuromuskularni blokator, s druge strane ima djelovanje u smislu produljene depolarizacije završne ploče koja time uzrokuje niz promjena. U prvom redu desenzitivira acetilkolinski receptor, zatim inaktivira natrijske naponom regulirane kanale na neuromuskularnom spoju te povećava propusnost za kalij u okolnoj membrani. Nastanak bloka prijenosa signala nastaje tako kao produkt nemogućnosti prijenosa signala, za razliku od acetilkolina koji također izaziva depolarizaciju no rezultira kontrakcijom mišića. Bitna razlika je u trajanju djelovanja, acetilkolin djeluje samo nekoliko milisekundi i u fiziološkim uvjetima takvo vezivanje uzrokuje depolarizaciju koja izaziva kontrakciju. Enzim koji vrlo brzo hidrolizira acetilkolin i time sprječava dugotrajno djelovanje je acetylcolinesteraza, razgrađuje ga u kolin i acetat. U eksperimentalnim uvjetima Bowman je izazvao neuromuskularnu blokadu davanjem visokih doza acetilkolina eksperimentalnim životinjama.

Koliko je važna promjena samo jedne podjedinice u fiziologiji acetilkolinskog receptora opisuje slijed događaja koji se odvija nakon vezivanja acetilkolina na fetalni nAChR. Fetalni nAChR je receptor koji je sporo vodeći kanal, za razliku od brzo provodnog adultnog oblika receptora. Nakon vezivanja acetilkolina dolazi do kratkotrajne aktivacije i smanjene

vjerojatnosti otvaranja kanala. Stanja denervacije mišića dovode do povećanja fetalnih oblika nAChR I do povećanja broja receptora za acetilkolin na samoj membrani denerviranog mišića (upregulacija). Posljedica toga je smanjena osjetljivost na nedepolarizirajuće neuromuskularne blokatore no povećana osjetljivost na depolarizirajuće mišićne blokatore(4,5,13,14), time nezrela izoforma nakon depolarizacije rezultira pretjeranim izlaskom K<sup>+</sup>iona iz stanice i produljenom fazom otvorenog ionskog kanala.

## **Presinaptičko djelovanje**

Na presinaptičkoj membrani se također odvijaju značajni procesi koji su odgovorni za modulaciju oslobađanja acetilkolina, opisani su nikotinski i muskarinski receptori na motoričkim završetcima neurona. Presinaptički nikotinski receptor je pentamerni kompleks sastavljen od tri alfa i dvije beta podjedinice. Uloga takvog smješaja receptora je dana u radu Bowmana(48) gdje se opisuje aktivacija presinaptičkih acetilkolinskih receptora i njihova uloga u pozitivnoj povratnoj sprezi kontrolnog mehanizma u stanjima povećane potrebe za acetilkolinom kao što je u stanju tetanije. Blokada tih receptora se manifestira i objašnjava ujedno, “fade” fenomen, dakle fenomen opadanja koji se vidi kod tetaničkog i TOF (Train – Of-Four) stimuliranja.

Modulacija oslobađanja acetilkolina se odvija i putem muskarinskih receptora, u tu svrhu su uključeni G-proteini vezani uz muskarinski receptor i djelovanje putem moduliranja prometa iona  $Ca^{2+}$ . Inhibicija je vezana uz M1 receptore dok je facilitacija oslobađanja povezana s M2 podtipom muskarinskih receptora. Nikotinski acetilkolinski receptori na presinaptičkoj membrani su uključeni u regulaciju mobiliziranja acetilkolina no nisu u izravnoj vezi s procesom oslobađanja acetilkolina. Iz navedenog je jasno da blokadom presinaptičkih nikotinskih receptora sa nedepolarizirajućim mišićnim relaksansima onemogućava raspoloživost acetilkolina u svrhu održavanja tetaničke ili TOF stimulacije, s druge strane presinaptički muskarinski receptori su uključeni u pojačavanje ili smanjivanje (upmodulaciju i downmodulaciju) mehanizma oslobađanja acetilkolina. Ne postoje dokazi o djelovanju nedepolarizirajućih blokatora na muskarinske receptore.

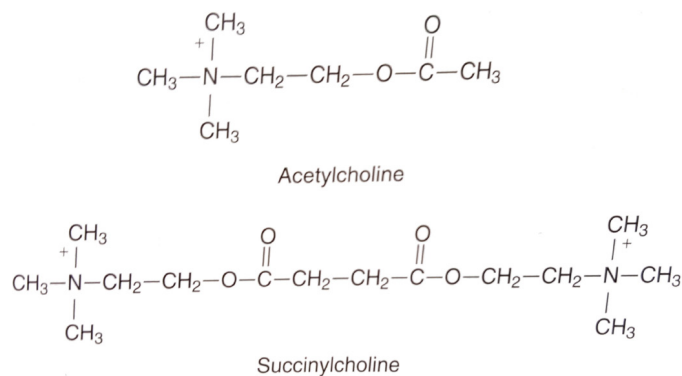
## **Ekstrajunkcionalni receptori**

Smješteni su izvan završne ploče, i brojem mogu nadmašiti broj receptora na završnoj ploči iako je gustoća receptora završne ploče oko 10 000 po micrometru<sup>2</sup> u usporedbi s 10 receptora po mikrometru<sup>2</sup> na mjestima izvan ploče. Kako se radi o velikoj površini u usporedbi s motoričkom pločom jasno je da broj ekstrajunkcionalnih receptora može biti vrlo velik. Oni su ciljna mjesta sukcinilkolina i vrlo su važna u nastanku hiperkalemije no nemaju ulogu u prijenosu signala.



### 1.2.3. Farmakologija sukcinilkolina

Molekula acetilkolina je strukturni temelj za sve neuromuskularne blokatore, svi su kvaternarni amonijski spojevi.



Slika 2a - Prema Miller's Anaesthesia, 7<sup>th</sup> Edition, 2010, Churchill-Livingstone, str. 863

Njihovo djelovanje je vezano uz imitaciju molekule acetilkolina, pozitivni naboji na molekulama neuromuskularnih spojeva imitiraju kvarterni dušični atom na acetilkolinskoj molekuli i najvažniji su element u privlačenju tih spojeva na kolinergičke nikotinske receptore neuromuskularne spojnice. Fiziološki nalazimo acetilkolinske receptore na mnogim mjestima u tijelu, kao na primjer nikotinski receptori na autonomnim ganglijima, muskarinski receptori (čak pet podvrsta M1-M5) na parasimpatičkim i simpatičkim neuronima autonomnog živčanog sustava. Dodatno podvrste nikotinskih i muskarinskih receptora su locirane presinaptički na neuromuskularnoj ploči.

Sukcinilkolin, depolarizirajući mišićni blokator, je građen od dvije molekule acetilkolina koje su zrcalno spojene kroz acetatno metilne grupe (slika 2a). Bovet(49) je u svom radu opisao sukcinilkolin kao dugu fleksibilnu molekulu. Vezanjem molekule sukcinilkolina, poput acetilkolina, dolazi do otvaranja ionskog kanala. Vezna mjesta su kolinergički receptori na neuromuskularnoj spojnici te nikotinski i muskarinski receptori autonomnog sustava.

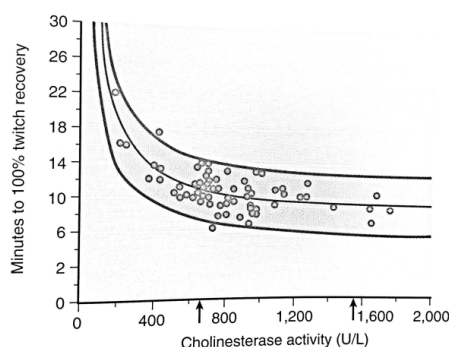
## Farmakokinetika i farmakodinamika sukcinilkolina

Sukcinilkolin je jedini mišićni relaksans koji uz brzi nastup djelovanja ima i ultrakratko trajanje djelovanja. Doza koja u 95% izaziva supresiju neuromuskularnog odgovora, ED<sub>95</sub>, za sukcinilkolin iznosi 0.51 – 0.63mg/kg(1,3), prema Smithu i sur. i prema Kopmanu i sur je doza smanjena na 0.3mg/kg.

Neuromuskularni prijenos je u potpunosti onemogućen u roku od 60 sekundi od davanja 1mg/kg sukcinilkolina. Oporavak slijedi, povrat 90% snage, nakon 9 -13 minuta ukoliko je kod pacijenta prisutna normalna aktivnost enzima butyrylcholinesteraze. Enzim je poznat još pod nazivom pseudocholinesteraza i plazmatska kolinesteraza. Ultrakratko djelovanje je upravo zbog brze razgradnje u kolin i acetat, kapacitet razgradnje je vrlo visok tako da samo 10% lijeka dostigne neuromuskularnu ploču. Mjesto djelovanja enzima je plazma. U neuromuskularnoj spojnici nema tog enzima, ili u vrlo malim količinama, tako da je blok vezan uz difuziju sukcinilkolina natrag u cirkulaciju. Pseudokolinesteraza dakle utječe na trajanje bloka tako što razgradi početnu količinu sukcinilkolina i tako što razgradi sukcinilkolin koji napusti sinaptičku pukotinu i difundira natrag u cirkulaciju.

## Dibukainski broj i aktivnost pseudokolinesteraze

Aktivnost pseudokolinesteraze je dakle presudna u metabolizmu sukcinilkolina, raspon normalne aktivnosti je jako širok kako je prikazano u radu Viby-Mogensen(50), tako da je potrebno veliko smanjenje aktivnosti kako bi bilo vidljivo skromno produljenje vremena oporavka mišićne snage (Slika 3a).



Slika 3a – prema Viby-Mogensen J: Correlation of succinylcholine duration of action with plasma cholinesterase activity in subjects with the genotypically normal enzyme. *Anesthesiology* 1980; 53:517-520.

Aktivnost je izražena u međunarodnim jedinicama (IU) i označava broj molekula supstrata (mikromol) kojeg enzim razgradi u jedinici vremena. Iz svega je vidljivo da neuromuskularni blok kojeg uzrokuje sukcinilkolin može biti produžen ukoliko je enzimatska aktivnost niska ili je koncentracija enzima niska. Mjesto sinteze enzima je jetra. Stanja koja su povezana sa smanjenom aktivnosti pseudokolinesteraze su jetrene bolesti, poodmakla životna dob, opekline, malnutricija, trudnoća, oralni kontraceptivi, MAO inhibitori, citotoksični lijekovi, echothiophat, antikolinestrazni lijekovi, neoplazme, tetrahydroaminekrin, hexafluorenium i metoklopramid. Antagonisti H<sub>2</sub> receptora nemaju djelovanja na pseudokolinestraznu aktivnost. Bambuterol, prethodnik terbutalina, pokazuje značajnu inhibiciju aktivnosti pseudokolinesteraze i time produžava aktivnost sukcinilkolina. Esmolol, kratkodjelujući beta blokator, izaziva manje produljenje djelovanja sukcinilkolina iako inhibira pseudokolinestrazu. Unatoč svim provedenim istraživanjima o stanjima koja mogu izazvati smanjenu aktivnost pseudokolinesteraze, široki raspon aktivnosti enzima je zaslužan što nije izazvalo veći klinički interes obzirom da velika smanjenja aktivnosti omogućavaju još uvijek adekvatnu razgradnju. U slučaju 80% smanjenja aktivnosti usljed jetrene bolesti, trajanje apneje nakon primjene sukcinilkolina sed produljuje s normalnih 3 minute na samo 9 minuta. Kod tretmana glaukoma s echothiophatom smanjena aktivnost s 49% kontrole na bez aktivnosti, produljenje neuromuskularnog bloka varira između 2 -14minuta. Nije zabilježeno trajanje u niti jednom slučaju iznad 23 minute.

### **Dibukainski broj i atipična pseudokolinesteraza**

Produljeni neuromuskularni blok međutim je jako naglašen u slučaju genetske abnormalne varijante pseudokolinesteraze. Varijanta enzima je opisana u radu Kalowa i Genesta i opisuje ekspeimente s dibukainom, koji inhibira normalnu varijantu u mnogo većem opsegu od inhibicije abnormalnog enzima. Zapažanje je dovelo do klinički važnog testa koji se dobije dibukainski broj. Kod standardiziranih uvijeta dolazi do inhibicije normalnog enzima u opsegu od 80%aktivnosti dok abnormalni enzim bude inhibiran samo 20% u usporedbi s početnom vrijednosti.

Genetska varijanta UU, označava normalnu homozigotnu varijantu, dibukainski broj je 70-80, odgovor na sukcinilkolin ili mivacurium je normalan.

Genetska varijanta UA, atipična heterozigotna varijanta, incidencije 1/480 osoba ima dibukainski broj 50-60, odgovor na sukcinilkolin i mivacurium je produljen za 50-100%.

Genetska varijanta AA, atipična homozigotna varijanta koju pronalazimo u 1/3200 osoba ima dibukainski broj od 20-30, djelovanje relaksansa može bit produženo na 4-8 pa i više sati.

Dibukainski broj nam govori samo o aktivnosti enzima nakon dibukaina, ne daje odgovor o koncentraciji istog ni o efikasnosti u hidrolizi sukcinilkolina odnosno mivacuriuma, to su faktori koji su određeni genetskim karakteristikama i potrebno je odrediti aktivnost pseudokolinesteraze. Zahvaljujući dobrom razumjevanju molekularne biologije samog enzima identificirana je sekvenca aminokiselina te greške u kodiranju zbog kojih dolazi do stvaranja varijanti. Mnoge varijante su nastale kao greška u sekvencioniranju ili substituciji jedne aminokiseline u blizini ili na aktivnom mjestu. To je slučaj kod atipičnog dibukain rezistentnog (A) gena, guanin na mjestu 209 je substituiran za adenin. Rezultat te izmjene je izmjena glicina za aspartatnu kiselinu na mjestu 70 enzima. Kontinuirano se pronalaze nove varijante enzima.

