

Učinci pentadekapeptida BPC 157 na modelima stresne inkontinencije kod ženki štakora

Jandrić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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:105:224537>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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





Središnja medicinska knjižnica

Jandrić, Ivan (2014) *Učinci pentadekapeptida BPC 157 na modelima stresne inkontinencije kod ženki štakora [The effects of pentadecapeptide BPC 157 in stress urinary incontinence models in female rats]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2185>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Jandrić

**Učinci pentadekapeptida BPC 157
na modelima stresne inkontinencije
kod ženki štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Jandrić

**Učinci pentadekapeptida BPC 157
na modelima stresne inkontinencije
kod ženki štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Lektura: Ivana Jandrić, prof.

Prijelom: Zvezdana Došlić, prof.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Stresna urinarna inkontinencija (SUI).....	1
1.1.1. Anatomske i funkcionalne supstrate SUI.....	1
1.1.2. Mogućnosti liječenja SUI.....	9
1.1.2.1. Konzervativno liječenje	9
1.1.2.2. Farmakološko liječenje	10
1.1.2.3. Kirurško liječenje.....	13
1.2. Pentadekapeptid BPC 157	18
1.2.1. Opće značajke pentadekapeptida BPC 157	18
1.2.2. Pentadekapeptid BPC 157 – osvrt na dosadašnja istraživanja.....	21
1.3. Pozadina i obrazloženje istraživanja	28
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	36
3. MATERIJALI I METODE	37
3.1. Pentadekapeptid BPC 157	37
3.2. Životinje.....	37
3.3. Eksperimentalni modeli stresne urinarne inkontinencije.....	37
3.3.1. Transabdominalna uretroliza	38
3.3.2. Protrahirana vaginalna dilatacija.....	39
3.4. Terapijski protokoli	40
3.5. Mjerenje LPP-a	41
3.6. Histološka analiza	42
3.7. Statistička analiza	43
4. REZULTATI.....	44
4.1. Mjerenje LPP-a	44
4.2. Histološka analiza	46
5. RASPRAVA.....	54
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. SAŽETAK.....	66
8. SUMMARY	68
9. LITERATURA.....	70
10. ŽIVOTOPIS	82
11. POPIS KRATICA.....	83

1. UVOD

1.1. Stresna urinarna inkontinencija (SUI)

Prema Međunarodnom društvu za inkontinenciju (eng. *International Continence Society, ICS*) SUI definira se kao neželjeno otjecanje mokraće kroz uretru istodobno s porastom intraabdominalnog tlaka, zbog kojeg intravezikalni tlak nadvlada tlak u uretri, uz odsutnu aktivnost detruzora [1]. Predstavlja rastući kronični medicinski, socijalni, pa i ekonomski problem, koji bitno narušava kvalitetu života. Prevalencija te bolesti iznosi 15% i dvostruko je veća u ženskoj populaciji [2], gdje je prisutna u 86% inkontinentnih žena, bilo kao čista (50%) ili kao miješana vrst (36%) inkontinencije [3].

1.1.1. Anatomski i funkcionalni supstrat SUI

U proteklih 100 godina, koliko postoji kao entitet, etiopatogeneza SUI intenzivno je istraživana s ciljem razvoja optimalnih preventivnih i terapijskih strategija. Uz tehnološki napredak i nove modalitete u dijagnostici, spoznaje o nastanku SUI evoluirale su od čisto anatomskih do integralnih anatomskih i funkcionalnih teorija [4].

Davne 1912., Howard A. Kelly svojim je uretroskopom dokumentirao zjapeći vrat mjehura koji se nepotpuno zatvara kod žena sa SUI i svojim operacijama plikacije vrata mjehura postigao značajno poboljšanje simptoma [5]. Deset godina poslije, Bonney je uočio abnormalnu mlohavost prednjeg vaginalnog zida u inkontinentnih žena i postavio hipotezu da je gubitak anatomske potpore uretre glavni uzrok SUI [6]. Uspjeh Kellyjevih operacija pripisao je upravo ojačanju

suburetralnih potpornih struktura, a ne samom sužavanju vrata mokraćnog mjehura. Proširujući tu teoriju, sredinom 20. stoljeća Jeffcoate i Roberts postulirali su gubitak ureterovezikalnog kuta kao ključno obilježje u SUI [7]. Enhörning [8] je 1960. razvio uretralni kateter s dva pretvarača tlaka na razmaku od 5 cm, što mu je omogućilo istodobno mjerenje intravezikalnog i intrauretralnog tlaka. Dokazujući da je intrauretralni tlak i u mirovanju i pri porastu intraabdominalnog tlaka (kašljanju) veći od intravezikalnog tlaka, postavio je hipotezu o prijenosu tlaka iz abdomena na mokraćni mjehur i proksimalni dio uretre smještene iznad dna zdjelične dijafragme [9]. Neuspjela transmisija intraabdominalnog tlaka na uretru koja se, gubeći anatomske potpore, „spustila“ ispod nivoa zdjelične dijafragme bila bi uzrokom SUI. Daljnja istraživanja ubrzo su implicirala da gubitak uretralne potpore nije jedini razlog nastanka SUI, opisujući tako žene koje su bile kontinentne usprkos descenzusu mokraćnog mjehura i uretre, ali i inkontinentne bolesnice koje su imale uretrovezikalni kut isti kao i kod kontinentnih žena [10,11]. U urodinamskim studijama prijenosa intraabdominalnog tlaka na uretru koje je u osamdesetim proveo Bump s kolegama [12], smanjenu transmisiju tlaka (ispod 90%) redovito su imale gotovo sve žene sa SUI, no specifičnost takvog nalaza bila je svega 53%, što ukazuje da su i mnoge kontinentne žene imale jednako smanjen prijenos tlaka. S napretkom neurofizioloških testova, istraživanja denervacije zdjeličnog dna provedena od strane Snooksa i suradnika [13] objavljena 1985. pokazala su da je neuronalni prijenos impulsa u perinealnim granama pudendalnog živca prolongiran u inkontinentnih žena. Korelirajući taj ispad s urodinamskim mjerenjima, Smith [14] je jasno demonstrirao denervacijsku leziju uretralnog sfinktera i mišića dna zdjelice u kohorti žena sa SUI. Takvo objašnjenje

nastanka SUI bilo je inkompatibilno s dotada prevladavajućim teorijama o prijenosu intraabdominalnog tlaka, dovodeći do dihotomne podjele etiologije SUI na gubitak uretralne anatomske potpore i zatajenje uretralnog sfinktera. Međusobna isključivost uzroka SUI podržana je kliničkom praksom u kojoj su pacijentice s gubitkom anatomske potpore uretre bile relativno uspješno oporavljene s retropubičnom uretropeksijom, a one s intrizičkom deficijencijom uretralnog sfinktera s tzv. sling operacijama [15].

Međutim, ostalo je neriješeno pitanje objektiviziranja disfunkcije uretralnog sfinktera, vjerojatno kao posljedica mjerenja različitih modaliteta funkcije uretralnog sfinktera [16]. Naime, dinamička funkcija uretre ovisna je o više različitih čimbenika. Ženska je uretra mišićna cijev obložena epitelom pločastog tipa koji prema bazi mjehura prelazi u kubični, a ispod kojeg je rahlo vezivno tkivo s bogatom krvnom opskrbom koja tvori suburotelne vaskularne pleksuse. Glatko mišićno tkivo sfinktera uretre leži duboko u uroepitelu i u rahlom vezivu i sastoji se od unutarnjeg longitudinalnog i vanjskog cirkularnog sloja. Dok uzdužno mišićje sudjeluje pri aktu mikcije na način da svojom kontrakcijom skraćuje uretru i otvara vrat mokraćnog mjehura, cirkularni vanjski sloj miješa se sa skeletnim mišićnim vlaknima i igra ulogu u održavanju kontinencije [17], a pod kontrolom je autonomnog nervnog sustava koji uključuje simpatičku inervaciju odgovornu za kontrakciju sfinktera putem aktivacije α -adrenergičkih receptora, a koju modulira parasimpatikus, posredstvom muskarinskih receptora [17,18]. Ovo glatko mišićje okruženo je poprečno-prugastim mišićnim vlaknima koja predstavljaju vanjski uretralni sfinkter. U proksimalne dvije trećine uretre vanjski uretralni sfinkter sačinjen je od cirkularnih skeletnih mišića (sfinkter uretre), a u distalnoj trećini čine

ga uretrovaginalni sfinkter i kompresor uretre, koji oba polaze s vaginalnog zida i ishiopubičnog ramusa i oblažu stražnji zid uretre [17,18]. Vanjski uretralni sfinkter posjeduje somatsku inervaciju putem pudendalnog živca. [18,19]. Funkcionalne animalne studije pokazale su da tlaku zatvaranja uretre otprilike podjednako doprinose kako vanjski tako i unutarnji uretralni sfinkter, ali i nemuskularna komponenta uretre, pod kojom se podrazumijeva doprinos vaskularnih pleskusa u adekvatnoj mukoznoj koaptaciji [20]. Rud [21] je na seriji kontinentnih žena podvrgnutih radikalnoj histerektomiji intraoperativnim mjerenjima na početku, nakon blokade poprečno-prugaste muskulature te nakon klemanja unutarnje ilijačne arterije, ustanovio da tlaku zatvaranja uretre poprečno-prugasti mišići doprinose s 33%, vaskularni pleskusi s 28%, a preostalih 39% kontribucija su glatkih mišića i vezivnog tkiva. Prema tome, disfunkcija uretralnog sfinktera može nastupiti kao posljedica disfunkcije jednog ili više čimbenika. Štoviše, mnoge žene imaju istovremeno objektivni gubitak suburetralne anatomske potpore i insuficijenciju uretralnog sfinktera, čime je bitno poljuljan koncept o dihotomnoj etiologiji SUI. Također, ostalo je neodgovoreno pitanje koji su točno anatomske i strukturalni faktori odgovorni za gubitak prijenosa tlaka u Enhörningovoj teoriji SUI.

U nastojanju anatomske-funkcionalnog objašnjenja nastanka SUI Petros i Ulmsten [22] publiciraju 1990. god. integralnu teoriju. Prema njihovoj teoriji, i SUI i urgentna inkontinencija, svaka iz različitih razloga, posljedica su laksativnosti prednje vaginalne stijenke. To stanje može biti uzrokovano slabošću samog zida vagine ili njezinih potpornih struktura (ligamenata, mišića ili vezivnog tkiva). Rodnica ima, prema njima, dvostruku ulogu: ona prenosi mišićne kontrakcije

vezane uz otvaranje i zatvaranje vrata mokraćnog mjehura, a služi i kao potpora hipotetskim receptorima za istezanje u proksimalnoj uretri i vratu mokraćnog mjehura, sprečavajući time pojavu urgencije. Oštećeni kolagen/elastin u zidu rodnice i ligamentarnom aparatu uzrokuje mlohavost, što mišićne kontrakcije čini neefikasnim i dovodi do pojave SUI, a aktivacija neodgovorajućih mikcijskih refleksa (stimulacija receptora istezanja na bazi mjehura) dovodi do nestabilnosti detruzora što je uzrok simptoma urgencije.

Konsolidirajuću teoriju o nastanku SUI, koja istovremeno obuhvaća i gubitak anatomske uretralne potpore i disfunkciju uretralnog sfinktera predstavio je 1996. godine ginekolog John O. L. DeLancey [23]. Kombinirajući teorije svojih prethodnika, Bonneya [6] i Enhörninga [9], hipotezirao je da pubocervikalna fascija predstavlja uporište poput viseće mreže za ležanje (eng. *hammock*) na koje se naslanja vrat mjehura i tako pruža oslonac za kompresiju proksimalnog dijela uretre za vrijeme porasta intraabdominalnog tlaka. Gubitak takvog oslonca (njegova mlohavost ili prepomičnost) kompromitirao bi prijenos intraabdominalnog tlaka na uretru i nastala bi SUI. Međutim, DeLancey istovremeno naglašava da gubitak uretralne potpore nije jedini razlog inkontinencije – njegove anatomske studije na kadaverima potvrdile su povezanost pubocervikalne fascije s mišićnim vlaknima levatora anusa na mjestu njegove insercije na pubičnoj simfizi, što bi omogućilo aktivno podizanje vrata mjehura prilikom kontrakcije tog mišića kod povišenja intraabdominalnog tlaka. Autor zaključuje da je neuromuskularna ozljeda važnija determinanta od uretralne hiperobilnosti u patogenezi SUI, naglašavajući nužan doprinos mišićnih vlakana u održavanju kontinentnosti: kao aktivna komponenta oni se oporavljaju nakon rastezanja i kontrahiraju kad je to

potrebno, dok se vezivno tkivo nepovratno rasteže kad je izloženo konstantnom opterećenju. Takav biomehanički princip u kojem mišićno tkivo sprječava kontinuirano opterećenje veziva logičan je i konzistentno prisutan u fiziologiji i drugih mišićno-vezivnih sustava; npr. stabilnost koljena aktivno održavaju mišići, dok su ligamenti tek kratkotrajno i povremeno angažirani.

Proučavajući velik broj anatomskih i funkcionalnih čimbenika koji doprinose nastanku SUI, DeLancey je 2008. zaključio ROSE studiju (eng. *Research on Stress Incontinence Etiology*) [24], kojom je demonstrirao da daleko najveću (više nego dvostruku) korelaciju SUI sa sniženim tlakom zatvaranja uretre, u usporedbi s korelacijom parametara anatomske potpore uretre (aksijalna mobilnost uretre, stupanj prolapsa zdjeličnih organa, snaga levatora anusa, veličina genitalnog hijatusa), koji su također značajni, ali u bitno manjoj mjeri. Time je dodatno podržan koncept koji u pitanje dovodi gubitak anatomske uretralne potpore kao glavnog uzroka SUI.

