

# Učinak pentadekapeptida BPC 157 i losartana na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnih životinja

---

Ćorić-Martinović, Valentina

Doctoral thesis / Disertacija

2012

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:105:043384>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Ćorić-Martinović, Valentina (2012) *Učinak pentadekapeptida BPC 157 i losartana na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnih životinja.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1592>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Valentina Ćorić-Martinović**

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 i  
losartana na nefrotoksičnost  
epirubicina u eksperimentalnih  
životinja**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2012.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Valentina Ćorić-Martinović**

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 i  
losartana na nefrotoksičnost  
epirubicina u eksperimentalnih  
životinja**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2012.**

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

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Jadranka Šeparović Hanževački

Najiskrenije zahvaljujem Prof. dr. sc. Predragu Sikiriću na velikoj pomoći u  
organizaciji istraživanja, dr. Boži Radiću na pomoći oko statističke analize  
podataka i obitelji na strpljenju.

# SADRŽAJ

<b>Popis oznaka i kratica .....</b>	<b>1</b>
<b>1.0 Uvod.....</b>	<b>2</b>
1.1. Nefrotski sindrom.....	2
1.1.1. Uvod.....	2
1.1.2. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma izazvan antraciklinom	5
1.1.3. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma izazvan epirubicinom	6
1.2. BPC 157.....	7
1.2.1. Sastav i sinteza.....	7
1.2.2. BPC 157 u dosadašnjim eksperimentima.....	7
1.2.3. BPC 157 kao mogući medijator nefroprotekcije.....	8
1.3. Renin angiotenzin aldosteron sustav u oštećenju funkcije bubrega	9
1.3.1. Losartan.....	10
1.3.2. Dosadašnja istraživanja losartana u oštećenoj funkciji bubrega.....	11
1.4. Učinak BPC-a 157 i losartana na kroničnu srčanu dekompenzaciju izazvanu u štakora i miševa primjenom doksorubicina.....	12
<b>2.0 Hipoteza i cilj istraživanja.....</b>	<b>14</b>
2.1. Hipoteza.....	14
2.2. Cilj istraživanja.....	14
<b>3.0 Materijal i metode.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materijal.....	15
3.1.1. Eksperimentalne životinje.....	15
3.1.2. Ispitivani agensi.....	15
3.2. Metode (protokol istraživanja).....	16
3.2.1. Izazivanje nefrotskog sindroma u životinja.....	16
3.2.2. Protokol 1 (kotretman).....	16
3.2.2.1. Štakori (kotretman).....	16
3.2.2.2. Miševi (kotretman).....	16
3.2.3. Protokol 2 (posttretman).....	17
3.2.3.1. Štakori (posttretman).....	17
3.2.3.2. Miševi (posttretman).....	18
3.2.4. Prikupljanje uzoraka i analiza.....	18
3.2.5. Praćenje kliničkih pokazatelja.....	19
3.2.6. Patohistološka analiza organa.....	19
3.2.7. Statistička analiza.....	20
<b>4.0 Rezultati.....</b>	<b>21</b>
4.1. Klinički i biokemijski pokazatelji.....	21
4.1.1. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u štakora.....	21
4.1.1.1. Kotretman (štakori).....	21
4.1.1.2. Posttretman (štakori).....	30
4.1.2. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u miševa.....	40
4.1.2.1. Kotretman (miševi).....	40
4.1.2.2. Posttretman (miševi).....	49
4.2. Patohistološki nalazi.....	60
4.2.1. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u štakora.....	60
4.2.2. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u miševa.....	66

<b>5.0 Rasprava.....</b>	<b>67</b>
5.1. Pentadekapeptid BPC 157.....	68
5.2. Losartan.....	72
<b>6.0 Zaključci.....</b>	<b>74</b>
6.1. Učinak losartana na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša.....	74
6.2. Učinak BPC-a 157 na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša.....	75
6.3. Uspoređivanje učinaka losartana i BPC-a 157 na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša.....	76
<b>7.0. Sažetak.....</b>	<b>78</b>
<b>Summary.....</b>	<b>79</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>80</b>
<b>Životopis autora.....</b>	<b>88</b>

Popis oznaka i kratica

RAS - Renin angiotenzin aldosteron sustav

ACE - Enzim angiotenzin konvertaza

ANP - atrijski natriuretski peptid

AT - angiotenzin

ET - endotelin



# **1. UVOD**

## **1.1. NEFROTSKI SINDROM**

### **1.1.1. Uvod**

Nefrotski sindrom karakteriziraju albuminurija, hipoalbuminemija, hiperlipidemija i edemi koji su posljedica prekomjerne filtracije proteina plazme iz glomerula u mokraću. U pozadini prekomjerne filtracije proteina plazme poremećaj je selektivnih barijera glomerularnog kapilarnog zida za naboj i veličinu čestica. Taj poremećaj može nastati kao posljedica različitih procesa, uključujući imuno loške bolesti, toksične ozljede, metaboličke abnormalnosti te biokemijski i žilni poremećaj. Prema tome, nefrotski sindrom zajednički je nazivnik za različite procese koji mijenjaju propusnost kapilarnog zida glomerula (1). Proteinurija je osnovni znak nefrotskog stanja, a tešku proteinuriju često, ali ne uvijek, prati hipoalbuminemija. Prekomjerni gubici mokraćom, uz bubrežni katabolizam i neadekvatnu jetrenu sintezu albumina, pridonose sniženju albumina u plazmi. Posljedični pad onkotskog tlaka plazme vodi k poremećaju Starlingovih sila u perifernim kapilarama. Intravaskularna tekućina odlazi u intersticijsko tkivo (edem), osobito u područjima niskog tkivnog tlaka. Ti poremećaji smanjuju vensko punjenje cirkulacije, što potiče niz homeostatskih prilagodbi radi podizanja efektivnog volumena plazme. Tu se ubrajaju aktivacija renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava, povišeno izlučivanje vazopresina, stimulacija simpatičkog živčanog sustava i promjene u izlučivanju ili bubrežnom odgovoru na atrijski natriuretski peptid. Te i druge prilagodbe vode k bubrežnoj retenciji vode i natrija, ponajprije zbog obilne reapsorpcije u distalnim segmentima nefrona, stvarajući tvrdokorne edeme. Prema takvom tumačenju, bubrezi neadekvatno odgovaraju na poremećaje u efektivnom arterijskom volumenu, što ipak nije objašnjenje za retenciju soli i vode u nefrotskom sindromu.

Mjerenja plazmatskog volumena, renina i aldosterona te istraživanja pozadine bubrežne reapsorpcije soli i vode, pokazala su raznorodnost patofiziologije volumne homeostaze u nefrotskom sindromu (2). Neki pacijenti imaju povećan intravaskularni volumen tekućine i suprimiranu osovinu renin-aldosteron, posredovanu primarnom i o aldosteronu neovisnom retencijom soli i tekućine, što je slično patofiziologiji akutnog nefritisa. Ti pacijenti često imaju nešto snižen GF i strukturne lezije glomerula. Na drugom su kraju spektra bolesnici s

pravom hipovolemijom, hiperreninemijom i izdašnom, sekundarnom bubrežnom retencijom soli. U obje su skupine serumske razine albumina niske, volumen izvanstanične tekućine je povećan i obično su prisutni edemi. Prema očekivanju, opseg edema korelira s depresijom albumina u plazmi (i onkotskog tlaka). Ta povezanost ipak nije uska i vjerojatno odražava komponentu primarne bubrežne retencije natrija i vode u brojnih pacijenata. Snižen onkotski tlak plazme po svojoj prilici stimulira jetrenu sintezu lipoproteina pa hiperlipidemija često prati nefrotski sindrom. Lipoproteini niske gustoće i kolesterol najčešće su povišeni, ali kako onkotski tlak plazme i dalje pada, rastu i lipoproteini veoma niske gustoće te trigliceridi. Prekomjerni urinarni gubici proteinskih čimbenika lipoproteinske sinteze ili metabolizma mogu također pridonositi hiperlipidemičkom stanju. Ubrzavaju li te lipidne abnormalnosti aterosklerozu, ostaje sporno. Lipidna se tjelešca (masni cilindri, ovalna masna tjelešca) svakako nalaze u mokraći.

Osim albumina, važan je i gubitak ostalih proteina plazme. Pad TBG (globulina koji veže tiroksin) može uzrokovati abnormalnosti tireoidnih testova, uključujući nizak tiroksin i povišeno vezanje trijodtironina. Gubitak proteina koji veže kolekalciferol može voditi hipovitaminozi D i sekundarnoj hiperparatireozu te pridonositi čestoj hipokalcemiji i hipokalcemiji. Pretjerano mokraćno izlučivanje transferina može izazvati mikrocitnu, hipokromnu anemiju neosjetljivu na željezo, a pomanjkanje cinka i bakra nastaje zbog mokraćnog gubitka proteina koji vežu te metale. Hiperkoagulabilno stanje često ide s teškim nefrotskim sindromom, čemu pridonosi niz čimbenika, uključujući nedostatak antitrombina III (zbog mokraćnih gubitaka), sniženje razina ili aktivnosti proteina C ili proteina S, hiperfibrinogenemiju, oštećenje fibrinolize, povišenu agregaciju trombocita i hiperlipidemiju. Neki bolesnici razviju teški nedostatak IgG, dijelom zbog hiperkatabolizma i gubitka mokraćom.

Niskomolekularne komponente komplementa mogu se također gubiti mokraćom i utjecati na poremećaje u opsonizaciji bakterija. Različiti proteini o koje se vežu lijekovi (pretežno albumini) mogu biti sniženi, mijenjajući farmakokinetiku i toksičnost mnogih lijekova. Elektroforeza seruma otkriva, osim sniženih razina albumina, povišenje  $\alpha$  i  $\beta$  globulina (1-3).

Etiologija nefrotskog sindroma su primarne bolesti glomerula, a može nastati i u sklopu nekih drugih bolesti.

Primarne bolesti glomerula koje izazivaju nefrotski sindrom su:

- glomerulonefritis s minimalnim oštećenjima,
- mezangioproliferativni glomerulonefritis,
- fokalna i segmentalna glomeruloskleroza,
- membranski glomerulonefritis,
- membranoproliferativni glomerulonefritis (tip I, II i druge varijante),
- glomerulonefritis sa stvaranjem polumjeseca, fokalni i segmentalni proliferativni glomerulonefritis te fibrilarni i/ili imunotaktoidni glomerulonefritis (4).

Druge bolesti u sklopu kojih može nastati nefrotski sindrom su:

- infektivne - poststreptokokni glomerulonefritis, endokarditis i druge,
- neoplazme - Hodgkinova bolest, drugi limfomi, leukemije, karcinomi, melanom, Wilmsov tumor,
- sistemske - SLE, purpura Henoch-Schonlein, vaskulitis, Goodpastureova bolest, dermatomiozitis, herpetiformni dermatitis, amiloidoza, sarkoidoza, Sjogrenov sindrom, reumatoidni artritis, miješana bolest veziva,
- heredofamilijarne - šećerna bolest, Alportov sindrom, drepanocitoza, Fabryjeva bolest i druge
- učinak lijekova - organsko zlato, organska, anorganska i elementarna živa, penicilamin, ulični heroin, nesteroidni antireumatici, probenecid, kaptopril i drugi,
- ostale bolesti - preeklampsija, tiroiditis, miksedem, maligna i renovaskularna hipertenzija, kronični intersticijski nefritis uz vezikoureteralni refluks, kronično odbacivanje presatka, ubodi pčela (1-2).

U liječenju nefrotskog sindroma u bolesti minimalnih promjena, mezangijskog proliferativnog glomerulonefritisa, fokalne i segmentalne glomeruloskleroze s hijalinozom, membranskog i membranoproliferativnog glomerulonefritisa koriste se glukokortikoidi te u nekim oblicima i citotoksični lijekovi. Edemi u nefrotskom sindromu liječe se oprezno i konzervativno, a stav je kliničara da kolesterol treba snižavati medikamentno. Tromboemboličke komplikacije predstavljaju jasnu indikaciju za dugotrajnu oralnu antikoagulaciju. U pogledu sadržaja bjelancevina u prehrani bolesnika s nefrotskim sindromom, stajališta se razilaze, no nadoknada transportnih proteina nije izvediva. Pri hipovitaminozi korisno je dodavanje vitamina D. U rijetkim okolnostima teške proteinske malnutricije i drugih komplikacija masivne proteinurije, dolazi u obzir medikamentna ili kirurška nefrektomija (1).

### **1.1.2. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma izazvan antraciklinom**

Adriamicin (doksorubicin) je antraciklinski antibiotik izoliran iz metaboličkih produkata *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (5). Antitumorski učinak daunomicina, supstancije otkrivene ranih 60-ih godina prošlog stoljeća (6) čiji je 14-hidroksil derivat adriamicin, potaknuo je niz istraživanja na utvrđivanju uloge adriamicina u terapiji karcinoma (7, 8). Antraciklini se danas primjenjuju u velikoj mjeri kao antineoplastici zbog širokog spektra antitumorske aktivnosti.

Ne postoji jasno definiran mehanizam djelovanja doksorubicina, što vrijedi i za druge antracikline, a neki od načina djelovanja su:

- a) ubacivanje između dvostrukih lanaca DNK, što pridonosi inhibiciji njegove sinteze,
  - b) smanjenje enzima reduktaze vezane na membranu, što dovodi do stvaranja brojnih slobodnih radikala koji mogu biti odgovorni za antitumorsku aktivnost i kardiotsičnost,
  - c) izravno djelovanje na staničnu membranu i mijenjanje njezine funkcije.
- U jetrima se doksorubicin reducira u adriamicinol koji je također aktivan (9).

Karakteristika koju adriamicin dijeli s drugim antraciklinima je sposobnost da izazove teški nefrotski sindrom u zečeva i štakora (10-13). Nakon jednokratne primjene adriamicina, u štakora se razvija nefrotski sindrom s bubrežnim lezijama, sličnim onima kod bolesti minimalnih promjena u čovjeka (14, 15). Teška proteinurija započinje nekoliko dana nakon injekcije i traje mjesecima (16).

Mehanizam nastanka oštećenja glomerula još je nejasan, iako je nedavno objavljeno da bi slobodni radikali mogli imati glavnu ulogu u akutnoj bubrežnoj toksičnosti adriamicina (17). Proteinurija je rezultat oštećenja u veličini glomerularnog selektivnog filtra i može biti vezana uz stvaranje tromboksana A<sub>2</sub> u glomerulima. Rane funkcionalne promjene uključuju smanjenu razinu glomerularne filtracije pojedinog nefrona i smanjen ultrafiltracijski koeficijent, unatoč povećanom ultrafiltracijskom pritisku (18, 19). Hiperlipidemija ima veliku ulogu u progresiji bubrežnog oštećenja izazvanog adriamicinom (20, 21). Uz proteinuriju i hiperlipidemiju, nakon primjene adriamicina u štakora, uočavamo i poliuriju, polidipsiju, povećane plazmatske vrijednosti uree i kreatinina te smanjene vrijednosti endogenog klirensa kreatinina. Laboratorijske vrijednosti i klinički znaci u dobroj su korelaciji s histopatološkim

lezijama bubrega, što pokazuje da je adriamicinom izazvan nefrotski sindrom (adriamicin u dozi od 3-7 mg/kg) dobar model progresivnog, kroničnog bubrežnog oštećenja (22-26). Glomerularno oštećenje uzrokovano adriamicinom vezano je uz stimulatívni učinak na glomerularni metabolizam koji je više naznačen kod jukstaglomerularnih nego kortikalnih glomerula, što uzrokuje povećanu osjetljivost jukstaglomerularnih glomerula na adriamicin. Budući da jukstaglomerularne stanice luče renin, značajna je uloga renin angiotenzinskog sustava u daljnjoj progresiji bubrežnog oštećenja uzrokovano antraciklinima (27).

Eksperimentalni model nefrotskog sindroma izazvan adriamicinom primjenjivao se u radovima u kojima je ispitivan učinak kaptoprila (28) i alpha tocopherola (25). U tim su radovima (25, 28) za procjenu učinkovitosti u liječenju nefrotskog sindroma korištene vrijednosti uree, kreatinina, kolesterola, triglicerida, klirensa endogenog kreatinina, 24h proteinurije, diureze, unosa vode, tjelesna težina i patohistološka slika bubrega. U našem smo se radu također koristili tim parametrima za određivanje težine nefrotskog sindroma.

### **1.1.3. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma izazvan epirubicinom**

Epirubicin (4-epi-doksorubicin) je analog doksorubicina sa sličnim antitumorskim kliničkim spektrom, ali manje toksičan. Zbog toga se sve više primjenjuje u kliničkoj praksi, istiskujući postupno doksorubicin. Mehanizam djelovanja gotovo je istovjetan doksorubicinskom. Slično adriamicinolu, stvara se epirubicinol koji također pokazuje antitumorsku aktivnost. Kardiotoksičnost je manje izražena na doksorubicin. Oštećenje srca pri ukupnim dozama manjim od 1000 mg/m<sup>2</sup> nastaje rijetko, dok su ostale nuspojave gotovo istovjetne onima doksorubicina (9). U štakora su nakon injekcije epirubicina, primjenom serumskih biokemijskih parametara, nađena i bubrežna i jetrena funkcionalna oštećenja. Uspoređujući toksičnost različitih antitumorskih lijekova u štakora, također primjenom serumskih biokemijskih parametara, nađen je sljedeći odnos: metotreksat < cisplatin < epirubicin < klorambucil (29). U radu Dardira i koautora ispitivan je učinak ICRF-187 na kardijalnu i renalnu toksičnost epirubicina u spontano hipertenzivnih štakora. Patohistološka analiza bubrega tih štakora pokazala je atrofiju i dilataciju tubula i glomerularnu vakuolizaciju sličnu onoj nakon davanja doksorubicina u sličnim eksperimentalnim uvjetima. Ta sličnost govori u prilog korištenju

epirubicina za izazivanja eksperimentalnog modela nefrotskog sindroma (30).

## **1.2. BPC 157**

### **1.2.1. Sastav i sinteza**

BPC 157 je sintetski 15-aminokiselinski peptid sa slijedom aminokiselina: Gly- Glu- Pro- Pro- Pro- Gly- Lys- Pro- Ala- Asp- Asp- Ala- Gly- Leu- Val- (molekularna težina 1419 Daltona), koji se koristio u nizu dosadašnjih istraživanja na različitim eksperimentalnim modelima.

Sinteza pentadekapeptida provodi se stupnjevitom kondenzacijom pomoću Fmoc zaštićenih aminokiselina. Kondenzacija započinje prvom aminokiselinom, valinom, vezanom uz polimerni nosač (benzildrilaminorezin). Kao vezivajući reagens koristi se diisopropilkarodimid. Svakim stupnjem kondenzacije jedna protektivna Fmoc grupa zamijeni se piperidinom, a jedna se aminokiselina nadoveže. Isti postupak primjenjuje se za svaku sljedeću aminokiselinu dok se sinteza ne završi. Razdvajanje se obavlja pomoću trifluorooctene kiseline/trifluormetansulfonske kiseline/anizola u omjeru 2:17:52. Sirova mješavina pentadekapeptida pročisti se u HPLC stupcu 5 mm i.d., duljine 150 mm, silicaRP-18, s gradijentom elucije u sustavu otapanja: 0,1 trifluorooctena kiselina u vodi/acetone nitrilu. U svim se pokusima koristi pentadekapeptid 99-postotne čistoće (31).

### **1.2.2. BPC 157 u dosadašnjim eksperimentima**

Kao gastrički pentadekapeptid, BPC 157 pokazuje povoljan učinak kod gastrointestinalnih lezija (32-35). Pomaže u cijeljenju različitih rana (32-39). Ima učinak i u angiogenezi (38) i modulira NO-sintezu (34). Smanjuje trajanje aritmija tijekom hipoksije i reoksigenacije u izoliranih srca zamoraca (40). Sprječava l-NAME porast krvnog tlaka i smanjuje već postojeću l-NAME hipertenziju jednako dobro kao i pad krvnog tlaka izazvan primjenom - arginina u štakora (41). Slično sprječava lezije različitih organa, izazvanim s l-NAME, u ptica, za razliku od l-arginina (42, 43). Promatrajući njegovu aktivnost tijekom procesa cijeljenja, gastrički pentadekapeptid BPC 157 dostiže svrhu tretmana time što započinje i održava taj proces. Posebno je značajno što se BPC 157, zbog visoke stabilnosti (32-38), odnosno zato što nema degradacije u ljudskom želučanom soku ni nakon 24 sata, može bez prepreke (32-38) koristiti

intragastrički ili peroralno, primijenjen u vodi za piće. Toksikološka istraživanja nisu pokazala znakove toksičnosti u usporedbi s dozama u kojima se dobiva pozitivan učinak, a letalna doza nije se uspjela postići unatoč aplikaciji doza kao što su 100 mg/kg (44).