## Nuspojave sukcinilkolina

### Kardiovaskularni efekti

Široki je spektar potencijalnih srčanih disritmija koje može uzrokovati sukcinilkolin. Stimulacija je širokog polja obzirom da ide putem svih kolinergičkih autonomnih receptora, nikotinskih receptora na simpatičkim i parasimpatičkim ganglijima(51), muskarinskih receptora u sinusnom čvoru srca. Negativne inotropne i negativne kronotropne efekte može izazvati već kod malih doza, no to su efekti koji se mogu izbjeći prethodnim davanjem atropina. Uz primjenu velikih doza sukcinilkolina učinci mogu postati pozitivni inotropni i kronotropni te nastaje tahikardija. Uz generaliziranu stimulaciju na autonomnoj razini dolazi do razvoja srčanih disritmija, poglavito sinusne bradikardije, junkcionalnih ritmova te ventrikularnih disritmija. Fenomen dodatno pojačan i prisutan uz trahealnu intubaciju i snažni autonomni stimulus koji ju prati, bez jasnog stava o tome jeli uzrok sam sukcinilkolin ili dodatni poticaj vanjske autonomne stimulacije refleksa.

### Sinusna bradikardija

Stimulacijom muskarinskih receptora na sinusnom čvoru nastaje autonomni mehanizam koji dovodi do sinusne bradikardije, pogotovo je naglašen kod osoba s predominantnim vagusnim tonom te djeci koja nisu dobila atropin(52), no prisutna je i kod odraslih pogotovo nakon primjene ponavljanih doza odnosno kod primjene druge doze otprilike 5 minuta nakon prve doze. To nam govori o ulozi metabolita hidrolize sukcinilkolina, u prvom redu kolina i sukcinilmonokolina, u sensitizaciji srčanog mišića na ponavljanje doze. Korisno je primjeniti, u svrhu prevencije pojave bradikardije, thiopental, atropin, ganglionske blokatore no također u kliničkoj praksi korisno i nedepolarizirajuće mišićne blokatore.

### Nodalni ritmovi

Nodalni ili junkcionalni ritmovi su uobičajena pojava nakon primjene sukcinilkolina, incidencija je višestruko veća nakon druge doze no izostaje nakon primjene d-tubocurarina(53). Mehanizam nastanka vjerovatno uključuje jaču stimulaciju muskarinskih receptora u sinusnom čvoru time nastaje supresija sinusnog mehanizma te AV čvor preuzima funkciju pacemakera.

## Ventrikularne disritmije

Porast cirkulirajućih kateholamina je zabilježen kod ljudi te kod pasa(54) čak kod potonjih do četverostrukog porasta kateholamina i porasta kalija za jednu trećinu. Aditivni efekti su svakako hipoksija, hiperkapnija, endotrahealna intubacija te kirurški stimulusi. Posebno od značaja mogu biti i lijekovi, poput digitalisa, MAO inhibitora, tricikličkih antidepresiva, halotan koji mogu spustiti prag za nastanak aritmija. Ventrikularna ektopična izbijanja bijega mogu biti uzrokovana zbog usporavanja provodnje u AV i sinusnom čvoru koja nastaje nakon primjene sukcinilkolina. Kalij koji se može osloboditi iz skeletnih mišića nakon primjene sukcinilkolina može dodatno pogoršati aritmije.

Smatra se da se plazmatska koncentracija kalija povećava za oko 0.5mEq/l nakon primjene sukcinilkolina kod zdravih osoba. Rezultat je to depolarizirajućeg efekta sukcinilkolina koji nastaje kada natrij krene u stanicu te slijedi izlazak kalija iz stanice, povećanje koncentracije

## Hiperkalemija

je obično dobro tolerirano. Postoje nažalost stanja kod kojih izlazak kalija može biti praćen ozbiljnim posljedicama.

Pacijenti s renalnim zatajenjem su bili smatrani da su posebno osjetljivi na porast kalija zbog primjene sukcinilkolina no postoje mnoge studije koje su to kasnije opovrgnule, isti je slučaj s uremičnom nefropatijom.

Stanje koje svakako može utjecati na nastanak komplikacija je metabolička acidoza i hipovolemija, eksperimentalno je utvrđeno značajno povećanje serumskih vrijednosti kalija nakon primjene sukcinilkolina te se prije primjene mora razmotriti priprema bikarbonatima i hiperventilacija.

Abdominalne infekcije su stanje koje također značajno djeluje na povećanje serumskih vrijednosti kalija, čak za preko 3mEq/l od početne vrijednosti kako je prikazano u radu Kohlschütter i sur., pogotovo nakon tjedan dana od početka infekcije.

Stanje nakon traume, tjedan dana od nastanka prema istraživanjima Bircha i sur. u Vietnamskom ratu, ne pokazuje pojačan efluks kalija no situacija se drastično mjenja nakon

tri tjedna od traume kada se kalemija, nakon primjene sukcinilkolina, može povećati za 3.6mEq/l i tako izazvati srčani arrest(55). U tom radu također zapažaju da je moguće izbjeći porast kalija ako se prethodno primjeni d-tubokurarin. Stanje može trajati i do 60 dana nakon traume ukoliko ne dođe do komplikacija u smislu upale ili trajne degeneracije mišićnog tkiva.

Stanja koja uzrokuju proliferaciju ekstrajunkcionalnih acilkolinskih receptora, kod neuromišićnih bolesti, svakako mogu rezultirati porastom kalija nakon primjene sukcinilkolina te potencijalnim srčanim arestom. To su stanja hemiplegije, paraplegije, mišićnih distrofija, Guillian Barreov sindrom.

#### Povećani intraokularni tlak

Primjena sukcinilkolina uzrokuje povećani intraokularni tlak, mehanizam nastanka nije razjašnjen u potpunosti. Smatra se da nastaje zbog toničke kontrakcije miofibrila te prolazne dilatacije koroidnih krvnih žila. Nastaje 1 minutu nakon primjene, najjači je od 2-4minute te se normalizira nakon 6 minuta(56), prethodna primjena nedepolarizirajućih blokatora otklanja povećanje intraokularnog tlaka.

#### Povećani intragastrični tlak

Povećani intragastrični tlak nije stalna pojava, smatra se da nastaje zbog fascikulacija mišića trbušne stijenke, te nije prisutan kod djece obzirom da fascikulacije u toj dobi nisu prisutne nakon primjene sukcinilkolina.

#### Povećani intrakranijalni tlak

Prema podacima u literaturi, intrakranijski tlak raste nakon primjene sukcinilkolina, izostaje ukoliko je primjenjen pretretman nedepolarizirajućim blokatorom. Mehanizam nastanka nije razjašnjen.

## Mijalgija

Nakon primjene sucinilkolina je vrlo često prisutna generalizirana mijalgija, može doseći čak do 89%(57). Učestalost je veća kod žena i ambulantnih zahvata, smatra se da nastaje usljed nesinhronizirane kontrakcije tijekom fascikulacija. Laboratorijski nalaz je mioglobinemija i povećanje serumske kreatin kinaze. Pretretman nedepolarizirajućim blokatorom umanjuje fascikulacije no bolnost upitno umanjuje. Postoje istraživanja koja prikazuju ulogu prostaglandina i ciklooksigenaze u nastanku mijalgija nakon primjene sucinilkolina.



## Spazam masetera

Vrlo česta nuspojava koja ponekad onemogućava intubaciju je spazam masetera kod odraslih(58) no i kod djece(59). Spazam masetera može biti rani znak nastanka maligne hipertermije no ne može se smatrati dijagnostičkim za malignu hipertermiju.

Pojava	Mehanizam	Mjesto nastanka	Efekt male doze nedepolarizirajućeg lijeka
Fascikulacije	Depolarizacija	Presinaptičko	Smanjuje incidenciju i jačinu
Mijalgija	Fascikulacije	Presinaptičko	Smanjuje incidenciju i jačinu
Mioglobinemija Porast keratin kinaze	Lezija mišića	Presinaptičko	Smanjuje porast
Porast potrošnje O <sub>2</sub> i proizvodnje CO <sub>2</sub>	Kontrakcija mišića	Presinaptičko	Otklanja porast
Oslobađanje katekolamina	Kontrakcija mišića	Presinaptičko	Otklanja porast
Porast intragastričnog tlaka	Kontrakcija mišića	Presinaptičko	Smanjuje porast
Porast intraokularnog tlaka	Kontrakture	Postsinaptički receptori	Mali ili nikakav efekt
Neuromuskularni blok	Desenzitizacija, inaktivacija natrijskih kanala	Postsinaptički receptori	Smanjuje blok, potrebno povećati dozu sukcinilkolina
Bradikardija	Aktivacija	Vagus	Bez efekta
Hiperkalemija	Otvaranje kanala	Postsinaptičko i ekstrajunkcionalni receptori	Mali ili nikakav efekt
Mioklonički odgovor Spazam masetera	Kontrakture	Postsinaptičko i ekstrajunkcionalni receptori	Mali ili nikakav efekt
Rabdomioliza	Fragilnost membrane	Membrane mišićnih stanica	Bez dokazanog efekta. Moguće manja fragilnost membrane?

Slika 4a Predloženi mehanizmi nastanka djelovanja sukcinilkolina

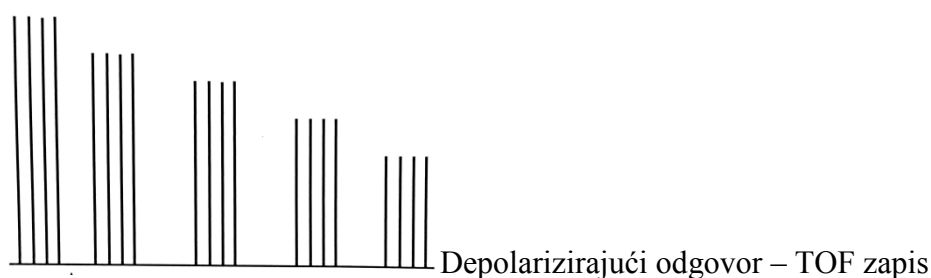
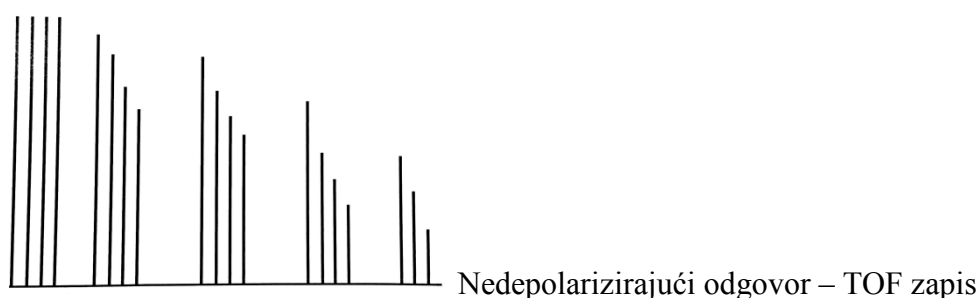
(Donati F. Succinylcholine in modern anesthesia. Anaesthesiology rounds. Montreal. June/July 2002 vol1, Issue2)

Unatoč brojnim kontroverzama sukcinilkolin opstaje kao sredstvo za brzu indukciju neuromuskularnog bloka u hitnim stanjima(Cochrane 2008), najvažnija alternativa je rocuronium koji se znatno približava brzini nastupa djelovanja no uz znatno produljeno djelovanje. U literaturi postoje mnogi članci koji revidiraju upotrebu sukcinilkolina u hitnim stanjima te zaključuju da je rocuronij dobra alternativa ukoliko postoji kontraindikacija za sukcinilkolin (Mallon,J Emerg med 2009, Curley Crit Care 2011,Marsch,Crit Care 2011, Herbstritt, Emerg Med J 2012).

#### 1.2.4. Monitoring neuromuskularne funkcije

S aspekta sigurnosti primjene neuromišićnih blokatora jasno je kroz povijest vidljiva važnost monitoringa, prisjetimo se 1954 godine i rada Beechera i Todda gdje je uočeno da je povećani moratlitet od čak 6 puta kod primjene neuromišićnih blokatora. Razumjevanje farmakologije, a time i monitoring efekta primjenjenih neuromuskularnih blokatora time dolazi u prvi plan radi sigurnosti pacijentata. U svrhu procjene dubine neuromišićnog blica je u kliničkoj praksi prisutno stimuliranje perifernog neuromuskularnog sklopa, dakle dostupni mišići su n.ulnaris - adductor pollicis, najčešće, te u slučajevima da on nije dostupan tada je alternative n. peroneus odnosno n.facialis.

Monitoring koji se koristi je TOF-Train Of Four( četiri stimulus kroz 2 sekunde) odnosno tetanički stimulus. Izbor modaliteta stimuliranja i praćenja odgovora ovisi o neuromuskularnom blokatoru koji se koristi, obzirom da je mehanizam djelovanja depolarizirajućih i nedepolarizirajućih neuromišićnih blokatora različit.



Slika 5a – Prema Miller's Anaesthesia, 7<sup>th</sup> Edition, 2010, Churchill-Livingstone, str.861-862

Na slici 5a je vidljiva razlika u prikazu odgovora nakon primjene nedepolarizirajućih odnosno depolarizirajućih blokatora. Važno je znati da kod potpunog bloka nema odgovora dok je grafički prikaz moguć kod parcijalnih blokova. Kod nedepolarizirajućih neuromišićnih

blokatora dolazi do kompetitivnog vezanja za acetilkolinski receptor te je s ponavljanjem stimulus vidljivo opadanje odgovora ("fade") obzirom da dolazi do opadanja količine acetilkolina koji se oslobađa iz presinaptičkog završetka. Četvrti odgovor je manji od prvoga jer nema dovoljno acetilkolina koji bi se kompetitivno vezao i izazvao odgovor.

S druge strane ukoliko primjenimo depolarizirajući neuromišićni blokator, kao što je sukcinilkolin, odgovor na monitoru će biti znatno različit. Uočavaju se četiri umanjena no jednaka odgovora (prethodno slučaj da je svaki bio manji od prethodnog).

Od kliničkog značaja je fenomen nejednakog razvoja neuromuskularnog bloka u pojedinim mišićima. Naime dijafragma, mišići larinksa i žvakači mišići (centralni mišići) ranije razviju neuromuskularni blok no prije i povrate funkciju. Stoga ukoliko se vrati neuromišićna funkcija na periferno monitoriranim mišićima smatra se da je i centralno smješteni mišići imaju potpuni oporavak.