Žene koje u anamnezi imaju dva vaginalna porođaja imaju omjer izgleda (eng. *odds ratio*) 2.4 za razvoj SUI u usporedbi s onima koje su rađale carskim rezom [25]. Iako je porođajna trauma odavno prepoznata kao ključni etiološki čimbenik SUI, način na koji se pritom alterira kontinencijski aparat nije do kraja rasvijetljen. Proučavajući relativni doprinos uretralne mobilnosti i intrizičke uretralne disfunkcije, DeLancey je u studijama istraživanja parova (eng. *case-control study*) žena koje su 9-12 mjeseci postpartalno reportirale simptome SUI iznašao dvostruko veću učestalost lezije mišića levatora anusa nego u kontrolnoj skupini kontinenih žena [26], što je u kontrastu s rezultatima ROSE studije u kojoj

su sudjelovale žene starije životne dobi. Uočenu diskrepancu u kojoj je neposredno po porodu nastanak SUI posljedica podjednakog doprinosa uretralne hipermobilnosti i intrizičke uretralne disfunkcije, dok je u starijoj životnoj dobi presudan pad same uretralne kompetencije, objasnio je postulirajući da oštećenje mišića levatora anusa (i/ili pudendalnog živca) nastupa prilikom vaginalnog porođaja, nakon čega se njegova funkcija tek marginalno agravira s dobi, dok gubitak uretralne kompetencije neminovno proporcionalno progredira sa starenjem. Doista, rezultati elektromiografije (EMG) i testova provodljivosti pudendalnog živca u britanskoj studiji koju su na 96 prvorodilja izveli Allen i sur., jasno su ukazali na parcijalnu denervaciju/oštećenje mišića dna zdjelice nakon poroda, s uspješnim spontanom cijeljenjem (reinervacijom) u (tek) 80% slučajeva. Autori zaključuju da zaostala parcijalna denervacija dna zdjelice predstavlja prvi korak prema budućoj SUI i/ili prolapsu organa zdjelice [27]. Neovisno o tome, istraživanja Ruda i suradnika [28], dokumentirala su linearan pad tlaka zatvaranja uretre, otprilike 15% po dekadi. Nadalje, radna skupina DeLancya dokazala je gubitak otprilike 1% poprečno-prugaste muskulature uretre po godini starenja koji je u paraleli s smanjenjem tlaka zatvaranja uretre, kao i nešto manje dramatičan pad udjela glatke muskulature uretre (identificirane imunohistokemijski bojanjem na glatkomišićni aktin) u kadavera starije životne dobi [29]. Susljedne kompjuterizirane morfometrijske analize parauretralnog tkiva u kontinentnih žena premenopauzalne i postmenopauzalne dobi, norveške skupine znanstvenika [30] utvrdile su prosječni sastav od 56% vezivnog tkiva, 30% glatke muskulature, 11% krvnih žila, 2% poprečno-prugaste muskulature, te 1% živčanog tkiva, čija distribucija ne varira bitno duž uretre, no udjel vezivnog tkiva u postmenopauzalnih

žena veći je za oko 10%, dok je udjel krvožilja značajno smanjen. S druge strane, južnokorejski autori [31], koristeći magnetsku rezonancu, ustanovili su značaje morfološke razlike i u samoj uretri (stanjenje poprečnoprugaste muskulature) i u potpornim strukturama uretre (distorzija peri-, para- i pubouretralnih ligamenata) uspoređujući žene sa i bez SUI. Prema DeLanceyu, iako je uloga uretralnih potpornih struktura u patofiziologiji SUI dokazano manja nego što se prije mislilo, identifikacija onog faktora koji u anatomske uretralnoj potpori funkcionalno alterira mehanizam kontinencije ostaje vitalno pitanje, za koje nedostaje *experimentum crucis* [26]. Objektivizacija peripartalne denervacijske traume zdjeličnog dna, iako tek dijelom rasvjetljava patofiziologiju SUI, stvara prostor za kreiranje preventivskih i pravovremenih terapijskih strategija za SUI.

Napokon, kompleksni neuralni mehanizmi kontrole donjeg urinarnog trakta, koji uključuju barem desetak monoaminskih (noradrenalin, serotonin, dopamin), aminokiselinskih (glutamat, γ -aminobutirična kiselina (GABA)), peptidnih (neuropeptid Y (NPY), galanin, vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), kalcitonin genu srodan peptid (eng. *calcitonin gene related peptide*, CGRP)) i drugih (npr. acetilkolin) neurotransmitera, sa svojom kolokalizacijom, kotransmisijom, *cross-talkom*, te presinaptičkom i postsinaptičkom modulacijom predstavljaju još uvijek nedovoljno istražen teren u patofiziologiji SUI [32].

Zaključno, neporeciva multifaktorijalnost kako fiziologije tako i patofiziologije SUI implicira da se ista teško može objasniti tek jednom teorijom, odnosno da je klinička slika SUI posljedica kompilacije više anatomske i funkcionalne ispada. Ilustrirajući tu multifaktorijalnost američki autori predložili su

tzv. „teroriju trampolina“ [33], kojom ne uvode nove elemente u patofiziologiju SUI, već metaforom trampolina, koji tek sa većim brojem potrganih opruga gubi svoju funkciju, upućuju na nužnost širenja horizonata u istraživanju patofiziologije, odnosno prevencije i terapije SUI.

1.1.2. Mogućnosti liječenja SUI

Idealna terapija za SUI trebala bi biti 100% učinkovita, aplikabilna u svim patofiziološkim varijacijama SUI, trajnog učinka, minimalno invazivna, bez nuspojava i/ili komplikacija, jednostavnog načina primjene, i konačno, dostupna i prihvatljive cijene, no, na žalost, takva za sada ne postoji [34]. Imajući na umu prethodno opisanu kompleksnu i multifaktorijsku patofiziologiju SUI, kao i činjenicu da ne postoji optimalan modus liječenja koji bi se primijenio na sve pacijente sa SUI, današnji uspjeh liječenja ovisi o uvažavanju niza aspekata i individualnih značajki kao što su dob, paritet, etiološki i patofiziološki supstrat inkontinencije, objektivni i subjektivni stupanj težine bolesti, prisutnost pridruženih stanja; vaginalni prolaps ili druga zdjelična patologija, prethodno provedena kirurška ili druga terapija, napose i sama spremnost pacijenta za prihvaćanje rizika, morbiditeta, uspjeha (i neuspjeha) te cijene liječenja. Konsekventno, za terapiju SUI predlažu se heterogene skupine konzervativnih, farmakoloških i kirurških opcija.

1.1.2.1. Konzervativno liječenje

Načelno, konzervativna terapija predstavlja prvu liniju liječenja i to ponajprije kod blažih simptoma SUI [35]. Inicijalno se predlažu intervencije na

području stila života; prestanak pušenja, gubitak na tjelesnoj težini, racionalan unos tekućine i sl., što vjerojanto ima pozitivan suportivni efekt, iako su znanstvena izvješća o tome rijetka [35,36].

Najčešće preporučivana konzervativna terapija SUI vježbe su za mišiće dna zdjelice, čiji je cilj jačanje potpornog aparata uretre i podizanje tonusa mišića dna zdjelice, napose levatora anusa. Otkako ih je u pred više od pola stoljeća u kliničku praksu uveo Arnold Kegel, po komu su i dobile ime, provedena su brojna istraživanja o njihovoj učinkovitosti, s varirajućim, često konfliktnim rezultatima [34]. Kombiniranje ovih vježbi s primjenom drugih bihevioralnih metoda; vaginalnih konusa, *biofeedback* metode, te funkcionalne elektrostimulacije, nema bitnijeg doprinosa u poboljšanju simptoma, ali mogu pospješiti učenje pravilnog izvođenja kontrakcija. [35]. Ekstrakorporalna magnetska stimulacija mišića dna zdjelice pokazala se neučinkovitom terapijom za SUI, iako može biti korisna u žena koje same ne mogu postići adekvatne kontrakcije [38].

Primjena intravaginalnih i intrauretralnih uložaka, s ciljem mehaničke potpore, odnosno okluzije uretre, općenito je naišla na vrlo slabu suradnju pacijentica (eng. *compliance*), prije svega zbog potrebne manualne vještine za aplikaciju tih uložaka, a potom i zbog prateće fizičke nelagode [35].

1.1.2.2. Farmakološko liječenje

Za sada ne postoji rašireni i opće prihvaćeni koncept farmakološkog liječenja stresne inkontinencije [34,36,37]. Nadomjesna terapija estrogenima korigira problem urogenitalnog starenja (poboljšava uretralnu sluzničku potporu revitalizacijom uroepitela uz djelovanje na submukzone krvožilne pleksuse,

pojačava aktivnost glatkih mišićnih stanica uretre) pa tako i urogenitalne simptome [39], uključivo i SUI. Autori opsežnog Cochrane sistematskog pregleda iz 2012. [40] zaključuju da je lokalna primjena estrogena učinkovita u terapiji SUI i lišena neželjenih nuspojava, dok su za sistemnu primjenu izvješća neadekvatna i mahom kontradiktorna.

S obzirom da vrat mokraćnog mjehura i uretra sadrže impresivnu koncentraciju α_1 -adrenergičkih receptora koji posreduju kontrakciju uretralne muskulature [32] brojni adrenergički lijekovi istraživani su u svrhu terapije SUI. U prvom redu, to su neselektivni α -agonist fenilpropranolamin, selektivni α_1 -agonist midodrin, te selektivni β_2 -agonist klembuterol. Iako su ovi lijekovi u nekim zemljama odobreni u svrhu liječenja SUI (fenilpropranolamin u Finskoj, midodrin u Portugalu, klembuterol u Japanu) [36,37], sistematski pregled Cochranove baze [41] pokazuje da postoje tek slabi dokazi njihove terapijske superiornosti placebo, uz relativno često dokumentirane nuspojave kao što su povišenje krvnog tlaka, tremor, palpitacije, glavobolja, insomnija, te u slučaju fenilpropranolamina, rizik od moždanog udara, zbog čega je američka Federalna agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration, FDA*) 2000. taj preparat povukla s tržišta. [42]. Studije novijih, podtip-selektivnih perifernih (metoksamin) i, tek odnedavna, centralnih (PF-3774076) α_{1A} -agonista i dalje su limitirane značajnim kardiovaskularnim nuspojavama [43,44], dok ispitivanja topičke primjene adrenergičkih agonista (20%-tni fenilefrin u gelu), sada u kliničkoj fazi 2, nailaze na slab klinički interes [45].

Triciklički antidepresivi (npr. imipramin) smanjuju nevoljne kontrakcije detruzora mjehura blokadom muskarinskih receptora, a zamijećeni su tek skromni učinci na stresnu inkontinenciju, posredovani presinaptičkom blokadom aktivnog transporta odgovornog za ponovnu pohranuaminskih neurotransmitera (noradrenalina i serotonina), s posljedičnom potencijacijom α -adrenergičkog učinka. No, poznate antikolinergičke nuspojave (kserostomija, retencija mokraće, opstipacija, smetnje vida, ortostatska hipotenzija i sl.) i nedostatak randomiziranih kontroliranih studija čine ove lijekove neprikalnim u terapiji SUI [36,37,46].

Među danas najperspektivnije farmakološke pripravake ubraja se balansirani selektivni inhibitor ponovne pohrane noradrenalina i serotonina (eng. *serotonine and norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI*), duloksetin. Iako je u provedenim studijama dokazana njegova efikasnost u smislu podizanja kvalitete života, te je zemljama EU je od 2004. odobren u terapiji SUI [37,46], učestale nuspojave, vezane prije svega uz serotoninski efekt (mučnina, slabost, insomnija, kserostomija i sl.), razlog su visoke stope odustajanja od liječenja čime je dovedena u pitanje održivost takve terapije [37,46]. Uz to, u kliničkim pokusima opisane su i ozbiljne nuspojave poput pokušaja suicida (11 kod pacijentica koje su uzimale duloksetin za SUI vs. 0 u placebo grupi) te teškog oštećenja jetre, zbog čega je u SAD-u 2005. godine FDA zabranila uporabu ovog preparata u svrhu liječenja SUI [47]. U novije vrijeme, predlažu se sinergističke kombinacije duloksetina s fizioterapijom [48] te, ekperimentalno, kombinacije duloksetina i α_2 -adrenoceptorskih antagonista (idazoksan, johimbin) [49]. No, kada su kombinacije lijekova u pitanju, važno je imati na umu da se duloksetin metabolizira preko

citokrom P450 izoenzima CYP 1A2 i CYP 2D6, što stvara rizik interakcije s (brojnim) lijekovima koji se metaboliziraju tim putem [50].

1.1.2.3. Kirurško liječenje

Kirurški pristup danas predstavlja glavni način liječenja stresne inkontinencije, što indirektno ocrta ograničenu praktičnu efikasnost ne-kirurških opcija. Prema velikoj presječnoj (eng. *cross-sectional*) studiji [51], provedenoj na mišigenskoj populaciji od skoro 25 000 žena, njih čak 4% u anamnezi ima kiruršku intervenciju zbog SUI.

Do sada je u svrhu liječenja SUI razvijeno gotovo 200 različitih operacijskih tehnika, različite invazivnosti, stope uspjeha izliječenja, ali i postoperativnih komplikacija [34,36]. U gore citiranoj američkoj studiji udio žena koje su bile zadovoljne ishodom operacije opao je s inicijalnih 67% neposredno po završetku liječenja, na tek 45% u trenutku provođenja istraživanja. Već sam broj koegzistirajućih kirurških oblika liječenja implicira da ni jedna tehnika nije savršena, odnosno da je, kako je i prethodno naglašeno, u procesu donošenja odluke koji zahvat primijeniti, ključno razmotriti sve individualne značajke pacijenta; od njegovih komorbiditeta, etiopatofiziološkog susprata i težine bolesti, pariteta, pa sve do njegovih subjektivnih očekivanja, ali i objektivnih rizika i izgleda za (dugoročni) uspjeh operacije.

Načelno, svi operacijski zahvati usmjereni su ili (i) na repoziciju uretre i/ili kreiranje oslonca za uretru i vrat mjehura, odnosno pozicioniranje uretre i vrata mjehura u retropubični prostor u kojem će biti receptivni za prijenos

intraabdominlanog tlaka, ili (ii) na kreiranje koaptacije i/ili kompresije, odnosno kreiranje drugih mehanizama pojačanja uretralnog otpora koji inače pruža sfinkter uretre, ili pak (iii) oboje [34].

Prve operacije repozicije uretre i uopće prve operacije za korekciju SUI u kliničku praksu uveo je dvadesetih godina Kelly sa svojim kolegama u bolnici Johna Hopkinsa u Baltimoreu. Iako se i danas ponegdje izvodi, Kellyeva plikacija vrata mjehura ima slab dugoročni učinak i nije uvrštena u moderne smjernice operativnog liječenja SUI [34].

Nakon pionirskih operacija Hepburna 1927. u svrhu korekcije prolapsa uretre kod djevojčica, prve rezultate transabdominalne (retropubične) vezikourethropeksije (kolposuspenzije) u liječenju SUI objavio je Marshall s kolegama Marchettijem i Krantzom 1949. godine [52]. Iako je prvi zahvat obavljen na muškarcu zbog inkontinencije nakon transuretralne resekcije prostate, njihova je operacija ubrzo postala standard u kirurškom zbrinjavanju žena sa SUI. S vremenom, operacija je doživjela brojne modifikacije, a najviše etablirana kolposuspenzija je po Burchu [53], kod koje se, nakon mobilizacije uretre i vrata mjehura u retropubičnom prostoru, paravaginalna fascija fiksira na Cooperove ligamente (ligg. ileopectinea), dok se u izvornoj inačici periuretralna fascija fiksirala na periostrast stražnje plohe simfize, što je uzrokovalo znatnu stopu osteitisa pubične kosti (2.5%) i češće probleme uretralne opstrukcije. Burchova kolposuspenzija, koja se u zadnje vrijeme sve više izvodi laparoskopski, predstavlja danas jednu od dugoročno najefikasnijih i opće prihvaćenih operacija za korekciju SUI. [54]. Transvaginalne suspenzije, koje je kao minimalno invazivnu

alternativu retropubičnim operacijama razvio Armand Pereyra 1959., kao i susljedne modifikacije te metode (po Gittesu, Razu, Stameyu itd.), pokazale su se nedovoljno učinkovitim te su kao takve izostavljene u modernom liječenju SUI [34].