### **1.2.3. BPC 157 kao mogući medijator nefroprotekcije**

Svojstva BPC-a 157 su ispitivanja i na modelu unilateralne nefrektomije u eksperimentalnih životinja. U njegov povoljan učinak na bubrege jednako su uključeni i morfološki i funkcionalni aspekti. Protektivni učinak tretmana BPC-om 157 na tubularnom epitelu očituje se u očuvanju diureze i dozno-ovisnom nedostatku oligurije, za razliku od podataka dobivenih u kontrolnih životinja nakon unilateralne nefrektomije. Zanimljivo je da je težina preostalog bubrega u životinja podvrgnutih unilateralnoj nefrektomiji, ali tretiranih BPC-om 157, znatno manja nego u odgovarajućoj kontroli, što bitno ukazuje na bolju funkciju preostalog bubrega. Ti su podaci u korelaciji s učincima zapaženim na hipertenzivnim štakorima sa stenozom renalne arterije i unilateralnom nefrektomijom (45). S obzirom na pokazani nefroprotektivni učinak BPC-a 157 u eksperimentalnom modelu unilateralne nefrektomije, očekuje se sličan učinak i u eksperimentalnom modelu nefrotoksičnosti.

### **1.3. RENIN ANGIOTENZIN ALDOSTERON SUSTAV U OŠTEĆENJU FUNKCIJE BUBREGA**

Značajnu ulogu u progresiji bubrežnih bolesti ima renin-angiotenzinski sustav. Renin luče jukstaglomerularne stanice i on započinje aktivaciju renin-angiotenzinskog sustava - RAS. Angiotenzinogen, stvoren u jetrima, pretvara se pomoću renina u angiotenzin I. Enzim konvertaza angiotenzina I iz endotela kapilara pluća pretvara angiotenzin I u angiotenzin II, koji se veže uza stanice nadbubrežne žlijezde i stimulira stvaranje i oslobađanje aldosterona. Osim konvertaze angiotenzina I (ACE), i drugi enzimi dovode do stvaranja angiotenzina II iz angiotenzina I (serin protease chymase). Svoj učinak angiotenzin II ostvaruje preko AT1 i AT 2 receptora. Angiotenzin II glavni je medijator hemodinamskih, a i brojnih nehemodinamskih učinaka koji ubrzavaju smanjenje funkcije oštećenog bubrega. Nakon početnog oštećenja bubrega, nastupaju hemodinamski mehanizmi koji dovode do glomerularne hipertenzije. Ti mehanizmi uključuju oslobađanje prostaglandina s vazodilatacijom aferentne arteriole glomerula, retenciju Na koja vodi u arterijsku hipertenziju i oslobađanje angiotenzina II s vazokonstrikcijom eferentne arteriole. Glomerularna hipertenzija potpomaže nastanak proteinurije i fokalne segmentalne glomeruloskleroze te progresivno smanjenje glomerularne filtracije kao zatvoreni krug (46).

Angiotenzin II povećava propusnost glomerula za proteine i nakupljanje proteina u podocitima preko:

- promjene strukture stanica (disfunkcijom bazalne membrane i permselektivnosti)
- aktivacije gena TGF- $\beta$  (aktivacija mezangijskih stanica i glomeruloskleroza)
- izmjene fenotipa (odvajanje podocita, nestanak nožica podocita i disfunkcija permselektivnosti) (47).



### **1.3.1. Losartan**

Losartan je poznati predstavnik grupe antihipertenziva antagonista receptora AT<sub>1</sub> za angiotenzin II. Kemijska supstancija je 2-butil-4-kloro-1-(p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)-benzil-imidazol 5-metanol monokalijeva sol i stoga je dobro topljiv u vodi.

Losartan i njegov prvi aktivni metabolit blokiraju vazokonstriktorni učinak angiotenzina II i učinak na sekreciju aldosterona selektivnom blokadom vezivanja angiotenzina II na angiotenzin II AT<sub>1</sub> receptor koji se nalazi u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila i u nadbubrežnoj žlijezdi. Sposobnost vezanja losartana i njegova metabolita 1000 je puta veća za angiotenzin II AT<sub>1</sub> receptor nego za AT<sub>2</sub> receptor.

Losartan se primjenjuje peroralno, dobro se apsorbira, pri prvom prolasku kroz jetra prolazi konverziju u aktivni metabolit s karboksilnom kiselinom preko kojega uglavnom ostvaruje svoje djelovanje. Poluživot u plazmi iznosi od 6 do 9 sati. Bioraspoloživost mu je oko 33%, metabolit postiže vršnu koncentraciju za 3 do 4 sata. Losartan i njegov metabolit vezani su uz proteine plazme u visokom postotku (oko 98%). Hrana usporava apsorpciju losartana. Izlučuje se podjednako i urinom i fecesom. Uobičajena početna doza u ljudi je 50 mg jednom dnevno, a može se povećati i do 200 mg/dan (48-53).

### **1.3.2. Dosadašnja istraživanja losartana u oštećenoj funkciji bubrega**

Angiotenzin II pridonosi pogresivnoj prirodi mnogih bubrežnih bolesti te tretman s ACE inhibitorima održava integritet tubulointersticijalnog prostora u ljudskih i eksperimentalnih bubrežnih bolesti. Učinak ACE inhibitora na razinu prostaglandina i bradikina, koji imaju duboke učinke na bubrežnu funkciju (54), ometa interpretaciju uloge renin-angiotenzinskog sustava u patogenezi lijekom izazvanog bubrežnog oštećenja. Losartan ne povećava razinu bradikina i dokazana je njegova uloga u renin-angiotenzinskom sustavu (RAS) u zdravih i bolesnih (55, 56). Istraživanja su pokazala da losartan antagonizira sve poznate učinke angiotenzina II u bubrezima bez agonističkih aktivnosti (57-60). Studije na ljudima pokazale su koristan učinak na dijabetičku nefropatiju (61) i kardiovaskularni morbiditet i mortalitet u LIFE studiji (62). Monoterapija losartanom 50-100 mg dnevno ili u kombinaciji s drugim antihipertenzivnim lijekovima učinkovita je i dobro tolerirana u liječenju hipertenzije u bolesnika s bubrežnim zatajenjem u različitim

stupnjevima (63). Učinak na smanjenje albuminurije neovisan je o smanjenju arterijskog tlaka (64). Losartan je pokazao dobar učinak u modelu ciklosporinske nefropatije (65-68). Inhibicija RAS-a losartanom može biti korisna u oporavku bubrežne funkcije pri cisplatinskoj nefrotoksičnosti, a isprepletanje vazokonstriktora i vazodilatatora može utjecati ne samo na vaskularni tonus i razinu glomerularne filtracije nego i na rast i obnovu stanica. Pri modelu cisplatinke nefrotoksičnosti na štakorima, akutna blokada AII receptora losartanom kao pretretman ne utječe na težinu stanja, dok kronična blokada AII receptora (losartanom u dozi 10 mg/kg ip.) smanjuje razinu ureje i kreatinina te ubrzava povećanje tjelesne težine tretiranih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom (69). Sva su spomenuta istraživanja pokazala povoljan učinak losartana u bubrežnom oštećenju blokadom angiotenzin II AT1 receptora kojim se smanjuje glomerularna hipertenzija i proteinurija na razini podocita i eferentne arteriole. Stoga smo i mi u ovom radu izabrali losartan kao djelujuću supstanciju.

## **1.4. UČINAK BPC-a 157 I LOSARTANA NA KRONIČNU SRČANU DEKOMPENZACIJU IZAZVANU U ŠTAKORA I MIŠEVA PRIMJENOM DOKSORUBICINA**

Losartan je ispitivan pri doksorubicinskoj kardiomiopatiji u štakora i miševa. Rezultati su pokazali umanjeno povećanje big endotelina-1 u tretiranih životinja (67). Istraživanje učinka BPC-a 157 u doksorubicinskoj kardiotoksičnosti počivalo je na značenju endotelina kao potentnog vazokonstriktora i promotora staničnog rasta. Većina kardiovaskularnih bolesti, kao što su arterijska hipertenzija, ateroskleroza, restenoza, kongestivno srčano zatajenje, idiopatska kardiomiopatija, plućna hipertenzija i bubrežno zatajenje, povezana je lokalnom aktivacijom endotelinskog sustava (71-73). Endotelin-1 značajno je uključen u funkcionalne i strukturalne promjene kardiovaskularnog sustava (74-82) i njegova veza s disfunkcijom NO-sustava dobro je prepoznata i istražena (82-85).

BPC 157 inducira i modulira oslobađanje NO iz želučanih rezova *in vitro*, efekt rezistentan na blokadu s L-NAME (41). Iako se NO oslobođen iz endotela smatra značajnom odrednicom vaskularnog tonusa i aktivnosti trombocita, modulacija srčanog metabolizma preko NO mogla bi imati jednu od najznačajnijih uloga u regulaciji tkivnog metabolizma. Pad u stvaranju NO uključen je u patofiziološku modifikaciju koja se javlja pri srčanom zatajenju, bubrežnom zatajenju zbog aktivacije angiotenzin I-receptora u sklopu renin-angiotenzinskog sustava, šećernoj bolesti te stanjima povezanim s oštećenim srčanim metabolizmom koja vode razvoju bolesti. S druge strane, nekoliko skupina lijekova (npr. ACE-inhibitori, amlodipin, statini i dr.) mogu obnoviti i održati endogeno stvaranje NO preko endotelinih stanica, a taj mehanizam može objasniti dio njihova povoljnog terapijskog učinka (78).

Oslobađanje NO u kroničnom srčanom zatajenju i modelima hipertenzije pod utjecajem losartana i drugih AT1 blokatora te ACE inhibitora, ispitano je i dobro dokumentirano u različitim istraživanjima (75, 84). Primjenom losartana koncentracija big endotelina-1 porasla je u usporedbi s početnim vrijednostima, ali je ostala značajno niža nego u neliječenoj kontroli u štakora i miševa pri modelu doksorubicinske kardiotoksičnosti.

Doksorubicin s izraženom kardiotoksičnošću može na različite načine oštetiti stvaranje NO *in vitro* (86, 87). Prema tome, smatrajući visoku vrijednost ET-1 kao implikaciju poremećaja NO-sustava koja se zbiva u doksorubicinom induciranom kroničnom srčanom zatajenju,

hipoteza je da BPC 157 modulira stvaranje ET-1 u štakora s doksorubicinskom kardiomiopatijom. Konzistentna zaštita endotela i poticanje angiogeneze u cijeljenju koju BPC 157 pokazuje u ovom radu, ukazuje da učinak BPC-a 157 u kroničnom srčanom zatajenju može biti u svezi s NO-sustavom. Te spoznaje jasno sugeriraju njegovu moguću upotrebu u budućoj terapiji kroničnog srčanog zatajenja (70).

## **2.0 HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Hipoteza**

S obzirom na opisane povoljne učinke losartana i pentadekapeptida BPC 157 u modelu kroničnog srčanog zatajenja (70), pretpostavljam da će u modelu bubrežnog oštećenja s posljedičnim nefrotskim sindromom BPC 157 i losartan u kotretmanu i posttretmanu također pokazati povoljan učinak na:

1. kliničke znakove nefrotskog sindroma
2. patološke laboratorijske parametre u nefrotskom sindromu
3. patohistološke promjene u bubrezima

### **2.2. Cilj istraživanja**

1. Ispitivanje učinka losartana na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša.

U ovom će se radu ispitati je li učinak losartana ovisan o dozi u prevenciji i liječenju već nastalog oštećenja u modelu epirubicinske nefrotoksičnosti ako se uzimu u obzir:

- a) klinički parametri - edemi, tjelesna težina, unos vode i diureza
- b) laboratorijski parametri - urea, kreatinin, klirens kreatinina, kolesterol, trigliceridi (u serumu) i proteinurija
- c) morfološki izgled patohistološkog nalaza bubrega

2. Ispitivanje učinka BPC-a 157 na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša.

U ovom će se radu ispitati je li učinak BPC-a 157 ovisan o dozi u prevenciji i liječenju već nastalog oštećenja u modelu epirubicinske nefrotoksičnosti, ako se uzimu u obzir:

- a) klinički parametri - edemi, tjelesna težina, unos vode i diureza
- b) laboratorijski parametri - urea, kreatinin, klirens kreatinina, kolesterol, trigliceridi (u serumu) i proteinurija
- c) morfološki izgled patohistološkog nalaza bubrega

3. Uspoređivanje učinaka losartana i BPC-a 157 na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša.

## **3.0 MATERIJAL I METODE**

### **3.1. MATERIJAL**

#### **3.1.1. Eksperimentalne životinje**

U pokus su uključeni:

- Wistar albino štakori
- albino miševi NMRI soja

Za pokus su korišteni štakori vrste Wistar albino, samo muškog spola, ukupno 78 životinja. Raspon težine korištenih štakora je od 200 do 250 grama. Smješteni su po 6 životinja u kavezu, uza slobodan pristup hrani i vodi, u kontroliranim laboratorijskim uvjetima temperature i vlažnosti zraka te 12-satnim ciklusima svjetla i tame. Za pokus kotretmana korišteno je 36, a 42 životinje korištene su za pokus posttretmana.

Za pokus su korišteni albino miševi NMRI soja iz vlastitog uzgoja, samo muškog spola, ukupno 150 životinja. Raspon težine korištenih miševa je od 20 do 25 grama. Smješteni su po 6 u kaveze, uza slobodan pristup hrani i vodi, u kontroliranim laboratorijskim uvjetima temperature i vlažnosti zraka te 12-satnim ciklusima svjetla i tame. U pokusu kotretmana korištene su 72, a 78 životinja korišteno je u pokusu posttretmana.

#### **3.1.2. Ispitivani agensi**

U pokusu za izazivanje nefrotskog sindroma u eksperimentalnih životinja korišten je epirubicin u obliku lioampula od 50 mg, proizvođača FARMITALIA.

Za tretiranje je upotrijebljena vodena otopina lijekova:

1. losartan kalija iz pripravka Cozaar, tableta od 50 mg, proizvođača Merck&CO., INC., Whitehouse Station, N.J., USA
2. pentadekapeptida BPC 157, 99% čistoće, sintetiziranog stupnjevitoj kondenzacijom pomoću Fmoc zaštićenih aminokiselina (Sikirić i sur., Patent EP 0572688)

## **3.2. METODE (protokol istraživanja)**

### **3.2.1. Izazivanje nefrotskog sindroma u životinja**

Nefrotski sindrom u štakora i miševa izazvan je primjenom epirubicina u jednoj dozi od 5 mg/kg intraperitonealno (29). Potom su štakori i miševi randomizirani u dva protokola (kotretmanski i posttretmanski), prema opisanim metodama (29, 70).

### **3.2.2. Protokol 1 (kotretman)**

U kotretmanskom protokolu tretman eksperimentalnih životinja započet je neposredno nakon primjene epirubicina.

#### **3.2.2.1. Štakori (kotretman)**

Štakori su neposredno nakon primjene epirubicina randomizirani u 6 tretiranih skupina. U svakoj je skupini bilo po 6 štakora. Štakori su po skupinama tretirani intragastrički 1x dnevno u isto vrijeme i to:

1. kontrola - destiliranom vodom u dozi 5,0 ml/kg
2. losartan 1 mg/kg - losartanom u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi od 1 mg/kg (0,2 mg/ml),
3. losartan 10 mg/kg - losartanom u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi od 10 mg/kg (2 mg/ml),
4. BPC 157 10 pg/kg - BPC 157 u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi 10 pg/kg (2 pg/ml),
5. BPC 157 10 ng/kg - BPC 157 u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi 10 ng/kg (2 ng/ml) i
6. BPC 157 10 µg/kg - BPC 157 u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi 10 µg/kg (2 µg/ml)

Tretman je započeo odmah nakon randomizacije i trajao je 4 tjedna, poslije čega su štakori žrtvovani uz uzimanje prema protokolu određenih uzoraka. Nakon dva tjedna uzeti su uzorci za biokemijske analize.

#### **3.2.2.2. Miševi (kotretman)**

Miševi su neposredno nakon primjene epirubicina randomizirani u 12 tretiranih skupina. U svakoj je skupini bilo po 6 miševa. Prvih 6 skupina žrtvovano je nakon 2 tjedna tretmana zbog dobivanja količinski primjerenog krvnog uzorka za biokemijske analize seruma pri žrtvovanju,

a skupine od 7 do 12 žrtvovane su nakon 4 tjedna tretmana. Miševi su po skupinama tretirani u vodi za piće (u volumenu 2 ml destilirane vode/miš/dan) i to dnevno:

1. kontrola - destiliranom vodom bez dodataka
2. losartan 1 mg/kg - losartanom u dozi od 1 mg/kg (0,01 mg/ml),
3. losartan 10 mg/kg - losartanom u dozi od 10 mg/kg (0,1 mg/ml),
4. BPC 157 10 pg/kg – BPC-om 157 u dozi 10 pg/kg (2 pg/ml)
5. BPC 157 10 ng/kg – BPC-om 157 u dozi 10 ng/ml (2 ng/ml)
6. BPC 157 10 µg/kg - BPC-om 157 u dozi 10 µg/ml (2 µg/ml)
7. kontrola - destiliranom vodom bez dodataka
8. losartan 1 mg/kg - losartanom u dozi od 1 mg/kg (0,01 mg/ml),
9. losartan 10 mg/kg - losartanom u dozi od 10 mg/kg (0,1 mg/ml),
10. BPC 157 10 pg/kg – BPC-om 157 u dozi 10 pg/kg (2 pg/ml)
11. BPC 157 10 ng/kg – BPC-om 157 u dozi 10 ng/ml (2 ng/ml)
12. BPC 157 10 µg/kg - BPC-om 157 u dozi 10 µg/ml (2 µg/ml)

### **3.2.3. Protokol 2 (posttretman)**

U posttretmanskome protokolu tretman eksperimentalnih životinja započet je sedam dana nakon primjene epirubicina (8. dan protokola).

#### **3.2.3.1. Štakori (posttretman)**

Štakori su u posttretmanskome protokolu randomizirani u sedam skupina neposredno nakon primjene epirubicina. U svakoj je skupini bilo po 6 štakora. Prvih 7 dana prema protokolu štakori nisu tretirani.

1. Prva kontrola (ta je skupina nazvana prva kontrola kako bi se razlikovala od kontrolne tretirane) žrtvovana je 7 dana nakon primjene epirubicina uz uzimanje uzoraka krvi i urina.

Skupine od 2 do 7 tretirane su 3 tjedna i nakon toga žrtvovane. Nakon jednog tjedna tretmana uzeti su uzorci za biokemijske analize. Te su skupine tretirane intragastrički 1x dnevno u isto vrijeme i to:

2. kontrola - destiliranom vodom u dozi 5,0 ml/kg
3. losartan 1 mg/kg - losartanom u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi od 1 mg/kg (0,2 mg/ml),
4. losartan 10 mg/kg - losartanom u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi od 10 mg/kg (2 mg/ml),
5. BPC 157 10 pg/kg - BPC-om 157 u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi 10 pg/kg (2 pg/ml),
6. BPC 157 10 ng/kg – BPC-om 157 u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi 10 ng/kg (2 ng/ml) i



7. BPC 157 10 µg/kg – BPC-om 157 u volumenu destilirane vode od 5,0 ml/kg u dozi 10 µg/kg (2 µg/ml)

### **3.2.3.2. Miševi (posttretman)**

Miševi su randomizirani u 13 skupina neposredno nakon primjene epirubicina. U svakoj je skupini bilo po 6 miševa. Prvih 7 dana prema protokolu miševi nisu tretirani.

1. Prva kontrola (ta je skupina nazvana prva kontrola kako bi se razlikovala od kontrolne tretirane) žrtvovana je 7 dana nakon primjene epirubicina, uz uzimanje uzoraka krvi i urina.

Skupine od 2 do 7 žrtvovane su nakon jednog tjedna tretmana zbog dobivanja količinski primjerenog krvnog uzorka za biokemijske analize seruma pri žrtvovanju, a skupine od 8 do 13 žrtvovane su nakon 3 tjedna tretmana. Miševi su po skupinama tretirani u vodi za piće (u volumenu 2 ml destilirane vode/miš/dan) i to dnevno:

2. kontrola - destiliranom vodom bez dodataka
3. losartan 1 mg/kg - losartanom u dozi od 1 mg/kg (0,01 mg/ml),
4. losartan 10 mg/kg - losartanom u dozi od 10 mg/kg (0,1 mg/ml),
5. BPC 157 10 pg/kg - BPC-om 157 u dozi 10 pg/kg (2 pg/ml)
6. BPC 157 10 ng/kg - BPC-om 157 u dozi 10 ng/ml (2 ng/ml)
7. BPC 157 10 µg/kg - BPC-om 157 u dozi 10 µg/ml (2 µg/ml)
8. kontrola - destiliranom vodom bez dodataka
9. losartan 1 mg/kg - losartanom u dozi od 1 mg/kg (0,01 mg/ml),
10. losartan 10 mg/kg - losartanom u dozi od 10 mg/kg (0,1 mg/ml),
11. BPC 157 10 pg/kg – BPC-om 157 u dozi 10 pg/kg (2 pg/ml)
12. BPC 157 10 ng/kg – BPC-om 157 u dozi 10 ng/ml (2 ng/ml)
13. BPC 157 10 µg/kg - BPC-om 157 u dozi 10 µg/ml (2 µg/ml)

### **3.2.4. Prikupljanje uzoraka i analiza**

Za praćenje unosa vode te prikupljanje 24-satnog urina, potrebnih za određivanje endogenog klirensa kreatinina i proteinurije, u određenim danima protokola korišteni su metabolički kavez (28).