### 1.2.5. Pentadekapeptid BPC 157

Stabilni gastrični pentadekapeptid BPC157 je peptid molekularne težine 40 000D, parcijalna sekvenca proteina izoliranog iz humanog želučanog soka. Biološki aktivna komponenta je sastavljena od 15 aminokiselina: Gly Glu Pro Pro Gly lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val. Stabilnih je fizikalno kemijskih osobina i ne razgrađuje se u želučanom soku ni nakon 24 sata. Peptid proizvodi Diagen, Ljubljana, Slovenija, GEPPPGKPADDAGLV, M.W.1419, 99%(HPLC) čistoće, topiv u vodi pri pH7.0 i 0.9%NaCl. Primijenjen je samostalno, bez nosača, u mikrogramskim i nanogramskim dozama uz razne oblike apliciranja: intraperitonealno, intragastrično, u vodi za piće, topički na mjestu ozljede. Takav oblik široke primjene nije u skladu s uobičajenim načinom primjene peptida koji vrlo često trebaju nosač kako bi bili aktivni te moraju biti aplicirani na mjesto ozljede. Obzirom na potencijale cijeljenja ozljeda smatra se medijatorom Robertsonve citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije (manja tkivna oštećenja primjenom malih doza različitih iritansa ostvaruju zaštitu odnosno citoprotekciju u slučaju izlaganja puno jačim iritansima (30)).

Primarno antiulkusno djelovanje je prošireno istraživanjima te se prepoznao njegov angiogenetski potencijal, protektivni učinak na endotel te antioksidativni učinak (48,60-76), u svim do sada provedenim istraživanjima nije postignuta letalna doza (LD1) unatoč vrlo širokom spektru primjenjenih doza. Peptid BPC 157 nema značajniji učinak na fiziološke parametre diureze, krvnog tlaka, temperature, gastrointestinalnog motiliteta ili skrecije.

Oštećenje sluznice gastrointestinalnog sustava stresom, NSAR, cisteaminom, akutnim pankreatitisom dokazano je zaštićeno BPC 157 citoprotektivnim učinkom. (61,64-69,72,77), uz to u modelu ezofagitisa oporavlja funkciju donjeg ezofagealnog i piloričnog sfinktera (80,81) te uz poticanje cijeljenja fistula (82).potiče i ubrzava cijeljenje intestinalnih anastomoza(82).

Primarni antiulkusni učinak je istraživanjima proširen na protektivni učinak izvan probavnog sustava, pogotovo u stanjima poremećene homeostaze, pokusni modeli su uspješno potvrdili efikasnost na oštećenjima usljed opekline, hepatobilijarnog trakta, bubrega, srca, mišića, rožnice, sluznice nosa, kosti te dijabetesa izazvanim naloksonom ili hepatotoksičnosti izazvane kapsaicinom.

Redukcija medijatora upale je dokazana usljed interakcije s adrenergičkim i dopaminergičkim

sustavom (60,67,68,69,78). Cijeljenje rana je prikazano u cijeloj seriji istraživanja kroz različite organske sustave, uz uspješno formiranje kolagena, granulacijskog tkiva i retikulinskih vlakana. Doakazano djeluje na reparaciju opekline, mišičnog tkiva, tetiva, kosti, živaca, epitela, rožnice (67,68,69,79,80).

Kod jetre je vidljiv antioksidativni potencijal i hepatoprotektivni efekt u modelu jetrenog oštećenja paracetamolom i NSARom. Pentadekapeptid BPC 157 dovodi do sniženja biokemijskih jetrenih parametara amanjuje oštećenja vezana uz akutno i kronično primjenjivanje alkohola (uz poznati efekt na želučanu sluznicu) te poboljšava portalnu hipertenziju i sami histološki nalaz jetre(83,84). U modelima tubularne nekroze je dokazan nefroprotektivni učinak, u modelima neurotoksičnosti i lezije živca je prikazan neuroprotektivni učinak te očuvanje funkcije Langerhansovih otočića u modelima dijabetesa usljed lezije naloksonom(60,61,62,63,67,68,69,75).

Poznata je iz niza istraživanja i interakcija sa sustavom dušičnog oksida(NO). Dušični oksid je sintetiziran iz esencijalne aminokiseline L-arginin. Smatra se da je relaksirajući čimbenik glatkih mišića koji nastaje u ednotelnim stanicama i ima funkciju kao medijator i kao stanični glasnik(87). Ima ulogu u fiziološkim i patofiziološkim procesima više organskih sustava: kardiovaskularnog, gastrointestinalnog i živčanog sustava kao i u procesima upale i cijeljenja. Smatra se da pentadekapeptid BPC 157 stabilizira sustav dušičnog oksida i održava stanične homeostaze čime ostvaruje citoprotekciju. (33,38,39,40).

Aktivacija NO sustava preko procesa mitohondrijske signalizacije potiče citoprotekciju i indukciju staničnih obrambenih mehanizama ali, s druge strane, aktivacija NO sustava putem energetskih procesa u mitohondrijskoj membrani može dovesti do poremećaja funkcije mitohondrija i oštećenja stanica (88,89).

Putem interakcije sa sustavom dušičnog oksida pentadekapepetid BPC 157 ima angiogenetske osobine i djeluje protektivno na endotel. Zapažanje povezano sa prevencijom nastanka i smanjenjem veličine tromba nakon uspostave aortne anastomoze u štakora te sa skraćenim vremenom trajanja krvarenja i terapijom inducirane trombocitopenije (85,86).

U kardiovaskularnom sustavu djelovanje NO, u modelu doksorubicinske toksičnosti, je protektivno kod posljedičnog srčanog popuštanja, smanjuje se lezija miocita i poboljšava funkcija miokarda (40).

BPC 157 normalizira krvni tlak i pokazuje protektivni učinak na endotel u modelima L-NAME uzrokovane arterijske hipertenzije i L-arginom uzrokovane arterijske hipotenzije (67,68,69).

Interakcija NO sustava i BPC 157 pozitivno djeluje na procese cijeljenja u različitim tkivima (mišići, tetive, ligamenti, živci, kosti, krvne žile, crijevne fistule) kao i na razne poremećaje funkcije tkiva i organa (akutna i kronična alkoholna intoksikacija, doksorubicinska kardiomiopatija, intoksikacija digitalisom, aritmije inducirane ishemijsko reprefuzijskom lezijom ili u sklopu poremećaja koncentracije kalija (6,9,10, 40,82,85).

#### Utjecaj na srce

Pentadekapeptid BPC 157 pokazao zaštitni i antiaritmički učinak na više različitih modela. Kod doksorubicinske kardiotoksičnosti koja kao posljedicu ima zatajenje srca, primjena BPC157 umanjuje oštećenje miokarda što je potvrđeno indirektno nižim vrijednostima kardioselektivnih enzima i big endotelina 1 kao markera srčane funkcije, a direktno patohistološkom analizom srčanog tkiva(40).

U modelu intoksikacije digitalisom primjena pentadekapeptida BPC 157 dovodi do smanjenje pojave i trajanja aritmija poput totalnog AV bloka, ventrikularne tahikardije i fibrilacije ventrikula uz značajno povećanje stope preživljenja u skupini trtiranoj BPC 157 u odnosu na kontrolnu skupinu (33), kod aritmija izazvanih ishemijsko-reperfuzijskom lezijom na modelu izoliranog srca zamorca su postignuti slični rezultati(90). Kod modela aritmija usljed hiperkalemije induciranih primjenom visokih doza otopine kalijeva klorida (doza 9mEq/kg) kao i u modelu aritmija kod hiopkalemije uzrokovanih primjenom visokih doza furosemida (100 mg/kg i.p.) potvrđen je antiaritmički učinak pentadekapeptida BPC 157. I profilaksa i terapija BPC157 kao primjene doveo je do prevencije tipičnih elektrokardiografskih promjena i aritmija uzorkovanih hiperkalijemijom odnosno hipokalijemijom ili do povrata normalnog ritma u slučaju nastanka (33).

### Utjecaj na mišiće

BPC157 utječe na oporavak mišića nakon različitih vrsta ozljeda(6,7,8). BPC157 inducira promptni oporavak mišića, nakon teške traume ( presjecanja(6), teške crush ozljede(7), u stanjima otežane regeneracije inducirane sistemskim kortikosteroidima(8) kao i kod mišićne slabosti zbog hiperkalemije(31).

### Utjecaj na živce

Pentadekapeptid BPC157 izravno umanjuje trenutnu i odgođenu ozljedu zbog traume mozga te značajno djeluje na opravak ishijadičnog živca nakon presjecanja(9,10). U eksperimentalnom modelu multiple skleroze (multiple sclerosis matched toxic rat model) kod aplikacije cuprizone-neurotoksina u dozama nekoliko puta većim od standardnih, BPC157 anagonizira cerebelarnu ataksiju i poboljšava funkciju prednjeg ekstremiteta(42).



## **2.0. Hipoteza**

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) antagonizirati lokalne i sistemske učinke intramuskularno apliciranog sukcinilkolina obzirom da pentadekapeptid BPC 157 ima pozitivne učinke na cijeljenje mišića i neuroprotektivni učinak.

### **3.0. Ciljevi rada**

**OPĆI CILJ:** Cilj ovog istraživanja je utvrditi da pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) antagonizira lokalna i sistemska djelovanja intramuskularno apliciranog depolarizirajućeg neuromuskularnog blokatora sukcinilkolina te time poboljšava neuromuskularnu funkciju.

**SPECIFIČNI CILJEVI:** Utvrditi učinak BPC 157 na djelovanje sukcinilkolina u odnosu na simptomatologiju vezanu za mišićni sustav: (A) prije, (B) za vrijeme (C) nakon nestanka simptoma, neposredno i dugotrajno.

#### 4.0. Materijali i metode

Istraživanje će se provoditi u skladu sa etičkim principima važećim u Republici Hrvatskoj (Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, NN19/99; Zakon o zaštiti životinja, NN135/06 i prema Vodiću za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ.(NIH)#86-23 1985., shodno Tablici

Tablica skupina shodno terminima žrtvovanja

Wistar albino štakore, ženskog spola, 180-250g tjelesne mase	0. dan	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	
BPC ip µg(microgram)	5	5	5	5	5	
0.9%NaCl i.p	5	5	5	5	5	
BPC i.p. ng(nanogram)	5	5	5	5	5	
0.9%NaCl i.p	5	5	5	5	5	
BPC i.p pg (picogram)	5	5	5	5	5	
0.9%NaCl i.p	5	5	5	5	5	
BPCp.o 24h	5	5	5	5	5	
voda p.o24h	5	5	5	5	5	
BPCp.o 48h	5	5	5	5	5	
voda p.o 48h	5	5	5	5	5	
BPC i.p posttretman	5	5	5	5	5	
0.9%NaCl i.p posttretman	5	5	5	5	5	
Ukupno	60	60	60	60	60	=300

*Životinje.* Pokusi će biti provedeni na Wistar albino štakorima, ženskog spola, 180-250g tjelesne mase, randomizirano, 5 štakora/skupina. *Nociceptivna procedura.* Sukcinilkolin (Lyshenon siccum, Nycomed, Njemačka) (1mg/kg i.m., 0.1ml/štakor). Mjesto aplikacije jest desni tibialis anterior, neposredno ispod koljenog zgloba, odnosno 1 cm iznad skočnog zgloba, lateralno. *Pentadekapeptid BPC 157.* Pentadekapeptid BPC 157 (Diagen, Ljubljana, Slovenija, GEPPPGKPADDAGLV, M.V.1419, parcijalna sekvenca humanog proteina iz želučanog soka BPC, peptid s 99% čistoće (HPLC), topiv u vodi pri pH 7.0 i u fiziološkoj otopini NaCl). *Medikacija.* Profilaktička (i;ii). (i) Intraperitonealno; aplikacija 15 minuta prije sukcinilkolina. BPC 157 (u 0.9% NaCl) (10µg/kg, 10ng/kg, 10pg/kg tjelesne mase); 0.9% NaCl (5ml/kg) (kontrola). (ii) Peroralna, u pijućoj vodi kroz 24 ili 48 sati do primjene sukcinilkolina. BPC 157 10 µg/kg u vodi za piće (0.16µg/ml/štakor, 12 ml/štakor/dan), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (kontrola). Terapijska (intraperitonealno) (iii). 1 minuta nakon tretiranja sukcinilkolinom. BPC 157 (u 0.9% NaCl) (10µg/kg tjelesne mase); 0.9% NaCl (5ml/kg) (kontrola).

Utvrđivanje učinka. *Kliničko. Mišićna slabost.* (A) prije, (B) za vrijeme (C) nakon nestanka simptoma, neposredno i dugotrajno.

(A) Ponašanje eksperimentalne životinje prije pojavljivanja mišićnih trzajeva i/ili mišićne slabosti.

Promjene ponašanja, (skor 0-3), od normalnog ponašanja (skor 0) do agitirane životinje (žvakanje, umivanje, povećana lokomotorna aktivnost), agitacija 1- blaga, 2- umjerena, 3- veoma izražena, shodno Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. Eur J Pharmacol 1999; 379: 19–31.

(B) Ponašanje eksperimentalne životinje od pojavljivanja prvih mišićnih simptoma (trzajevi i/ili slabost) (slabosti do nestanka mišićnih simptoma. Mišićni trzaji su promatrani u odnosu na vrijeme nastanka nakon intramuskularne injekcije (sekunde), te broj mišićnih trzajeva.

Mišićna paraliza (izostanak spontanih pokreta) u odnosu na vrijeme nakon sukcinilkolina (sekunde), zadržavanje tonusa (štakor nepokretan u stojećoj poziciji) (skor 1), odnosno

nezadržavanje tonusa (štakor leži nepokretan, ispružen); vrijeme do ponovnog spontanog pokreta (sekunde).

(C) Ponašanje eksperimentalne životinje nakon nestanka simptoma (normalno ponašanje/agitiranost; normalgezija/hiperalgezija; post-aplikacijska kontraktura, odustna/prisutna), neposredno (C1) i dugotrajno (C2).