Originalno opisane pred skoro 100 godina, tzv. *sling* operacije u proteklim dekadama oživjele su svoju popularnost. Između ostalog, tome je doprinijela promjena percepcije patofiziologije SIU, po kojoj je uvaženo da kod svake pacijentice sa SUI postoji komponenta intrizičke deficijencije uretralnog sfinketra, neovisno o prisustvu uretralne hiperaktivnosti. Naime, za razliku od uretropeksija, sling operacije, uz to što ojačavaju potporu uretroveziklanom spoju, doprinose i koaptaciji/kompresiji uretre [34]. Tradicionalno se *sling* postavljao pod vrat mokraćnog mjehura, no nakon predstavljanja integralne teorije o nastanku SUI, njezini autori, Ulmsten i kolege, zagovaraju plasiranje *slinga* pod srednji dio uretre, s minimalnom ili uopće bez tenzije (eng. *tension free*) koja bi uzrokovala opstrukciju uretre tj. retenciju urina [55]. Tako je počeo razvoj, po prvi puta prospektivno (na osnovi prethodno predloženog mehanizma patofiziologije), niza minimalno invazivnih operacija u kojima se propilenska mrežica provlači ispod srednjeg segmenta uretre te se izvodi retropubično (*TVT*[®], *SPARC*[®]), transobturatorno (*TVT-O*[®], *Monarc*[®]), ili se fiksira za mišiće ili fascije dna zdjelice (*MiniArc*[®], *TVT-Secur*[®]). Stope izlječenja kod primjene ovih metoda kreću se od 66-91%, što ih čini usporedivim s rezultatima kolposuspenzija i opravdava njihovu široku prihvaćenost u prvoj liniji operativnog liječenja SUI. No, unatoč tehničkoj jednostavnosti, mogućnosti izvođenja u lokalnoj anesteziji i kratkoj rekoalescenciji, ni *tension free* operacije nisu pošteđene komplikacija: perforacije mjehura javljaju

se u oko 4%, otežano mokrenje u 3-5% (ponekad zahtijeva reviziju/presijecanje mrežice), urinarne infekcije u 6-22%, *de novo* hiperreaktivnost detruzora 3-9% te retropubični hematoma u 0.5% slučajeva. [36]. Kao ni kolposuspenzije, ni *tension free* postupci nisu primjereni ženama koje nisu ostvarile svoj reproduksijski potencijal. Pacijentice također treba upozoriti na mogućnost dispareunije nakon operacije.

Već duže vrijeme (koncept je idejno začet radovima Roberta Gersunya krajem 19. stoljeća [56]) ispituju se minimalno invazivni postupci periuretralnog injiciranja različitih auto/ksenoloških i umjetnih masa (eng. *bulking agents*); autologno masno tkivo, derivati goveđeg i sintetski unakrsno povezan kolagen (*Contigen*[®]), karbonski partikli (*Durasphere*[™]), polidimetilksiloksan (silikon, *Macroplastique*[®]), etilen/vinil-alkoholni kopolimer (*Uryx*[™]/*Tegress*[™]), kopolimer dekstranomera i hijaluronske kiseline (*Zuidex*[™]-*Implacer*[™]), poliakrilamid hidrogel (*Bulkamid*[®]), kalcij hidroksiapatit (*Coaptite*[®]) i politetrafluoroetilen (*Teflon*[®]). Cilj ovakvih zahvata stabilizacija je uretrovezikalnog segmenta s pretpostavljenim opstruktivnim efektom (eng. *seal effect*) injicirane supstance. Moguće komplikacije pretjerane obstrukcije te problemi migracije injiciranih partikli, reakcije preosjetljivosti u slučaju ksenoloških i sintetskih, te apsorpcija u slučaju organskih pripravaka s posljedičnim gubitkom učinka, uz druge opisane komplikacije (*de novo* urgentna inkontinencija, periuretralni apscesi i pseudociste, hematurija, retencija urina pa čak i fatalna masna embolija) čine ovaj pristup prihvatljivim tek u drugoj liniji liječenja, a za čiju jasnu kliničku preporuku su potrebna daljnja istraživanja [57].

Ograničena učinkovitost, koja k tome ne počiva na fiziološkim mehanizmima, i učestale nuspojave terapije *bulking* supstancama izazvale su potragu za „idealnim implantatima“, gdje su matične stanice i tkivni inženjering ponudili zanimljiv pristup deficijentnom sfinkterskom mehanizmu uretre, obećavajući ideal liječenja po principu *restitutio ad intergrum*. U tu svrhu razvijeno je nekoliko eksperimentalnih terapijskih modela za SUI, u kojima se koristi periuretralna implantacija matičnih stanica deriviranih iz mišića (eng. *muscle-derived stem cells, MDSC*) ili masti (eng. *adipose-derived stem cells, ADSC*), ili pak mezenhimalnih matičnih stanica iz koštane srži (eng. *mesenchymal stromal cells, MSC*). [58]. Iako pojedini pokusi pokazuju mogućnost diferencijacije matičnih stanica nakon transplantacije u aktin pozitivno glatko, kao i desmin pozitivno poprečno-prugasto mišićje, s posljedičnom histološkom i funkcionalnom restitucijom prethodno oštećenog/denerviranog uretralnog sfinktera, kritički osvrti upozoravaju da mehanizam djelovanja takve terapije manje počiva na diferencijaciji stanica kao što je izvorno postulirano, već je po svemu sudeći uvjetovan parakrinim faktorima koji su prijelom iz transplantiranih stanica. [58,59]. Dodatno, ove su pretkliničke animalne studije (kao i, nažalost, sve, op. a.) u svojoj naravi preventivne (terapija se ordinira neposredno nakon producirane lezije) pa je njihovo istinsko terapijsko značenje donekle upitno. [58]. Preliminarna i do sada jedina randomizirana klinička studija terapije SUI s autolognim mioblastima i fibroblastima objavljena u Lancetu 2007., nakon godinu dana povučena je zbog upitne kvalitete provedbe i etičke nedorečenosti istraživanja [60], tako da zvanično (još) ne postoji mjesto u kliničkoj praksi za ovaj vid liječenja, no obećavajući potencijal ovog pristupa u liječenju SUI danas se intenzivno istražuje i usavršava.

U očekivanju usavršenja i kliničke afirmacije gore spomenutog liječenja transplatacijom matičnih stanica u cilju restitucije deficijentnog sfinktera, kao aktualna „terapija spasa“ za tešku i kirurški neuspješno korigiranu intrizičku uretralnu deficijenciju ostaje ugradnja umjetnog sfinktera, čija se stopa uspješnosti u ženskoj populaciji prema recentnoj studiji francuskih autora kreće oko 73.5% [61].

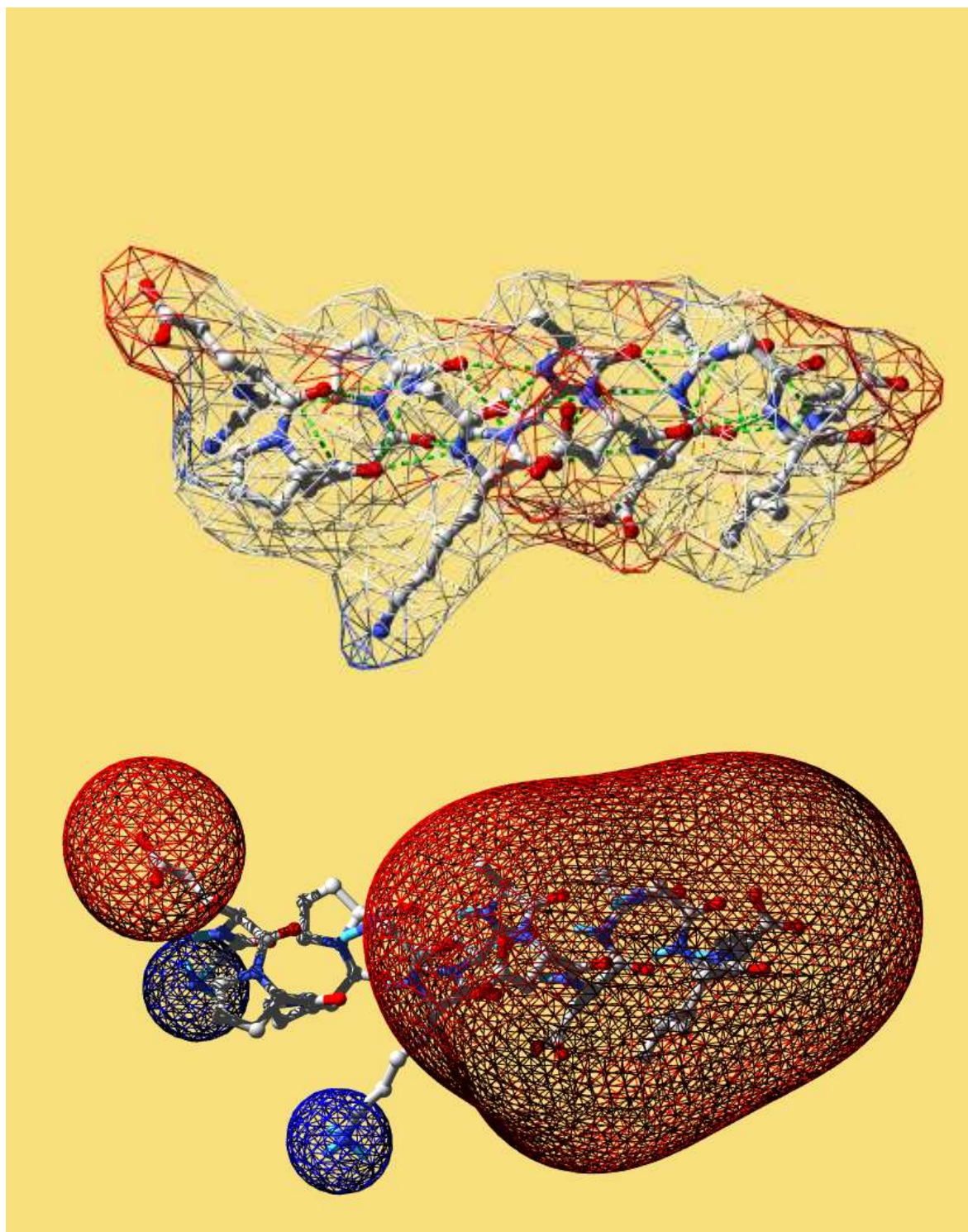
1.2. Pentadekapeptid BPC 157

1.2.1. Opće značajke pentadekapeptida BPC 157

Općenito, za peptide je poznato da imaju ključnu regulatornu i medijatorsku ulogu u održanju homeostaze fizioloških zbivanja, napose u imunološkom sustavu te procesima cijeljenja. Iako je uvaženo da peptidi iz gastrointestinalnog trakta kao najvećeg neuroendokrinog organa pripadaju posebnoj kategoriji peptida, gastrointestinalni lumen je dosad relativno malo istraživani. Kao što se pokazalo u prijašnjim istraživanjima, okolišni čimbenici u gastrointestinalnom lumenu, zahvaljujući širokom rasponu pH vrijednosti (1-10), temperaturnim razlikama 4-80°C, proteolitičkim enzimima, bakterijskoj i virusnoj kontaminaciji, brzom izmjeni sluzničkog pokrova, mogli bi predstavljati specifičan probirni potencijal za visoko postojane peptide. I dok su drugi, svojstveno nepostojani peptidi i unatoč velikom znanstvenom i komercijalnom interesu (koji se ogleda u otkriću novih sustava nosača i drugim visoko sofisticiranim tehnologijama), u terapijskom smislu još uvijek daleko od njihovog pretpostavljenog fiziološkog djelovanja [62,63], stabilni peptidi koji opstaju u nepovoljnim i promjenjivim uvjetima gastrointestinalnog lumena, morali bi pripadati

posebnoj fiziološkoj kategoriji, a od njih se, teleološki gledano, očekuju primarno zaštitna, antiupalna / antimikrobna i u cijeljenju promovirajuća / integrirajuća svojstva, odnosno citoprotektivna svojstva, koja se ispoljavaju lokalno i sistemno te koja su u terapijskom aspektu lišena toksičnog efekta.

U tom svjetlu, 1993. godine Sikirić i sur. u preglednom članku publiciranom u *Journal of Physiology* (Paris) [64], opisujući identifikaciju i načela biološke aktivnosti novootkrivenog proteina izoliranog iz želučanog soka (imunohistokemijski dokazan u želučanoj mukozi i lumenu) kodnog imena BPC, molekulske mase 40 000 Da (utvrđene gel kromatografijom), predlaže aktivni fragment tog proteina – pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV; M_r 1419; Slika 5) - kao visoko potentni endogeni medijator/ligand cijeljenja. Odlikujući se visokom stabilnošću (npr. kroz period inkubacije u želučanom soku od 24 sata), i do danas bez iznađene homologije s drugim poznatim peptidima, pentadekapatid BPC 157 u preko 100 meritornih *in vitro* i *in vivo* znanstvenih pokusa pokazao je jasan učinak na promociju cijeljenja i održanje homeostaze različitih organskih sustava, i u topičkoj i u sistemnoj (peoralnoj i parenteralnoj) primjeni, bez uočenih toksičnih nuspojava (granični test negativan) [62,65]. Time je, dakle, potkrepljen koncept specifičnog peptidergičkog obrambenog sustava, a opisane interakcije ovog pentadekapeptida s važnim regulatornim sustavima (adrenergičkim, dopaminergičkim, GABA, NO, prostaglandinskim, nekolinergičkim/ neadrenergičkim inhibitornim somatosenzornim sustavom) [63], dodatno podupiru uočene zaštitne/terapijske učinke.



Slika 1. Računalni trodimenzionalni prikaz strukture pentadekapeptida BPC 157; s vanjskim konturama (gore) i s naznačenim elektrostatskim potencijalom (dolje) [67].

Za terapijske protokole koristi se sintetski pentadekapeptid dobiven stupnjevitom kondenzacijom pomoću "Fmoc" (fluoren-9-ilmetoksikarbonil) zaštićenih aminokiselina. Kondenzacija započinje prvom aminokiselinom, valinom, vezanom za polimerni nosač (benzildrilaminorezin). Kao vezivajući reagens koristi se diisopropilkarodimid. Svakim stupnjem kondenzacije, jedna protektivna „Fmoc“ grupa zamijeni se piperidinom, a jedna aminokiselina se nadoveže. Isti postupak primijenjuje se za svaku sljedeću aminokiselinu dok sinteza nije završena. Razdvajanje se vrši pomoću trifluorooctene kiseline/trifluormetansulfonske kiseline/anizola u omjeru 2:17:52. Sirova mješavina pentadekapeptida pročisti se u HPLC (eng., high pressure liquid chromatography) stupcu čime se postiže čistoća od 99% (1-des-Gly kao onečišćenje, biološki inaktivno). Lako topljiv u vodi i fiziološkoj otopini pri pH 7.0, pentadekapeptid BPC 157 koristi se u mikrogramskim i nanogramskim terapijskim dozama. [66]

1.2.2. Pentadekapeptid BPC 157 – osvrt na dosadašnja istraživanja

S obzirom na svoje porijeklo, BPC 157 inicijalno je ustanovljen kao snažan antiulcerogeni peptid, čija su terapijska svojstva u gastrointestinalnom traktu u susljednim pokusima ekstenzivno istraživana. Kao bazalni protektant u slini i želučanom soku [62] djelotvoran je i ako se daje u vodi za piće [62-64, 68,69] te je pokazao široki antiulkusni potencijal superioran standardnim lijekovima (npr. Xue i sur. ocijenili da je njegova snaga 50 puta veća od famotidina [70]), s iznimno visokim terapijskim indeksom dokazanim u provedenim studijama o sigurnosti lijeka, kao i kliničkim studijama (uspješno završena klinička faza II istraživanja u liječenju upalnih bolesti crijeva; PL-10, PLD-116, PL-14736; Pliva, Zagreb,

Hrvatska [71,72]), uključujući i studije o peridontalnom [73], ezofagealnom [74-76], želučanom [70,77-79], duodenalnom tkivu [80,81] te ekperimentalne modele lezije tankog i debelog crijeva [69,79,81-83], jetre i gušterače [68,79,84,]. U skladu s klasičnim Robertovim [85] ili Szabovim [86] konceptom citoprotekcije, pentadekapeptid BPC 157 povećava krvni protok u želučanoj sluznici na granici ulkusa, omogućavajući ubrzanu proliferaciju stanica i cijeljenje, bez direktnog utjecaja na sekreciju želučane kiseline [87] te promovira opravak AMP-ADP-ATP energetskog sustava mukoze [88]. Recentne studije ukazuju na važnu ulogu pentadekapeptida BPC 157 u korekciji insuficijencije ezofagealnog i piloričnog sfinktera, na modelima kroničnog ezofagitisa [65,75,76] i kod distenzije želuca [68], i to neovisno o načinu administracije (parenteralno ili peroralno). Primijenjen u ranijim intervalima, ali i nakon 12 [75], pa i 20 mjeseci kontinuiranog trajanja ezofagitisa [76], u štakora s kompletnom disfunkcijom sfinktera pentadekapeptid BPC 157 djeluje povišenjem tonusa piloričkoga i ezofagealnog sfinktera. Uz oporavak samog sfinkternog mišića, predloženo je da različit učinak BPC 157 na sfinkterske tlakove u zdravom (povišenje tlaka donjeg ezofagealnog sfinktera uz sniženje tlaka piloričkog sfinktera) i bolesnom stanju (konzistentno povišenje sfinkterskog tlaka u stanju ezofagitisa), predstavlja kontrolu sfinkterske povratne sprege, bitnu za održavanje integriteta odgovarajućeg tkiva u fiziološkim i patološkim uvjetima. Ovdje treba spomenuti da koncept citoprotekcije vodi konceptu organoprotekcije, što se očituje u specifičnim zaštitnim učincima dokazanim i na drugim organima gastrointestinalnog trakta, gdje izvorno predloženi organoprotektivni agensi (npr. prostaglandini, somatostatin itd.) pokazuju koristan efekt jedino kada su dati profilaktički, npr. na modelima

ekperimentalnog akutnog pankreatitisa ili lezije jetre, dok je u istim pokusima za pentadekapeptid BPC 157 demonstrirano i profilaktičko i terapijsko djelovanje [68,84]. U preglednom članku J. D. Wooda iz 2004., pentadekapeptid BPC 157 razmatran je u kontekstu terapijskog potencijala gastričnog soka, u skladu sa više od stoljeća starim postulatom Pavlovljeve integrativne fiziologije [89].