Životinje su boravile u metaboličkim kavezima sljedeće dane protokola:

- 7. dan od primjene epirubicina prva kontrola posttretmana štakora i miševa
- 14. dan od primjene epirubicina skupine od 1 do 6 kotretmana i od 2 do 7 posttretmana štakora i miševa

- 28. dan od primjene epirubicina - štakori - skupine od 1 do 6 kotretmana i od 2 do 7 posttretmana te miševi skupine od 7 do 12 kotretmana i od 8 do 13 posttretmana.

Minimum od 12 sati prilagodbe na metabolički kavez primijenjen je prije svakog 24-satnog razdoblja tijekom kojega smo prikupljali urin i pratili unos vode. Nakon 24 sata boravka eksperimentalne životinje u metaboličkom kavezu izmjerili smo količinu prikupljenog urina i unesene vode, a prikupljeni urin poslan je na biokemijsku analizu.

Krvni su uzorci uzimani otvorenim pristupom u epruvete neposredno nakon izlaska iz metaboličkog kaveza:

- u štakora nakon 14 dana izazivanjem manje posjekline na jeziku pomoću skalpela, a nakon 28 dana pri žrtvovanju

- u miševa nakon 14 i 28 dana pri žrtvovanju jer nije moguće dobiti količinski primjeren uzorak krvi bez žrtvovanja.

Iz krvnih uzoraka dobiven je serum u kojemu je određena koncentracija uree, kreatinina, kolesterola i triglicerida, a izračunat je endogeni klirens kreatinina po kilogramu tjelesne težine. U 24-satnom urinu, prikupljenom u metaboličkom kavezu, određene su vrijednosti kreatinina u  $\mu\text{mol/l}$ , pomoću čega smo izračunali 24-satne klirens kreatinina u  $\text{ml/min/kg}$ . U istim uzorcima urina je određena i 24-satna proteinurija u miligramima koja je korigirana u miligramima preračunatim vrijednostima kreatinina formulom  $\text{protein/kreatinin}$ . To je učinjeno zbog male količine urina, a prema literaturnim podacima (25-30).

### **3.2.5. Praćenje kliničkih pokazatelja**

Pratili smo težinu životinja i stupanj težine edema.

Vaganje životinja bilo je redovito i svakodnevno zbog prilagođavanja doze lijekova, a vrijednostima izmjerenim 14. i 28. dana nakon izlaska iz metaboličkog kaveza koristili smo se za daljnju statističku analizu podataka.

Težinu edema ocjenjivali smo promatranjem životinja i bilježili 14. i 28. dana semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa.

### **3.2.6. Patohistološka analiza organa**

Životinje su žrtvovane cervikalnom sekcijom. Nakon žrtvovanja uzimani su sljedeći organi: bubrezi, jetra, slezena, srce i pluća. Svi organi pažljivo su izvagani na laboratorijskoj vagi Sartorius. Svaki je organ odmah nakon žrtvovanja životinje izdvojen, izvagan i fiksiran. Nakon vaganja posebno su uzimani bubrezi za daljnju analizu. Bubrezi su fiksirani u 10-postotnom formalinu i uklopljeni u parafin. Iz parafinskih blokova rezani su rezovi debljine 3-4 mikrometra i bojani hemalaun eozinom za patohistološku analizu svjetlosnim mikroskopom (14 i 17). Svi su rezovi pregledani bez prethodne informacije o tretmanu žrtvovane životinje. Stupanj bubrežnog oštećenja procijenjen je semikvantitativno, primjenom skale od 0 do 3: stupanj 0 - bez histoloških abnormalnosti, stupanj 1 - blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela, stupanj 2 - degenerativne promjene tubularnog epitela uz početnu dilataciju tubula i stupanj 3 - fokalna nekroza epitelnih stanica s dilatiranim tubulima.

### **3.2.7. Statistička analiza**

Brojevni su podaci obrađeni pomoću PC-sofverske podrške Excel 2000 te su potom statistički obrađeni programom za medicinsku statistiku. U statističkoj obradi koristit će se Kolmogorov-Smirnoff test za procjenu distribucije podataka. U slučaju normalne distribucije, bit će primijenjen one-way ANOVA test s adekvatnim post hoc testom, a u slučaju nenormalne distribucije, primijenit će se Kruskal-Wallis test s adekvatnim post hoc testom. Za usporedbu frekvencijske razlike među grupama koristit će se Chi kvadrat test, odnosno Fischer exact test. Za statistički značajnu razliku uzimao se  $p < 0,05$ .

## **4.0 REZULTATI**

### **4.1. KLINIČKI I BIOKEMIJSKI POKAZATELJI**

Sedam dana nakon aplikacije epirubicina, kontrolne životinje (bez tretmana) imale su znakove nefrotskog sindroma sa specifičnim razlikama između vrsta eksperimentalnih životinja. Ti su znaci dalje napredovali 14. i 28. dan.

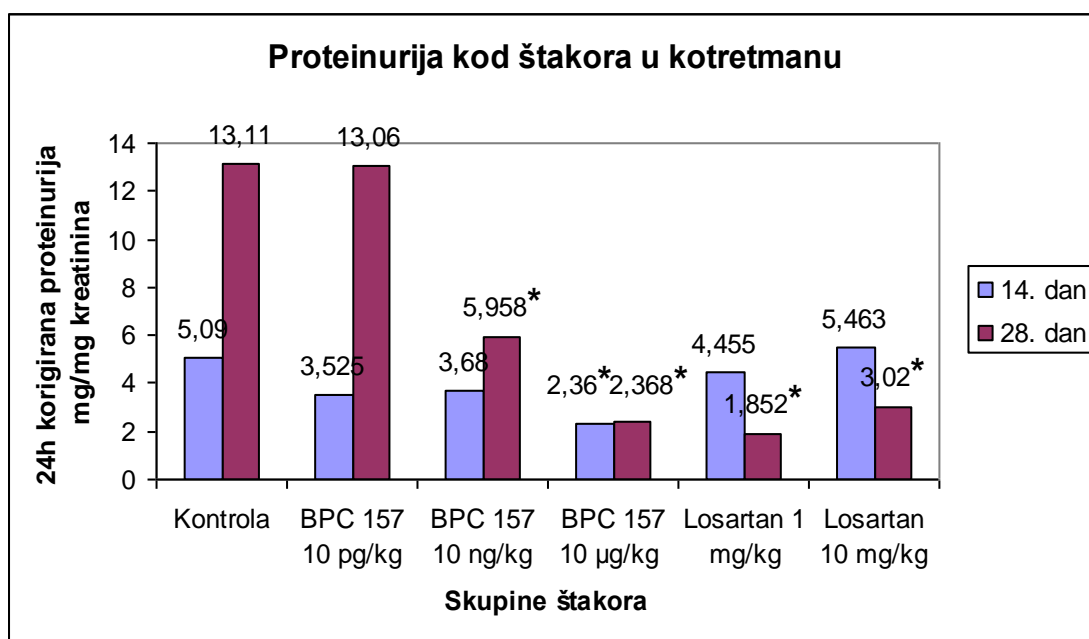
#### **4.1.1. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u štakora**

Sve su skupine štakora tijekom praćenja nakon aplikacije epirubicina imale vrijednosti uree više od referentnih ( $2,82 \pm 0,35$  mmol/l), dok kreatinin ni u jednoj skupini nije prešao granicu referentnih vrijednosti ( $35,4-331,5$   $\mu$ mol/l). Zapaža se povišena vrijednost ukupnog kolesterola u svim skupinama (referentne vrijednosti od 0,13-1,41 mmol/l), s tim da su vrijednosti najviše u životinja tretiranih losartanom u kotretmanskome protokolu. Jedino su u te dvije skupine povišene i vrijednosti triglicerida, dok su u ostalim skupinama u granicama referentnih vrijednosti ( $1,96 \pm 0,29$ ). Proteinurija s posljedičnim edemima prisutna je u svih životinja u istraživanju.

##### **4.1.1.1. Kotretman (štakori)**

Proteinurija kao najznačajniji klinički parametar praćenja nefrotskog sindroma je 14. dan kotretmana bila statistički značajno manja samo u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu$ g/kg, dok je 28. dan kotretmana bila statistički značajno manja u svim tretiranim skupinama, osim u onih tretiranih BPC-om 157 u najmanjoj dozi. Vrijednost uree bila je statistički značajno manja jedino u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu$ g/kg 28. dan kotretmana. Kreatinin je bio statistički značajno manji u skupina tretiranih losartanom u obje doze 28. dan kotretmana. Razina kolesterola bila je statistički značajno manja u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu$ g/kg i 14. i 28. dan kotretmana, dok je razina triglicerida bila statistički značajno veća u štakora tretiranih losartanom u obje doze 28. dan kotretmana. Značajan parametar bubrežne funkcije 24-satnog klirens kreatinina bio je statistički značajno veći u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu$ g/kg i losartanom u dozi 1 mg/kg 28. dan kotretmana. Unos vode i diureza u 24 sata bili su statistički značajno

veći u štakora tretiranih losartanom u obje doze 14. dan kotretmana. Stupanj edema bio je statistički značajno manji u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg 14. i 28. dan kotretmana te losartanom u dozi 1 mg/kg 14. i 28. dan, a u dozi 10 mg/kg samo 28. dan kotretmana. Tjelesna masa bila je statistički značajno veća u štakora tretiranih losartanom u obje doze 14. dan kotretmana. Ostale određivane vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



**Grafikon 1.** Prikazane su vrijednosti 24-satne korigirane proteinurije mg/mg kreatinina 14. i 28. dana kotretmana u štakora

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Štakori kotretman 14.dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu$ mol/l)	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	9,440 $\pm$ 1,01	116,83 $\pm$ 53,92	2,944 $\pm$ 0,68	5,090 $\pm$ 3,44
BPC 157 10 pg/kg	8,675 $\pm$ 1,76	46,25 $\pm$ 6,29	3,850 $\pm$ 1,39	3,525 $\pm$ 2,31
BPC 157 10 ng/kg	7,880 $\pm$ 2,07	46,00 $\pm$ 4,18	3,732 $\pm$ 1,47	3,680 $\pm$ 2,13
BPC 157 10 $\mu$ g/kg	8,633 $\pm$ 2,99	55,00 $\pm$ 7,9	3,183 $\pm$ 1,36	2,360* $\pm$ 0,45
Losartan 1mg/kg	8,800 $\pm$ 1,71	68,67 $\pm$ 2,80	4,668 $\pm$ 1,96	4,455 $\pm$ 1,39
Losartan 10 mg/kg	8,917 $\pm$ 1,80	68,33 $\pm$ 7,76	3,442 $\pm$ 1,13	5,463 $\pm$ 2,09

**Tablica 1.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u štakora 14. dan kotretmana i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu$ mol/l) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg), izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajna vrijednost ( $p < 0,05$ ) označena je sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Štakori kotretman 14.dan</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	3,617 ± 1,43	2,625 ± 2,61
BPC 157 10 pg/kg	2,275 ± 0,82	1,825 ± 0,05
BPC 157 10 ng/kg	1,780 ± 0,48	0,974 ± 0,33
BPC 157 10 μg/kg	2,000* ± 0,32	1,433 ± 0,40
Losartan 1mg/kg	2,950 ± 1,29	2,098 ± 1,43
Losartan 10 mg/kg	2,560 ± 1,43	1,408 ± 0,52

**Tablica 2.** Pokazuje srednje vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u štakora 14. dan kotretmana.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori kotretman 14. dan	24h unos vode (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	23,20 ± 7,56	10,20 ± 5,21	3,200 ± 0,44	198,0 ± 54,04
BPC 157 10 pg/kg	17,75 ± 4,57	7,750 ± 3,30	3,750 ± 0,50	187,5 ± 67,02
BPC 157 10 ng/kg	17,80 ± 7,72	9,400 ± 6,58	2,800 ± 0,83	184,0 ± 73,01
BPC 157 10 µg/kg	21,33 ± 9,73	7,833 ± 3,12	2,000* ± 0,00	178,3 ± 39,71
Losartan 1mg/kg	59,17* ± 11,14	21,50* ± 6,95	2,167* ± 0,40	280* ± 16,73
Losartan 10 mg/kg	52,50* ± 12,94	25,00* ± 10,02	2,833 ± 0,75	293* ± 29,44

**Tablica 3.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u štakora 14. dan kotretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



<b>Štakori kotretman 28. dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu$ mol/l)	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	10,96 $\pm$ 4,88	64,40 $\pm$ 2,07	4,054 $\pm$ 1,72	13,11 $\pm$ 3,96
BPC 157 10 pg/kg	8,200 $\pm$ 1,81	26,50 $\pm$ 4,04	6,050 $\pm$ 3,26	13,06 $\pm$ 11,58
BPC 157 10 ng/kg	11,93 $\pm$ 7,52	28,09 $\pm$ 12,24	7,365 $\pm$ 7,70	5,958* $\pm$ 5,54
BPC 157 10 $\mu$ g/kg	6,933* $\pm$ 1,24	25,83 $\pm$ 3,86	11,27* $\pm$ 1,00	2,368* $\pm$ 1,33
Losartan 1mg/kg	8,383 $\pm$ 2,47	33,83* $\pm$ 9,49	9,887* $\pm$ 2,22	1,852* $\pm$ 1,05
Losartan 10 mg/kg	8,760 $\pm$ 1,37	45,60* $\pm$ 7,19	7,040 $\pm$ 2,02	3,020* $\pm$ 1,60

**Tablica 4.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije 28. dan kotretmana i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu$ mol/l) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg), izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Štakori kotretman 28.dan</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	2,697 ± 0,71	1,795 ± 0,92
BPC 157 10 pg/kg	1,975 ± 0,69	1,478 ± 0,26
BPC 157 10 ng/kg	2,005 ± 0,39	1,720 ± 0,81
BPC 157 10 µg/kg	1,640* ± 0,11	0,904 ± 0,16
Losartan 1mg/kg	2,193 ± 0,41	1,883* ± 0,95
Losartan 10 mg/kg	2,760 ± 1,30	2,154* ± 0,67

**Tablica 5.** Prikazane su srednje vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u štakora 28. dan kotretmana.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori kotretman 28. dan	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24 h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	27,00 ± 8,36	20,60 ± 12,50	3,600 ± 0,54	222,0 ± 47,64
BPC 157 10 pg/kg	27,50 ± 9,57	11,00 ± 6,97	3,500 ± 0,57	207,5 ± 64,49
BPC 157 10 ng/kg	24,00 ± 10,83	14,50 ± 9,32	3,7 ± 0,59	183,3 ± 121,4
BPC 157 10 µg/kg	28,33 ± 7,52	12,67 ± 6,03	1,500* ± 0,54	233,3 ± 53,17
Losartan 1mg/kg	32,50 ± 16,66	12,17 ± 6,52	2,833* ± 0,75	275,0 ± 60,58
Losartan 10 mg/kg	20,00 ± 14,14	15,00 ± 5,29	2,000* ± 0,70	294,0 ± 48,27

**Tablica 6.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u štakora 14. dan kotretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Štakori kotretman 28. dan</b>	Masa bubrega (g)	Masa srca (g)	Masa jetara (g)	Masa slezene (g)	Masa pluća (g)
Kontrola	2,284 ± 0,54	0,6618 ± 0,23	8,577 ± 1,20	0,867 ± 0,12	1,903 ± 1,00
BPC 157 10 pg/kg	2,134 ± 0,65	0,704 ± 0,32	8,424 ± 3,12	1,009 ± 0,32	1,560 ± 0,88
BPC 157 10 ng/kg	2,217 ± 0,71	0,858 ± 0,29	7,649 ± 4,18	0,866 ± 0,12	2,672 ± 0,24
BPC 157 10 µg/kg	1,673 ± 1,24	0,879 ± 0,20	10,19 ± 2,72	0,915 ± 0,30	1,567 ± 0,31
Losartan 1mg/kg	2,425 ± 0,48	0,913 ± 0,22	9,508 ± 3,15	0,890 ± 0,46	1,743 ± 0,49
Losartan 10 mg/kg	1,643 ± 0,84	0,997 ± 0,13	8,134 ± 4,72	0,788 ± 0,22	1,262 ± 0,89

**Tablica 7.** Nakon žrtvovanja štakora 28. dana kotretmana, izmjerene su vrijednosti mase obaju bubrega, srca, jetara, slezene i pluća izražene u gramima. Uz  $p < 0,05$  nijedna vrijednost nije pokazala statističku značajnost.

#### 4.1.1.2. Posttretman (štakori)

U posttretmanu smo pratili dinamiku parametara bubrežne funkcije u kontrolne skupine koja je pokazala statistički značajno povećanje vrijednosti proteinurije, uree, stupnja edema i tjelesne mase 14. i 28. dan posttretmana. 24-satni unos vode je u kontrolne skupine bio statistički značajno manji 14. dan u usporedbi sa 7. danom posttretmana. Za kontrolnu skupinu su diureza i 24-satni klirens kreatinina bili statistički značajno veći 28. dan u usporedbi sa 7. danom posttretmana.

<b>Štakori posttretman kontrola</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin( $\mu$ mol/l)	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Prva kontrola 7. dan	8,933 $\pm$ 0,58	73,67 $\pm$ 10,31	2,167 $\pm$ 0,69	1,713 $\pm$ 0,83
14. dan kontrola	11,03* $\pm$ 1,62	137,5 $\pm$ 81,47	1,883 $\pm$ 1,10	4,00* $\pm$ 4,11
28. dan kontrola	11,53* $\pm$ 2,09	86,0 $\pm$ 63,64	3,70* $\pm$ 0,79	9,80* $\pm$ 3,79

**Tablica 8.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u štakora u prvoj kontroli prije žrtvovanja (7 dana nakon aplikacije epirubicina) i kontrolama 14. i 28. dan i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu$ mol/l) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg) izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s prvom kontrolom označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

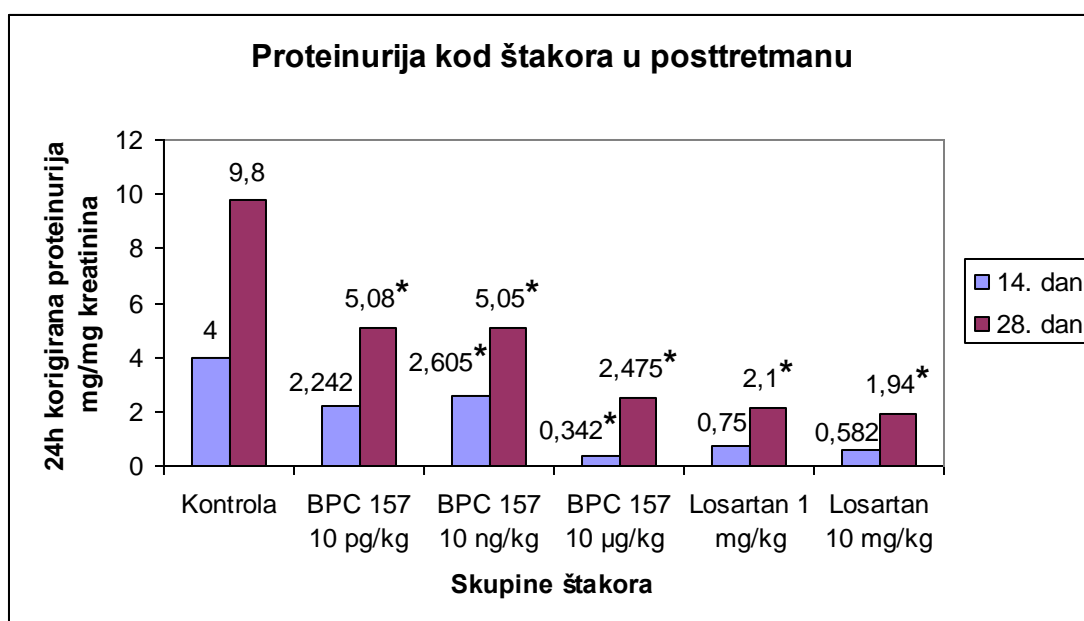
<b>Štakori posttretman kontrola</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Prva kontrola 7. dan	2,017 ± 0,29	1,453 ± 0,48
14. dan kontrola	3,500 ± 1,52	3,380 ± 1,88
28. dan kontrola	2,475 ± 0,85	1,725 ± 0,67

**Tablica 9.** Prikazane su vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l 7., 14. i 28. dan praćenja kontrolnih skupina posttretmana u štakora. Uz  $p < 0,05$  nijedna vrijednost nije pokazala statističku značajnost.