C1. Promjene ponašanja, (skor 0-3), od normalnog ponašanja (skor 0) do agitirane životinje (žvakanje, umivanje, povećana lokomotorna aktivnost), agitacija 1- blaga, 2- umjerena, 3- veoma izražena, shodno:

Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 379: 19–31.

J Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, i sur. A novel pentadecapeptide, BPC157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry* 1998; 43:511-519.

Hiperalgezija (cičanje i bijeg na lagani dodir ruke po leđima) od povratka spontanih pokreta do isteka hiperalgezije (minuta 5) (normalgezija - na lagani dodir ruke po leđima štakora izostanak vokalizacije i/ili bijega). Skoriranje (0-2) svake minute, lagani dodir ruke po leđima štakora, izostanak vokalizacije - odsutnost hiperalgezije (skor 0); odnosno prisutnost hiperalgezija, 1- cičanje, 2-cičanje i bijeg), te trajanje (sekunde). (Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 379: 19–31.).

C1, C2. Post-aplikacijska kontraktura, odustna/prisutna. Kontraktura nožice je utvrđena shodno:

Novinščak T, Brčić L, Starešinić M i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008; 38:716-25;

Starešinić M, Petrović I, Novinščak T i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006; 24:1109-17;

Pevec D, Novinščak T, Brčić L i sur. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit* 2010; 16: 81-8.

odmah po intramuskularnom sukcinilkolinu te po prestanku simptoma djelovanja na mišiće te po danima 1,3,5,7 nakon pokusa u trenutku žrtvovanja. Ukratko kontraktura eksperimentalno injicirane nožice (EL) u smislu izostanka ekstenzije koljena u odnosu na netretiranu ekstremitet (NL) kao razlika ( $\Delta$ , mm) NL-EL u trenutku kada jedan promatrač ekstendira ekstremitete pokusne životinje dok drugi stavlja oznaku na netretiranu nožicu na mjesto gdje dolazi palac tretiranog ekstremiteta. Također je promatran postotak tretiranih eksperimentalnih životinja kod kojih nije došlo do skraćivanja ekstremiteta.

Dodatno je utvrđen postotak pokusnih životinja kod kojih se javila cijanoza ( šape, njuška, uške), mikcija, pojačana defekacija (više od 3 stolice po pokusnoj životinji te neformirana stolica). Zabilježen je broj letalnih pokusa te vrijeme do nastupa letalnog ishoda.

EKG će se mjeriti i određivati shodno Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M i sur. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009;156:83-9.

kroz prve 4 minute, te će se nakon toga odrediti u serumu vrijednosti shodno:

Ilic S, Drmic D, Zarkovic K i sur. Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;667: 322-9.

Ilic S, Drmic D, Franjic S i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci* 2011; 88: 535-42.

Ilic S, Drmic D, Zarkovic K i sur. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 241-50.

Parametri: glukoza, urea, kreatinin, CK, CK-MB, LDH, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT, natrij, kalij, kloridi, alkalna fosfataza.

#### Mikroskopska analiza

Mikroskopska analiza učiniti će se nakon žrtvovanja, i to nakon 4 minute, te nakon 1,3,5,7 dana nakon tretmana sukcinilkolinom mišići su fiksirani odmah po uklanjanju kože s tretiranog i netretiranog ekstremiteta, u puferiranom formalinu (pH 7.4), tijekom 24 sata, dehidrirani i uklopljeni u parafinski vosak, kako je opisano u:

Novinščak T, Brčić L, Starešinić M i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008; 38:716-25;

Starešinić M, Petrović I, Novinščak T i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006; 24:1109-17;

Pevec D, Novinščak T, Brčić L i sur. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit* 2010; 16: 81-8.

Za patohistološku evaluaciju korištene su transverzalne sekcije debljine 2 mikrona i bojane po hemalaun eozinu. Za morfometrijske analize korišten je program za pohranu i obradu slika ISSA (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska). Pet polja velikog povećanja je odabrano za analizu iz područja neposredno oko mjesta injekcije koje je bilo utvrđeno na serijskim sekcijama. Uzet je uzorak mišića drugog ekstremiteta, netretiranog, s jednakim anatomskim mjestom u pet polja velikog povećanja po principu slijepe probe za analizu. U odabranim područjima

mjeren je kraći promjer mišićnog vlakna. Za patohistološku evaluaciju transverzalna sekcija mišića dijafragme je također korištena po istim principima korištenim za analizu promjena mišića noge. Edem je utvrđen semikvantitativo i bodovan (1-3) kao: 1-blagi edem, 2-umjeren edem, 3-jak edem., kako je opisano u:

Novinščak T, Brčić L, Starešinić M i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008; 38:716-25;

Starešinić M, Petrović I, Novinščak T i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006; 24:1109-17;

Pevec D, Novinščak T, Brčić L i sur. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit* 2010; 16: 81-8.

Žrtvovanje životinja shodno napucima Povjerenstva, 100 mg/kg ip tiopental.

#### Statistička analiza

Korišten je program Statistika 7.1 za Windowse za statističku analizu podataka. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD) i minimum/medium/maksimum. Statistička značajnost razlike između grupa je analizirana će se ANOVA (jednosmjernom analizom varijance) s odgovarajućim post hoc Student Newman-Keulsov test odnosno, alternativno Kruskal-Wallis testom nakon kojeg je post hoc Mann-Whitney test. Postotak eksperimentalnih životinja sa ili bez kontrakture ekstremiteta, cijanozom, mikcijom, pojačanom defekacijom je uspoređivan s Fisherovim testom. Razlike su smatrane statistički značajnima u slučaju  $p < 0.05$ .



## 5.0. Rezultati

Zabilježena je značajna antagonizacija nuspojava sukcinilkolina kod svih načina davanja ( akutna i odgođena paraliza, sistemsko djelovanje – mišićna paraliza, oštećenje mišića, hiperkalemija, aritmije).

Intramuskularni sukcinilkolin: kratko nakon aplikacije (Tablica 1, Tablica 2, Tablica 3, Tablica 4, Tablica 5, Tablica 6, Tablica 7, Slika 1, Slika 2, Slika 3, Slika 4), eksperimentalne životinje postaju hiperkalemične, nastaju aritmije (šiljasti T valovi, produljenje PR intervala i širenje QRS kompleksa, nastanak intermitentnog AV bloka i asistolčkih pauza u 4-5minuti) do postupne reverzije i normalizacije u 15 minuti od aplikacije. Uz navedeno bili su značajno neuromuskularno blokirani (trenutna kontraktura ekstremiteta, inicialna agitiranost, fascikulacije i mišićni trzajevi do neuromuskularne slabosti, nepomičnost te po prestanku djelovanja hiperalgezija, jako glasanje na blagi dodir). Po prestanku djelovanja dolazi do općenitog oporavka od mišićne slabosti, no uz agitiranost (Tablica 1, Tablica 2, Tablica 3, Tablica 4) te dugotrajnu kontrakciju injiciranog ekstremiteta nakon prestanka sistemskog djelovanja.

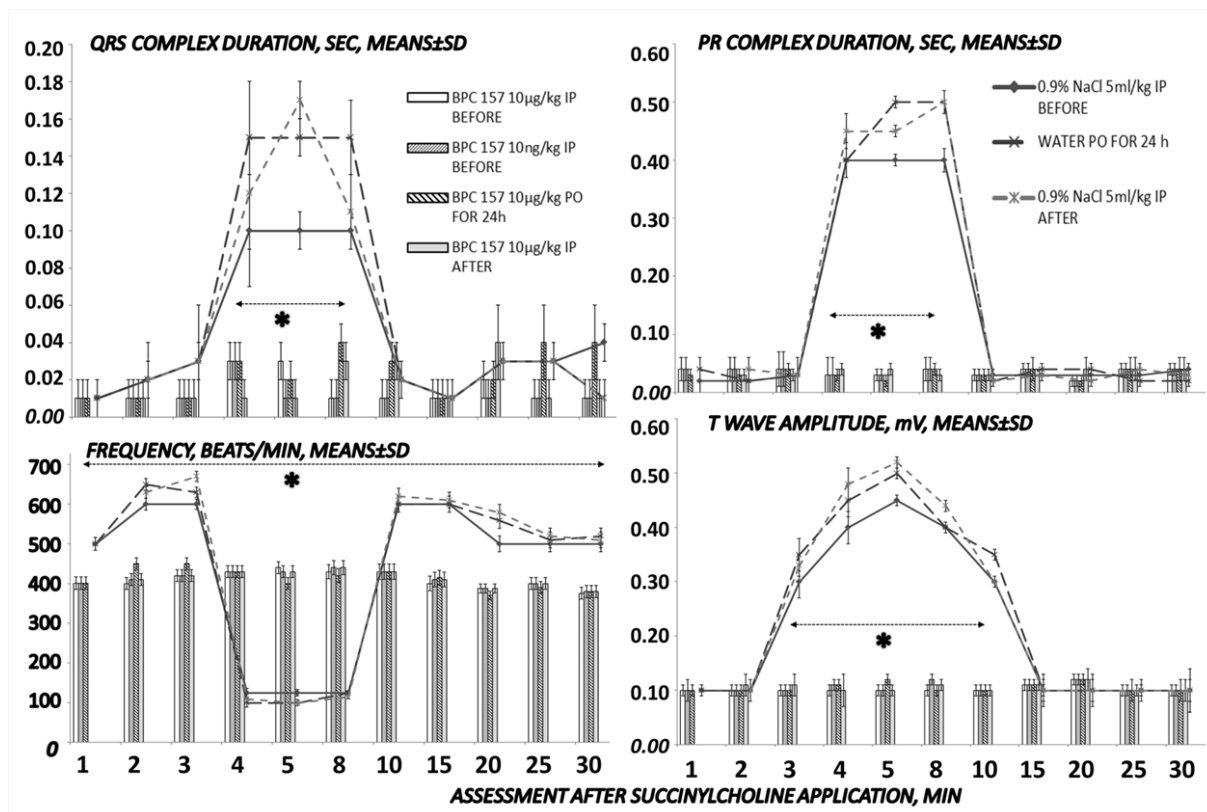
U skladu s navedenim, mišićna vlakna pokazuju skraćenje i edem u injiciranom i ne injiciranom prednjem tibijalnom mišiću i dijafragmi progresivno od 4 minute te po danima 1,3,5,7 nakon sukcinilkolina (Tablica 5, Tablica 6, Tablica 7, Slika 1). Kod svih je zabilježena cijanoza, pojačanja mikcija, defekacija i mišićna slabost.

BPC 157 tretirane eksperimentalne životinje (mikrogramska, nanogramska doza, intraperitonealno i peroralno davanje) u laboratorijskim nalazima imaju normokalemiju, nemaju aritmije, AV bloka ili asistolije ( u usporedbi s kontrolnom skupinom  $p < 0.05$ ). Tokom cijelog trajanja snimanja EKG-a nalazi se sinusni ritam. Djelovanje sukcinilkolina je odgođeno i mitigirano (Tablica 1, Tablica 2, Tablica 3, Tablica 4, Tablica 5, Tablica 6, Tablica 7, Slika 1, Slika 2, Slika 3, Slika 4), uz značajno manju mišićnu paralizu. Serumaska razina enzima, kraće djelovanje do potpunog izostanka mišićne paralize te puno bržeg

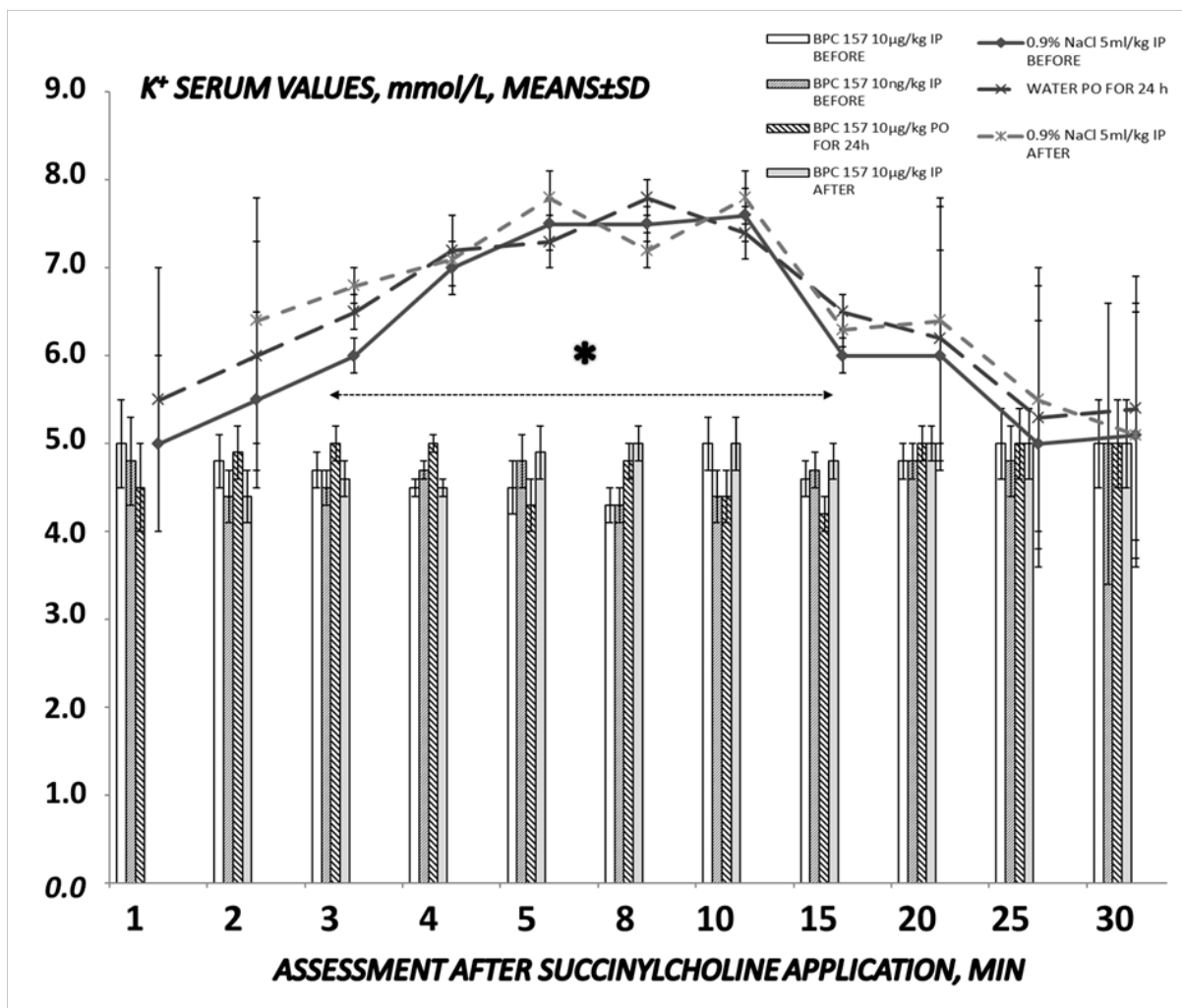
oporavka mišićne funkcije bez hiperalgezije, agitiranosti, cijanoze, mikcije i defekacije (kod svih BPC157 tretiranih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom  $p < 0.05$ ).