Istražujući osovinu mozak-crijevo (eng. *brain-gut axis*) u konceptu citoprotekcije, značajan broj istraživanja usmjeren je na evaluaciju centralnih učinaka pentadekapeptida BPC 157. Tako je pokazano da tretman s ovim peptidom može prevenirati pa i ukloniti posljedice dopaminske insuficijencije [90,91], a jednako tako antagonizira dopaminsku hiperstimulaciju, npr. kod akutne [90,91] ili kronične primjene amfetamina [92]. Nadalje, autoradiografskim studijama, kanadski istraživači utvrdili su da primjena pentadekapeptida BPC 157 selektivno modulira sintezu serotonina u štakorskom mozgu [93]. S tim u vezi, nađen je unaprijeđen bihevioralni odgovor u Porsoltovom testu (naspram imipramina) [94], sa specifičnim antagonizmom prema serotoninskom sindromu izazvanom pargilinom i L-triptofanom [95]. Isto tako, ilustrirajući interakciju s GABA-ergičkim sustavom, za BPC 157 utvrđen je učinak odgode nastupa tolerancije i/ili sindroma ustezanja nakon prolongirane primjene diazepama [96]. Ostavljajući po strani raspravu o (ne)prolasku peptida kroz krvno-mozgovnu barijeru [90,91], za naglasiti je da je u svim navedenim radovima pentadekapeptid BPC 157 administriran periferno, parenteralno ili intragastrički, a navedeni učinci su poglavito centralno posredovani.

Kao ekstenzija citoprotekcije, promocija cijeljenja različitih rana je idući aspekt evaluiran u istraživanjima pentadekapeptida BPC 157, pa je tako u primjeru gastrointestinalnog sustava dokazan njegov terapijski učinak u cijeljenju gastrokutanih [78] i kolokutanih fistula [97] te anastomoza crijeva (ileoilealne, kolokolične, ileojejunalne) [66,69,82], uključujući i model kratkog crijeva, gdje je i kod peroralno i kod parenteralno tretiranih životinja uz uspješno cijeljenje anastomoze nakon 80%-tne resekcije tankog crijeva, uočena i kompenzatorna hipertrofija intestinalnih vila i produbljenje kripte u mukozni crijeva te posebice zadebljanje cirkularnog mišićnog sloja crijeva (4x više u odnosu na neoperirane kontrole) [83]. Nadalje, bitno je uočiti paralelizam u BPC-om promoviranom istovremenom cijeljenju eksternih i internih, dakle različitih tkiva, kao kod spomenutih gastrokutanih i kolokutanih fistula, ili npr. kod opeklinških rana s posljedičnom ulkusnom bolesti želuca [98], što sugerira generalizaciju promocije cijeljenja kao značajku citoprotekcije, a koja je, osim za BPC, ustanovljena i za neke druge predložene citoprotektivne lijekove (npr. atropin, ranitidin, famotidin) [78,99], no u bitno manjem opsegu.

Nastavno na opisanu pluripotentnost pentadekapeptida BPC 157 u cijeljenju, njegovi mehanizmi djelovanja proučavani su na nizu *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnih modela. Ispitivanja učinaka na granulacijskom tkivu, kao bazičnom kompleksu u procesu cijeljenja, dokazala su selektivnost BPC-a 157 za stimulaciju granulacije sličnu onoj koju posjeduje aktualni peptidni standard u promoviranju cijeljenja – rekombinantni trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor, PDGF*) [100]. U toj usporedbi, za BPC 157 dokazana je znatno ranija ekspresija *egr-1* (eng. *early growth response-1*) gena [100], kritično

važnog induktora transaktivacije više srodnih gena u ranom procesu cijeljenja [101] te njegovog korepresora NAB2 (eng. *nerve growth factor 1-A binding protein-2*), s posljedičnim ranim odlaganjem i organizacijom kolagenog matriksa (tip III kolagena promptno zamijenjen tipom I) i konačnim povećanjem tkivnog volumena [100]. Istovremeno, in vitro studije pokazale su odgođenu endogenu ekspresiju γ -interferona u granulacijskom tkivu tretiranom BPC-om [100], koji inače, egzogeno apliciran, inhibira sintezu kolagena i maturaciju granulacijskog tkiva na mjestu ozljede [102]. Nadalje, u granulacijskom tkivu, kolagen producirajući fibroblasti i njihova daljnja diferencijacija u funkciji su formiranja novostvorenih krvnih žila, i u tom aspektu BPC-ev doprinos cijeljenju jasno je dokazan [103]; primjerice na modelu opekline [98], gdje je angiogeni efekt (broj novostvorenih krvnih žila) korelirao s kvalitetom cijeljenja rane (obilnija produkcija retikulina i kolagena koji daju rani njezin konačan oblik i čvrstoću), ili pak na modelima cijeljenja mišića i tetiva [104], gdje je u tretmanu s BPC 157 demonstriran „pomak u lijevo“ u neoangiogenezi (rana ekspresija angiogenih markera VEGF, CD34 i FVIII) [104]. Uz angiogeni učinak, u procesu cijeljenja istraživani su i antiinflamatorni učinci ovog peptida. Tako je uočeno da primjena BPC-a 157 smanjuje eksudaciju upalnih medijatora, leukotriena B_4 i tromboksana B_2 u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze u području ozljede. Na taj način dolazi do značajno manje eksudacije polimorfonukleara uz istovremeno pojačanu eksudaciju mononukleara u područje ozljede, čime je reducirana aktivnost kolagenaza, a povećana produkcija citokina u mononuklearnim fagocitima bitnih za kvalitetan proces cijeljenja [66,105]. Nadalje, pentadekapeptid BPC-a 157 ima dokazan direktan učinak na sintezu i modulaciju sinteze dušikovog monoksida (npr. antagonizam

učinaka snažnog kompetitivnog inhibitora endotelne NO sintaze, N^G-nitro-L-arginin metil estera (L-NAME)) [77,106-108], što neposredno stimulira proces cijeljenja; u ranom razdoblju, NO posredovanim vazodilatacijskim učinkom, i kasnije, poticanjem sinteze kolagena [77,106-110]. Nastavno na interakciju s NO sustavom, čije zatajenje dovodi do hiperprodukcije endotelina, uzrokujući razvoj fibroze, [111], na modelu doksorubicinskog oštećenja srčanog mišića, demonstriran je antagonizirajući učinak BPC-a 157 na prekomjernu ekspresiju endotelina [112], što uz efekt direktne protekcije endotela (dokazan originalnim Szabovim protokolom za etanolska endotelna oštećenja [113]) te antitrombotskim djelovanjem (npr. na mjestu kreirane aortalne anastomoze [114]) u konjukciji s gore opisanim učincima upućuje na zaključak da pentadekapeptid BPC 157 inicira i održava proces cijeljenja u svim njegovim fazama [109].

Kvaliteta cijeljenja uz terapiju pentadekapeptidom BPC 157 jasno je ilustrirana na modelima ozljeda koje bez terapije uzrokuju trajni gubitak funkcije ozlijeđenih struktura, primjerice kod potpune transekcije kvadricepsa štakora [104,115] gdje je i histološki (izražena dezmin pozitivnost na reznim rubovima; presječni segmenti mišića povezani regeneriranim mišićnim vlaknima; ispunjen defekt na mjestu transekcije; veći promjer proksimalnih i distalnih miofibrila u odnosu na kontrolne vrijednosti) i makroskopski (uspostavljenje kontinuiteta mišića uz reduciranu atrofiju; prezentacija ekstremiteta slična kao i kod neozlijeđenog mišića; izostanak postoperativne kontrakture) i funkcionalno/biomehanički (oporavak hoda i posturalne funkcije), potvrđena sistemna i topička efektivnost terapije ovim peptidom. Konzistentan učinak dokazan je i kod dugih mišićnih ozljeda, npr. kod zgnječenja gastroknemijalnog kompleksa [104,116] (povrat

fiziološke funkcije mišića uz kraće vrijeme oporavka; histološki potvrđena ubrzana regeneracija miocita; reducirana veličina hematoma/edema; atenuirana proteoliza ozlijeđenog mišića). Analogan oporavak demonstriran je i kod transekcije ishijadičnog živca [117] (klinički; odsutnost autotomije, histološki; ubrzana aksonalna regeneracija, uniformna orijentacija nervnih vlakana, veći udio neuronalnog naspram vezivnog tkiva, elektrofiziološki; povećanje motornih akcijskih potencijala, i funkcionalni; oporavak funkcije hoda i scijatičnog funkcionalnog indexa), ali i drugih neuralnih ozljeda, npr. kod kapsicinskog oštećenja somatosenzornih neurona u odraslih i novorođenih štakora [118] te kod traumatskog oštećenja mozga [119].

Potencijal za promociju cijeljenja BPC 157 pokazao je i u tkivima koja su oskudno vaskularizirana i inervirana te gdje je terapijska djelotvornost bilo kojeg primjenjivanog agensa obično bitno ograničena. Tako je, primjerice, na modelu transekcije ahilove tetive [104,120,121], sistemna (intraperitonealna) primjena BPC-a 157, u dozi od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 10 ng/kg tjelesne težine dovela do jasnog biomehaničkog (povećana čvrstoća i krutost tetive) i histološkog (veća eksudacija mononukleara i manja eksudacija polimorfonukleara, statistički značajno povećan broj fibroblasta sedmog i desetog poslijeoperacijskog dana te statistički značajno povećana količina kolagena desetog i četrnaestog poslijeoperacijskog dana) opravka. Jednako uvjerljive su i studije sraštanja Ahilove tetive s petnom kosti nakon oštre disekcije [122,123], gdje je opet i biomehanički (unaprijeđeno maksimalno opterećenje, krutost, Youngov modul elastičnosti) i funkcionalno (funkcionalni indeks Ahilove tetive) i histološki (bolja organizacija kolagenih vlakana, predominacija tipa I kolagena, neoangiogeneza) dokazano unaprijeđeno

cijeljenje, čak i u uvjetima agraviranim korstikosteroidima [122]. Isto tako, istraživani je i učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje prijeloma kostiju pri čemu je korišten model pseudartroze radijusa u kunića [124]. U tome je radu kombinacijom radiološke procjene, mikrofotodenzitometrije i kvantitavne histomorfometrije, jasno dokazano da šest tjedana po intramuskularnoj i lokalnoj primjeni pentadekapeptida BPC 157 dolazi do značajnog ubrzanja premoštenja segmentalnog koštanog defekta radijusa u kunića u usporedbi sa skupinama kunića koje su liječene uobičajenim postupcima, kao što su primjena autolognog presadka ili primjena koštane srži. Pored svega navedenog, ovdje valja svakako naglasiti da primjena pentadekapeptida BPC 157 u cijeljenju ne izaziva osifikaciju i metaplaziju okolnih tkiva kao što je uočeno pri primjeni nekih faktora rasta [125].

Zaključno, imajući u vidu sve gore opisane učinke primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje, otvoren je prostor za daljnja istraživanja kojima bi se ostvarila praktična translacija opisanih učinaka u terapijske strategije kliničke prakse.

1.3. Pozadina i obrazloženje istraživanja

U svrhu boljeg razumijevanja etiologije i mehanizama nastanka SUI, u protekloj dekadi razvijeno je nekoliko animalnih modela, koji su, međusobno se upotpunjavajući, postali standard za razvoj potencijalnih terapijskih i preventivskih strategija [126-131]. Najčešće korišteni i najviše istraženi su štakorski modeli SUI, kod kojih urodinamske promjene „mimikriraju“ one koje se susreću u kliničkoj praksi [127]. Konkretno, kod štakorskih modela SUI moguće je ustanoviti tipično snižen prag tlaka u mjehuru (pri porastu intraabdominalnog tlaka, a u odsutnosti

kontrakcija detruzora) iznad kojeg nastupa gubitak mokraće (eng. *leak point pressure, LPP*), a što po definiciji reflektira stanje SUI [1,131].

Kao što je prethodno opširnije razmatrano, mehanizam kontinencije konceptualno ima dvije ispreplićuće komponente: jedna je strukturalna, fizička potpora donjem urinarnom traktu koju čine mišići i vezivo dna zdjelice, a druga je neuromuskularna, sačinjena od pudendalnog živca i sfinkterskog aparata uretre [132]. Simulirani porođaj ili protrahirana vaginalna dilatacija (VD) funkcionlano ocrtava stanje SUI posredstvom ozljede uretralnog sfinktera (disrupcija glatkih i poprečno-prugastih mišićnih vlakana uretre), distalnih ogranaka pudendalnog živca i adrenergičkih živčanih vlakana, a koja je izazvana pritiskom dilatirane vagine na kosti zdjelice (napose na pubičnu simfizu), te hipoksičnim oštećenjem uzrokovanim reduciranom krvnom opskrbom uretre, mjehura i vagine [128,133-135]. Transabdominalna uretroliza (TU), s druge strane, prototip je durabilnog modela SUI u kojem postoji znatan gubitak uretralne anatomske potpore oštećenjem parauretralnog veziva te denervacijska ozljeda s posljedičnom atrofijom mišićja i konačnim smanjenjem omjera mišićnog i vezivnog tkiva uretre [126, 129]. Zajedno, modeli VD i TU mogu vjerno korespondirati kompleksim patofiziološkim zbivanjima koji dovode do kroničnog funkcionalnog sindroma SUI.