<b>Štakori posttretman kontrola</b>	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Prva kontrola 7. dan	12,33 ± 0,81	5,767 ± 2,53	1,583 ± 0,49	248,3 ± 9,83
14. dan kontrola	9,117* ± 2,98	4,033 ± 1,13	2,833* ± 0,40	285,0* ± 24,29
28. dan kontrola	25,25 ± 10,34	15,0* ± 4,08	3,750* ± 0,5	312,5* ± 33,04

**Tablica 10.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u štakora u kontrolnim skupinama i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s prvom kontrolom označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Proteinurija je 14. dan posttretmana bila statistički značajno manja u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi od 10 ng/kg i 10 µg/kg, dok je 28. dan kotretmana bila statistički značajno manja u svim tretiranim skupinama. Vrijednost uree bila je statistički značajno manja u svih tretiranih skupina 28. dan posttretmana. Statistički značajniju nižu vrijednost kolesterola imala je skupina štakora tretirana BPC-om 157 14. i 28. dan posttretmana, dok je razina triglicerida bila statistički značajno niža u skupina tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 pg/kg i losartanom u dozi 10 mg/kg.. 24-satni unos vode je 28. dan posttretmana bio statistički značajno veći u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 ng/kg i losartanom u dozi 1 mg/kg. Samo je skupina tretirana losartanom u dozi 10 mg/kg imala statistički značajno manju 24-satnu diurezu 28. dan posttretmana. Stupanj edema bio je statistički značajno manji u štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg 28. dan posttretmana te losartanom u dozi 10 mg/kg 14. i 28. dan, a u dozi 1 mg/kg samo 14. dan kotretmana. Ostale određivane vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



**Grafikon 2.** Prikazana je 24-satna korigirana proteinurija mg/mg kreatinina 14. i 28. dana posttretmana u štakora.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori posttretman 14. dan	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	11,03 $\pm$ 1,62	137,5 $\pm$ 81,47	1,883 $\pm$ 1,10	4,00 $\pm$ 4,11
BPC 157 10 pg/kg	8,460 $\pm$ 2,80	83,80 $\pm$ 55,07	2,698 $\pm$ 1,08	2,242 $\pm$ 1,32
BPC 157 10 ng/kg	7,600 $\pm$ 2,85	85,17 $\pm$ 77,70	3,030 $\pm$ 1,15	2,605* $\pm$ 1,77
BPC 157 10 $\mu\text{g/kg}$	6,983 $\pm$ 0,73	98,17 $\pm$ 56,31	2,593 $\pm$ 1,31	0,342* $\pm$ 0,14
Losartan 1mg/kg	8,040 $\pm$ 2,11	71,75 $\pm$ 26,25	3,230 $\pm$ 2,42	0,750 $\pm$ 0,59
Losartan 10 mg/kg	9,180 $\pm$ 2,27	71,20 $\pm$ 15,61	3,510 $\pm$ 1,78	0,582 $\pm$ 0,35

**Tablica 11.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije 14. dan posttretmana i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg) izračunat za korištenje vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) su označene sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



Štakori posttretman 14. dan	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	3,500 ± 1,52	3,380 ± 1,88
BPC 157 10 pg/kg	2,060 ± 0,95	1,746 ± 0,59
BPC 157 10 ng/kg	2,233 ± 0,97	1,548 ± 1,17
BPC 157 10 µg/kg	1,910* ± 1,61	1,528 ± 1,43
Losartan 1mg/kg	2,660 ± 1,84	1,836 ± 1,59
Losartan 10 mg/kg	2,160 ± 0,48	0,940 ± 0,29

**Tablica 12.** Prikazane su vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u štakora 14. dan posttretmana.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori posttretman 14. dan	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	9,117 ± 2,98	4,033 ± 1,13	2,833 ± 0,40	285,0 ± 24,29
BPC 157 10 pg/kg	8,448 ± 2,42	5,440 ± 1,95	2,100 ± 0,22	276,0 ± 11,40
BPC 157 10 ng/kg	13,28* ± 2,71	5,900 ± 3,95	1,750 ± 0,61	271,7 ± 13,29
BPC 157 10 µg/kg	12,57 ± 3,65	5,383 ± 0,86	1,583 ± 0,49	255,0 ± 25,88
Losartan 1mg/kg	14,14* ± 2,59	5,080 ± 0,66	2,300* ± 0,44	266,0 ± 27,02
Losartan 10 mg/kg	11,54 ± 6,11	5,00 ± 2,33	2,20* ± 0,44	244,0 ± 35,75

**Tablica 13.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u štakora 14. dan posttretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Štakori posttretman 28. dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin (μmol/l)	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	11,53 ± 2,09	86,0 ± 63,64	3,70 ± 0,79	9,80 ± 3,79
BPC 157 10 pg/kg	7,900* ± 1,95	51,80 ± 38,24	4,800 ± 3,44	5,080* ± 2,24
BPC 157 10 ng/kg	6,867* ± 1,77	46,50 ± 38,89	8,017 ± 3,54	5,050* ± 2,51
BPC 157 10 μg/kg	6,475* ± 0,64	38,75 ± 10,31	6,925 ± 2,85	2,475* ± 0,49
Losartan 1mg/kg	7,525* ± 1,33	58,75 ± 43,28	5,375 ± 4,71	2,100* ± 1,08
Losartan 10 mg/kg	8,540* ± 1,97	39,00 ± 10,84	7,080 ± 3,63	1,940* ± 0,43

**Tablica 14.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije 28. dan posttretmana i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin (μmol/l) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg) izračunat za korištenje vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori posttretman 28. dan	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	2,475 ± 0,85	1,725 ± 0,67
BPC 157 10 pg/kg	1,720 ± 0,69	0,8440* ± 0,20
BPC 157 10 ng/kg	1,767 ± 0,80	1,117 ± 0,66
BPC 157 10 µg/kg	1,175* ± 0,62	1,075 ± 0,48
Losartan 1mg/kg	1,722 ± 0,97	1,063 ± 0,09
Losartan 10 mg/kg	1,720 ± 0,41	0,7300* ± 0,17

**Tablica 15. Prikazane** su vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u štakora 28. dan posttretmana.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori posttretman 28. dan	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	25,25 ± 10,34	15,0 ± 4,08	3,750 ± 0,5	312,5 ± 33,04
BPC 157 10 pg/kg	33,40 ± 7,60	12,20 ± 2,49	3,600 ± 0,54	288,0 ± 17,89
BPC 157 10 ng/kg	22,00 ± 10,35	10,33 ± 3,33	2,833 ± 0,75	293,3 ± 12,11
BPC 157 10 µg/kg	22,50 ± 12,15	15,25 ± 3,09	2,000* ± 0,81	280,0 ± 33,67
Losartan 1mg/kg	23,50 ± 13,00	10,50 ± 7,32	2,500 ± 0,57	265,0 ± 59,16
Losartan 10 mg/kg	25,40 ± 7,30	8,800* ± 3,89	1,800* ± 0,83	276 ± 38,30

**Tablica 16.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u štakora 28. dan posttretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Štakori posttretman 28. dan	Masa bubreg (g)	Masa srca (g)	Masa jetara (g)	Masa slezene (g)	Masa pluća (g)
Kontrola	3,137 ± 0,15	1,078 ± 0,12	12,33 ± 2,57	1,282 ± 0,22	2,361 ± 0,3
BPC 157 10 pg/kg	3,097 ± 0,42	1,058 ± 0,06	11,19 ± 1,41	1,277 ± 0,12	2,345 ± 0,39
BPC 157 10 ng/kg	2,895 ± 0,25	1,128 ± 0,17	11,01 ± 1,33	1,037 ± 0,25	2,084 ± 0,45
BPC 157 10 µg/kg	2,853 ± 0,47	0,9804 ± 0,10	10,60 ± 1,55	0,876 ± 0,17	2,232 ± 0,57
Losartan 1mg/kg	2,868 ± 0,85	0,9670 ± 0,24	9,999 ± 2,43	1,066 ± 0,46	2,109 ± 0,57
Losartan 10 mg/kg	2,923 ± 0,63	0,9640 ± 0,18	9,587 ± 1,82	0,999 ± 0,26	2,079 ± 0,47

**Tablica 17.** Nakon žrtvovanja štakora 28. dan posttretmana izmjerene su vrijednosti mase obaju bubrega, srca, jetara, slezene i pluća izražene u gramima. Uz  $p < 0,05$  nijedna vrijednost nije pokazala statističku značajnost.

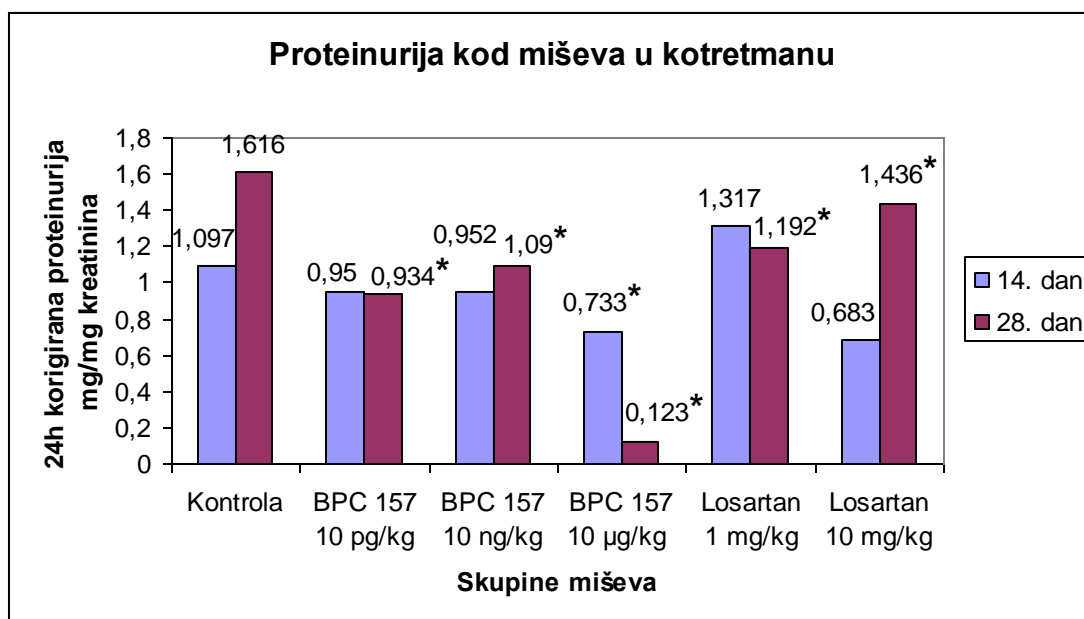
## **4.1.2. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u miševa**

Sve su skupine miševa nakon aplikacije epirubicina imale vrijednosti uree iznad referentnih vrijednosti ( $3,45 \pm 0,85$ ), dok je kreatinin bio u granicama referentnih vrijednosti (44,2-123,8). Svi su miševi imali proteinuriju s posljedičnim edemima te vrijednosti kolesterola (ref. vr. 0,74-2,86) i triglicerida (ref. vr. do 1,53) iznad referentnih vrijednosti.

### **4.1.2.1. Kotretman (miševi)**

Proteinurija je 14. dan kotretmana bila statistički značajno manja u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dok je 28. dan kotretmana bila statistički značajno manja u svim tretiranim skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom. Vrijednost uree bila je statistički značajno manja u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  14. dan kotretmana, a 28. dan u skupina miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\text{ng}/\text{kg}$  i 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  te losartanom u dozi 1  $\text{mg}/\text{kg}$ . Kreatinin je bio statistički značajno manji u skupinama miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  14. dan, a 28. dan u dozi i 10  $\text{ng}/\text{kg}$  i 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . U miševa tretiranih losartanom u dozi 1  $\text{mg}/\text{kg}$  vrijednosti kreatinina bile su statistički značajno niže i 14. i 28. dana kotretmana. Vrijednost kolesterola bila je statistički značajno viša u miševa tretiranih losartanom u obje doze 14. dan kotretmana, dok je 28. dan bila statistički značajno niža u svim tretiranim skupinama. Razina triglicerida bila je statistički značajno viša u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\text{pg}/\text{ml}$  14. dan kotretmana, dok je 28. dan bila statistički značajno niža u svim tretiranim skupinama. Značajan parametar bubrežne funkcije - 24-satni klirens kreatinina, bio je statistički značajno veći u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  14. i 28. dan kotretmana, a losartanom u dozi 1  $\text{mg}/\text{kg}$  samo 14. dan kotretmana. Unos vode u 24 sata bio je statistički značajno veći u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a statistički značajno manji u tretiranih losartanom u obje doze 14. dan kotretmana, dok je 28. dana bilo obrnuto - manji kod BPC-a 157 (sve 3 doze), a veći kod losartana (obje doze). Diureza u 24 sata bila je statistički značajno manja u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a statistički značajno veća u tretiranih losartanom u obje doze 14. dan kotretmana, dok je 28. dana bilo obrnuto - veća kod BPC-a 157 (sve 3 doze), a manja kod losartana (obje doze). Stupanj edema bio je statistički značajno manji u miševa tretiranih

BPC-om 157 u dozi 10 ng/kg i 10 µg/kg 14. i 28. dan kotretmana. Ostale određivane vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



**Grafikon 3.** Prikazana je 24-satna korigirana proteinurija mg/mg kreatinina 14. i 28. dana kotretmana u miševa.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



<b>Miševi kotretman 14. dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	10,08 $\pm$ 3,62	101,0 $\pm$ 54,17	0,938 $\pm$ 0,30	1,097 $\pm$ 0,1
BPC 157 10 pg/kg	9,600 $\pm$ 1,25	122,6 $\pm$ 14,33	0,188 $\pm$ 0,02	0,950 $\pm$ 0,44
BPC 157 10 ng/kg	9,980 $\pm$ 2,78	67,80 $\pm$ 18,58	1,304 $\pm$ 0,61	0,952 $\pm$ 0,13
BPC 157 10 $\mu\text{g/kg}$	7,267* $\pm$ 1,39	65,50* $\pm$ 20,71	5,005* $\pm$ 2,11	0,733* $\pm$ 0,05
Losartan 1mg/kg	9,833 $\pm$ 1,50	61,00* $\pm$ 15,06	2,952* $\pm$ 1,24	1,317 $\pm$ 0,32
Losartan 10 mg/kg	11,20 $\pm$ 2,51	86,20 $\pm$ 27,04	2,136 $\pm$ 0,95	0,683 $\pm$ 0,19

**Tablica 18.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u miševa 14. dan kotretmana i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg), izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi kotretman 14. dan</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	4,933 ± 1,00	2,722 ± 0,91
BPC 157 10 pg/kg	7,160* ± 1,18	3,776* ± 0,54
BPC 157 10 ng/kg	4,617 ± 1,58	2,485 ± 0,49
BPC 157 10 µg/kg	5,540 ± 1,37	2,580 ± 0,85
Losartan 1mg/kg	6,500* ± 0,14	2,660 ± 0,06
Losartan 10 mg/kg	7,400* ± 0,29	3,006 ± 0,39

**Tablica 19.** Navedene su vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u miševa 14. dan kotretmana.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi kotretman 14. dan</b>	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	6,167 ± 0,40	2,000 ± 0,35	2,667 ± 0,51	32,50 ± 4,18
BPC 157 10 pg/kg	6,000 ± 2,33	2,000 ± 0,44	2,400 ± 0,54	30,00 ± 3,53
BPC 157 10 ng/kg	5,833 ± 0,40	1,750 ± 0,41	1,833* ± 0,40	30,00 ± 3,16
BPC 157 10 µg/kg	8,00* ± 1,03	3,600* ± 0,54	1,400* ± 0,54	28,0 ± 3,73
Losartan 1mg/kg	5,000* ± 0,63	10,67* ± 0,81	2,833 ± 0,40	29,17 ± 2,04
Losartan 10 mg/kg	4,800* ± 0,44	8,100* ± 0,74	2,200 ± 0,44	30,00 ± 3,53

**Tablica 20.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u miševa 14. dan kotretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\*= p<0,05, a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi kotretman 28. dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	10,87 $\pm$ 2,33	75,83 $\pm$ 20,35	1,900 $\pm$ 0,86	1,616 $\pm$ 0,17
BPC 157 10 pg/kg	9,325 $\pm$ 1,17	92,50 $\pm$ 6,45	1,725 $\pm$ 0,62	0,934* $\pm$ 0,04
BPC 157 10 ng/kg	6,733* $\pm$ 1,30	55,83* $\pm$ 12,42	3,425 $\pm$ 1,35	1,090* $\pm$ 0,26
BPC 157 10 $\mu\text{g/kg}$	8,675* $\pm$ 1,43	50,00* $\pm$ 10,80	7,533* $\pm$ 1,98	0,123* $\pm$ 0,1
Losartan 1mg/kg	8,250* $\pm$ 0,75	50,83* $\pm$ 10,68	3,017 $\pm$ 1,11	1,192* $\pm$ 0,2
Losartan 10 mg/kg	11,83 $\pm$ 2,04	73,17 $\pm$ 21,09	2,217 $\pm$ 0,77	1,436* $\pm$ 0,09

**Tablica 21.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u miševa 28. dan kotretmana i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg) izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi kotretman 28. dan</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	11,83 ± 0,29	7,383 ± 0,99
BPC 157 10 pg/kg	5,825* ± 0,85	1,780* ± 0,55
BPC 157 10 ng/kg	5,317* ± 1,08	2,165* ± 0,50
BPC 157 10 µg/kg	6,375* ± 0,26	2,660* ± 0,08
Losartan 1mg/kg	5,783* ± 0,31	2,003* ± 0,35
Losartan 10 mg/kg	7,083* ± 0,21	2,758* ± 0,20

**Tablica 22.** Navedene su vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u miševa 28. dan kotretmana.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi kotretman 28. dan</b>	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	9,000 ± 0,10	7,500 ± 0,54	3,333 ± 0,51	34,17 ± 2,04
BPC 157 10 pg/kg	6,00 ± 0,10	11,00* ± 0,81	3,1 ± 0,20	28,75 ± 2,50
BPC 157 10 ng/kg	6,667* ± 0,51	7,667* ± 0,11	2,000* ± 0,63	35,83 ± 2,04
BPC 157 10 µg/kg	5,000* ± 0,10	13,50* ± 1,00	1,500* ± 0,57	35,00 ± 0,00
Losartan 1mg/kg	12,50* ± 0,54	3,167* ± 0,40	2,800 ± 0,54	38,33 ± 4,08
Losartan 10 mg/kg	11,67* ± 0,51	2,667* ± 0,51	2,167 ± 0,40	37,50 ± 2,73

**Tablica 23.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u miševa 28. dan kotretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\*= p<0,05, a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi kotretman 28. dan</b>	Masa bubreg (g)	Masa srca (g)	Masa jetara (g)	Masa slezene (g)	Masa pluća (g)
Kontrola	0,505 ± 0,06	0,204 ± 0,05	1,635 ± 0,16	0,232 ± 0,07	0,247 ± 0,07
BPC 157 10 pg/kg	0,554 ± 0,05	0,149 ± 0,01	1,598 ± 0,27	0,156 ± 0,06	0,274 ± 0,04
BPC 157 10 ng/kg	0,390 ± 0,08	0,127 ± 0,04	0,956 ± 0,15	0,134 ± 0,03	0,255 ± 0,04
BPC 157 10 µg/kg	0,531 ± 0,04	0,177 ± 0,01	1,148 ± 0,08	0,209 ± 0,06	0,298 ± 0,06
Losartan 1mg/kg	0,509 ± 0,09	0,151 ± 0,01	1,721 ± 0,26	0,144 ± 0,04	0,189± 0,03
Losartan 10 mg/kg	0,470 ± 0,10	0,118 ± 0,03	1,424 ± 0,29	0,126 ± 0,04	0,182 ± 0,03

**Tablica 24.** Nakon žrtvovanja miševa 28. dan kotretmana, izmjerene su vrijednosti mase obaju bubrega, srca, jetara, slezene, pluća izražene u gramima. Uz  $p < 0,05$ , nijedna vrijednost nije pokazala statističku značajnost.

#### 4.1.2.2. Posttretman (miševi)

U posttretmanu smo pratili dinamiku parametara bubrežne funkcije u kontrolne skupine koja je pokazala statistički značajno povećanje vrijednosti proteinurije 14. i 28. dan posttretmana. Kreatinin i 24-satni klirens kreatinina bili su statistički značajno manji u kontrolne skupine 14. dan kotretmana u usporedbi s prvom kontrolnom skupinom pri žrtvovanju 7. dan kotretmana. Vrijednosti kolesterola i triglicerida te 24-satni unos vode i 24-satna diureza su, nakon statistički značajnog pada vrijednosti 14. dan, 28. dan kotretmana bile statistički značajno više. Score edema i tjelesna masa statistički su se značajno povećali 14. dan u kontrolnih miševa pri posttretmanu.