BPC157 apliciran u terapijske svrhe, 1 minutu nakon sukcinilkolina, postiže pozitivne efekte koji su prethodno navedeni. Općenito se postiže izostanak kontrakture ekstremiteta, izostanak smanjenja promjera mišićnih vlakana i edema u štakora koji su tretirani BPC157.

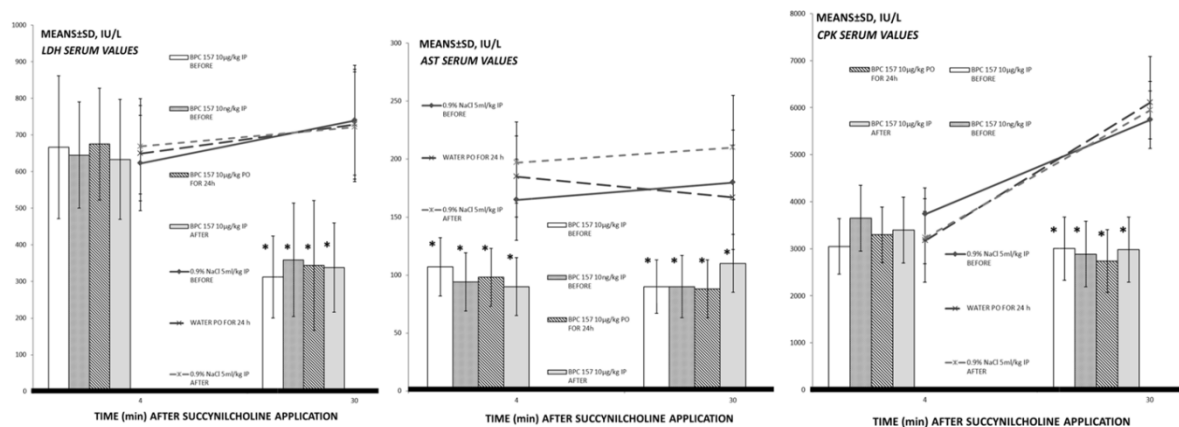
Tablice i slike:



Slika 1. Promjene u EKG-u nakon intramuskularne primjene sukcinilkolina. Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Mean±SD, \*vs. Kontrola  $p < 0.05$ .

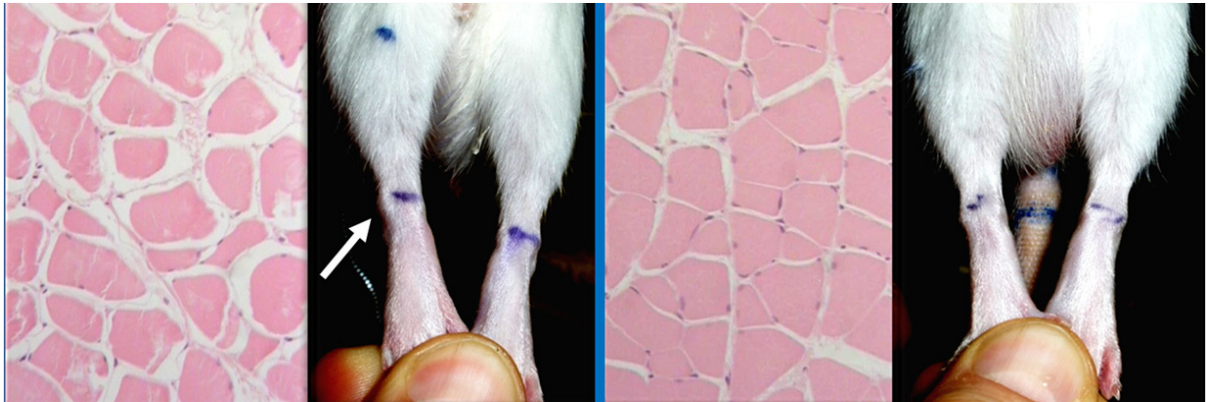


Slika 2. Serumske vrijednosti kalija nakon intramuskularne primjene sukcinilkolina. Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Mean±SD, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .



Slika 3. Serumske vrijednosti enzima nakon intramuskularne primjene sukcinilkolina.

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Mean±SD, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .



Slika 4. Pet dana nakon primjene sukcinilkolina (1mg/kg i.m.) Lijevo: Kontrola. Karakteristična prezentacija, injicirani prednji tibijalni mišić. Mišićna vlakna su manjeg promjera uz jaki edem, Hex25. Kontraktura vidljiva odmah nakon primjene sukcinilkolina dok je ozljeda injiciranog mišića persistentna i prisutna dugo nakon nestanka sistemskog djelovanja. (strijelica). Desna slika prikazuje stanje kod primjene BPC 157. Karakteristična prezentacija. Injicirani prednji tibijalni mišić. Mišićna vlakna održanog promjera uz blagi edem. HEx25. Kontraktura odsutna – normalni izgled ekstremiteta.

Tablica 1. Trzaji mišića

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno		Trzaji mišića	
		Vrijeme nakon aplikacije sukcinilkolina do nastupa trzaja mišića (sekunde)	Broj trzaja mišića
<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>31/35/43</b>	<b>22/26/34</b>
BPC 157 10µg i.p.	sukcinilkolin	82/98/108*	0/0/2*
BPC 157 10ng i.p.	sukcinilkolin	78/95/102*	0/0/1*
<b>voda p.o. (kroz 24h)</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>18/27/35</b>	<b>23/30/42</b>
BPC 157 10µg p.o.(kroz 24h)	sukcinilkolin	77/103/115*	2/7/9*
<b>sukcinilkolin</b>	<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>31/36/47</b>	<b>22/28/38</b>
sukcinilkolin	BPC 157 10µg i.p.	72/88/100*	4/10/12*

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Min/Med/Max, \*vs. kontrola  $p < 0.05$

Tablica 2. Mišićna paraliza i zadržavanje tonusa

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno		Mišićna paraliza i zadržavanje tonusa		
		Vrijeme nakon aplikacije sukcinilkolina do nastupa mišićne paralize i zadržavanja tonusa (sekunde)	Mišićna paraliza i zadržavanje tonusa - težina (skor 1 ili 2)	Mišićna paraliza i zadržavanje tonusa- trajanje (sekunde)
<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>53/64/75</b>	<b>1/2/2</b>	<b>660/891/1075</b>
BPC 157 10µg i.p.	sukcinilkolin	101/119/131*	1/1/1*	310/393/450*
BPC 157 10ng i.p.	sukcinilkolin	111/123/139*	1/1/1*	322/433/501*
<b>Voda p.o. (kroz 24h)</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>27/35/51</b>	<b>1/2/2</b>	<b>709/919/1020</b>
BPC 157 10µg p.o.(kroz 24h)	sukcinilkolin	111/122/141*	1/1/1*	404/432/512*
<b>sukcinilkolin</b>	<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>48/70/78</b>	<b>1/2/2</b>	<b>760/911/1005</b>
sukcinilkolin	BPC 157 10µg i.p.	91/105/120*	1/1/2*	330/407/470*

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Min/Med/Max, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .



Tablica 3. Hiperalghezija - prezentacija po prestanku mišićne paralize

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno		Hiperalghezija nakon mišićne paralize	
		Hiperalghezija težina (skor 0-2)	Trajanje hiperalghezije (sekunde)
<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>1/2/2</b>	<b>274/303/347</b>
BPC 157 10µg i.p.	sukcinilkolin	0/0/0*	0/0/0*
BPC 157 10ng i.p.	sukcinilkolin	0/0/0*	0/0/0*
<b>voda p.o. (kroz 24h)</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>1/2/2</b>	<b>189/326/464</b>
BPC 157 10µg p.o.(kroz 24h)	sukcinilkolin	0/0/0*	0/0/0*
<b>sukcinilkolin</b>	<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>1/2/2</b>	<b>241/290/364</b>
sukcinilkolin	BPC 157 10µg i.p.	0/0/0*	0/0/0*

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Min/Med/Max, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .

Tablica 4. Agitiranost

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno		Agitirano ponašanje prije ili nakon mišićnih simptoma	
		Agitirano ponašanje prije mišićnih simptoma (skor 0-3)	Agitirano ponašanje nakon mišićnih simptoma (skor 0-3)
<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>2/2/3</b>	<b>1/2/3</b>
BPC 157 10µg i.p.	sukcinilkolin	0/0/1*	0/0/1*
BPC 157 10ng i.p.	sukcinilkolin	0/0/1*	0/0/1*
<b>Water p.o. (kroz 24h)</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>1/3/3</b>	<b>2/3/3</b>
BPC 157 10µg p.o.(kroz 24h)	sukcinilkolin	0/0/1*	0/0/1*
<b>sukcinilkolin</b>	<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	<b>2/2/3</b>	<b>1/2/3</b>
sukcinilkolin	BPC 157 10µg i.p.	0/0/1*	0/0/1*

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Min/Med/Max, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .

Tablica 5. Kontraktura noge u relaciji s neinjciranom nogom kao razlika ( $\Delta$ , mm), prezentacija nakon intramuskularnog sukcinilkolina.

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno		Kontraktura noge					
		Neposredno po aplikaciji sukcinilkolina		Dani nakon sukcinilkolina			
		Neposredno nakon aplikacije	Kraj akutne mišićne slabosti	1	3	5	7
<b>0.9%NaCl</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>3.6/</b>	<b>4.6/</b>	<b>6.9/</b>	<b>6.3/</b>	<b>4.6/</b>	<b>5.6/</b>
<b>5ml i.p.</b>		<b>3.8/</b>	<b>4.8/</b>	<b>7.6/</b>	<b>7.6/</b>	<b>4.6/</b>	<b>6.6/</b>
		<b>4.9</b>	<b>5.9</b>	<b>8.1</b>	<b>8.5</b>	<b>5.2</b>	<b>7.2</b>
BPC 157 10 $\mu$ g	sukcinilkolin	0/	0/	0/	0/	0/	0/
i.p.		0/	0/	0/	0/	0/	0/
		0*	0*	0*	0*	0*	0*
BPC 157 10ng	sukcinilkolin	0/	0/	0/	0/	0/	0/
i.p.		0/	0/	0/	0/	0/	0/
		0*	0*	0*	0*	0*	0*
<b>Voda p.o.</b>	<b>sukcinilkolin</b>	<b>3.6/</b>	<b>4.1/</b>	<b>5.9/</b>	<b>6.2/</b>	<b>3.7/</b>	<b>5.9/</b>
<b>(kroz 24h)</b>		<b>3.8/</b>	<b>5.0/</b>	<b>6.6/</b>	<b>7.0/</b>	<b>4.1/</b>	<b>6.9/</b>
		<b>4.9</b>	<b>5.3</b>	<b>8.1</b>	<b>8.3</b>	<b>5.2</b>	<b>7.9</b>
BPC 157 10 $\mu$ g	sukcinilkolin	0/	0/	0/	0/	0/	0/
p.o.(kroz 24h)		0/	0/	0/	0/	0/	0/

		0*	0*	0*	0*	0*	0*
<b>sukcinilkolin</b>	<b>0.9%NaCl</b>	<b>3.8/</b>	<b>4.6/</b>	<b>6.9/</b>	<b>6.3/</b>	<b>4.6/</b>	<b>5.6/</b>
	<b>5ml i.p.</b>	<b>4.0/</b>	<b>4.8/</b>	<b>7.6/</b>	<b>7.6/</b>	<b>4.6/</b>	<b>6.6/</b>
		<b>4.7</b>	<b>5.9</b>	<b>8.1</b>	<b>8.5</b>	<b>5.2</b>	<b>7.2</b>
sukcinilkolin	BPC 157 10 $\mu$ g	0/	0/	0/	0/	0/	0/
	i.p.	0/	0/	0/	0/	0/	0/
		0 <sup>+</sup> *	0*	0*	0*	0*	0*

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Min/Med/Max, \*vs. kontrola  $p < 0.05.$ , <sup>+</sup>BPC 157 efekt terapije: vrijednosti se odnose na prezentaciju nožice neposredno po davanju BPC 157 kod štakora kod kojih je ranije postala kontraktura ekstremiteta nakon intramuskularne aplikacije sukcinilkolina.