Na platformi razvijenih štakorskih modela SUI i u svjetlu demonstriranih patofizioloških zbivanja, u novije vrijeme predložene su različite eksperimentalne terapijske i preventivne strategije. Uz prethodno spomenute kombinacije duloksetina i α_2 -adrenoceptorskih antagonista (idazoksan, johimbin) [49]., od sistemnih farmakoloških pripravaka evaluirani su i neki drugi SNRI lijekovi

(venlafaksin [136], nizoksetin (na modelima VD) [137]) te angiotenzin II (u modelima lezije pudendalnog živca i TU) [138]. Iako ovi lijekovi podižu LPP (N.B., SNRI i adrenergički agonisti imaju taj efekt i kod zdravih kontrola), ni jedna od tih studija nije dokazala cijeljenje neuromuskularne ozljede kojom bi poduprli učinak na SUI. Neovisno o tome, realan problem u translaciji ovih farmakoloških terapija u kliničku praksu su potencijalno ozbiljne nuspojave [47,50,138].

Na osnovi dobro etablirane kliničke uloge estrogena u homeostazi vezivnog tkiva uretre i zdjelice dna i napose urogenitalnog starenja [39], provedene su animalne studije estrogenog učinka na postpartalnu inkontinenciju, u kojima su dokazani neuroprotektivni i vjerojatno neuroregenerativni (pojačana ekspresija β_{II} -tubulina) učinci na ledirani pudendalni živac [139], što se klinički može tumačiti kao efekt ranog oporavka neuromuskularne jedinice nakon porođajne traume, pogotovo zato što je i u cijeljenju same mišićne lezije ključna regeneracija intramuskularnih živčanih vlakana [140]. Terapijska, odnosno preventivna, nastojanja usmjerena na promoviranje neuromuskularne regeneracije neposredno nakon traume imaju, dakle, logično uporište koje je u skladu i s prethodno citiranom studijom Allena i sur. [27] u kojoj je demonstrirana uredna postpartalna reinervacija tek u 80% prvorodilja, a zaostala parcijalna denervacija dna zdjelice u preostalih 20% žena predstavlja osnov za kasniji razvoj SUI. U skladu s tim su i rezultati Cochraneovog sistematskog pregleda iz 2012. koji ukazuju na 40% (RR 0.60) sniženu stopu SUI godinu dana nakon poroda, ako su neposredno pospartalno provedene tromjesečne vježbe za mišiće dna zdjelice kod simptomatskih babinjača (RR 0.60) [141]. U tom smislu, najnovija istraživanja predložila su kontinuiranu lokalno (na mjesto ozljede) apliciranu infuziju moždanog

neurotrofnog faktora (eng. *brain-derived neurotrophic factor*, *BDNF*) neposredno nakon simulirane porodne traume kao terapiju kojom se promovira neuroregenerativni odgovor, s posljedičnom i funkcionalnom i histološkom regeneracijom sfinktera uretre [142]. Zbog nepraktičnosti administriranja terapije ovakav pristup nije primjenjiv u kliničkoj praksi (npr. u svrhu postpartalne profilakse). Alternativno, ekspresija istih markera neuroregenerativnog odgovora (*BDNF* i β_{II} -tubulina) postignuta je uz primjenu električne stimulacije pudendalnog živca nakon simulirane porođajne traume [143], čime je u izvjesnoj mjeri poduprt mehanizam učinka fizioterapije. Imajući u vidu prethodno predložene sinergističke terapije standardnih farmakoloških pripravaka (npr. duloksetin) s fizioterapijskim pristupom [48], još je više iznenađujuća spoznaja da do sada nije dokumentiran utjecaj farmakološkog liječenja SUI na cijeljenje neuromuskularne ozljede, tj. oštećenog/denerviranog (presječenog ili nagnječenog) mišićnog tkiva, a koje je, kao što je na više mjesta naglašeno, ključan čimbenik u patofiziologiji (pa tako i u prevenciji/terapiji) SUI.

S druge strane, stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157, predložen u ovom istraživanju za terapiju SUI nakon VD i TU, ima, kako je prethodno sustavno prikazano, dobro dokumentirane promotivne učinke na tkivno specifične procese cijeljenja i poprečno-prugastih (potpuna transekcija mišića kvadricepsa, zgnječenje (eng. *crush injury*) gastroknemijusa) [104,115,116,144], i glatkih mišića (npr. anastomoze crijeva) [66,69,82,83], napose sfinktera gastrointestinalnog trakta [65,75,76] te živčanog tkiva (npr. transekcija ishijadičnog živca) [117]. Jednaki učinci su primijećeni i kod sraštanja mišićno-tetivne [120], te tetivno-koštane jedinice [122,123], dakle i u hipocelularnim, hipovaskularnim i hiponeuronalnim

uvjetima. Beneficijalan učinak ovog peptida na cijeljenje dokazan je i u uvjetima agraviranim hiperglikemijom [100,145], koja je u pacijentica sa SUI najuže povezana s neuspjehom liječenja [146], što je dodatno ilustrirano i na štakorskim modelima gdje je kod dijabetičkih životinja zamijećen prolongiran oporavak nakon VD, uz bitno niže izmjerene vrijednosti LPP-a [147]. Pored spomenutih, promotivni učinci ovog peptida na cijeljenje dokazani su i na nizu drugih modela [53,66,98,148].

Nadalje, percipirajući proces cijeljenja kao kompleksnu paralelnu interakciju više vrsta stanica i signalnih molekula, peptidi, napose pojedini peptidni faktori rasta, identificirani su kao integralni medijatori i promotori tog procesa [149]. Njihov relativni uspjeh u praktičnoj primjeni nužno je uvjetovan lokalnom (na mjesto ozljede) aplikacijom, zajedno s peptidnim nosačem, pa je tako u primjerima štakorskih modela SUI prethodno spomenuta kontinuirana lokalna infuzija BDNF [142], ili pak periuretralna injekcija bazičnog fibroblastnog faktora rasta (eng. *basic fibroblast growth factor, bFGF*) uklopljenog u želatinozni hidrogel [150] unaprijedila regeneraciju uretralnih mišića i kontraktilnost sfinktera nakon simulirane porođajne, odnosno denervacijske ozljede. Također, u okviru obećavajućeg terapijskog koncepta s periuretralno transplahiranim ADSC, MDSC ili mioblastima [58], ključni problem slabog preživljenja stanica nastoji se riješiti, primjerice, preinkubacijom MDSC s bFGF prije transplantacije [151], ili pak sa simultanom lokalnom koaplikacijom peptidnih faktora rasta (npr. PDGF-a ili bFGF-a uz mioblaste [152], odnosno nervnog faktora rasta (eng. *nerve growth factor, NGF*) uz ADSC [153]), čime je ilustrirana presudna uloga peptidnih medijatora u procesu cijeljenja. U tom svjetlu, pentadekapeptid BPC 157, za kojeg je u *in vivo* studijama

utvrđen superioran modulacijski efekt na tkivo u cijeljenju, npr. kod ekscizijskih ozljeda gdje se pokazao superiornim nad farmakološkim standardom u peptidnoj terapiji – rekombinantnim PDGF-om [100], opravdano se predstavlja se kao perspektivan kandidat za terapiju SUI nakon VD i TU. K tome, uspjeh cijeljenja (i, u primjeru stanične transplantacije, opstanka transplatiranih stanica) direktno ovisi o adekvatnom angiogenom odnosno angiomodulatornom potencijalu [104,154], koji je u terapijskim pokusima s pentadekapeptidom BPC 157 dokazan na različitim modelima cijeljenja, gdje je unaprijeđenje biomehaničkih svojstava zacijeljenog tkiva jasno koreliralo s pomakom ulijevo u angiogenezi i ranom ekspresijom angiogenih markera VEGF, CD34 i FVIII. [104]. Takav učinak tim više opravdava istraživanje pentadekapeptida BPC 157 na modelima SUI, jer se upravo pojačanom ekspresijom VEGF i posljedičnim porastom broja periuretralnih krvnih žila tumači efekt transplantiranih ADSC na oporavak SUI nakon VD [155].

Način na koji transplantirane matične stanice promoviraju cijeljenje ostaje pomalo kontroverzan. Naime, suprotno izvornoj premisi terapijskog mehanizma djelovanja periuretralno transplantiranih prekurzorskih stanica [58,156], prema kojoj se one diferenciraju u različite tipove stanica i tako inkorporiraju u oštećeno tkivo, sve su uvjerljiviji dokazi da su njihovi terapijski učinci prije svega posljedica produkcije parakrinih medijatora poput peptidnih faktora rasta [58,59,157], napose VEGF-a [155,158], s pratećim porastom broja periuretralnih krvnih žila [154] i konačnom regeneracijom oštećenog tkiva/organa. Sukladni s tim su i nalazi prethodno spomenute uspješnije terapije s transplantiranim mioblastima uz simultanu lokalnu koaplifikaciju rekombinantnog PDGF-a [152]. Ovaj potonji koncept, dakle, podrazumijeva mogućnost da medijatori cijeljenja (npr. peptidni

faktori rasta) kontinuirano producirani (ili aplicirani) na mjestu udaljenom od ozljede mogu promovirati procese cijeljenja u samom ozlijeđenom tkivu/organu, što je i eksperimentalno dokazano; u primjeru, na hrčkovu modelu srčanog zatajenja intramuskularnom (u stražnju ložu natkoljenice) injekcijom MSC postignuta je znatna regeneracija miocita uz atenuaciju fibroze srčanog mišića [157]. Nastavno na takav koncept terapijskog djelovanja, kompleksan supstrat ozljede (mehanički, denervacijski i ishemijski) koja dovodi do SUI, prisutan npr. kod (simulirane) porođajne traume [133.,134], koji, dakle, obuhvaća različita tkiva (glatke i poprečno-prugaste mišiće uretre, mišiće dna zdjelice, periferne ogranke pudendalnog te adrenergičke živce), sugerira da funkcionalno uspješan oporavak podrazumijeva istovremeno cijeljenje ozljeda na više različitih mjesta, što jasno ukazuje na prednost sistemne naspram lokalne terapije. U tom smislu, dodatno se čini interesantnim istražiti učinke terapije pentadekapeptidom BPC 157 na modelima SUI jer, za razliku od svojstvene nestabilnosti standardnih peptida drugih izvora koja zahtijeva njihovu koaplifikaciju s nosačem ili inhibitorom peptidaza te njihove nesigurne dostave i/ili otpuštanja na ciljnom mjestu, kao i slabo definirane aktivnosti pojedinih komponenti u peptid/nosač kompleksu, što na koncu, dakako, ograničava njihovu praktičnu primjenu, napose sistemnu [62,159], predloženi peptid dokazano je terapijski efikasan kada je apliciran sam, i u peroralnom i parenteralnom režimu primjene [npr. 62.,160]. Stabilnost pentadekapeptida BPC 157 u odnosu na druge peptide specifično je ilustrirana u eksperimentima inkubacije u želučanom soku, gdje se ovaj peptid nije razgradio ni nakon 24 sata, dok su drugi standardni peptidi poput h-EGF (eng. *human*

epidermal growth factor) i h-TGF (eng. *human transforming growth factor*) u potpunosti bili degradirani već nakon petnaestak minuta [159].

Dakle, na osnovu svega gore iznešenog, u ovom je istraživanju procjenjivan učinak peroralne i intraperitonealne terapije pentadekapeptidom BPC 157 na oporavak od SUI nakon VD i TU kod ženki štakora, i to funkcionalno – mjerenjem LPP-a (pri porastu intraabdominalnog tlaka, a u odsutnosti kontrakcija detruzora) te imunohistokemijski, gdje je, uvažavajući činjenicu da oporavak od SUI nakon VD i TU u konačnici podrazumijeva regeneraciju i poprečno-prugastih i glatkih mišića, procjenjivan učinak pentadekapeptida BPC 157 na oba mišićna sloja, zasebno u proksimalnom, središnjem i distalnom dijelu uretre, zajedno s procjenom angiogenog učinka kao ključnog procesa u cijeljenju te određivanjem omjera mišićnog i vezivnog tkiva uretre, čime je dodatno objektivizirana kvaliteta cijeljenja nakon VD i TU.

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza istraživanja

Hipoteza istraživanja je da sedmodnevna peroralna i intraperitonealna terapija pentadekapeptidom BPC 157 korigira stresnu urinarnu inkontinenciju nakon protrahirane vaginalne dilatacije i transabdominalne uretrolize kod ženki štakora.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je urodinamski i histološki procijeniti učinak sedmodnevne peroralne i intraperitonealne terapije pentadekapeptidom BPC 157 na stresnu urinarnu inkontinenciju kod ženki štakora nakon protrahirane vaginalne dilatacije i transabdominalne uretrolize, u usporedbi s korespondentnim kontrolnim i zdravim (tretiranim i netretiranim) životinjama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419), (Diagen, Ljubljana, Republika Slovenija), dio sekvence proteina BPC iz ljudskog želučanog soka, u potpunosti topiv u vodi (pri pH 7.0) i fiziološkoj otopini, pripremljen je kao što je prije opisano [65], metodom visokotlačne kromatografije (HPLC; 99%-tne čistoće uz 1-des-Gly peptid kao biološki inaktivno onečišćenje). U eksperimentima je primjenjivan bez proteinskog nosača ili inhibitora peptidaza.

3.2. Životinje

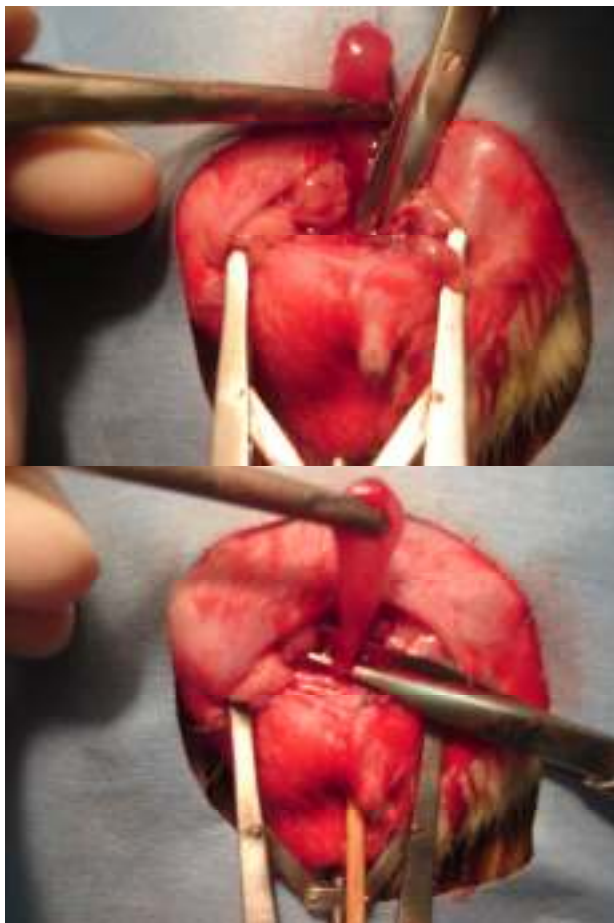
U istraživanju su korištene Wistar albino ženke štakora (pluripare, starije od 12 mjeseci, TT 310-350g), uzgojene pri Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, raspoređene u eksperimentalne skupine po 7 jedinki. Ekperimentalni protokoli odobreni su od strane nadležnog Povjerenstva za rad na pokusnim životinjama (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Ur. Broj: 04-76/2008-455) te su usklađeni s međunarodno prihvaćeniim principima za dobrobit životinja (Direktiva 86/609/EEC, potom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća).