<b>Miševi posttretman kontrole</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
7. dan kontrola	13,97 $\pm$ 3,52	117,0 $\pm$ 19,69	4,508 $\pm$ 1,24	0,210 $\pm$ 0,03
14. dan kontrola	10,08 $\pm$ 3,62	101,0* $\pm$ 54,17	0,938* $\pm$ 0,30	1,097* $\pm$ 0,1
28. dan kontrola	10,87 $\pm$ 2,33	75,83 $\pm$ 20,35	1,900 $\pm$ 0,86	1,616* $\pm$ 0,13

**Tablica 25.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u miševa pri prvoj kontroli prije žrtvovanja (7 dana nakon aplikacije epirubicina) i kontrolama 14. i 28. dan i to: serumska urea (mmol/l) i kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg), izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) su u usporedbi s prvom kontrolom označene sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



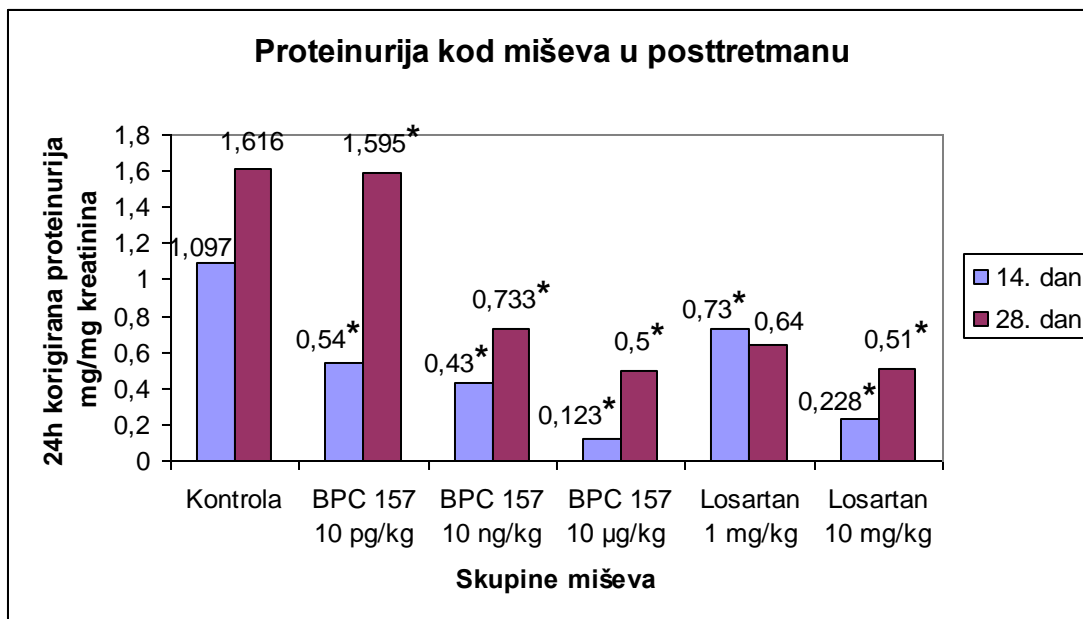
<b>Miševi posttretman kontrola</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
7. dan kontrola	5,067 ± 1,22	2,813 ± 0,95
14. dan kontrola	4,933* ± 1,00	2,722* ± 0,91
28. dan kontrola	11,83* ± 0,29	7,383* ± 0,99

**Tablica 26.** Prikazuje vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l 7., 14. i 28. dan praćenja kontrolnih skupina posttretmana u štakora. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s prvom kontrolom označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi posttretman kontrola</b>	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
7. dan kontrola	7,000 ± 0,63	2,500 ± 0,31	1,500 ± 0,54	27,50 ± 2,73
14. dan kontrola	6,167* ± 0,40	2,1* ± 0,33	2,667* ± 0,51	32,50* ± 4,18
28. dan kontrola	9,20* ± 0,2	7,500* ± 0,54	3,333 ± 0,51	34,17 ± 2,04

**Tablica 27.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u štakora u kontrolnim skupinama i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) su u usporedbi s prvom kontrolom označene sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

Proteinurija je 14. i 28. dan posttretmana u usporedbi s kontrolom bila statistički značajno manja u svih tretiranih miševa, s izuzetkom skupine tretirane losartanom u dozi 1 mg/kg 28. dan. Vrijednost uree bila je statistički značajno manja u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg 14. dan posttretmana, a 28. dan u skupinama miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 ng/kg i 10 µg/kg. Kreatinin je bio statistički značajno manji u skupinama miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg 14. i 28. dan. Razina kolesterola i triglicerida bila je statistički značajno niža u usporedbi s kontrolom u svih tretiranih skupina miševa 28. dan posttretmana. Značajan parametar bubrežne funkcije - 24-satni klirens kreatinina, bio je statistički značajno veći u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 ng/kg i 10 µg/kg i losartanom u dozi 10 mg/kg 14. i 28. dan kotretmana. Unos vode u 24 sata bio je statistički značajno manji kod losartanom tretiranih miševa u dozi 1 mg/kg 14. dan posttretmana, a 28. dan bio je statistički značajno manji u skupina tretiranih BPC-om 157 (sve 3 doze) i veći u losartanom tretiranih miševa u dozi 1 mg/kg. Diureza u 24 sata bila je statistički značajno veća u miševa tretiranih losartanom u obje doze 14. dan posttretmana, dok je 28. dana bila statistički značajno veća pri tretiranju BPC-om 157 (10 pg/kg i 10 µg/kg), a manja pri tetiranju losartanom (obje doze). Stupanj edema bio je statistički značajno manji u miševa tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg i losartanom u dozi 10 mg/kg 14. dan posttretmana, a 28. dan u miševa tretiranih BPC-om 157 (10 ng/kg i 10 µg/kg) i losartanom (1 mg/kg i 10 mg/kg). Miševi tretirani BPC-om 157 u dozi 10 pg/kg i losartanom u dozama 1 mg/kg i 10 mg/kg imali su statistički značajno veću tjelesnu masu. Ostale određivane vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



**Grafikon 4.** Prikazana je 24-satna korigirana proteinurija mg/mg kreatinina 14. i 28. dana kotretmana u miševa.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi posttretman 14. dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Kreatinin klirens 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	10,08 $\pm$ 3,62	101,0 $\pm$ 54,17	0,938 $\pm$ 0,30	1,097 $\pm$ 0,1
BPC 157 10 pg/kg	7,000 $\pm$ 0,89	88,50 $\pm$ 41,23	0,765 $\pm$ 0,46	0,540* $\pm$ 0,04
BPC 157 10 ng/kg	10,30* $\pm$ 0,59	111,0 $\pm$ 63,96	1,855* $\pm$ 0,24	0,430* $\pm$ 0,01
BPC 157 10 $\mu\text{g/kg}$	9,033 $\pm$ 1,45	53,00* $\pm$ 2,82	1,708* $\pm$ 0,62	0,123* $\pm$ 0,01
Losartan 1mg/kg	10,60 $\pm$ 2,82	92,67 $\pm$ 42,11	1,022 $\pm$ 0,23	0,730* $\pm$ 0,01
Losartan 10 mg/kg	11,48 $\pm$ 3,72	68,83 $\pm$ 16,68	1,683* $\pm$ 0,49	0,228* $\pm$ 0,02

**Tablica 28.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u miševa 14. dan posttretmana i to: serumska urea (mmo/l) i kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg), izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi posttretman 14. dan</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	4,933 ± 1,00	2,722 ± 0,91
BPC 157 10 pg/kg	4,700 ± 1,87	2,273 ± 0,95
BPC 157 10 ng/kg	4,267 ± 0,82	2,163 ± 0,39
BPC 157 10 µg/kg	8,200 ± 0,88	4,840 ± 1,71
Losartan 1mg/kg	6,883 ± 0,78	2,810 ± 0,19
Losartan 10 mg/kg	5,933 ± 0,54	2,230 ± 0,03

**Tablica 29.** Prikazuje vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u miševa 14. dan posttretmana. Uz  $p < 0,05$  nijedna vrijednost nije pokazala statističku značajnost.

<b>Miševi posttretman 14. dan</b>	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	6,167 ± 0,40	2,1 ± 0,33	2,667 ± 0,51	32,50 ± 4,18
BPC 157 10 pg/kg	7,500 ± 0,94	2,2 ± 0,21	2,500 ± 0,54	28,3 ± 2,58
BPC 157 10 ng/kg	6,667 ± 0,51	2,3 ± 0,11	2,333 ± 0,51	31,67 ± 4,08
BPC 157 10 µg/kg	6,667 ± 0,51	2,000 ± 0,12	1,333* ± 0,51	30,00 ± 3,16
Losartan 1mg/kg	4,000* ± 0,00	8,000* ± 0,63	2,333 ± 0,51	33,33 ± 2,58
Losartan 10 mg/kg	6,000 ± 0,89	7,500* ± 0,54	1,667* ± 0,51	33,33 ± 2,58

**Tablica 30.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u miševa 14. dan posttretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi posttretman 28. dan</b>	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Klirens kreatinina 24h (ml/min/kg)	Proteinuria 24h korigirana (mg/mg kreat)
Kontrola	10,87 $\pm$ 2,33	75,83 $\pm$ 20,35	1,900 $\pm$ 0,86	1,616 $\pm$ 0,13
BPC 157 10 pg/kg	9,37 $\pm$ 2,41	65,00 $\pm$ 8,16	2,825 $\pm$ 0,25	1,595* $\pm$ 0,12
BPC 157 10 ng/kg	9,40* $\pm$ 0,61	66,67 $\pm$ 26,58	5,520* $\pm$ 1,87	0,733* $\pm$ 0,13
BPC 157 10 $\mu\text{g/kg}$	7,93* $\pm$ 1,17	46,20* $\pm$ 7,56	4,417* $\pm$ 1,23	0,500* $\pm$ 0,03
Losartan 1mg/kg	10,1 $\pm$ 2,82	72,00 $\pm$ 21,10	2,160 $\pm$ 0,63	0,640 $\pm$ 0,11
Losartan 10 mg/kg	10,25 $\pm$ 3,09	64,50 $\pm$ 7,91	3,817* $\pm$ 0,85	0,510* $\pm$ 0,12

**Tablica 31.** Prikazane su vrijednosti laboratorijskih parametara bubrežne funkcije u miševa 28. dan posttretmana i to: serumska urea (mmo/l) i kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) u serumu dobivenom iz krvnih uzoraka, a iz urina 24-satna korigirana proteinurija (mg proteina/mg kreatinina u urinu) i 24-satni klirens kreatinina (ml/min/kg), izračunat iz vrijednosti kreatinina određenih u serumu i 24-satnom urinu. Svi su podaci statistički obrađeni, a statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ) označene su sa \*. Ostale neoznačene vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

<b>Miševi posttretman 28. dan</b>	Kolesterol (mmol/l)	Trigliceridi (mmol/l)
Kontrola	11,83 ± 0,29	7,383 ± 0,99
BPC 157 10 pg/kg	6,275* ± 0,64	2,510* ± 0,09
BPC 157 10 ng/kg	6,820* ± 0,19	2,412* ± 0,12
BPC 157 10 µg/kg	6,500* ± 0,14	2,300* ± 0,32
Losartan 1mg/kg	5,540* ± 0,42	2,224* ± 0,20
Losartan 10 mg/kg	5,167* ± 0,68	1,880* ± 0,35

**Tablica 32.** Navedene su vrijednosti serumskog kolesterola i triglicerida u mmol/l u miševa 28. dan posttretmana.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.



<b>Miševi posttretman 28. dan</b>	Unos vode 24h (ml)	Diureza 24h (ml)	Score edema	Tjelesna masa (g)
Kontrola	9,000 ± 0,10	7,500 ± 0,54	3,333 ± 0,51	34,17 ± 2,04
BPC 157 10 pg/kg	6,000* ± 0,81	10,00* ± 0,81	3,080 ± 0,40	38,7* ± 2,50
BPC 157 10 ng/kg	6,000* ± 0,70	7,800 ± 1,30	2,200* ± 0,44	35,00 ± 3,53
BPC 157 10 µg/kg	8,000* ± 0,63	10,00* ± 0,63	1,667* ± 0,51	34,17 ± 2,04
Losartan 1mg/kg	12,40* ± 0,89	2,800* ± 0,44	2,600* ± 0,54	40,0* ± 0,00
Losartan 10 mg/kg	9,167 ± 0,40	5,333* ± 0,51	1,667* ± 0,51	38,3* ± 2,58

**Tablica 33.** Prikazane su vrijednosti kliničkih parametara nefrotskog sindroma u miševa 14. dan posttretmana i to: 24-satni unos vode i 24-satna diureza u mililitrima. Stupanj edema određivan je semikvantitativnom metodom: 1 - edem usnica, 2 - edem usnica i nosa, 3 - edem usnica, nosa i periorbitalnog područja i 4 - edem usnica, nosa, periorbitalnog područja i šapa. Tjelesna masa izražena je u gramima.

\*=  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

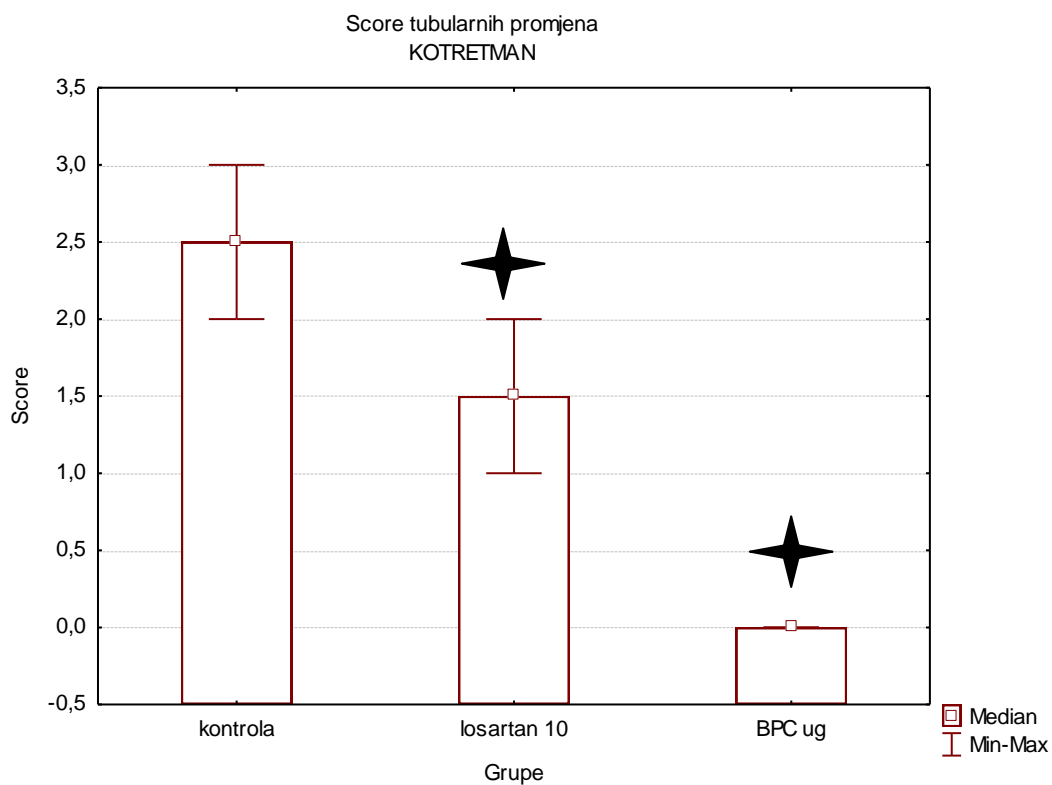
<b>Miševi posttretman 28. dan</b>	Masa bubreg (g)	Masa srca (g)	Masa jetara (g)	Masa slezene (g)	Masa pluća (g)
Kontrola	0,505 ± 0,06	0,204 ± 0,05	1,635 ± 0,16	0,232 ± 0,07	0,247 ± 0,07
BPC 10 pg/kg	0,555 ± 0,07	0,153 ± 0,02	1,614 ± 0,23	0,137 ± 0,03	0,256 ± 0,06
BPC 10 ng/kg	0,540 ± 0,11	0,135 ± 0,03	1,252 ± 0,36	0,158 ± 0,12	0,341 ± 0,08
BPC 10 µg/kg	0,384* ± 0,07	0,145 ± 0,04	0,995 ± 0,21	0,151 ± 0,04	0,288 ± 0,07
Losartan 1mg/kg	0,491 ± 0,09	0,128 ± 0,02	1,246 ± 0,16	0,126 ± 0,03	0,285 ± 0,05
Losartan 10 mg/kg	0,428 ± 0,08	0,122 ± 0,01	1,147 ± 0,14	0,076 ± 0,01	0,236 ± 0,04

Tablica 34. Nakon žrtvovanja miševa 28. dan posttretmana izmjerene su vrijednosti mase obaju bubrega, srca, jetara, slezene i pluća izražene u gramima. \* =  $p < 0,05$ , a ostale vrijednosti nisu pokazale statističku značajnost.

## **4.2. Patohistološki nalazi**

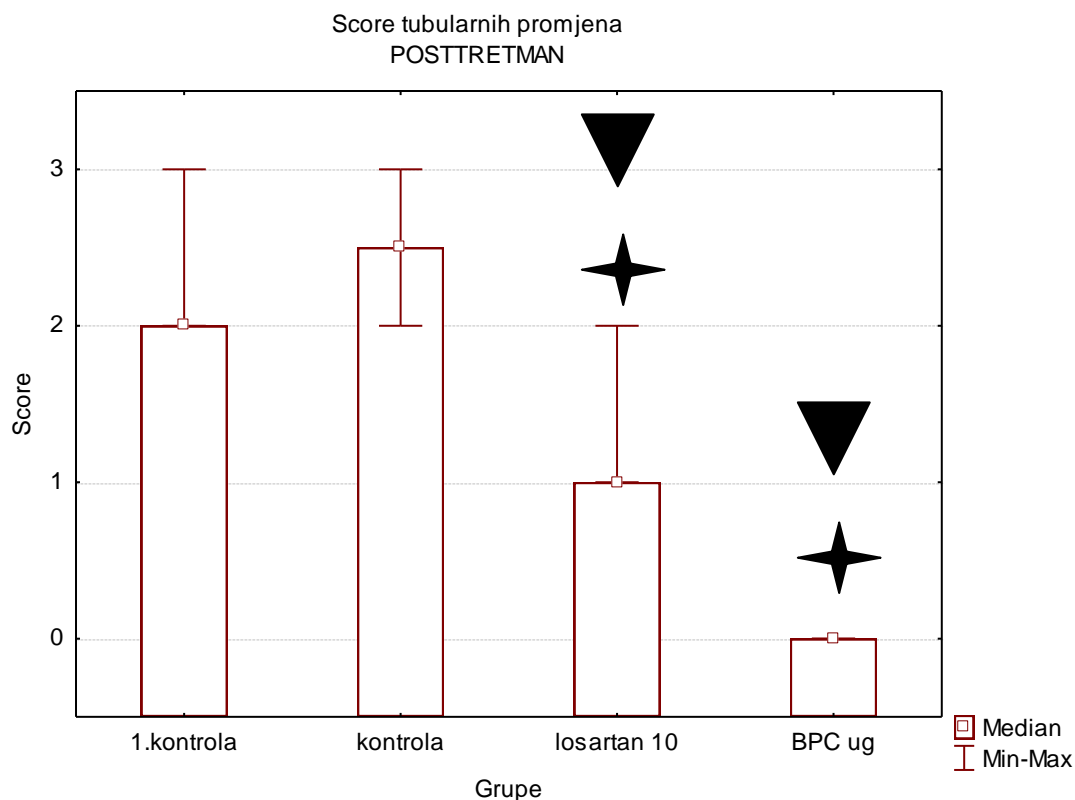
### **4.2.1. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u štakora**

Oštećenje bubrežnog parenhima manifestiralo se dilatacijom kanalića i nekrozom tubularnog epitela. Stupanj bubrežnog oštećenja procijenjen je semikvantitativno primjenom skale od 0 do 3: stupanj 0 - bez histoloških abnormalnosti, stupanj 1 - blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela, stupanj 2 - degenerativne promjene tubularnog epitela uz početnu dilataciju tubula i stupanj 3 - fokalna nekroza epitelnih stanica s dilatiranim tubulima. U kotretmanu je stupanj tubularnih promjena u bubrežima štakora liječenih losartanom u dozi 10 mg/kg i BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg bio statistički značajno manji u usporedbi s kontrolom. U posttretmanu je stupanj tubularnih promjena u bubrežima štakora liječenih losartanom u dozi 10 mg/kg i BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg bio statistički značajno manji u usporedbi s 1. kontrolom (bubrezi štakora žrtvovanih 7 dana nakon aplikacije epirubicina) i kontrolnom skupinom.



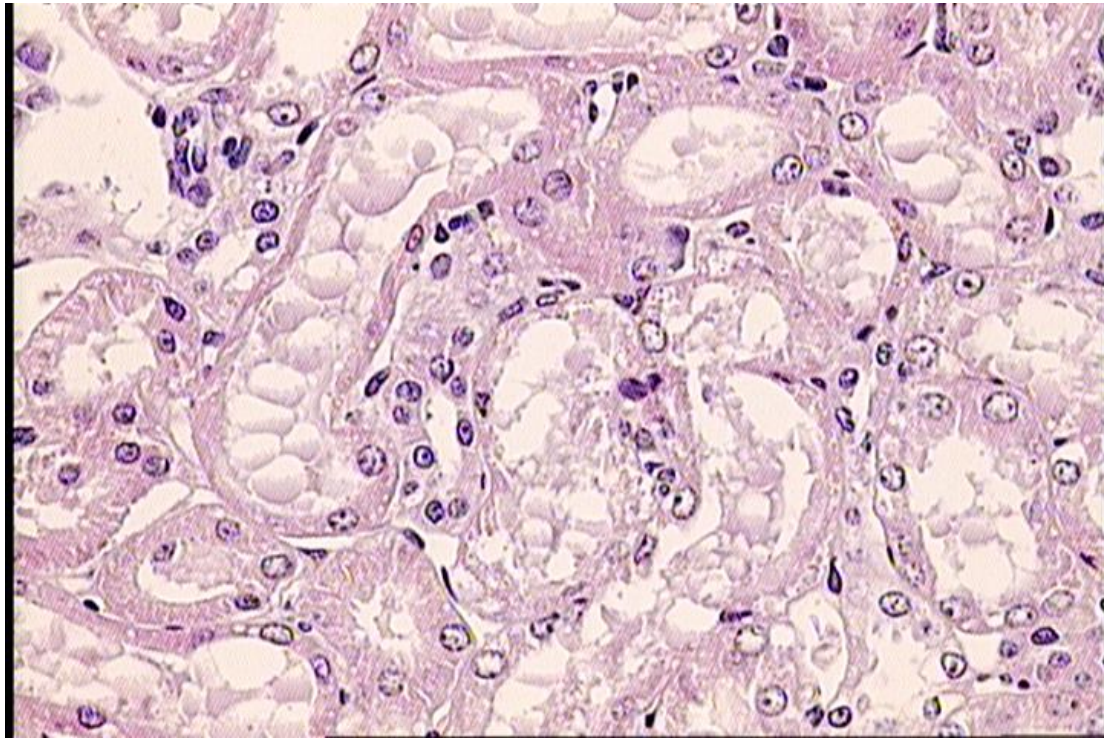
**Grafikon 5.** Prikazan je stupanj tubularnih promjena u bubrezima štakora u kontrolnoj skupini te u skupinama liječenim losartanom u dozi 10 mg/kg i BPC-om 157 u dozi 10  $\mu$ g/kg u kotretmanu.