Tablica 6. Promjer mišićnih vlakana ( $\mu\text{m}$ ) u injiciranoj i neiniciranom prednjem tibijalnom mišiću i dijafragmi nakon aplikacije sukcinilkolina

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno	Mišić	Promjer mišićnih vlakana ( $\mu\text{m}$ )					
		Minute nakon sukcinilkolina			Dani nakon sukcinilkolina		
		3 min	30 min	1	3	5	7
<b>0.9%NaCl sukcinilkolin</b> <b>5ml i.p.</b>	Injicirani	16.82±1.93	16.27±3.93	23.04±2.93	15.25±2.56	18.23±1.77	23.39±1.31
	prednji tibijalni mišić						
	Ne-	17.15±2.03	14.62±3.23	20.53±2.33	18.18±1.34	19.90±2.04	18.51±1.78
	Dijafragma	24.29±3.63	21.09±3.13	21.01±1.56	22.13±1.74	19.88±2.33	21.40±2.15
BPC 157 sukcinilkolin 10 $\mu\text{g}$ i.p.	Injicirani	25.48±1.83*	30.82±3.43*	33.17±2.34*	19.07±2.34*	22.13±2.45*	26.53±1.25*
	prednji tibijalni mišić						
	Ne-	29.12±2.56*	30.82±3.59*	27.05±2.46*	25.86±2.81*	27.28±2.65*	25.84±1.56*
	Dijafragma	33.33±1.03*	30.33±1.53*	22.46±2.57	20.11±2.22	19.90±1.42	24.02±1.27*
BPC 157 sukcinilkolin 10ng i.p.	Injicirani	27.48±3.11*	32.32±3.51*	31.17±3.64*	18.67±2.35*	21.16±2.15*	25.66±1.35*
	prednji tibijalni mišić						

		Ne-	30.13±2.19*	33.82±2.36*	28.65±2.76*	23.56±1.72*	26.28±1.95*	25.84±1.46*
		injecirani						
		prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Dijafragma	34.33±1.19*	32.53±1.09*	23.67±3.57	19.15±2.68	19.90±1.67	24.87±1.68*
<b>voda p.o.</b>	<b>sukcinitkolin</b>	Injecirani	15.62±2.13	17.26±2.83	22.14±2.88	16.25±2.33	18.46±2.07	22.69±1.41
(kroz 24h)		prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Ne-	16.55±2.93	15.62±2.43	21.13±2.55	18.38±1.30	19.82±1.94	19.61±2.08
		injecirani						
		prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Dijafragma	24.29±2.57	20.59±2.49	22.01±1.76	21.93±1.54	19.69±2.23	20.33±2.25
BPC 157	sukcinitkolin	Injecirani	26.84±2.73*	31.92±1.53*	34.21±2.44*	19.57±2.54*	23.13±2.35*	25.63±2.25*
10µg p.o.		prednji						
(kroz 24h)		tibijalni						
		mišić						
		Ne-	31.12±3.13*	32.52±2.90*	26.15±2.66*	24.76±3.81*	26.28±2.53*	24.64±2.46*
		injecirani						
		prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Dijafragma	35.33±3.46	36.33±1.87*	21.98±2.46	21.11±2.52	20.00±2.41	24.22±1.57*
<b>sukcinitkolin</b>	<b>0.9%NaCl</b>	Injecirani	15.72±1.10	16.36±2.10	21.54±3.10	15.81±2.20	17.80±1.10	20.69±1.10
	<b>5ml i.p.</b>	prednji						
		tibijalni						
		mišić						

		Ne-	16.15±1.10	14.62±2.35	20.25±1.45	17.88±1.10	19.35±1.72	18.85±1.88
		injicirani						
		prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Dijafragma	23.59±2.35	22.79±1.35	22.81±1.10	20.13±1.54	18.09±2.35	19.53±1.55
sukcinilkolin	BPC 157	Injicirani	27.48±2.55*	32.32±1.72*	32.17±3.44*	19.87±1.35*	22.74±2.06*	24.66±1.30*
	10µg i.p.	prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Ne-	31.12±1.36*	33.82±2.44*	25.35±2.76*	22.86±1.36*	25.28±2.45*	23.84±2.67*
		injicirani						
		prednji						
		tibijalni						
		mišić						
		Dijafragma	34.46±2.44*	35.33±2.87*	22.57±2.57	18.15±2.61	19.70±2.33	23.47±1.88*

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Mean±SD, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .

Tablica 7. Edem (skor 0-3) u injiciranom i neiniciranom prednjem tibijalnom mišiću i dijafragmi nakon aplikacije sukcinilkolina

Medikacija (/kg) aplicirana prije ili nakon sukcinilkolina (1.0 mg/kg) intramuskularno		Mišić	Edem					
			Minute nakon sukcinilkolina			Dani nakon sukcinilkolina		
			4	30	1	3	5	7
<b>0.9%NaCl</b>	<b>sukcinilkolin</b>	Injicirani	1/2/2	1/2/2	1/2/2	2/3/3	2/3/3	2/3/3
		5ml i.p. prednji tibijalni mišić						
		Ne- injicirani prednji tibijalni mišić	1/1/2	1/1/2	1/1/2	2/3/3	1/2/3	2/2/3
BPC 157 10µg	sukcinilkolin	Injicirani	0/0/1*	0/1/1*	0/1/1*	1/2/2*	0/1/2*	0/1/2*
		i.p. prednji tibijalni mišić						
		Ne- injicirani prednji tibijalni mišić	0/0/1*	0/0/1*	0/0/1*	0/0/0*	0/1/2*	0/1/2*
BPC 157 10ng	sukcinilkolin	Injicirani	0/1/1*	0/1/1*	0/1/1*	1/2/2*	0/1/2*	0/1/2*
		i.p. prednji tibijalni mišić						
		Ne- injicirani	0/0/1*	0/0/1*	0/0/1*	0/0/1*	0/1/2*	0/1/2*



		prednji tibijalni mišić						
<b>voda p.o. (kroz 24h)</b>	<b>sukcinilkolin</b>	Injicirani	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/3</b>	<b>2/3/3</b>	<b>2/3/3</b>	<b>2/3/3</b>
		prednji tibijalni mišić						
		Ne- injicirani prednji tibijalni mišić	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/2</b>	<b>2/3/3</b>	<b>1/2/3</b>	<b>2/2/3</b>
BPC 157 10µg p.o. (kroz 24h)	sukcinilkolin	Injicirani	<i>0/1/1*</i>	<i>0/1/1*</i>	<i>0/1/1*</i>	<i>1/2/2*</i>	<i>0/1/2*</i>	<i>0/1/1*</i>
		prednji tibijalni mišić						
		Ne- injicirani prednji tibijalni mišić	<i>0/0/1*</i>	<i>0/0/1*</i>	<i>0/0/1*</i>	<i>0/0/1*</i>	<i>0/1/2*</i>	<i>0/1/1*</i>
<b>sukcinilkolin</b>	<b>0.9%NaCl 5ml i.p.</b>	Injicirani	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/3</b>	<b>2/3/3</b>	<b>2/3/3</b>	<b>2/3/3</b>
		prednji tibijalni mišić						
		Ne- injicirani prednji tibijalni mišić	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/2</b>	<b>1/2/2</b>	<b>2/3/3</b>	<b>1/2/3</b>	<b>2/2/3</b>
sukcinilkolin	BPC 157 10µg i.p.	Injicirani	<i>0/1/1*</i>	<i>0/1/1*</i>	<i>0/1/1*</i>	<i>1/2/2*</i>	<i>0/1/2*</i>	<i>0/1/1*</i>
		prednji						

tibijalni						
mišić						
Ne-	0/0/1*	0/0/1*	0/0/1*	0/0/1*	0/1/2*	0/1/1*
injicirani						
prednji						
tibijalni						
mišić						

Štakori koji su dobili sukcinilkolin (1mg/kg) su dobili BPC157 10 mikrograma/kg ili 10 nanograma/kg intraperitonealno 15 minuta prije ili neposredno nakon sukcinilkolina odnosno kontinuirano u vodi za piće. Min/Med/Max, \*vs. kontrola  $p < 0.05$ .

## 6.0. Rasprava

BPC 157 je spasio štakore tretirane sukcinilkolinom i time otkrio vezu između sukcinilkolina, BPC 157, hiperkalemije u skladu s dosadašnjim suportivnim rezultatima kod drugih poremećaja uzrokovanim hiperkalemijom. (Barišić et al 2013)

Ističući opći, generalizirani efekt BPC 157 na štakore tretirane sukcinilkolinom, čini se da je antagonizacija na nivou akutnog i odgođenog paralitičkog djelovanja na mišiće injicirane sukcinilkolinom (Walker et al 2013), na sistemskoj mišičnoj slabosti (Perry et al 2008) i posljedičnom mišičnom oštećenju uz hiperkalemiju (Martyn and Richtsfeld 2006) te na utjecaju na aritmije (Bartolone and Rao 1983).

U obranu prvog argumenta, dokazao sam da su agitiranost prije mišične slabosti, brojni trzajevi koji prethode potpunom gubitku mišičnog tonusa, nepomičnost te na kraju bolna reakcija (jako cičanje prilikom laganog dodira) u potpunosti uklonjeni. Uz antagonizaciju bihevioralnih poremećaja, sljedeći argumenti uključuju smanjenje promjera mišičnih vlakana, edem u injiciranom i neinjiciranom tibijalnom mišiću i dijafragmi koje je sve uspješno antagonizirao BPC 157. Nadalje kod štakora koji su dobili BPC 157 prije aplikacije sukcinilkolina, skraćanje (kontrakcija) stražnje noge se nije razvila odnosno nestala je nakon aplikacije BPC 157 kod štakora koji su dobili BPC 157 nakon aplikacije sukcinilkolina. Stoga BPC 157 prevenira cijeli lanac povezanih poremećaja.

Sljedeći argument je da BPC 157 antagonizira već nastale poremećaje uzrokovane sukcinilkolinom: BPC 157 apliciran nakon intramuskularne injekcije sukcinilkolina također ima pozitivne efekte. Važno je napomenuti da je kontrakcija ozljeđene noge i antagonizacija već opisana kod prijašnjih studija kod različitih uzroka (Novinscak, Pevec Starešinić). Uz to vrlo često nakon aplikacije sukcinilkolina može nastupiti rigiditet muskulature (Colier 1980, Maclaren 1968), stimulacija i oštećenje završetaka motoričkih neurona, motoričkih završnih ploča i mišičnih vretena (Colier 1980). Za postoperacijsku mišičnu bol, specifični argumenti su zamjećeni na kraju inicijalnog djelovanja sukcinilkolina. Uključuju izraženo cičanje na lagani dodir kod preživjelih štakora, fenomen koji je u potpunosti odsutan kod štakora koji su dobili BPC 157. Vrlo vjerovatno sukcinilkolinom inducirano oštećenje završetaka motoričkih

živaca, motoričkih završnih ploča i mišićnih vretena je uspješno prevenirano i antagonizirano kod štakora tretiranim s BPC 157.

Ograničeno mišićno oštećenje kod BPC 157 štakora tretiranih sukcinilkolinom rezultira smanjenim porastom serumskih vrijednosti enzima. Za razliku od kontrolnih nakon inicijalnog porasta, uočava se smanjenje vrijednosti u BPC 157/sukcinilkolin grupi. Rezultati su u korelaciji sa već ranije objavljenom iskustvima kod štakora s teškim crush ozljedama (Novinščak et al 2008). Stoga postoji pozitivni ciklus oporavka s BPC157 terapijom, na lokalnoj i sistemskej razini (Novinščak et al 2008), što uključuje smanjenu vrijednost serumskih enzima u period nakon ozljede, drugim riječima postoji smanjena mišićna proteoliza nakon lokalne traume (Farges et al 2002, Jarvinen et al 2005) kao i nakon lokalne i sistemske ozljede uzrokovane sukcinilkolinom.

Jedan od najvažnijih dokaza je povezan s možda najpogubnijom nuspojavom davanja sukcinilkolina (Cairolu 1982), podatak da BPC 157 antagonizira oštećenje mišića vezano uz nastanak hiperkalemije (Martin and Ritchensfeld 2006) i aritmije (Barolone and Rao 1983). Kod štakora kojima je apliciran sukcinilkolin BPC 157 antagonizira akutni nastanak hiperkalemije i posljedičnu kardiovaskularnu nestabilnost. Doima se da u slučaju sukcinilkolina, BPC 157 može antagonizirati inicijalni efekt čime dovodi do izostanka nagle hiperkalemije koja može usljediti nakon davanja sukcinilkolina. Taj efekt može biti specifičan. Naime kod predoziranja KCl-om (Barišić et al 2013) u svih BPC157 protokola, datih prije ili nakon KCl-a, dolazi do uspostavljanja sinus ritma, smanjenja produljenja QRS kompleksa, smanjenja asistoličkih pauza, antagonizacije mišićne slabosti, hipertenzije i smanjenja pritiska u donjem ezofagealnom sfinkteru kao i piloričkom sfinkteru, čak i u slučajevima gdje je hiperkalemija inducirana KCl-om dostigla vrijednosti od preko 12mmol/l (Barišić et al 2013).

Dokazano je da sukcinilkolin izaziva depolarizaciju membrane sličnu acetilkolinu i decamethoniumu (Paton 1956; Thesleff 1955), process koji je vezan uz oslobađanje intracelularnih iona kalija (Cairolu et al 1982), dok BPC 157 smanjuje depolarizaciju u stanjima teške hiperkalemije in vitro (Barišić et al 2013). Uz sve navedeno prethodno citirana istraživanja neupitno poržavaju predloženu antagonizaciju BPC157/sukcinilkolin/hiperkalemija mišićnih poremećaja kod štakora tretiranih sukcinilkolinom. Postoji trenutni i generalizirani oporavak mišića kao i odgođeno

zacijeljivanje koje slijedi nakon teških izravnih oštećenja, presijecanja (Starešinić et al 2006), crush ozljeda (Novinščak et al 2008, Pevec et al 2010) kao i u sučaju teških poremećaja cijeljenja kao u slučaju davanja sistemskih kortikosteroida (Pevec et al 2006). Popravlak mišićne funkcije se javlja i nakon ozljede središnjeg živčanog sustava (Kliček et al 2013), disfunkcije dopaminskog sustava (Jelovac et al 1999) i posebno, kao što je prethodno navedeno, u slučaju teške mišićne slabosti nakon sistemske hiperkalemije inducirane predoziranjem KCl-om. S vrijednostima preko 12mmol/l, koje su znatno iznad detektiranih u ovom istraživanju (Barišić et al 2013). Na kraju BPC 157 snažno antagonizira kronično srčano zatajenje (Lovrić Benčić et al 2004), jake aritmije uzrokovane digitalisom (Balenović et al 2009) uz izravno inducirane aritmije sukcinilkolinom i prethodno citirane inducirane predoziranjem KCl-om (Barišić et al 2013).

Dodatno BPC157 izravno smanjuje izravnu i odgođenu ozljedu nastalu kod traume mozga, kao i značajno poboljšanje regeneracije živca nakon transekcije (Gjurašin et al 2010; Tudor et al 2010). Nedavno objavljeni rezultati pokazuju da BPC 157 može imati utjecaja na miozu i antagonizaciju atropinske midrijaze, moguće putem NO i/ili kolinergičkih mehanizama (Kokot et al 2015).