3.3. Eksperimentalni modeli stresne urinarne inkontinencije

Za postizanje SUI kod ženski štakora korištena su dva prethodno etablirana eksperimentalna modela: transabdominalna uretroliza i protrahirana vaginalna dilatacija [126-129].

3.3.1. *Transabdominalna uretroliza*

Životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina (20mg/kg bruto težine, intraperitonealno; Ketanest, Parke-Davis GmbH, Berlin, Njemačka) i diazepama (6mg/kg bruto težine, intraperitonealno; Apaurin, Krka d.d., Novo Mesto, Slovenija). Nakon provjere dubine anestezije i standardne kirurške pripreme operativnog polja, donjom medijanom laparotomijom pristupa se mokraćnom mjehuru i uretri uz pomoć retraktora po Almu. Potom se tenotomijskim škarama po Stevensu (Jorgensen Laboratories, Inc., Loveland, Colorado, SAD) proksimalni i distalni dio uretre cijelom cirkumferencijom oštro otprepariraju od pubične kosti te s prednjeg vaginalnog zida, pazeći pritom da se ne kompromitiraju ureteri i donja vezikalna vaskulatura (Slika 2). Kao pomoć pri disekciji korišten je vatirani štapić potisnut u rodnicu štakorice. U kontrolnih (placebo-operiranih) životinja nakon učinjene laparotomije i vizualizacije mokraćnog mjehura, vrat mjehura i uretra ostavljeni su netaknuti. Abdomen se zatvara po slojevima koristeći resorptivni poliglaktinski 4-0 šav za mišiće i fasciju rektusa te neresorptivni najlonski 3-0 šav za kožu. Po završenom zahvatu životinje su grijane i nadzirane do uspostavljanja stabilne ravnoteže u potrbušnom ležećem stavu i potom vraćene u vivarijum.



Slika 2. Transabdominalna uretroliza: oštrom preparacijom uretra se cijelom cirkumferencijom odvaja od pubične kosti (gore) i prednjeg vaginalnog zida (dolje). Vatirani štapić potisnut u rodnicu olakšava disekciju rastežući rodnicu prema kranijalno.

3.3.2. *Protrahirana vaginalna dilatacija*

Prethodno anesteziranim (kao gore) i na leđima imobiliziranim životinjama u rodnicu se postavi modificirani (odrezan vrh) Foleyevog katetera veličine 12 Fr. (Rüsch, Inc., Duluth, Georgia, SAD), koji se potom fiksira s jednim situacijskim, svilenim 3-0 šavom, presvođujući tako introitus rodnice (Slika 3). Balon katetera se potom inflatira se s 5 mL fiziološke otopine i ostavi u rodnici kroz 2 sata, nakon čega se deflatira i zajedno s fiksacijskim šavom ukloni. Kontrolnim životinjama (placebo-operiranim) u anesteziji postavljan je kateter, no izostavljeno je punjenje balona. Životinje su potom zbrinute na tipičan način, kao što je gore opisano.



Slika 3. Protrahirana vaginalna dilatacija: vrh modificiranog Foleyevog katetera fiskiran je u rodnici i inflatiran s 5 mL fiziološke otopine.

3.4. Terapijski protokoli

Tretman s pentadekapeptidom BPC157 provođen je u trajanju od 7 dana i kod zdravih i kod operiranih životinja (TU ili VD), i to intraperitonealnom aplikacijom (otopljen u fiziološkoj otopini u koncentracijama 2 μg ili 2 ng/mL , u jednokratnim dnevnim dozama od 10 $\mu\text{g/kg}$ ili 10 ng/kg bruto težine, s prvom dozom ordiniranom 30 minuta nakon operacije te posljednjom 24 sata prije mjerenja LPP-a i žrtvovanja), ili pak peroralno (otopljen u vodi za piće u koncentraciji 0.16 $\mu\text{g/mL}$, u dnevnoj dozi 10 $\mu\text{g/kg}$ bruto težine (12 mL po štakoru po danu)). Kontrolne životinje primale su ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu, odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće.

3.5. Mjerenje LPP-a

Sedmi postoperativni dan kod svih operiranih i kontrolnih životinja, te kod sedam zdravih životinja provedeno je mjerenje LPP-a metodologijom baziranom na prethodno opisanim tehnikama [126-131]. U cilju očuvanja mikcijskih refleksa korištena je uretanska anestezija (1.2mg/kg, intraperitonealno; SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) [130]. Uzdužnom laparotomijom prikaže se mokraćni mjehur koji se manualno ispazni, a potom se u području fundusa uvede i fiksira transvezikalni kateter promjera 24G, spojen istovremeno na infuzijsku pumpu (green stream[®] VO-P ARGUS 414, Argus Medical AG, Heimberg, Švicarska), i na monitor s pretvaračem tlaka (model 90309, Spacelabs Medical Inc, Redmond, Wahington, SAD) (Slika 4), nakon čega se trbušna stijenka privremeno zatvori šavima. Intravezikalni tlak [mmHg] referencira se prema vrijednosti tlaka zraka u razini mjehura i potom kontinuirano prati uz instilaciju u grijane (37°C) fiziološke otopine (5ml/h). Nakon instiliranog volumena koji odgovara otprilike polovici kapaciteta mjehura (≈0.4 mL) zaustavi se infuzija, te se suprapubičnom palpacijom („Credeov hvat“) postiže postupni porast intraabdominalnog i (posljedično) intravezikalnog tlaka, do vrijednosti kod koje se uoči prva kap instilirane tekućine na vanjskom ušću uretre i ta se vrijednost bilježi kao LPP. Gubitak mokraće kod SUI po definiciji se događa u odsutnosti kontrakcije detrusora [1], stoga su mjerenja u kojima se ista nastupi (a što se lako detektira jer uz porast tlaka nastupa i cjelovit akt mikcije [126,131]) izuzeta iz obrade, a mjerenje je ponovljeno nakon pražnjenja mjehura. Za daljnju obradu podataka uzimala se prosječna vrijednost triju uzastopnih mjerenja LPP-a.



Slika 4. Instrumentarij i laboratorijska oprema za mjerenje LPP-a: infuzijska pumpa i monitor s pretvaračem tlaka (gore) spojeni su na transvezikalni kateter koji se uvodi u području fundusa mjehura (dolje).

3.6. Histološka analiza

Neposredno po završetku mjerenja, (anestezirane) životinje žrtvovane su eksangvinacijom, a mokraćni mjehur s uretrom ekstirpiran je uz resekciju pubične simfize, kako bi se izbjegla naknadna trauma i očuvao intaktan cijeli uretrovezikalni segment. Preparat je rutinski fiksiran u 10%-tnoj puferiranoj otopini formaldehida kroz 24 sata, potom uklopljen u parafin i transverzalno semisekvencijalno (u razinama proksimalnog, središnjeg i distalnog dijela uretre) narezan na rezove debljine 5 μm . Nakon deparafinizacije rezovi su obojeni hemalaun-eozinom i Mallory trikrom metodom u svrhu procjene omjera mišićnog i vezivnog u području srednjeg segmenta uretre. Dodatno, za sva tri uretralna segmenta, provedene su kvantitativne imunohistokemijske analize za dezmin (prikaz udjela poprečno-prugastih mišićnih vlakana) [115,116,144], glatkomišićni aktin (eng. *smooth muscle actin*, *SMA*; prikaz udjela glatkih mušićnih vlakana) te

angiogeni marker CD34 [104] (prikaz gustoće krvnih žila; svaka stanična formacija s lumenom koja je pokazivala pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na CD34 antigen smatrala se zasebnom krvnom žilom). Svi preparati su priređeni u skladu s uputama proizvođača (razrjeđenje 1:50; Dako Denmark A/S, Glostrup, Danska). Svakom setu preparata za imunohistološku analizu pridruženi su kontrolni preparati sa poznatom prisutnošću traženog antigena. Morfometrijska analiza provedena je računlano, s aplikacijama Sform i Issa (Vams Tec d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Pet polja velikog uvećanja nasumično je izabrano za analizu svakog histološkog preparata.

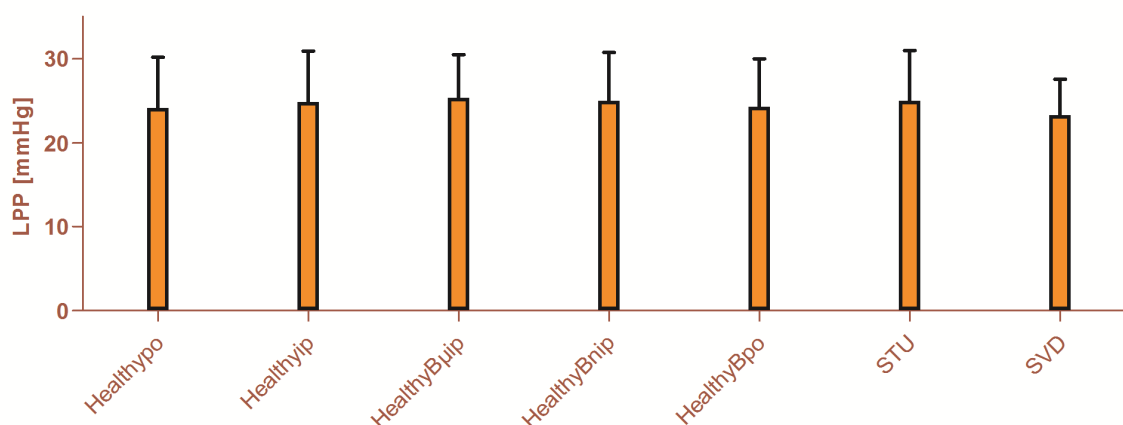
3.7. Statistička analiza

Za statističku obradu korišten je računalni program STATISTICA 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, SAD). Podaci su testirani Kolmogorov-Smirnoff testom za procjenu distribucije podataka. U slučaju normalne distribucije, primijenjen je one-way ANOVA test s Newman-Keulsovim *post hoc* testom. U suprotnom, bio je primijenjen Kruskal-Wallisov test s Mann-Whitneyvim *post hoc* testom. Statistički značajna razlika utvrđena je kod $p < 0.05$. Rezultati statističke analize predočeni su grafikonima izrađenim u računalnoj aplikaciji GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Mjerenje LPP-a

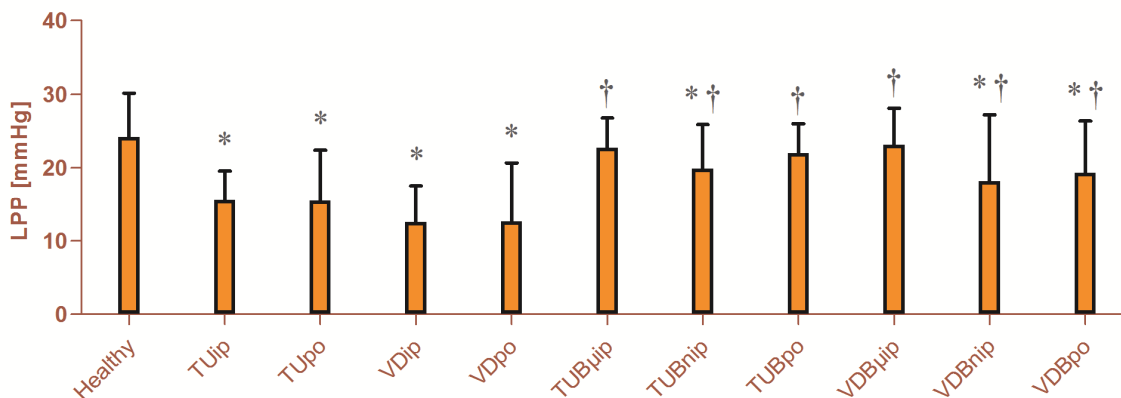
Sve životinje prethodno podvrgnute odgovarajućoj eksperimentalnoj proceduri preživjele su do sedmog poslijeoperativnog dana kada su izvršena mjerenja LPP-a. Vrijednosti LPP-a izmjerene u zdravih netretiranih životinja nisu se razlikovale se u odnosu na zdrave životinje tretirane s pentadekapeptidom BPC 157. Isto tako, vrijednosti LPP-a u placebo-operiranih životinja nisu se značajno razlikovale od zdravih kontrola (Grafikon 1).



Grafikon 1. Vrijednosti LPP-a (eng. *leak point pressure*; tlak u mokraćnom mjehuru kod kojeg nastupa gubitak mokraće) [medijan – raspon, mmHg] izmjerene kod ženki štakora 7 dana nakon placebo-transabdominalne uretrolize (STU) i placebo-vaginalne dilatacije (SVD) te u zdravih životinja koje su tretirane s pentadekapeptidom BPC 157 (7 dana, intraperitonealno (10 µg/kg (HealthyBµip) ili 10 ng/kg (HealthyBnip)) ili peroralno (10 µg/kg (HealthyBpo))). Kontrolna skupina životinja primala je ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu (Healthyip), odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće (Healthypo). n=7 za svaku skupinu. Nema statistički značajnih razlika ($p > 0.05$) između placebo-operiranih ili životinja tretiranih BPC 157 u usporedbi s korespondentnim kontrolnim skupinama.

S druge strane, kod štakorica podvrgnutih TU izmjerene su značajno niže vrijednosti LPP-a sedmi postoperativni dan. Operirane životinje tretirane pentadekapeptidom BPC 157, neovisno o apliciranoj dozi i putu administracije, imale su bitno manji pad vrijednosti LPP-a, koji se u nekim skupinama (mikrogramske doze) i nije statistički značajno razlikovao od vrijednosti zabilježenih kod zdravih životinja.

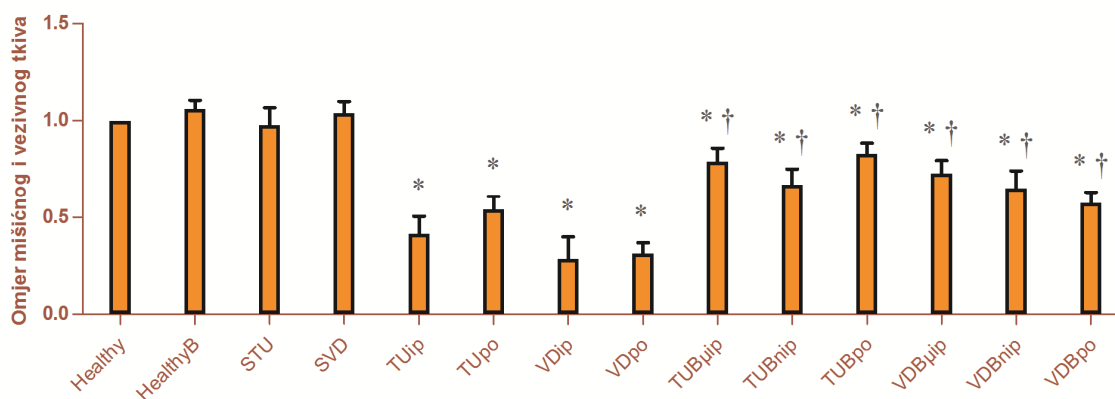
Također, rezultati testiranja životinja sedmi dan nakon VD pokazali su znatan pad u vrijednostima LPP-a u usporedbi s kontrolnim skupinama, i opet, statistički više vrijednosti LPP-a u svim skupinama tretiranih životinja, od kojih su neke (mikrogramske doze intraperitonealno) izgubile i statističku različitost prema skupini zdravih životinja (Grafikon 2).