- stupanj 0 - bez histoloških abnormalnosti,
- stupanj 1 - blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela,
- stupanj 2 - degenerativne promjene tubularnog epitela uz početnu dilataciju tubula
- stupanj 3 - fokalna nekroza epitelnih stanica s dilatiranim tubulima

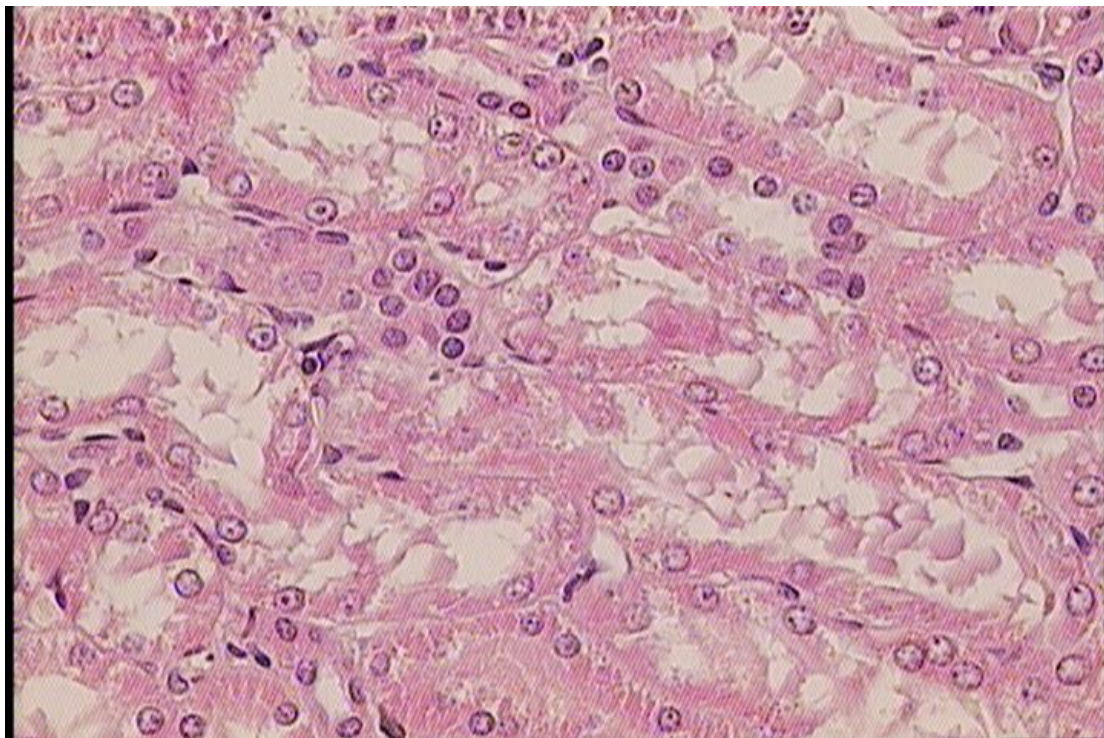


**Grafikon 6.** Prikazan je stupanj tubularnih promjena u bubrezima štakora u 1. kontrolnoj skupini, kontrolnoj skupini te u skupinama liječenim losartanom u dozi 10 mg/kg i BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg u posttretmanu.

- stupanj 0 - bez histoloških abnormalnosti,
- stupanj 1 - blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela,
- stupanj 2 - degenerativne promjene tubularnog epitela uz početnu dilataciju tubula
- stupanj 3 - fokalna nekroza epitelnih stanica s dilatiranim tubulima

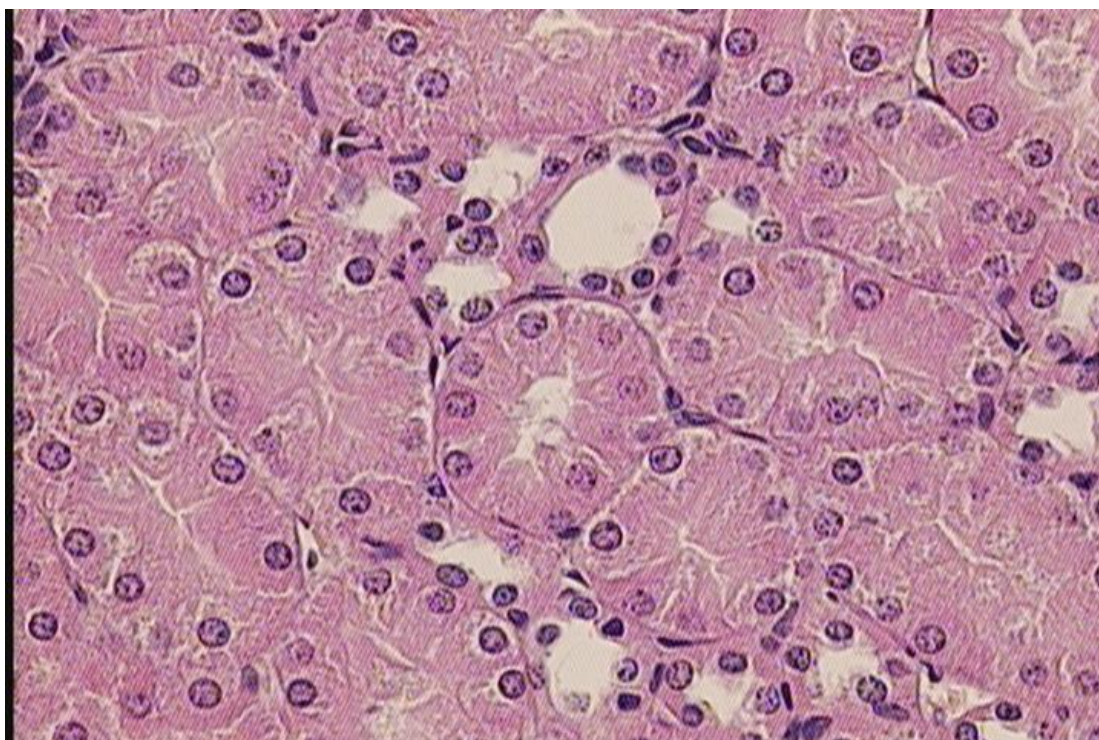


**Slika 1.** Tjedan dana nakon aplikacije epirubicina bubrežne se lezije vide kao dilatirani tubuli i fokalna nekroza tubularnih epitelnih stanica.

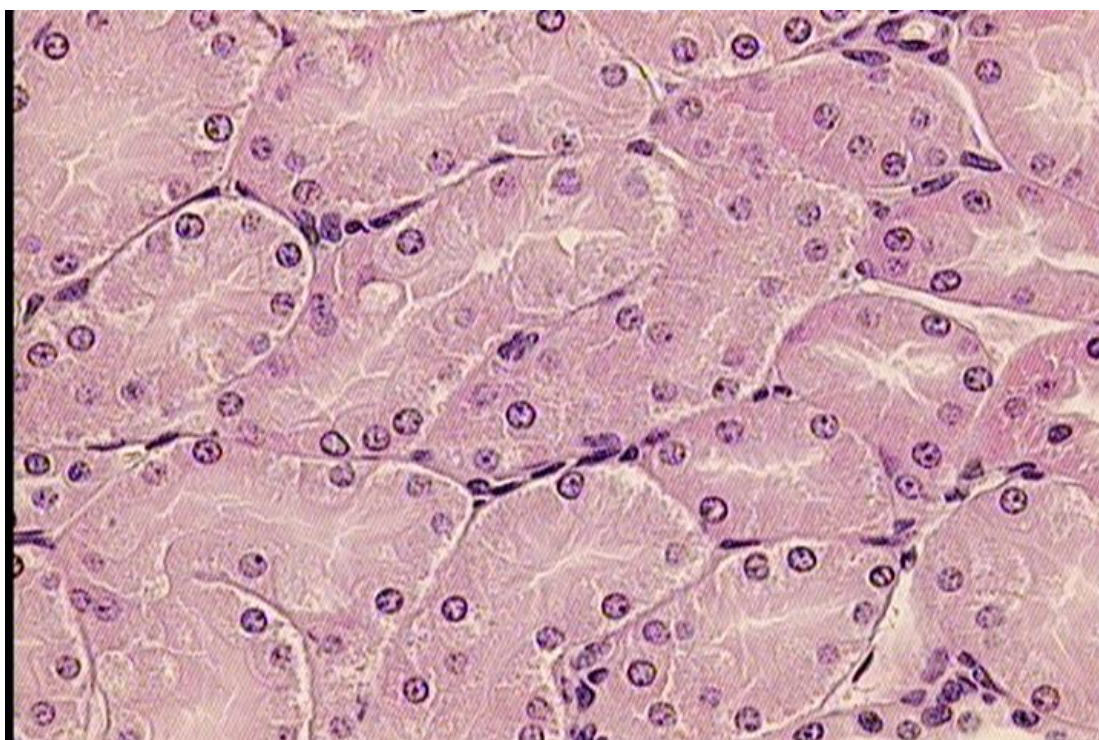


**Slika 2.** Četiri tjedna nakon aplikacije epirubicina bubrežne se lezije vide kao dilatirani tubuli i fokalna nekroza tubularnih epitelnih stanica.



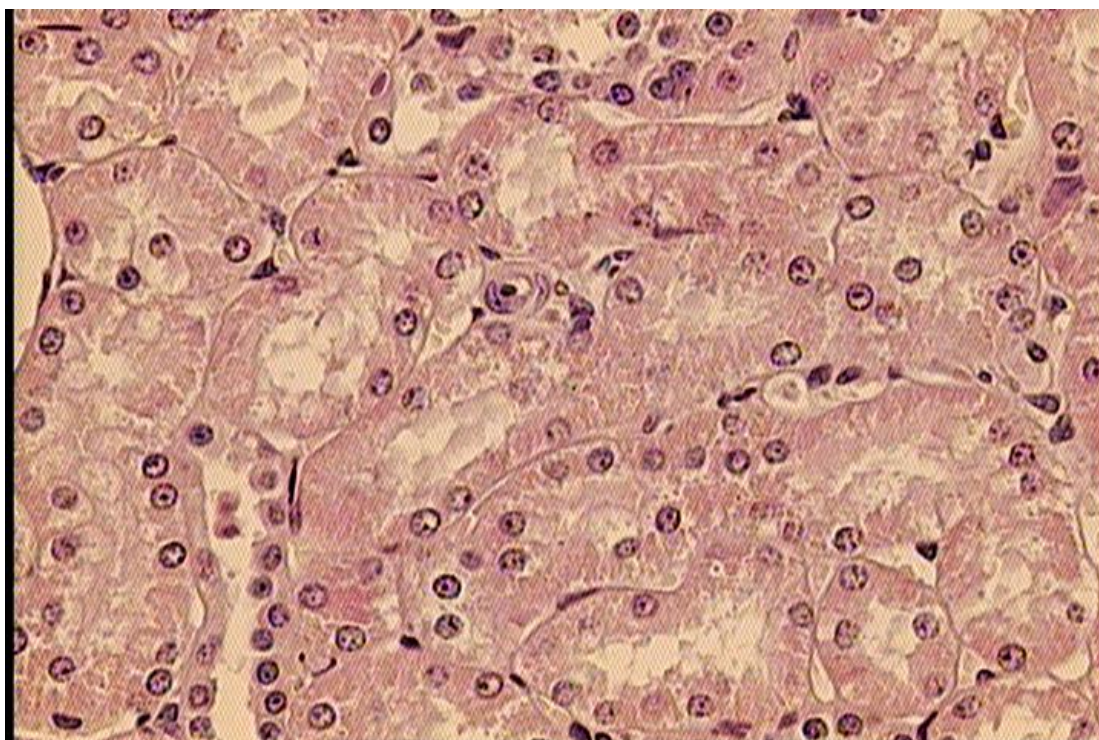


**Slika 3.** Tubularni epitel ne pokazuje histološke abnormalnosti 4 tjedna nakon aplikacije epirubicina uz tretman BPC-om 157 u dozi 10 $\mu$ g/kg tijekom 3 tjedna, započeto tjedan dana nakon aplikacije epirubicina.

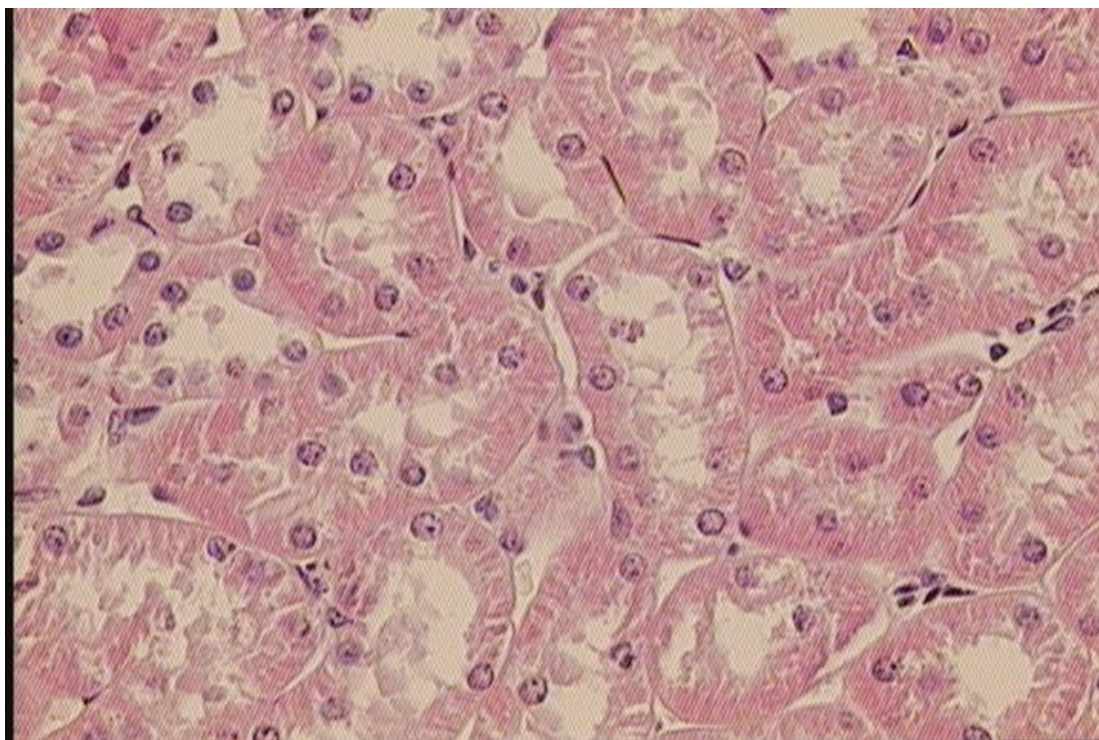


**Slika 4.** Tubularni epitel ne pokazuje histološke abnormalnosti 4 tjedna nakon aplikacije epirubicina uz tretman BPC-om 157 u dozi 10 $\mu$ g/kg tijekom 4 tjedna, započeto odmah nakon aplikacije epirubicina.





**Slika 5.** Blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela zapažaju se 4 tjedna nakon aplikacije epirubicina uz tretman losartanom u dozi 10 mg/kg u trajanju od 3 tjedna, započeto tjedan dana nakon aplikacije epirubicina.



**Slika 6.** Blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela zapažaju se 4 tjedna nakon aplikacije epirubicina uz tretman losartanom u dozi 10 mg/kg u trajanju od 4 tjedna, započeto odmah nakon aplikacije epirubicina.



#### **4.2.2. Eksperimentalni model nefrotskog sindroma u miševa**

Oštećenje bubrežnog parenhima manifestiralo se dilatacijom kanalića i nekrozom tubularnog epitela. Stupanj bubrežnog oštećenja procijenjen je semikvantitativno primjenom skale od 0 do 3: stupanj 0 - bez histoloških abnormalnosti, stupanj 1 - blage degenerativne promjene stanica tubularnog epitela, stupanj 2 - degenerativne promjene tubularnog epitela uz početnu dilataciju tubula i stupanj 3 - fokalna nekroza epitelnih stanica s dilatiranim tubulima. U bubrežima je u kontrolnih životinja nađena fokalna nekroza epitela proksimalnih kanalića najvišeg stupnja, nižeg stupnja u životinja tretiranih losartanom, a u životinja tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg nisu nađene patološke promjene. Razina stupnjeva odgovara gore navedenoj u štakora. U stupnju tubularnih promjena navedena razlika bila je značajna u usporedbi s primjenom BPC-a s kontrolama i losartana s kontrolama u kotretmanu i posttretmanu.

## **5. RASPRAVA**

Navedeni rezultati kliničkih pokazatelja, laboratorijskih i patohistoloških analiza, govore u prilog adekvatnosti epirubicinske nefrotoksičnosti kao eksperimentalnog modela nefrotskog sindroma u sklopu antraciklinske nefrotoksičnosti (30).

Eksperimentalne životinje (štakori i miševi) u ovom su radu nakon tjedan dana imale razvijene simptome nefrotskog sindroma - edeme i proteinuriju koji su u kontrolnoj skupini dalje progredirali zajedno s pojavom hiperlipoproteinemije, što odgovara literaturnim podacima (25-30).

Patohistološke promjene u obliku fokalne nekroze epitela proksimalnih kanalića bubrega, opisane su već tjedan dana nakon aplikacije epirubicina u kontrolnih skupina. Svjetlosnom mikroskopijom nisu nađene glomerularne promjene u bubrezima žrtvovanih štakora. Te promjene odgovaraju promjenama na tubulima opisanima u literaturi pri nefrotskom sindromu uzrokovanom antraciklinima koji uspoređuju s bolešću minimalnih promjena u ljudi (25-30). U bubrezima kontrolnih životinja nađena je dilatacija kanalića i nekroza tubularnog epitela najvećeg stupnja, nižeg stupnja u životinja tretiranih losartanom, a u životinja tretiranih BPC-om 157 u dozi 10 µg/kg nisu nađene patološke promjene, što govori u prilog povoljnom učinku ispitivanih agenasa. Sličan protektivni učinak BPC-a 157 na tubularni epitel nađen je i u eksperimentalnom modelu unilateralne nefrektomije. Protektivni učinak tretmana BPC-a 157 na tubularnom epitelu očituje se u očuvanju diureze i dozno-ovisnom nedostatku oligurije, za razliku od podataka dobivenih za kontrolne životinje nakon unilateralne nefrektomije (45).

## 5.1. Pentadekapeptid BPC 157

BPC 157 je pokazao bolji i raniji učinak od losartana na nekrozu tubularnog epitela i dilataciju kanalića bubrega, proteinuriju, hiperlipidemiju i edeme u eksperimentalnom nefrotskom sindromu izazvanom epirubicinom u štakora i miševa. To je u čvrstoj korelaciji s učincima BPC-a 157 u studiji o kroničnom srčanom zatajenju izazvanom doksorubicinom (70).

Bez obzira na to što renin angiotenzin sustav ima značajnu ulogu u progresiji bubrežnog oštećenja uzrokovanog antraciklinima (27), kaptopril nije pokazao učinkovitost na kliničke parametre doksorubicinom izazvanog nefrotskog sindroma u eksperimentalnih životinja (28), dok BPC 157 pokazuje značajnu učinkovitost u liječenju epirubicinom izazvanog nefrotskog sindroma u ovom radu. Proteinurija, najznačajniji klinički parametar praćenja razvoja nefrotskog sindroma, bila je značajno manja u životinja tretiranih BPC-om 157 u usporedbi s kontrolom, s tim da je učinak bio izraženiji pri većim dozama BPC-a 157. Proteinurija nakon aplikacija epirubicina rezultat je oštećenja u veličini glomerularnog selektivnog filtra i može biti vezana uz stvaranje tromboksana A<sub>2</sub> u glomerulima. Rane funkcionalne promjene uključuju smanjenu razinu glomerularne filtracije pojedinog nefrona i smanjen ultrafiltracijski koeficijent, unatoč povećanom ultrafiltracijskom pritisku (18, 19). Uvidom u nalaze proteinurije, zapaža se manja progresija nefrotskog sindroma u većine skupina štakora i miševa tretiranih BPC-om 157, a u skupini kotretmana u najvećoj dozi vidimo najbolji učinak te i oporavak miševa.