Važno je za napomenuti da je ovo istraživanje povuklo slijed pitanja za sljedeća istraživanja i njihovo rasvjetljavanje, pogotovo o točnom mehanizmu kojim BPC prevenira/antagonizira hiperkalemiju. Sažimajući izravnu brzu i odgođenu sposobnost antagonizacije BPC 157 pentadekapeptida u širokom rasponu doza (mikrogrami-nanogrami), apliciranom intraperitonealno ili peroralno, prije ili kratko nakon davanja sukcinilkolina dokazuje antagonizaciju kratkotrajnih i dugotrajnih posljedica nakon davanja sukcinilkolina koji su vidljivi kroz potpuni izostanak kontrakture ekstremiteta.

Uz nedostatak mišićne kolinesteraze, enzima koji hidrolizira sukcinilkolin (Bownam 1980, Walker et al 1993) injekcija u različite mišiče može svakako poremetiti njihovu funkciju dugo po prestanku sistemskog djelovanja (Foldes and Brown 1961; Mazze and Dumbar 1968) Trajanje paralize inducirane intramuskularnim davanjem je dugotrajnije od intravenskog (Bowman 1980; Walker et al 1993). To ističe značajni efekt BPC 157 na poboljšano cijeljenje koje ima putem djelovanja na egr-1 gen i njegov korepresor  $\alpha$ 2, na stvaranje kolagena (Tkalčević et al 2007) i moguće putem djelovanja na druge gene i puteve cijeljenja (Chang et al 2011; Huang et al 2015).

Slijedom svega navedenog, kao pogodan antagonist, BPC 157 spriječava ili umanjuje sve efekte sukcinilkolina (sistemske i lokalne; akutne, subakutne i kronične), pokazuje definitivni popravak disabilitiranih neuromišićnih spojnica i antagonizaciju izostanka transmisije signal sa živca na mišić. Antagonizacija učinaka sukcinilkolina može biti korisna i putem prikazane antagonizacije učinaka hiperkalemije i poremećaja koje uzrokuje (Barišić et al 2013).

## **7.0. Zaključci**

Temeljem dobivenih rezultata slijedi zaključak da BPC 157 značajno antagonizira nuspojave sukcinilkolina kod svih načina davanja ( akutna i odgođena paraliza, sistemsko djelovanje – mišićna paraliza, oštećenje mišića, hiperkalemija, aritmije).

Kao pogodan antagonist, BPC 157 spriječava ili umanjuje sve efekte sukcinilkolina (sistemske i lokalne; akutne, subakutne i kronične), pokazuje definitivni popravak disabilitiranih neuromišićnih spojnica i antagonizaciju izostanka transmisije signal sa živca na mišić

## 8.0. Popis citirane literature

1. *Plumley MH, Bevan JC, Saddler JM, et al.* Dose-related effects of succinylcholine on adductor pollicis and masseter muscle in children. *Can J Anaesth* 1990; 37: 15-20.
2. *Walker FO, Scott GE, Butterworth J.* Sustained focal effects of low-dose intramuscular succinylcholine. *Muscle Nerve* 1993; 16:181-7.
3. *Perry JJ, Lee JS, Sillberg VA, Wells GA.* Rocuronium versus succinylcholine for rapid sequence induction intubation. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 2:CD002788.
4. *Martyn JAJ, Richtsfeld M.* Succinylcholine-induced hyperkalemia in acquired pathologic states. Etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 2006; 104: 158–69.
5. *Bartolone RS, Rao TL.* Dysrhythmias following muscle relaxant administration in patients receiving digitalis. *Anesthesiology* 1983; 58: 567-9.
6. Novinščak T, Brčić L, Starešinić M i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008; 38:716-25.
7. Starešinić M, Petrović I, Novinščak T i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006; 24: 1109-17.
8. Pevec D, Novinščak T, Brčić L i sur. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit* 2010; 16: 81-8.
9. Gjurašin M, Miklić P, Zupančić B i sur. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept* 2010; 160: 33-41.
10. Tudor M, Jandrić I, Marović A i sur. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul Pept* 2010; 160: 26-32.
11. Low H and Tammelin LE. On succinylcholine, a neuromuscular blocking drug, and its synergism with TEPP. *Acta Physiol Scand* 1951; 23: 78–84.
12. Blayney ML, Lai FA. Ryanodine receptor-mediated arrhythmias and sudden cardiac death. *Pharmacol Ther* 2009; 123: 151-177.
13. Shaaban MJ, Lakkis S, Ashkar K. Succinylcholine-induced rhabdomyolysis in a healthy child. *Middle East J Anaesthesiol* 2000; 15: 681-6.
14. Matthews JM. Succinylcholine-induced hyperkalemia and rhabdomyolysis in a patient with necrotizing pancreatitis. *Anesth Analg* 2000; 91:1552-4.
15. Foldes FF, Brown IM. The possible dangers of intramuscular succinylcholine. *JAMA* 1961; 177: 514-5.
16. Sims C. Masseter spasm after suxamethonium in children. *Br J Hosp Med* 1992; 47: 139-43.
17. Maclaren CAB. Myoglobinuria following the use of suxamethonium chloride. A case report. *Br J Anaesthesia* 1968; 40: 901-2.



18. Collier CB. Suxamethonium fasciculations: a topographical study. *Anaesth Intensive Care* 1980; 8: 26-33.
19. Magshoudi B, Khademi B. Succinylcholine-induced masseter muscle rigidity during bronchoscopic removal of a tracheal foreign body. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69:1283-5.
20. Tegazzin V, Scutari E, Treves S i sur. Succinylcholine, induces contracture of human malignant hyperthermia-susceptible muscles via activation of the ryanodine receptor calcium Sup 2+ channel. *Anesthesiology* 1996; 84:1380-1385.
21. Fletcher JE, Rosenberg H, Lizzo FH. Effects of droperidol, haloperidol and ketamine on halothane, succinylcholine and caffeine contractures: implications for malignant hyperthermia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1988; 33:187-192.
22. Ramirez JA, Cheetham ED, Laurence AS i sur. Suxamethonium, masseter spasm and later malignant hyperthermia. *Anaesthesia* 1998;53:1111-6.
23. Rosenberg H, Davis M, James D i sur. Malignant hyperthermia. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 24: 2-21.
24. Sigg DC and Iaizzo PA. Malignant hyperthermia phenotype. Hypotension induced by succinylcholine in susceptible swine. *Anesthesiology* 2000; 92: 1777-88.
25. Wong SF, Chung F. Succinylcholine-associated postoperative myalgia. *Anaesthesia* 2000; 55:144-152.
26. Umesh G, Jasvinder K, Shetty N. Suxamethonium stands the test of time: it is too early to say goodbye. *Anaesthesia* 2009; 64:1023.
27. Lee C. Goodbye suxamethonium. *Anaesthesia* 2009; 64: 73-81.
28. Asmussen G, Gaunitz U. Contractures in normal and denervated inferior oblique muscle of the rabbit. *Pflugers Arch* 1981; 392: 191-7.
29. Bowman WC. *Pharmacology of Neuromuscular Function*. Wright, London 1990.
30. Sikirić P, Seiwerth S, Brčić L i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1224-34.
31. Barišić I, Radić B, Kliček R i sur. The pentadecapeptide BPC 157 prevents and reverses cardiac arrhythmias and sphincter pressure failure caused by hyperkalemia. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 9.
32. Barišić I, Seiwerth S, Sikirić P i sur. BPC 157 inhibits K<sup>+</sup> conductance in WT HEK293 cells. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 10.
33. Balenović D, Benčić ML, Udovičić M i sur. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009; 156: 83-9.

34. *Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des 2011; 17: 1612-32.*
35. *Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, et al. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem 2012; 19: 126-32.*
36. *Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, et al. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Pharm Des 2013; 19: 76-83.*
37. *Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, et al. BPC 157 and blood vessels. Curr Pharm Des 2014;20: 1121-5*
38. *Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. Curr Pharm Des 2014; 20: 1126-35.*
39. *Barisic I, Balenovic D, Klicek R, et al. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. Regul Pept 2013; 181: 50-66.*
40. *Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci 2004; 95 :19-26.*
41. *Balenovic D, Barisic I, Prkacin I, et al. Mortal furosemide-hypokalemia-disturbances in rats NO-system related. Shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 more than with L-arginine. J Clin Exp Cardiol 2012; 3: 201.*
42. *Klicek R, Kolenc D, Suran J, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. J Physiol Pharmacol 2013; 64(5):597-612.*
43. *Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, et al. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. Burns 2003; 29: 323-34.*
44. *Tkalcević VI, Cuzić S, Brajsa K, et al. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. Eur J Pharmacol 2007; 570: 212-21.*
45. Griffith HR, Johnson GE: The use of curare in general anesthesia. *Anesthesiology* 1942; 3:418.
46. Thesleff S: Farmakologiska och kliniska forsok med L.T.I. (O,Osuccinylcholine jodid). *Nord Med*1951; 46:1045.
47. NaguibM, Flood P, McArdle JJ,et.al: Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: Implications for the anesthesiologist, *Anesthesiology* 2002;96:202-231.
48. Bowman WC: Prejunctional and postjunctional cholinoreceptors at the neuromuscular junction. *Anesth Analg* 1980;59:935-943.
49. Bovet D: Some aspects oft he relationship between chemical constitution and curare-like activity. *An N Y Acad Sci* 1951;54:407-437.
50. Viby-Mogensen J: Correlation of succinylcholine duration of action with plasma cholinesterase activity in subjects with the genotypically normal enzyme. *Anesthesiology* 1980; 53:517-520.
51. Galindo AHF, Davis TB: Succinylcholine and cardiac excitability. *Anesthesiology* 1962; 23:32-40.
52. Craythorne NWB, Turndorf H, Dripps RD: Changes in pulse rate and rhythm associated with the use of succinylcholine in anesthetized patients. *Anesthesiology* 1960; 21:465.

53. Schoenstadt DA, Witcher CE: Observations on the mechanism of succinylcholine-induced cardiac arrhythmias. *Anesthesiology* 1963; 24:358-362.
54. Leiman BC, Katz J, Butler BD: Mechanisms of succinylcholine-induced arrhythmias in hypoxic or hypoxic:hypercarbic dogs. *Anesth Analg* 1987; 66:1292-1297.
55. Birch AA, Jr., Mitchell GD, Playford GA et al: Changes in serum potassium response to succinylcholine following trauma. *JAMA* 1969; 210:490-493.
56. Pandey K, Badola RP, Kumar S: Time course of intraocular hypertension produced by suxamethonium. *Br J Anaesth* 1972; 44:191-196.
57. Brodsky JB, Brock-Utne JG, Samuels SI: Pancuronium pretreatment and post-succinylcholine myalgias. *Anesthesiology* 1979; 51:259-261.
58. Leary NP, Ellis FR: Masseteric muscle spasm as a normal response to suxamethonium. *Br J Anaesth* 1990; 64:488-492.
59. Meakin G, Walker RW, Dearlove OR: Myotonic and neuromuscular blocking effects of increased doses of suxamethonium in infants and children. *Br J Anaesth* 1990; 65:816-818.
60. Sikirić P, Petek M, Ručman R, Dodig M, Seiwerth S, Grabarević Z, Jagić V, Rotkvić I, Danilović Z, Krnjević H, Duvnjak M, Suchanek E, Burek V, Anić B, Uglesić M, Erceg D, Vuković S (1991): Influence of BPC on experimental kidney lesions models. *Exp Clin Gastroent* 1: 25-27.
61. Sikirić P, Petek M, Ručman R, Seiwerth S, Grabarević Ž, Rotkvić I, Turković B, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M, Lang N, Danilović Z, Cviko A, Kolega M, Sallmani A, Djačić S, Bura M, Brkić T, Banić M, Dodig M, Ćorić V, Šimičević V, Veljaca M, Erceg D, Ježek D, Simunić-Banek Lj, Skroza N, Bulić K, Buljat G, Hanževački M, Orihovac V, Lučinger D, Culig J, Šeparović J, Marović A, Miše S, Suchanek E, Matoz W, Perović D, Gjurašin M, Mikulandra S, Derniković K, Cuk V, Karakas I (1993a): A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effect of BPC. *J Physiol* 87: 313-327.
62. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Rotkvić I, Turković B, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M, Danilović Z, Kolega M, Sallmani A, Dacic S, Dodig M, Lang N, Šeparović J, Ćorić V, Šimičević V, Bulić K, Veljaca M, Skroza N, Banić M, Brkić T, Buljat G, Miše S, Lucinger D, Bura M (1993b): Hepato-protective effect of BPC 157, a 15-aminoacid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl<sub>4</sub> administration. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci* 53: 291-296.
63. Sikirić P, Gyires K, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Rotkvić I, Turković B, Udović I, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M, Danilović Z (1993c): The effect of pentadecapeptide BPC 157 on inflammatory, non-inflammatory, direct and indirect pain and capsaicin neurotoxicity. *Inflammopharmacology* 2: 121-127.
64. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Petek M, Rucman R, Turković B, Rotkvić I, Jagić V, Duvnjak M, Miše S, Djačić S, Šeparović J, Veljaca M, Sallmani A, Banić M, Brkić T (1994): The beneficial effect of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H<sub>2</sub> receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 54 (5): PL63-68.
65. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Miše S, Zoričić I, Gjurasin M, Konjevoda P, Šeparović J, Ljubanović D, Artuković B, Bratulić M, Tišljarić M, Jurina L, Buljat G, Miklić P, Marović A (1996a): Beneficial effect of novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress,

- ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci* 41 (8): 1604–1614.
66. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Ručman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Miše S, Zoričić I, Jurina Lj, Konjevoda P, Hanževački M, Ljubanović D, Šeparović J, Gjurašin M, Bratulić M, Artuković B, Jelovac N, Buljat G (1996b): Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 41: 1518-1526.
  67. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S, Grabarević Ž, Ručman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Miše S, Zoričić I, Jurina Lj, Konjevoda P, Hanževački M, Gjurašin M, Šeparović J, Ljubanović D, Artuković B, Bratulić M, Tišljarić M, Miklić P, Sumajstorčić J (1997a): Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. *Dig Dis Sci* 42: 661-671.
  68. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Ž, Ručman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Miše S, Zoričić I, Konjevoda P, Perović D, Simicević V, Šeparović J, Hanževački M, Ljubanović D, Artuković B, Bratulić M, Tišljarić M, Rekić B, Gjurasin M, Miklić P, Buljat G (1997b): Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol (Paris)* 91: 113-122.
  69. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Ž, Ručman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Miše S, Zoričić I, Konjevoda P, Perović D, Jurina Lj, Šeparović J, Hanževački M, Artuković B, Bratulić M, Tišljarić M, Gjurašin M, Miklić P, Stančić-Rokotov D, Slobodnjak Z, Jelovac N, Marović A (1997c): The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol* 332: 23-33.
  70. Sikirić P (1999a): The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). *Inflammopharmacology* 7: 1-14
  71. Sikirić P, Šeparović J, Anić T, Buljat G, Mikus D, Seiwerth S, Grabarević Z, Stancić Rokotov D, Pigac B, Hanževački M, Marović A, Ručman R, Petek M, Zoričić I, Žiger T, Aralica G, Konjevoda P, Prkacin I, Gjurasin M, Miklić P, Artuković B, Tišljarić M, Bratulić M, Miše S, Rotkvić I (1999b): The effect of pentadecapeptide BPC 157, H<sub>2</sub>-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol (Paris)* 93: 479-485.
  72. Sikirić P, Šeparović J, Buljat G, Anić T, Stančić-Rokotov D, Mikus D, Duplancić B, Marović A, Zoričić I, Prkacin I, Lovrić-Bencić M, Aralica G, Žiger T, Perović D, Jelovac N, Dodig G, Rotkvić I, Miše S, Seiwerth S, Turković B, Grabarević Ž, Petek M, Ručman R (2000): Gastric mucosal lesions induced by complete dopamine system failure in rats. The effects of dopamine agents, ranitidine, atropine, omeprazole and pentadecapeptide BPC 157. *J Physiol (Paris)* 94: 105-110.
  73. Sikirić P, Seiwerth S, Brcić L, Blagačić AB, Zoričić I, Sever M, Klicek R, Radić B, Keller N, Sipos K, Jakir A, Udović M, Tonkić A, Kokić N, Turković B, Miše S, Anić T. 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 Dec;14(5-6):214-21. Review.
  74. Seiwerth S, Sikirić P, Grabarević Z, Zoričić I, Hanževački M, Ljubanović D, Corić V, Konjevoda P, Petek M, Ručman R, Turković B, Perović D, Mikus D, Jadrijević S, Medvidović M, Tadić T, Romac B, Kos J, Perić J, Kolega Z (1997): BPC 157's effect on healing. *J Physiol (Paris)* 91: 173-178.
  75. Jelovac N, Sikirić P, Ručman R, Petek M, Perović D, Konjevoda P, et al. A novel pentadecapeptide, BPC-157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine

- and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry* 1998;43:511-519.
76. Grabarević Z, Tišljarić M, Artuković B, Bratulić M, Džaja P, Seiwerth S, Sikirić P, Perić J, Geres D, Kos J. The influence of BPC-157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris* 1997; 91(3-5):139-49.
  77. Paré W, Klucyznski JM. The effect of new gastric juice peptide BPC on classic stress triad in stress procedure. *Exp Clin Gastroent* 1994;1: 234-236.
  78. Kalogjera L, Ries M, Baudoin T, Ferencic Z, Trotic R, Pegan B. Dose-dependent protective effect of BPC 157 on capsaicin induced rhinitis in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254:9-11.
  79. Mikus D, Sikirić P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, Rucman R, Petek M, Pigac B, Perovic D, Kolombo M, Kokic N, Mikus S, Duplancic B, Fattorini I, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Prkacin I, Konjevoda P, Stambuk N, Anic T. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns*. 2001 Dec;27(8):817-27.
  80. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, Batelja L, Sever M, Kokic N, Tonkic A, Zoricic I, Mise S, Staresinic M, Radic B, Jakir A, Babel J, Ilic S, Vuksic T, Jelic I, Anic T, Seiwerth S, Sikirić P. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC-157. *J Pharmacol Sci* 2007; 104(1):7-18.
  81. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, Batelja L, Kokic N, Tonkic A, Mise S, Baotic T, Staresinic M, Radic B, Jakir A, Vuksic T, Anic T, Seiwerth S, Sikirić P. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC-157. *J Pharmacol Sci* 2006; 102(3):269-77.
  82. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, Vuksic T, Ivica M, Barisic I, Ilic S, Berkopic L, Vrcic H, Brcic L, Boban Blagaic A, Coric M, Brcic I, Stancic Rokotov D, Anic T, Seiwerth S, Sikirić P. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in healing of colocutaneous fistulas in rats:role of nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci* 2008;108: 7-17.
  83. Prkacin I, Aralica G, perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, Stancic-Rokotov D, Ziger T, Anic T, Sikirić P, Seiwerth S, Staresinic M, Mise S, Rotkvic I, Jagic V, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Marovic A, Sjekavica I, Sebecic B, Boban-Blagaic A, Ivasovic Z. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC-157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris* 2001;95(1-6);295-301.
  84. Boban Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Sikirić P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur J Pharmacol*. 2004;499(3):285-90.
  85. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko I, Seiwerth S, Sikirić P. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:161-5.
  86. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, Hrelec M, Kolenc D, Radic B, Bojic D, Vcev A, Seiwerth S, Sikirić P. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb Res*. 2012 May;129(5):652-9

87. 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.
88. Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007(12):2524-31.
89. Taylor CT, Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010(4):643-7
90. Bosnjak ZJ, Graf BM, Sikiric P, Stowe DF. Protective effect of newly isolated gastric peptide following hypoxic and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *FASEB J* 1994;8:A 12
91. Cairoli VJ, Ivankovich AD, Vucicevic D, et al. Succinylcholine-induced hyperkalemia in the rat following radiation injury to muscle. *Anesth Analg* 1982; 61: 83-6.
92. Farges, M.C., Balcerzak, D., Fisher, B.D., Attaix, D., Bechet, D., Ferrara, M., Baracos, V. E. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am. J. Physiol. Endocrinol* 2002. Me- tab. 282, E326–E335.
93. Järvinen, T.A.H., Järvinen, T.L.N., Minna Kääriäinen, M., Kalimo, H., Järvinen, M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am. J. Sports Med* 2005. 33, 745–762.
94. Mazze RI, Dunbar RW. Intralingual succinylcholine administration in children: an alternative to intravenous and intramuscular routes? *Anesth Analg* 1968; 47: 605-15.

## 9.0. Sažetak

Pentadekapeptid BPC 157 pospješuje cijeljenje mišića te pokazuje neuroprotektivna svojstva. Proučili smo antagonizirajuća svojstva BPC 157 na intramuskularnoj aplikaciji sukcinilkolina. Sukcinilkolin je injiciran u desni kvadriceps štakora i proučavan je lokalni paralitički utjecaj u injiciranom mišiću, neposredna kontraktura ekstremiteta, inicijalna agitiranost pred mišićnu blokadu, trzajevi pred kompletni gubitak mišićnog tonusa, bespomično ležanje, bolnu vokalizaciju na lagani dodir te smanjenje mišićnih vlakana i edem u tretiranom i netretiranom kvadricepsu i dijafragmi. BPC 157 je u potpunosti uklonio lokalne učinke sukcinilkolina (kontraktura ekstremiteta) i značajno smanjio ili uklonio bihevioralnu agitiranost, mišićne trzajeve i mišićnu blokadu. Kod tretiranih životinja nije bilo bolnih vokalizacija na lagani dodir. BPC 157 je antagonizirao smanjenje broja mišićnih vlakana i edema koje je nastalo u tretiranom i netretiranom kvadricepsu te dijafragmi.

## **10.0. Abstract**

### **Antagonisation of intramuscular application of succinylcholine in rats by pentadecapeptide BPC 157**

Pentadecapeptide BPC 157 improves muscle healing and has neuroprotective properties. We tested BPC 157 counteracting effect on intramuscular application of succinylcholine. Succinylcholine was given into the right quadriceps muscle of the rats, and we assessed local paralytic effect in injected muscle, immediate leg contracture, initial agitation before muscle disability, countless muscle twitches before complete muscle tonus loss, motionless laying, and thereafter, violent screaming upon light touch, and muscle fibers decrease, and edema in injected and non-injected quadriceps muscle and diaphragm. BPC 157 completely eliminated the local succinylcholine effect (leg contracture) and markedly attenuated or eliminated behavioral agitation, muscle twitches, motionless laying. No violent screaming upon light touch appeared in IM succinylcholine-rats. BPC 157 counteracted muscle fibers decrease and edema that otherwise appeared in injected and non-injected quadriceps muscle and diaphragm.



## 11. Životopis

Ime i prezime: Vasilije Stambolija

Datum i mjesto rođenja: 13.11.1977, Kopar, Slovenija

Adresa: Vinec 8; 10 000 Zagreb; Hrvatska

Telefonski broj: 091/ 512 60 97 01/2445705; 052/ 756 337  
e-mail: vasilije.stambolija@pu.t-com.hr

Bračno stanje: oženjen

Trenutno zaposlenje: Specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja; Klinika za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje – Odjel za anesteziju i intenzivno liječenje neurokirurških bolesnika; KBC Zagreb-Rebro, Kišpatićeva 12;

Student poslijediplomskog studija “Biomedicina” Medicinski fakultet u Zagrebu

### Edukacija

- 2008. Položio specijalistički ispit iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja;
- 2002. Upisao postdiplomski studij “Biomedicina” na Medicinskom fakultetu u Rijeci
- 2002. Diplomirao 28.06.2002. studij medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci
  - trajanje studija: 6 godina
  - prosjek ocjena: 4.14
- 1996. - 2002. Studirao na Medicinskom fakultetu u Rijeci; studij medicine, član Sveučilišnog kluba 4 plus
- 1992. – 1996. Srednja škola; Opća gimnazija s nastavom na talijanskom jeziku “Leonardo da Vinci”, Buje
- 1984. - 1992. Osnovna škola “Marija i Lina”, Umag

### Stručne aktivnosti i publikacije

- 18.12.2008. Položio specijalistički ispit
- 24.rujna 2003. položio državni ispit
- Liječnik košarkaškog kluba “Umag”; sezone 2002/2003 i 2003/2004
- 2002.-2003. Pripravnički staž u Domu Zdravlja Umag i KBC Rijeka
- 1998. – 2002. Demonstrator na Zavodu za Histologiju i embriologiju; Medicinski fakultet u Rijeci
- 2001. Uvodni tečaj znakovnog jezika
- 2000. Demonstrator na Zavodu za Farmakologiju za studente stomatologije iz Italije
- 1999. Demonstrator na Zavodu za Fiziku za studente stomatologije iz Italije

- Publikacije:
- 1. **Stambolija V, Stambolija TP, Holjevac JK, Murselovic T, Radonic J, Duzel V, Duplancic B, Uzun S, Zivanovic-Posilovic G, Kolenc D, Drmic D, Romc Z, Seiwerth S, Sikiric P.** BPC 157: The counteraction of succinylcholine, hyperkalemia, and arrhythmias. Eur J Pharmacol. 2016 Jun 15;781:83-91. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.004. Epub 2016 Apr 6.
- 2. Zemba M, Cilic AZ, Balenovic I, Cilic M, Radic B, Suran J, Drmic D, Kokot A, **Stambolija V, Murselovic T, Holjevac JK, Uzun S, Djuzel V, Vlainic J, Seiwerth S, Sikiric P.** BPC 157 antagonized the general anaesthetic potency of thiopental and reduced prolongation of anaesthesia induced by L-NAME/thiopental combination. Inflammopharmacology. 2015 Dec;23(6):329-36. doi: 10.1007/s10787-015-0249-9. Epub 2015 Nov 13.
- 3. Radonić J, Mihaljević L, Radonić R, Rogić D, Sekulić A, Katancić-Holjevac J, Murselović T, **Stambolija V.** Peripheral arterial catheter related infections in the neurosurgical intensive care unit. Coll Antropol. 2014 Jun;38(2):665-9.
- 4. Mrak G, Paladino J, **Stambolija V, Nemir J, Sekhar LN.** Treatment of giant and large fusiform middle cerebral artery aneurysms with excision and interposition radial artery graft in a 4-year-old child: case report. Neurosurgery. 2014 Mar;10 Suppl 1:E172-7; discussion E177. doi: 10.1227/NEU.000000000000168.
- 5. Duplancic B, **Stambolija V, Holjevac J, Zemba M, Balenovic I, Drmic D, Suran J, Radic B, Filipovic M, Blagaic AB, Brcic L, Kolenc D, Grabarevic Z, Seiwerth S, Sikiric P.** Pentadecapeptide BPC 157 and anaphylactoid reaction in rats and mice after intravenous dextran and white egg administration. Eur J Pharmacol. 2014 Mar 15;727:75-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.046. Epub 2014 Jan 31
- 6. Handžić J, Radić B, Bagatin T, Savić A, **Stambolija V, Nevajda B.** Hearing in children with otitis media with effusion--clinical retrospective study. Coll Antropol. 2012 Dec;36(4):1273-7.
- 7. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Drmic D, Ilic S, Kolenc D, **Stambolija V, Zoricic Z, Vrcic H, Sebecic B.** Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem. 2012;19(1):126-32. Review.
- 8. Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L, Klicek R, Radic B, Sever M, Djuzel V, Filipovic M, Djakovic Z, **Stambolija V, Blagaic AB, Zoricic I, Gjurasin M, Stupnisek M, Romc Z, Zarkovic K, Dzidic S, Seiwerth S, Sikiric P.** Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. Life Sci. 2011 Mar 14;88(11-12):535-42. doi: 10.1016/j.lfs.2011.01.015. Epub 2011 Feb 2.

#### Strani jezici i informatičke vještine

- Engleski jezik: aktivno
- Talijanski jezik: aktivno
- Njemački jezik: osnove
- Osnovne informatičke vještine