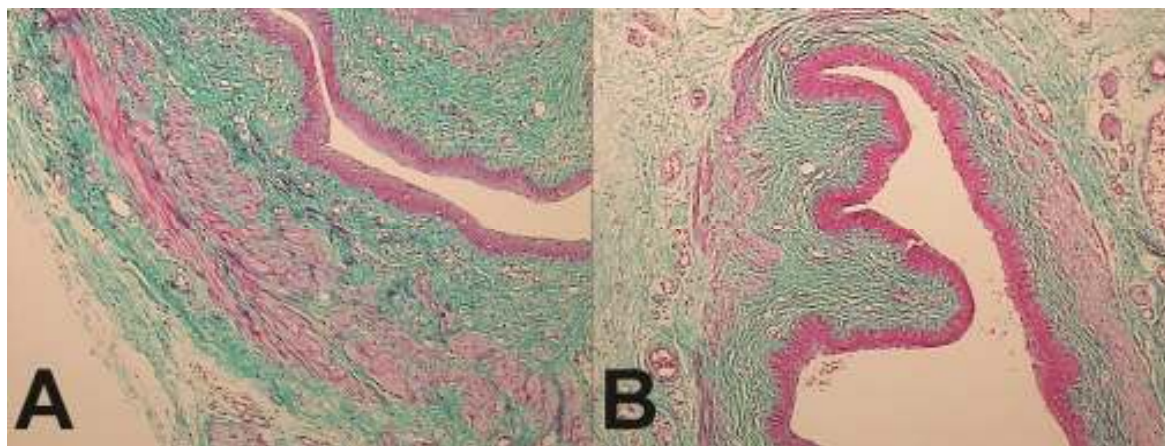
Grafikon 2. Vrijednosti LPP-a (eng. *leak point pressure*; tlak u mokraćnom mjehuru kod kojeg nastupa gubitak mokraće) [medijan – raspon, mmHg] izmjerene kod zdravih (Healthy) te 7 dana nakon transabdominalne uretrolize (TU) i protrahirane vaginalne dilatacije (VD) kod ženki štakora tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 (7 dana, intraperitonealno (10 µg/kg (TUBµip, VDµip) ili 10 ng/kg (TUBnip, VDnip)) ili peroralno (10 µg/kg (TUBpo, VDBpo))). Kontrolna skupina životinja primala je ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu (TUip, VDip), odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće (TUpo, VDpo). n=7 za svaku skupinu. * $p < 0.05$ u usporedbi prema skupini Healthy. † $p < 0.05$ u usporedbi s korespondentnim kontrolnim skupinama.

4.2. Histološka analiza

Nalazi histoloških analiza u konzistentnom su skladu s urodinamskim mjerenjima, bez iznađenih razlika u međusobnoj usporedbi zdravih netretiranih, zdravih tretiranih i placebo-operiranih životinja. Histomorfometrijske studije s Mallory trikrom bojanjem pokazale su naznačen gubitak mišićnog tkiva u nivou srednjeg segmenta uretre kod svih operiranih životinja, no gubitak je osobito izražen kod netretiranih životinja, kod kojih je ustanovljen statistički značajno niži omjer mišićnog i vezivnog tkiva u usporedbi s tretiranim eksperimentalnih grupama (Grafikon 3, Slika 5).

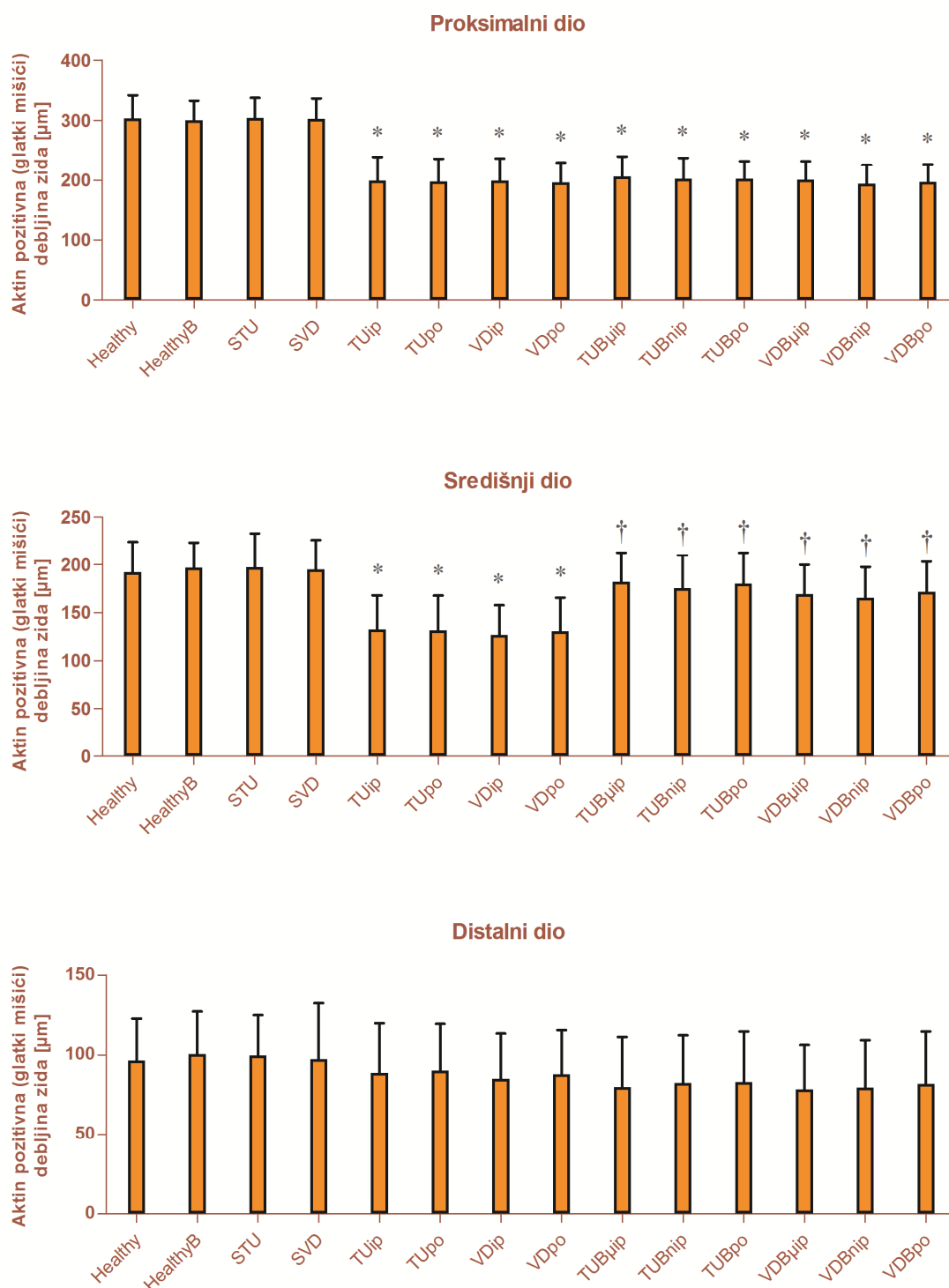


Grafikon 3. Omjeri mišićnog i vezivnog tkiva [prosjeak – SD] ustanovljeni u razini srednjeg segmenta uretre 7 dana nakon transabdominalne uretrolize (TU) i protrahirane vaginalne dilatacije (VD) kod ženki štakora tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 (7 dana, intraperitonealno (10 µg/kg (TUBµip, VDµip) ili 10 ng/kg (TUBnip, VDnip)) ili peroralno (10 µg/kg (TUBpo, VDBpo))), odnosno kod placebo-operiranih životinja (STU, SVD). Kontrolna skupina operiranih životinja primala je ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu (TUip, VDip), odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće (TUpo, VDpo). Zdrave kontrole primale su standardnu vodu za piće (Healthy) ili BPC 157 (10 µg/kg, intraperitonealno (HealthyB)). n=7 za svaku skupinu. * p<0.05 u usporedbi prema skupini Healthy. † p<0.05 u usporedbi s korespondentnim kontrolnim skupinama.



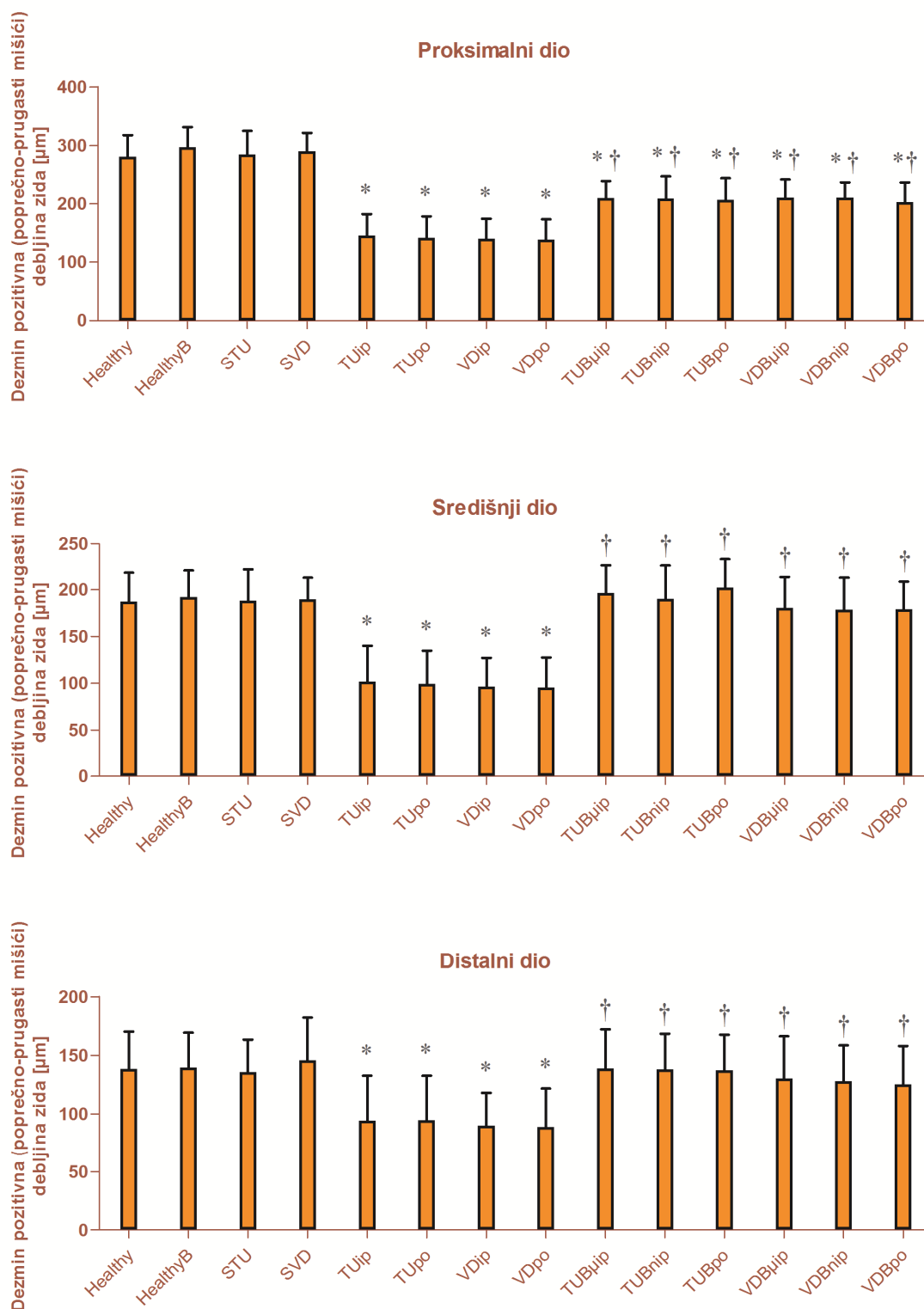
Slika 5. Mallory trikrom obojenje transverzalnog presjeka na razini središnjeg segmenta uretre 7 dana nakon protrahirane vaginalne dilatacije; BPC tretirane životinje (7 dana po 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intraperitonealno) pokazuju deblji i strukturalno pravilniji mišićni sloj uretralnog zida (A). U netretiranih životinja uočava se reducirani mišićni sloj na račun vezivnog tkiva (B). Izvorno povećanje 100x.

Nadalje, za skupine koje su nakon TU i VD primale terapiju s BPC 157, imunohistokemijske analize potvrdile su bitno veći udio SMA u razini središnjeg dijela uretre (Grafikon 4) te bitno veći udio dezmin pozitivnih struktura (Grafikon 5, Slika 6) u svim segmentima uretre (proksimalnom, središnjem i distalnom), kao i značajan porast gustoće krvnih žila (imunohistokemijsko bojanje na CD 34 antigen; Grafikon 6), također u svim segmentima uretre, u odnosu na netretirane operirane životinje. U usporedbi zdravih netretiranih životinja prema zdravim životinjama koje su primale terapiju s BPC 157, ni u jednom aspektu imunohistokemijskih analiza nije nađena statistički značajna razlika. Isto tako, uspoređujući zdrave prema skupinama operiranih životinjama koje su primale terapiju, razlike u rezultatima imunohistokemijskih analiza za CD34 antigen u svim segmentima, za dezmin u središnjem i distalnom te za SMA u središnjem dijelu uretre, nisu bili statistički značajne.



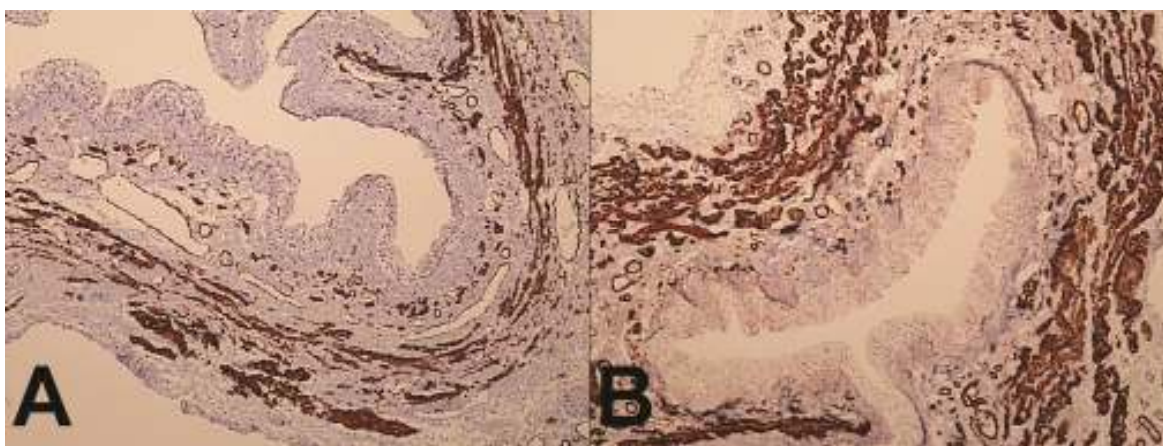
Grafikon 4. Aktin pozitivna (glatki mišići) debljina zida [prosjeak – SD, µm] izmjerena u razini proksimalnog, središnjeg i distalnog dijela uretre 7 dana nakon transabdominalne uretrolize (TU) i protrahirane vaginalne dilatacije (VD) kod ženki štakora tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 (7 dana, intraperitonealno (10 µg/kg (TUBµip, VDµip)

ili 10 ng/kg (TUBnip, VDnip)) ili peroralno (10 µg/kg (TUBpo, VDBpo))), odnosno kod placebo-operiranih životinja (STU, SVD). Kontrolna skupina operiranih životinja primala je ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu (TUip, VDip), odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće (TUpo, VDpo). Zdrave kontrole primale su standardnu vodu za piće (Healthy) ili BPC 157 (10 µg/kg, intraperitonealno (HealthyB)). n=7 za svaku skupinu. * p<0.05 u usporedbi prema skupini Healthy. † p<0.05 u usporedbi s korespondentnim kontrolnim skupinama.