Proteinurija s posljedičnim promjenama u onkotskom tlaku plazme u nefrotskom sindromu vodi k hiperlipidemiji s povećanom sintezom i smanjenim katabolizmom apoB 100 lipoproteina. Hiperlipidemija ima veliku ulogu u progresiji bubrežnog oštećenja izazvanog adriamicinom pa i epirubicinom (20, 21). Povoljan učinak BPC-a 157 na hiperlipidemiju u ovom je radu izrazito važan zbog dokazanog nepovoljnog učinka hiperlipidemije na progresiju nefrotskog sindroma u čovjeka i eksperimentalnih životinja (88). Akumulacija lipida u mezangijalnim stanicama pri nefrotskom sindromu rezultira proliferacijom mezangijalnih stanica i matriksa, a sama hiperlipidemija povećava sklonost trombocita agregaciji i oslobađanju trombocitnog faktora rasta koji također inducira proliferaciju mezangijalnih stanica (25, 26). Učinak BPC-a 157 je i na hiperlipidemiju bio u skladu s učinkom na proteinuriju u smislu statistički

značajnog povoljnog učinka najveće doze u štakora tijekom cijelog praćenja, a u miševa u svim dozama 28. dan praćenja, ali uključujući i povoljan učinak na trigliceride. U skladu s povoljnim učinkom na sprječavanje razvoja nefrotskog sindroma u skupinama štakora u kotretmanu i miševa u kotretmanu i posttretmanu, tretiranih većim dozama BPC-a 157, imamo i statistički značajan veći korigirani 24-satni klirens kreatinina, što govori u prilog boljoj bubrežnoj funkciji. Zbog manje proteinurije i bolje bubrežne funkcije, stupanj edema bio je statistički značajno manji u skupinama tretiranim BPC-om 157 u većim dozama.

U prilog citoprotektivnoj i zaštitnoj endotelnoj aktivnosti BPC-a 157 (89) pokazali smo da je BPC 157 učinkovit protiv antraciklinske nefrotoksičnosti tako da štiti tubularni epitel te smanjuje proteinuriju i hiperlipidemiju u slučaju kada tretman započne neposredno nakon davanja epirubicina. Također smo pokazali usporediv povoljan učinak na progresiju proteinurije, hiperlipidemije i edema te odsutnost histopatoloških tubularnih promjena i kada tretman BPC-om 157 započne u okolnostima već razvijenog nefrotskog sindroma, sedam dana nakon aplikacije epirubicina. Taj učinak ovisi o dozi i izraženiji je pri većim dozama BPC-a 157.

Mehanizam povoljnog učinka BPC-a 157 nije sasvim razjašnjen, ali pokazujući konzistentnu zaštitu endotela i promociju angiogeneze u procesima cijeljenja, od posebnog bi interesa za učinak BPC-a 157 u bubrežnom zatajenju mogla biti njegova interakcija s NO-sustavom, korelirajući s učinkom losartana. BPC 157 sam inducira stvaranje NO-a koji se ne može inhibirati s L-NAME. Pokazujući oporavak NO-a potreban za oporavak u kongestivnom srčanom zatajenju i nefrotskom sindromu, BPC 157 prevenira i popravlja L-NAME hipertenziju zajedno sa suprotstavljanjem ulcerogenezi. Smatra se da je visoka vrijednost BET-1 znak poremećaja NO-sustava koja se događa pri doksorubicinom induciranom kroničnom srčanom zatajenju i može se očekivati i pri epirubicinom izazvanom bubrežnom zatajenju. Povoljan učinak BPC-a 157 svakako se može povezati u ova dva eksperimentalna modela (70).

Endotelin je potentan kardiovaskularni i bubrežni regulatorni peptid koji potiče vazokonstrikciju, iako njegova precizna fiziološka uloga još nije definirana. Dva su moguća pretpostavljena modela:

1. kao autokrini i parakrini hormon uključen je u dugotrajnu regulaciju vaskularnog tonusa i normalnu fiziologiju endotela (interakcija u obliku stimulacije s drugim hormonskim sustavima kao što su RAS i ANP)

2. kao proinflamatorni peptid, lokalno proizveden na mjestu vaskularnog oštećenja i ozljede, endotelin ima značajnu ulogu kao vazoaktivni i natriuretski peptid u regulaciji hemodinamskih i ekskretornih funkcija bubrega, čija je patofiziološka uloga opisana u bubrežnoj ishemiji, ciklosporinom induciranoj nefrotoksičnosti i kroničnom bubrežnom zatajenju (90-93).

Hiperlipidemija je u nefrotskom sindromu također povezana sa stimulacijom proizvodnje endotelina i to od strane HDL-a u stanicama proksimalnih tubula i inhibicijom učinka NO sustava s LDL, što sve rezultira smanjenom oksigenacijom bubrežnog tkiva (93).

BPC 157 je pokazao povoljan učinak na kongestivno srčano zatajivanje uzrokovano doksorubicinom u eksperimentalnih životinja (miševa i štakora). Učinak se pokazao kao značajno poboljšanje kliničke slike (praćeni su frekvencija disanja, srčana frekvencija, vrijednosti arterijskog tlaka), smanjenje povišenih vrijednosti BET-1, AST, ALT, CK (miševi i štakori) te LDH (miševi). Važno je istaknuti da su štakori tretirani BPC-om 157 ostali normotenzivni, za razliku od hipotenzivne kontrole, a hipotenzija je jedan od loših znakova kongestivnog srčanog zatajenja u štakora. Hipotenzija je također loš znak i pri nefrotskom sindromu u štakora te je povoljan učinak BPC-a 157 u održavanju normotenzije od velikog značaja za oporavak bubrežne funkcije. Iako su brojni peptidi uključeni u patofiziologiju kongestivnog srčanog zatajenja i nefrotskog sindroma, do sada nijedan nije pokazao povoljan učinak u doksorubicinom izazvanom kongestivnom srčanom zatajenju niti adriamicinom ili epirubicinom izazvanom nefrotskom sindromu.

Hiperkalemija se često javlja pri bubrežnom zatajenju i može ju pratiti ozbiljan poremećaj srčanog rada. U tretmanu hiperkalemije provode se konzervativne mjere i dijaliza. Povoljan antiaritmogeni učinak BPC-a 157 pri hiperkalemiji zapažen je na WT HEK293 stanicama. Taj se učinak pripisuje inhibiciji provodljivosti kalija na staničnoj membrani, što svakako govori u prilog primjeni BPC-a 157 u bubrežnom zatajenju (94, 95).

BPC 157 je stabilan u ljudskom želučanom soku čak oko 24 sata i kao takav pogodan je za terapiju kongestivnog srčanog zatajenja i nefrotskog sindroma. Značajno je napomenuti da je BPC 157 u svim studijama uvijek davan sam (bez nosača) i da su se povoljni učinci pokazali i pri intraperitonejskom i intragastričkom davanju. BPC 157 je dokazano povoljan u tretmanu različitih procesa cijeljenja, uz siguran toksikološki profil (70 i 89). U liječenju nefrotskog sindroma, za bolesti

minimalnih promjena, mezangijskog proliferativnog glomerulonefritisa, fokalne i segmentalne glomeruloskleroze s hijalinozom, membranskog i membranoproliferativnog glomerulonefritisa koriste se glukokortikoidi te u nekim oblicima i citotoksični lijekovi koji mogu imati ozbiljne nuspojave. S obzirom na siguran toksikološki profil BPC-a 157, ovaj rad sugerira njegovu moguću upotrebu u liječenju i prevenciji nefrotskog sindroma.

## 5.2. Losartan

Losartan u dozi od 50-100 mg dnevno ili u kombinaciji s drugim antihipertenzivnim lijekovima učinkovita je i dobro tolerirana terapija pri liječenju hipertenzije u bolesnika s bubrežnim zatajenjem u različitim stadijima (63.) Za model cisplatinске nefrotoksičnosti na štakorima, akutna blokada AII receptora losartanom u smislu pretretmana ne utječe na težinu stanja, dok kronična blokada AII receptora (losartanom u dozi 10 mg/kg ip.) smanjuje razinu uree i kreatinina te ubrzava povećanje tjelesne težine tretiranih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom. Mehanizam povoljnog učinka losartana veže se uz inhibiciju učinaka RAS sustava ne samo preko vaskularnog tonusa i glomerularne filtracije nego i preko oporavka bubrežnih stanica (69). Angiotenzin II glavni je medijator hemodinamskih i brojnih nehodinamskih učinaka koji ubrzavaju smanjenje funkcije oštećenog bubrega. Nakon početnog oštećenja bubrega nastupaju hemodinamski mehanizmi koji dovode do glomerularne hipertenzije. Ti mehanizmi uključuju oslobađanje prostaglandina s vazodilatacijom afrentne arteriole glomerula, retenciju Na koja vodi u arterijsku hipertenziju i oslobađanje angiotenzina II s vazokonstrikcijom eferentne arteriole. Glomerularna hipertenzija potpomaže nastanak proteinurije i fokalne segmentalne glomeruloskleroze te progresivno smanjenje glomerularne filtracije kao zatvoreni krug (46).

Adriamicin uzrokuje glomerularno oštećenje koje je vezano uza stimulativni učinak na glomerularni metabolizam više naznačen u jukstaglomerularnih nego u kortikalnih glomerula, što uzrokuje povećanu osjetljivost jukstaglomerularnih glomerula na adriamicin. Budući da jukstaglomerularne stanice luče renin, veoma je značajna uloga renin-angiotenzinskog sustava u daljnjoj progresiji bubrežnog oštećenja uzrokovanog antraciklinima (27). S obzirom na spomenutu ulogu RAS sustava i u antraciklinskom tipu oštećenja bubrega, inhibicija tog sustava losartanom mogla bi imati značajan učinak na glomerularnu filtraciju, vaskularni tonus i oporavak bubrežnih stanica u eksperimentalnom modelu nefrotskog sindroma uzrokovanog epirubicinom.

U doksorubicinskoj kardiomiopatiji losartan smanjuje vrijednosti AST, ALT, CK i LDH te sprječava daljnje povećanje BET-1 koji se smatra markerom oštećenja NO-sustava. Pad u stvaranju NO uključen je u patofiziološku modifikaciju koja se javlja i u srčanom zatajenju i u bubrežnom zatajenju zbog aktivacije angiotenzin I receptora u sklopu

renin-angiotenzinskog sustava. Povećanje oslobađanja NO u kongestivnom srčanom zatajenju i modelima hipertenzije do sada je opisivano za ACE inhibitore, losartan i druge AT1 inhibitore i moglo bi biti značajno i u eksperimentalnom modelu nefrotskog sindroma uzrokovanog epirubicinom (70). U ovom radu primijenjeni losartan pokazao je povoljan učinak na simptome nefrotskog sindroma izazvanog epirubicinom u štakora i miševa, utjecajem na smanjenje proteinurije, hiperlipidemije, perifernih edema i nekroze tubularnog epitela bubrega. Taj se učinak pojavljuje kasnije i manje je izražen u usporedbi s učinkom BPC-a 157.



## **6.0 ZAKLJUČCI**

U dvije vrste životinja epirubicinom smo izazvali nefrotski sindrom i primijenili tretman losartanom i BPC-om 157 u različitim dozama. Na znake nefrotskog sindroma pozitivno je utjecala primjena navedenih supstancija.

### **6.1. Učinak losartana na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miševa**

U ovom su radu prikazani statistički značajni učinci na nefrotoksičnost epirubicina u skupinama štakora i miševa tretiranih losartanom u sljedećim parametrima:

#### a) Klinički parametri:

- periferni edemi bili su statistički značajno manji u štakora tretiranih manjom dozom tijekom cijelog kotretmana te u ranijoj fazi posttretmana, a u miševa u kasnijoj fazi posttretmana. Pri većoj dozi bili su manji edemi u štakora u kasnijoj fazi kotretmana te tijekom cijelog posttretmana, a u miševa tijekom cijelog posttretmana
- tjelesna težina bila je statistički značajno veća za obje doze u štakora u ranijoj fazi kotretmana te u miševa kasnije u posttretmanu, što nije bilo posljedica viška tekućine u organizmu uvidom u stanje perifernih edema
- pasivan unos vode u 24 sata pri manjoj dozi bio je statistički značajno veći u štakora u ranijoj fazi praćenja kotretmana i posttretmana, a u miševa u kasnijoj. U većoj dozi veći unos vode bio je u štakora ranije i u miševa kasnije u kotretmanu. Manji unos vode bio je u miševa u ranijoj fazi kotretmana u obje doze te posttretmana u manjoj dozi
- Diureza u 24 sata bila je statistički značajno veća pri manjoj dozi u štakora ranije u kotretmanu, a u miševa i u kotretmanu i u posttretmanu. Pri većoj dozi 24-satna diureza bila je veća ranije u kotretmanu štakora te u miševa u kotretmanu i posttretmanu. Značajno je manja diureza bila u manjoj dozi u kasnijoj fazi kotretmana i posttretmana u miševa, što nije utjecalo na stanje perifernih edema. Pri većoj dozi značajno manja diureza bila je u kasnijoj fazi

posttretmana u štakora te u miševa tijekom kotretmana i posttretmana, što nije utjecalo na stanje perifernih edema.

b) Laboratorijski parametri:

- urea je bila statistički značajno manja u štakora kasnije u posttretmanu u obje doze te u miševa u kotretmanu u manjoj dozi
- kreatinin je bio statistički značajno manji u štakora kasnije u kotretmanu u obje doze. U miševa je postignut povoljan učinak u ranijoj fazi kotretmana u manjoj dozi.
- na klirens kreatinina u 24 sata povoljno je utjecao losartan u manjoj dozi u kasnijoj fazi kotretmana u štakora. U miševa se našao povoljan učinak ranije u kotretmanu u manjoj dozi te tijekom cijelog posttretmana u većoj dozi
- kolesterol je bio statistički značajno manji u miševa tretiranih i manjom i većom dozom losartana na kraju kotretmana i posttretmana
- trigliceridi su bili statistički značajno manji u štakora tretiranih većom dozom na kraju posttretmana. U miševa je postignut povoljan učinak na hipertrigliceridemiju na kraju kotretmana i posttretmana u obje doze
- proteinurija u 24 sata korigirana (mg/mg kreatinina) povoljno je utjecala na štakore na kraju kotretmana i posttretmana u obje doze. U miševa se našao povoljan učinak na proteinuriju na kraju kotretmana i u početnoj fazi posttretmana u obje doze, a u većoj dozi na kraju posttretmana.

c) Morfološki izgled patohistološkog nalaza bubrega pokazao je povoljan učinak losartana u većoj dozi na nekrozu tubularnog epitela i dilataciju tubula.

## **6.2. Učinak BPC-a 157 na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša**

U ovom su radu prikazani statistički značajni učinci na nefrotoksičnost epirubicina u skupinama štakora i miševa tretiranim pentadekapeptidom BPC 157 u sljedećim parametrima:

a) Klinički parametri:

- periferni edemi bili su statistički značajno manji u štakora tretiranih BPC-om 157 u najvećoj dozi tijekom cijelog kotretmana te krajem posttretmana, a u miševa u prvoj fazi posttretmana. U miševa je povoljan učinak, uz najveću dozu,

imala i srednja doza u cijelom kotretmanu te krajem posttretmana

- na tjelesnu težinu miševa i štakora tretman BPC-om 157 nije statistički značajno utjecao.
- pasivan unos vode u 24 sata bio je značajno veći u štakora pri srednjoj dozi u prvoj fazi posttretmana i miševa pri najvećoj dozi u prvoj fazi kotretmana. Značajno manji unos vode nađen je u miševa na kraju kotretmana i posttretmana u sve tri doze
- diureza u 24 sata bila je značajno veća u miševa tretiranih najvećom dozom tijekom cijelog kotretmana te na kraju posttretmana, a srednjom dozom na kraju kotretmana i najmanjom dozom na kraju posttretmana.

b) Laboratorijski parametri:

- urea je bila značajno niža pri najvećoj dozi na kraju kotretmana i pri svim dozama na kraju posttretmana u štakora. Povoljan učinak BPC-a 157 na vrijednosti uree u miševa pokazao se u najvećoj dozi tijekom cijelog kotretmana i na kraju posttretmana, a u srednjoj dozi na kraju kotretmana te tijekom cijelog posttretmana
- kreatinin je bio značajno niži u miševa tretiranih najvećom dozom BPC-a 157 tijekom cijelog kotretmana i posttretmana. U srednjoj dozi nađen je povoljan učinak na kraju kotretmana
- na klirens kreatinina u 24 sata povoljno je utjecao BPC 157 u miševa u najvećoj dozi tijekom cijelog kotretmana i posttretmana. U miševa tretiranih srednjom dozom također je nađen povoljan učinak tijekom cijelog posttretmana
- kolesterol je bio statistički značajno smanjen u štakora tretiranih BPC-om 157 u najvećoj dozi tijekom cijelog kotretmana i posttretmana. U miševa se našao povoljan učinak na hiperkolesterolemiju na kraju kotretmana i posttretmana u sve tri doze BPC-a 157.
- trigliceridi su bili značajno smanjeni na kraju posttretmana u štakora tretiranih najmanjom dozom BPC-a 157. Povoljan učinak na hipertrigliceridemiju u miševa našao se na kraju kotretmana i posttretmana u sve tri doze BPC-a 157.
- proteinurija u 24 sata korigirana (mg/mg kreatinina) bila je značajno snižena na kraju kotretmana i posttretmana u sve tri doze BPC-a 157. U prvoj fazi kotretmana u štakora proteinurija je bila smanjena pri najvećoj dozi, a posttretmana pri najvećoj i srednjoj dozi. U miševa je izražen učinak u najvećoj dozi u prvoj fazi kotretmana, u sve

tri doze u prvoj fazi posttretmana i tijekom cijelog posttretmana.

c) Morfološki izgled patohistološkog nalaza bubrega pokazao je da BPC 157 u najvećoj dozi povoljno utječe na sprječavanje nekroze tubularnog epitela i dilataciju tubula.

### **6.3. Uspoređivanje učinaka losartana i BPC-a 157 na nefrotoksičnost epirubicina u eksperimentalnim modelima štakora i miša**

Pentadekapeptid BPC 157 i referentni lijek losartan spriječili su i/ili popravili razvoj nefrotskog sindroma u epirubicinom tretiranih štakora i miševa. Ti zaključci slijede jer je nađeno da su tijekom cijelog protokola:

- a) Klinički parametri: u štakora i miševa tretiranih losartanom i BPC-om 157 u usporedbi s kontrolnim skupinama bili su značajno manje izraženi periferni edemi, s time da je score za BPC 157, u usporedbi s losartanom, bio manji na kraju kotretmana i posttretmana u štakora, a u miševa sve dane praćenja.
- b) Laboratorijski parametri: na kraju medikacije imamo značajno niže vrijednosti kolesterola i triglicerida u svim skupinama tretiranih miševa te niže vrijednosti kolesterola u kotretmanu i posttretmanu štakora tretiranih BPC-om 157 u najvećoj dozi, što daje prednost BPC-u 157 u tretmanu tog važnog znaka nefrotskog sindroma. Na kraju medikacije u svim je tretiranim skupinama bila značajno manja proteinurija, osim u miševa tretiranih manjom dozom losartana u posttretmanu, a zapaža se raniji i bolji učinak BPC-a 157 u najvećoj dozi na proteinuriju u svih skupina tretiranih štakora i miševa u kotretmanu i posttretmanu.
- c) Morfološki izgled patohistološkog nalaza bubrega u životinja tretiranih BPC-om 157: nije bilo patoloških promjena tubula u bubrezima, dok su u skupinama tretiranim losartanom te promjene bile značajno manje prisutne nego u kontrolnim skupinama.

Ovi podaci pružaju korisnu osnovu za daljnje proučavanje djelovanja (i primjene) pentadekapeptida BPC 157 (uz referentne agense) u izučavanju eksperimentalnog modela nefrotskog sindroma.

## **7. SAŽETAK**

U radu su prikazani učinci pentadekapeptida BPC 157 i losartana u eksperimentalnom modelu nefrotskog sindroma izazvanog primjenom epirubicina u štakora i miša. Nefrotski sindrom izazvan je jednokratnom intraperitonealnom primjenom epirubicina u dozi od 5 mg/kg TT. Eksperimentalne životinje su podijeljene u dvije skupine: kotretman, za koje je tretman započeo neposredno nakon aplikacije epirubicina, i posttretman, za kojih je tretman započeo 7 dana nakon aplikacije epirubicina. Životinje su svakodnevno tretirane intragastrički (štakori) ili u vodi za piće (miševi) losartanom u dozama 1 mg/kg i 10 mg/kg i pentadekapeptidom u dozama BPC-a 157 10 pg/ml, 10 ng/ml i 10 µg/kg, a žrtvovane su 28 dana nakon aplikacije epirubicina. Dobiveni su sljedeći rezultati: u kontrolnim skupinama neliječene su životinje imale izražene znakove nefrotskog sindroma u smislu edema s proteinurijom i hiperlipidemijom u značajno većoj mjeri od tretiranih životinja. Losartan je pokazao očekivani povoljan učinak na te znakove nefrotskog sindroma. BPC 157 je pokazao bolji i raniji učinak na proteinuriju i posljedične periferne edeme te hiperlipidemiju od losartana. Učinci su bili izraženiji primjenom mikrogramske doze. Histopatološka analiza također je pokazala povoljan učinak BPC-a 157 na potpuni izostanak promjena, a losartana na značajno manju pojavu promjena u usporedbi s kontrolom. Ti su rezultati u korelaciji s povoljnim učinkom BPC-a 157 na doksorubicinom izazvano kongestivno srčano zatajenje i sugeriraju njegovu upotrebu u liječenju nefrotskog sindroma.

## **SUMMARY**

We focused on epirubicin induced progressive renal failure and the effects of stable gastric pentadecapeptide BPC 157 and losartan. In rats and mice epirubicin 5 mg/kg was used intraperitoneally. Thereafter, all the animals were randomly assigned for two subsequent protocols: in co-treatment protocol with treatment started immediately after randomisation and in post-treatment protocol with treatment started 7 days after epirubicin injection. We used for medication: losartan (1 mg/kg and 10 mg/kg) and BPC 157 ( 10 pg/kg, 10 ng/kg, 10 µg/kg) given intragastric once daily (rats) or in drinking water (mice, 2 ml/mouse daily), while controls received an equivolumen of distilled water (rats, 5.0 ml/kg, i.g.) or drinking water (mice). The animals were sacrificed 28 days after epirubicin application. Seven days following epirubicin regimen, control animals (without treatment) have a signs of nephrotic syndrome (proteinuria, hyperlipidaemia and edema) with specific differences between species. These signs developed in control groups in 14. and 28. day. Losartan showed expected beneficial effects on signs of nephrotic syndrome. BPC 157 showed better and more rapid effect than losartan on hystopathological changes, proteinuria, hyperlipidaemia and edema in present study. Control animals had focal epitel necrosis of proximal tubule in significantly higher stage then animals treated with losartan. Animals treated with BPC 157 did not have pathological changes. These results are in correlation with beneficial effect of BPC-157 on doxorubicine induced congestive heart failure and suggest use of BPC 157 in treatment of nephrotic syndrome.

## **LITERATURA**

1. Harrison. Principi interne medicine. Prvo hrvatsko izdanje. Trinaesto izdanje. 1136-1140.
2. Cameron J. S., Glassock R. J. The nephrotic syndrome. New York, Marcel Dekker 1998.
3. Rees A. J., Camron J. S. Crescentic glomerulonephritis. Oxford textbook of Clinical nephrology. J. Cameron i sur. Oxford, Oxford University Press, 1992.: 408-437.
4. Glassock R. J.: Primary glomerular disease. The Kidney. 4 izd., B. M. Brenner, F. C. Rector Jr (eds) Philadelphia, Saunders, 1991., 1182-1279.
5. Ghione M. Development of adriamycin (NSC-123127). Cancer Chemoter. Rep. 1975.; 6:83-89.
6. DiMarco A. Adriamycin (NSC-123127): Mode and mechanism of action. Cancer Chemoter. Rep. 1975.; 6:91-106.
7. Carter S. K. Fifth New Drug Seminar: Adriamycin. Cancer Chemoter. Rep. 1975.; 6
8. Bachur N. S., Benjamin R. S., Hall T. C. Adriamycin: new drug seminar. Cancer Chemoter. Rep. 6.
9. Turić M., Kolarić K., Eljuga D. Klinička onkologija. Nakladni zavod Globus, 1996.; 217-218.
10. Sternberg S. S., Philips F. S. Biphasic intoxication and nephrotic syndrome in rats given daunomycin. Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res. 1967.; 8: 63.
11. Bertazzoli C., Chieli T., Ferni G., Ricevuti G., Solcia E. Chronic toxicity of adriamycin: A new antineoplastic antibiotic. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1972. 21: 287-301.
12. Young D. M. Pathologic effects of adriamycin (NSC-123127) in experimental systems. Cancer Chemoter. Rep. 1975. 6: 159-175.
13. Philips F. S., Gilladoga A., Marquardt H., Sternberg S. S., Vidal P. M. Some observations on the toxicity of adriamycin (NSC-123127). Cancer Chemoter. Rep. 1975.; 6: 177-181.
14. Fajardo L. F., Eltringham J. R., Stewart J. R., Klauber M. R. Adriamycin nephrotoxicity. Lab. Invest. 1980.; 43: 242-253.
15. Bertani T., Poggi A., Pozzoni R. et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. Sequence of pathologic events. Lab. Invest. 1982., 46: 16-23.
16. Weening J. J., Rennke H. G. Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat. Kidney Int. 1983.; 24: 152-159.

17. Bertani T., Rocchi G., Mecca G., Sacchi G., Remuzzi G. Adriamycin induced chronic proteinuria: A new model of glomerular focal sclerosis. *Kidney Int.* 1983.; 23: 192.
18. Okasora T., Takikawa T., Utsunomiya Y. et al. Suppressive effect of superoxide dismutase on adriamycin nephropathy. *Nephron* 1992.; 60: 199-203.
19. Michels L. D., Davidman M., Keane W. F. Adriamycin nephrotic syndrome: Glomerular hemodynamics and permselectivity. *Kidney Int.* 1983.; 23: 246.
20. Weening J. J., Rennke H. G. Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat *Kidney Int.* 1983.; 24: 152-159.
21. Washio M., Nanishi F., Onoyama K. Effects of anti-hyperlipidemic agent or dietary protein restriction on the progressive renal deterioration in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Int. Urol. Nephrol.* 1993.; 25: 295-303.
22. Washio M., Nanishi F., Onoyama K. Effect of fish oil rich in eicosapentaenoic acid on focal glomerulosclerosis of adriamycin-induced nephropathy in rats. *Cur. Ther. Res.* 1993.; 53: 35-41.
23. Bricio T., Molina A., Egido J., Gonzales E., Mampaso F. IL-1like production in adriamycin-induced nephrotic syndrome in rat. *Clinical & Experimental Immunology* 1992.; 87: 117-124.
24. Wang Z., Wang Z. G., Liu Z. Changes of glomerular fixed anionic charge sites in adriamycin nephrosis in rats. *Chinese Medical Journal* 1991.; 104: 128-133.
25. Washio M., Nanishi F., Okuda S., Onoyama K., Fujishima M. Alpha tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. *Nephron* 1994.; 68: 347-352.
26. Joles J. A., van Tol A., Jansen EHJM, Koomans H. A., Rabelnik T. J., Grond J., van Goor H. Plasma lipoproteins and renal apolipoproteins in rats with chronic adriamycin nephrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 1993.; 8: 831-838.
27. Kastner S., Wilks M. F., Gwinner W., Soose M., Bach P. H., Stolte H. Metabolic heterogeneity of isolated cortical and juxtamedullary glomeruli in adriamycin nephrotoxicity. *Renal Physiol. Biochem.* 1991.; 14: 48-54.
28. Hall R. L., Lee W. W., Fettman M. J. The progression of adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats and the effect of captopril. *Toxicology and applied pharmacology* 1986.; 82: 164-174.
29. Pispirgos K., Catsoulakos P., Karakiulakis G. Evaluation of kidney and liver subacute toxicity of antitumor agents using serum biochemical parameters in rats. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1993.; 31: 565-573.



30. Dardir M., Herman E. H., Ferrans V. J. Effects of ICRF-187 on the cardiac and renal toxicity of epirubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989.; 23: 269-275.
31. Seiwerth S., Sikirić P., Grabarević Z., et al. BPC 157 effect on healing. *J. Physiol (Paris)*. 1997.; 91:173-178.
32. Mikuš D., Sikirić P., Seiwerth S., et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns*; 2001.: 127 : 817-827.
33. Sikirić P., Seiwerth S., Grabarević Ž., Ručman R., Petek M., Jagić V., Turković B., Rotkvić I., Miše S., Zoričić I. et al. Salutary and Prophylactic Effect of Pentadecapeptide BPC 157 on Acute Pancreatitis and Concomitant Gastroduodenal Lesions in Rats. *Dig Dis Sci* 1996.; 41: 1518-1526.
34. Sikirić P., Seiwerth S., Grabarević Ž., Ručman R., Petek M., Jagić V., Turković B., Rotkvić I., Miše S., Zoričić I. et al. The influence of a novel pentadecapeptide BPC 157 on N -nitro-Larginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosal integrity and blood pressure. *European J Pharmacol* 1997.; 332:23-33.
35. Prkačin I., Aralica G., Perović D., et al. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuates and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J. Physiol (Paris)*. 2001.; 95: 295-301.
36. Sebečić B., Nikolić V., Sikirić P., et al. Osteogenic effect of gastric pentadecapeptide BPC 157, on the healing of segmental bone defect in rabbits. A comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone*. 1999., 24: 195-202.
37. Sikirić P., Seiwerth S., Grabarević Ž., Petek M., Ručman R., Turković B. The beneficial effects of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restrain stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 1994.; 54:63-68.
38. Sikirić P., Seiwerth S., Miše S., et al. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC 157 creams in burned mice. *Burns*. 2003; 29: 323-334.
39. Sikirić P., Šeparović J., Anić T., et al. The effect of pentadecapeptide BPC 157 , H2- blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J. Physiol. (Paris)*. 1999.; 93: 479-485.
40. Bošnjak Z. J., Graf B. M., Sikirić P., Stolwe D. F. Protective effects of newly isolated gastric peptide following hypoxic and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *FASEB J*. 1994.; 8:A12.

41. Sikirić P., Seiwerth S., Grabarević Ž., Ručman R., Petek M., Jagić V., Turković B., Rotkvić I., Miše S., Zoričić I. et al. The influence of a novel pentadecapeptide BPC 157 on N -nitro-Larginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosal integrity and blood pressure. *European J Pharmacol* 1997.; 332:23-33.
42. Grabarević Z., Tišljarić M., Džaja P. et al. The influence of nitric oxide and BPC 157 on stress induced gizzard erosions and development of pulmonary hypertension syndrome in chickens. *Dig. Dis. Sci.* 1997.; 42: 216.
43. Grabarević Z., Tišljarić M., Artuković B., et al. The influence of BPC 157 on nitric-oxide agonists and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J. Physiol. (Paris)*. 1997.; 21: 139-150.
44. Sikirić P., Gyires K., Seiwerth S., Grabarević Ž., Ručman R., Petek M., Rotkvić I., Turković B., Udovičić I., Jagić V. et al. The effect of pentadecapeptide BPC 157 on inflammatory, non-inflammatory, direct and indirect pain and capsaicin neurotoxicity. *Inflammopharmacology* 1993.; 2: 121-127.
45. Sikirić P., Petek M., Ručman R., Dodig M., Seiwerth S., Grabarević Ž. et al. Influence of BPC on experimental kidney lesions models. *Exp Clin Gastroenterol* 1991.; 25-26.
46. Wolf G., Butzman U., Wenzel U. O. The Renin-Angiotensin System and progression of renal disease: From hemodynamics to cell biology. *Nephron physiology* 2003.; 93: 3-13.
47. Schieppati A., Perico N., Remuzzi G. Preventing end-stage renal disease: The potential impact of screening and intervention in developing countries. *Kidney International* 2003.; 63: 1948-1950
48. Lo M. W., Goldberg M. R., McCrea J. B., Lu H., Furtek C. I., Bjornsson T. D. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3714 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995.; 58: 641-649.
49. Wong P. C., Christ D. D., Wong Y. N., Lam G. N. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonist: pharmacokinetics and pharmacodynamics in rat of EXP3714, an active metabolite of losartan. *Pharmacology* 1996.; 52:25-29.
50. Sasaki M., Fujimura A., Harada K., Sunaga K., Ebihara A. Clinical pharmacology of multiple-dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in patients with essential hypertension. *J Clin Pharmacol* 1996.; 36: 403-408.
51. Goa K. L., Wagstaff A. J. Losartan potassium: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs* 1996.; 51:820-845.

52. Csajka C., Buclin T., Brunner H. R., Biollaz J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic profile of angiotensin II receptor antagonists. *Clin Pharmacokinet* 1997.; 32: 1-29.
53. Lankford S. M., Plummer D., Hellyer P., Christ D. D., Bai S. A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relations of losartan and EXP3714 in porcine animal model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997., 30: 583-590.
54. Cushman D. W., Ondetti M. A. Inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Prog Med Chem* 1980.; 17: 41-103.
55. Fenoy F. J., Miličić I., Smith R. D., Wong P. C., Timmermans PBMWM, Roman R. Effects of DuP753 on renal function of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1991.; 4: 321-326.
56. Raya T. E. et al. Hemodynamic effects of direct angiotensin II blockade compared to converting enzyme inhibition in rat model hypertension. *Am J Hypertens* 1991.; 4: 334-340.
57. Fontoura B. M. A., Nussenzveig D. R., Timmermans PBMWM, Mack T. DuP 753 is potent nonpeptide antagonist of angiotensin II receptors on isolated perfused rat kidney and cultured renal cells. *Am J Hypertens* 1991.; 4: 303-308.
58. Loutzenhiser R., Epstein M., Hayashi K., Takenaka T., Forster H. Characterization of the renal microvascular effects of angiotensin II antagonist DuP 753: Studies in isolated perfused hydronephrotic kidneys. *Am J Hypertens* 1991.; 4: 309-314.
59. Cogan M. C., Xie M. H., Liu F. Y., Wong P. C., Timmermans PBMWM. Effects of DuP 753 on proximal nephron and renal transport. *Am J Hypertens* 1991.; 4: 315-320.
60. Ueda H., Sugiyama K., Yokota M., Matsuno K., Ezaki T. Reduction of Cisplatin Toxicity and Lethality by Sodium Malate in Mice. *Biol Pharm Bull* 1998.; 21:34-43.
61. Barry M.B., Marke E. C., Dick de Zeeun, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patient with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2001.; 345: 861-869.
62. Dahlof B., Devereux R. B., Kjeldsen S. E., et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002.; 359: 995-1003.
63. Toto R., Shultz P., Raij L., Mitchel H., Shaw W. et al. Efficacy and tolerability of losartan in hypertensive patients with renal impairment. *Hypertension.* 1998.; 31:684-691.
64. Dirk Laverman G., Andersen S., Rossing P., Navis G., De Zeeuw D. and Parving H. Renoprotection with and without blood pressure

- reduction. *Kidney International*, Vol.67, Supplement 94 2005. S54-S59.
65. Shihab F. S., Bennett W. M., Tanner A. M., Andoh T. F. Angiotensin II blockade decreases TGF- $\beta$ 1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 1997.; 52: 660-673.
  66. Pichler R. H. et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: Roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 1995.; 6: 1186-1196.
  67. Burdmann E. A. et al. Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1995.; 269: 38-44.
  68. Thomas S. E. et al. Accelerated apoptosis characterises cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998.; 53: 897-908.
  69. Deegan P. M., Nolan C., Ryan P. M., Basinger M. A., Jones M. M., Hande K. R. The Role of the Renin-Angiotensin System in Cisplatin Nephrotoxicity. *Renal Failure* 1995.; 52: 660-673.
  70. Lovrić-Benčić M., Sikirić P., Šeparović-Hanževački J. et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rat and mouse. *J Pharm Sci* 2004.; 95: 19-26.
  71. Cannan C. R., Burnett J. C., Lerman A. Enhanced coronary vasoconstriction to endothelin B receptor activation in experimental chronic heart failure. *Circulation.* 1996.; 93: 646-651.
  72. Cannan C. R., Verghese M., Lerman A. New insight into coronary endothelial dysfunction. Role of endothelin. *J Lab Clin Med.* 1998.; 131: 300-305.
  73. Kiowski W., Sutsch G., Hunziker P., et al. Evidence for endothelin-1 mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet.* 1995.; 346: 732-736.
  74. Berger R., Strecker K., Huelsmann M. et al. Prognostic power of neurohumoral parameters in chronic heart failure depends on clinical stage and observation period. *J. Heart Lung Transpl.* 2003; 22: 1037-1045.
  75. Mulder P., Richard V., Derumeaux G., et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1997., 96 : 1976.-1982.
  76. Nakamura M., Saito S., Yoshida H., Arakawa N., Sugawara S., Hiramori K. Effects of chronic subdepressor dose of angiotensin II type 1 receptor antagonist on endothelium- dependent vasodilatation in patient with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacolephrotoxicity.* *Renal Failure* 1995.; 52: 660-673.

77. Pacher R., Bergler-Klein J., Globits S., et al. Plasma big endothelin -1 concentration s in congestive heart failure compared to systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 1993.; 71: 1293-1299.
78. Trochu J. N., Bouhour J. B., Kaley G., Hintze T. H. Role of endothelium -derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implication in health and disease. *Circ Res.* 2000.; 87: 1108-1117.
79. Vasku A., Spinarova L., Goldbergova M., et al. The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphism (G8002 and – 3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. *Exp. Mol. Pathol.* 2002.; 73:230-233.
80. Yamauchi Y., Kurosaki E., Azuma H., Pathophysiological role of endothelin-1 in the vascular remodeling process. *Folia Pharmacol Jpn (Nippon Yakurigaku Zasshi).* 2002.; 120 Suppč 1: 79P-91P. (in Japanese).
81. Yoshizumi M., Kagami S., Suzaki Y., et al. Effect of endothelin-1 (1-31) on human mesangial cell proliferation. *Jpn J Pharmacol.* 2000.; 84: 146-155.
82. Lavalley M., Takamura M., Parent R., Thorin E. Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. *Heart Fail. Rev.* 2001.; 6: 265-276.
83. Ozaki K., Yamamoto T., Ishibasi T., Matsubara T., Nishio M., Aizawa Y. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 expression cells by fluvastatin in human vascular endothelial cells. *Jpn J Pharmacol.* 2001., 85: 147-154.
84. Wagner F. D., Buz S., Knosalla C., Hetzer R., Hoher B. Modulation of circulating endothelin-1 and BET by nitric oxide inhalation following left ventricular assist device implantation. *Circulation.* 2003.; 108 Suppl. 1: 278-284.
85. Wittstein I. S., Kass D. A., Pak P. H., Maughan W. L., Fetis B., hare J. M. Cardiac nitric oxide production due to angiotensin-converting enzyme inhibition decreases beta adrenergic myocardial contractility in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol* 2001.; 38: 429-435.
86. Aldieri E., Bergandi L., Riganti C., Costa Magna C., Bosia A., Ghigo D. Doxorubicin induces an incese of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002., 185: 85-90.
87. Jung I. D., Lee J. S., Yun S.Y., et al. Doxorubicin inhibits the production of nitric oxide by colorectal cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* 2002.; 25: 691-696.
88. Marsh J. B. Lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome. *Frontiers in Bioscience* 2002.; 7: e326-338.

89. Sikirić P., Seiwerth S., Brčić L., Blagaić AB, Zoričić I., Sever M. Et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach and vascular response. *Inflammo-pharmacology* 2006.; 14:214-21.
90. Simonson M. S., Dunn M. J. The molecular mechanism of cardiovascular and renal regulation by endothelin peptides. *J Lab Clin med.* 1992. Jun; 119(6): 622-39.
91. Clavell A. L., Burnett J. C. Jr. Physiologic and pathophysiologic roles of endothelin in the kidney. *Curr Opin Nephrol hypertens.* 1994. Jan;3(1):66-72.
92. Ochodnicky P., Henning R. H., Buikema H., Kluppel A. C., van Wattum M. et al. Renal endothelial function and blood flow predict the individual susceptibility to adriamycin-induced renal damage. *Nephrol Dial Transplant.* 2009. Feb; 24(2): 413-20.
93. Moorhead J. F., Brunton C., Fernando RL, Burns A., Varghese Z. Do glomerular atherosclerosis and lipid mediated tubulo-interstitial disease cause progressive renal failure in man? *Blood Purif.* 1996.;14(1): 58-66.
94. Barišić I., Balenović D., Sindić A., Udovičić M., Lovrić-Benčić M., Šeparović-Hanževački J., Seiwerth S., Sikirić P. BPC 157 inhibits K<sup>+</sup> conductance in WT HEK293 cells. *Liječnički vjesnik* 2010.; Supplement 4:59-60.
95. Sikirić P., Lovrić-Benčić M., Barišić I., Balenović D. BPC-157 in cardiology. *Liječnički vjesnik* 2010.; Supplement 4: 137.

## **Životopis autora**

Valentina Ćorić Martinović rođena je 1969. godine u Brčkom. Medicinski fakultet u Sarajevu upisala je 1987. godine, a diplomirala 1992. godine. Tijekom studija bila je demonstrator na Institutu za anatomiju. Nakon završenog pripravničkog staža, od 1993. do 1994. godine radila je kao asistent na Institutu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu. Od 1994. do 1998. radila je kao liječnik opće medicine u Domu zdravlja Županja. Poslijediplomski studij iz kliničke farmakologije završila je 1997. godine i stekla akademski stupanj magistra znanosti iz znanstvenog područja biomedicine i zdravstva. Od 1998. godine radi na Internom odjelu Opće bolnice Vinkovci. Završila je specijalizaciju iz interne medicine 2004. godine, a subspecijalizaciju iz nefrologije 2010. godine. Autor je radova objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents i drugih radova objavljenih u medicinskim časopisima te prikazanim na međunarodnim i domaćim kongresima. Član je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskog društva hipertenzije i ERA-EDTA (European renal association - European dialysis transplantation association).

Majka je dviju kćeri - Sonje i Olje.