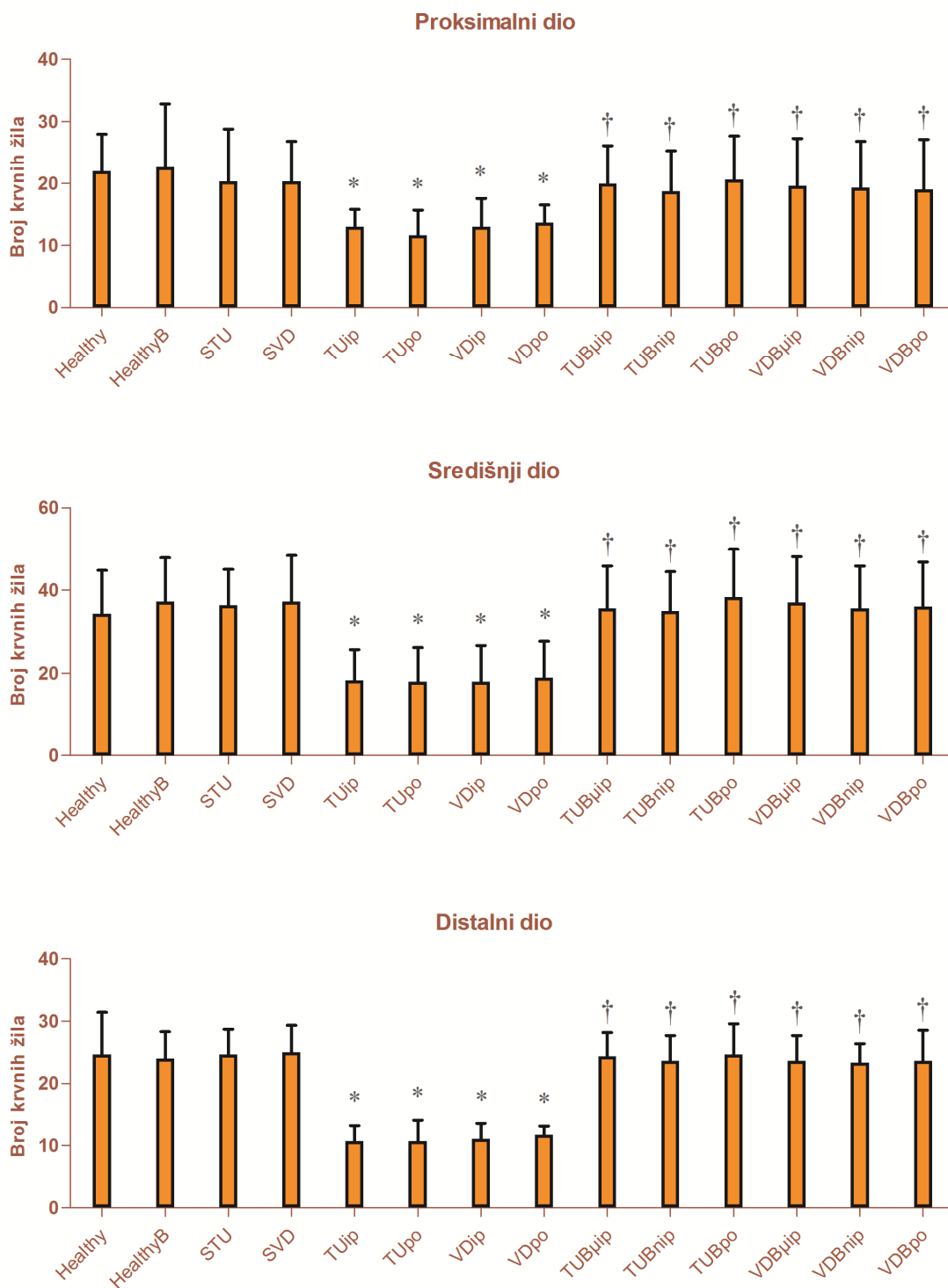


Grafikon 5. Dezmin pozitivna (poprečno-prugasti mišići) debljina zida [prosjeak – SD, μm] izmjerena u razini proksimalnog, središnjeg i distalnog dijela uretre 7 dana nakon

transabdominalne uretrolize (TU) i protrahirane vaginalne dilatacije (VD) kod ženki štakora tretiranih s pentadekapeptidom BPC 157 (7 dana, intraperitonealno (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TUB μip , VD μip) ili 10 ng/kg (TUB nip , VD nip)) ili peroralno (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TUB po , VDB po))), odnosno kod placebo-operiranih životinja (STU, SVD). Kontrolna skupina operiranih životinja primala je ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu (TU ip , VD ip), odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće (TU po , VD po). Zdrave kontrole primale su standardnu vodu za piće (Healthy) ili BPC 157 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intraperitonealno (HealthyB)). n=7 za svaku skupinu. * $p < 0.05$ u usporedbi prema skupini Healthy. † $p < 0.05$ u usporedbi s korespondentnim kontrolnim skupinama.



Slika 6. Imunohistokemijska izraženost dezmina u transverzalnom presjeku srednjeg segmenta uretre 7 dana nakon protrahirane vaginalne dilatacije; u netretiranih životinja uočava se reducirana dezmin pozitivna (poprečno-prugasti mišići) debljina uretralnog zida (A), u usporebi s BPC tretiranim životinjama (7 dana po 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intraperitonealno) (B). Izvorno povećanje 100x.



Grafikon 6. Broj krvnih žila [prosjeak – SD] izmjeren u razini u razini proksimalnog, središnjeg i distalnog dijela uretre 7 dana nakon transabdominalne uretrolize (TU) i protrahirane vaginalne dilatacije (VD) kod ženki štakora tretiranih s

pentadekapeptidom BPC 157 (7 dana, intraperitonealno (10 µg/kg (TUBµip, VDµip) ili 10 ng/kg (TUBnip, VDnip)) ili peroralno (10 µg/kg (TUBpo, VDBpo))), odnosno kod placebo-operiranih životinja (STU, SVD). Kontrolna skupina operiranih životinja primala je ekvolumno (5 mL/kg bruto težine) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu (TUip, VDip), odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće (TUpo, VDpo). Zdrave kontrole primale su standardnu vodu za piće (Healthy) ili BPC 157 (10 µg/kg, intraperitonealno (HealthyB)). n=7 za svaku skupinu. * p<0.05 u usporedbi prema skupini Healthy. † p<0.05 u usporedbi s korespondentnim kontrolnim skupinama.

5. RASPRAVA

Kao što je na osnovi prethodno uočenih terapijskih efekata pentadekapaptida BPC 157 na oštećenja glatkih i poprečno-prugastih mišića [66,82,83,104,115,116,144] i disfunkciju sfinktera (npr. donjeg ezofagealnog i piloričkog) [65,75,76] u ovom radu hipotetizirano, sedmodnevna terapija s BPC 157 uspješno je prevenirala pad vrijednosti LPP-a izazvan TU i VD, i to i u intraperitonealnom (μg i ng doze) i u peroralnom režimu primjene. Urodinamski dokaz održane funkcije konzistentno je poduprt s unaprijeđenom mikroskopskom/imunohistekimijskom prezentacijom glatkog i poprečno-prugastog mišićnog tkiva praćenom u svim segmentima uretre. Za razliku od nekih predloženih medikamentoznih terapija koje mijenjaju tlakove u mjehuru i uretri i kod zdravih životinja (npr. α -agonisti [44] ili SNRI [136], čime se u konačnici simptomatski korigira i stanje SUI, terapija s BPC 157 nije izazvala promjenu LPP-a u zdravih životinja, sugerirajući specifičan učinak na oporavak zapornog mehanizma uretre nakon lezija koje inače redovito dovode do stanja SUI. Značajno narušena funkcija uretre kod kontrolnih životinja nakon TU i VD, (koja je inače konzistentna s rezultatima studija drugih istraživača [126]) te njezin oporavak kod BPC 157 tretiranih životinja, može biti posljedica, kao što je u dosadašnjim studijama o oštećenju mišića redovito uočeno [83,104,115,116,144], unaprijeđenog procesa cijeljenja, ili *vice versa*; oporavak funkcije može sam po sebi promovirati kvalitetu cijeljenja [161]. Pokazano je da takav oporavak može biti gotovo potpun i, u izvjesnoj mjeri, ovisan o terapijskoj dozi, s vrijednostima LPP-a koje nakon terapije dostižu one izmjerene u potpuno zdravih životinja. Jednako tako, atenuacija glatke i poprečno-prugaste uretralne muskulature u svim

segmentima izbjegnuta je uz terapiju s BPC 157, s održanim skoro normalnim histološkim ustrojem, što omogućava funkcionalno fiziološko očuvanje primjerenih LPP vrijednosti u tretiranih životinja.

Uvažavajući činjenicu da je SUI u naravi kompleksne patogeneze, i da svaki „akutni“ životinjski model ima svoja ograničenja, za potrebe ovog istraživanja korištena su dva različita, ali dobro etablirana [126-129], životinjska modela: TU i VD. TU prototip je durabilnog modela SUI u kojem postoji znatan gubitak uretralne anatomske potpore oštećenjem parauretralnog veziva te denervacijska ozljeda s posljedičnom atrofijom mišićja i konačnim smanjenjem omjera mišićnog i vezivnog tkiva uretre [126,129]. S druge strane, simulirani porođaj tj. VD funkcionalno ocrtava stanje SUI posredstvom ozljede uretralnog sfinktera (disrupcija glatkih i poprečno-prugastih mišićnih vlakana uretre), distalnih ogranaka pudendalnog živca i adrenergičkih živčanih vlakana, a koja je izazvana pritiskom dilatirane vagine na kosti zdjelice (napose na pubičnu simfizu), te hipoksičnim oštećenjem uzrokovanim reduciranom krvnom opskrbom uretre, mjehura i vagine [126-128,133-135]. Imajući, dakle, na umu da ovi modeli svaki na svoj način uključuju alteraciju i strukturalne (fizička potpora donjem urinarnom traktu koju čine mišići i vezivo dna zdjelice) i neuromuskularne (pudendalni živac i sfinkterski aparat uretre) [28] sastavnice mehanizma kontinencije, uspjeh terapije s BPC 157 dokazan na oba modela podrazumijeva multifaktorijalnu promociju cijeljenja tj. analogan je prethodno opisanim učincima ovog pentadekapeptida na cijeljenje različitih tkiva [82,83,97,98,100,114-124,144,145,148]. Nadalje, važnost ovakvih rezultata ogleda se i u činjenici da, primjerice učinci na cijeljenje ozlijeđenih i/ili presječenih različitih mišićnih struktura koji bi bili korespondentni učincima na SUI

modelima [83,104,115,116,144], do sada nisu konkretno dokumentirani kod drugih predloženih terapeutika za SUI [34,36,41,43,44,49]. Prvenstveno, kako je prikazano u ovom istraživanju, a i u studijama drugih autora [126,128], najupadljiviji histološki dokaz oštećenja uretre upravo je u poprečno-prugastom mišićnom sloju, pa je uočena mikroskopska/imunohistokemijska prezentacija te povraćena funkcija (koja bi inače bila ireverzibilno ograničena) kod BPC 157 modela s presječenim [104,115] ili nagnječenim poprečno-prugastim mišićem [104,116,144], u potpunoj analogiji sa značajno očuvanom dezmin pozitivnošću u svim segmentima uretre životinja tretiranih s BPC 157 nakon TU i VD, kao i sa posljedično održanim fiziološkim vrijednostima LPP-a. Po svemu sudeći, cijeljenje mišića inducirano s pentadekapeptidom BPC 157 odnosi se na modulaciju istih procesa; promicanju regeneracije miocita, s posljedično skraćenim periodom cijeljenja i stoga manje izraženim formiranjem vezivnog ožiljka, efektom koji je opet analogan značajno poboljšanom omjeru mišićnog i vezivnog tkiva u uretrama tretiranih životinja, kako je ustanovljeno u ovom istraživanju. Nastavno na opisane učinke u cijeljenju poprečno-prugastih mišića [104,115,116,144], učinci BPC 157 (u istim režimima primjene) na cijeljenje glatke muskulature i sfinktera gastrointestinalnog trakta [66,69,75,76,82,83], na oporavak lezije perifernih živaca [117] te na angiogenezu [104], također mogu biti osobito relevantni za tijek oporavka nakon TU i VD, što će u daljnjem tekstu biti detaljnije obrazloženo.

Kako je ustanovljeno, postupci TU i VD, uz leziju poprečno-prugaste muskulature, istodobno uzrokuju i nesposredno narušavanje integriteta glatkih mišićnih struktura. U tom smislu, značajno je spomenuti učinak terapije s BPC 157 na cijeljenje anastomoza crijeva (ileoilealne, kolokolične, ileojejunalne)

[66,69,82,83], uključujući i model kratkog crijeva, gdje je i kod peroralno i kod parenteralno tretiranih životinja uz uspješno cijeljenje anastomoze nakon 80%-tne resekcije tankog crijeva, uočena i kompenzatorna hipertrofija intestinalnih vila i produbljenje kripti u mukozu crijeva te posebice zadebljanje unutarnjeg (cirkularnog) mišićnog sloja crijeva (4x više u odnosu na neoperirane kontrole) [83]. Naime, s obzirom da uretralnom tlaku u fazi punjenja mjehura doprinose i poprečno-prugasti i glatki mišići, uz naknadnu aktivaciju i brzokontraktilnih (eng. *fast-twitch*) vlakana (kod porasta intraabdominalnog tlaka) [17,32], integralan oporavak funkcije svake od mišićnih sastavnica može biti ključan za uočeno održanje kontinencije kod BPC 157 tretiranih životinja. Kao sugestivna konjektura, sličnosti gastrointestinalnog i urinarnog trakta: prisutnost stanica u uretralnim mišićima sa svojstvima sličnim intersticijskim Cajalovim stanicama gastrointestinalnog trakta [162], analogna povezanost tih i Cajalovih stanica s nitrergičkim i drugim neuronima [163], napose obilje peptidergičkih neurona u gastrointestinalnim i uretralnom sfinkteru [32,164] ukazuju na mogućnost da su isti/slični homeostatski mehanizmi aplikabilni na oba sustava. No, čak iako disfunkcije gastrointestinalnog i urinarnog trakta (npr. SUI) mogu biti predstavljene potpuno različitim mehanizmima, mehanizam sfinkterskog zatajenja na modelu štakorskog ezofagitisa [75,76] konkretno se može poistovijetiti s onim kod VD [49,126-128]. Naime, u oba slučaja lezija je posredovana prolongiranom dilatacijom mišićnih struktura, sa trajnim gubitkom zaporne moći sfinktera koje nije spontano povraćena do kraja eksperimentalnog praćenja. Također, u oba slučaja evidentan je učinak terpije s BPC 157 na sfinktersku funkciju, i to u parenteralnom i peroralnom režimu primjene.

Kao što je u uvodnim poglavljima opširnije iznešeno, oštećenje pudendalnog živca bitna je sastavnica u patofiziologiji SUI. Rezultati EMG-a i testova provodljivosti pudendalnog živca u britanskoj studiji koju su na 96 prvorodilja izveli Allen i sur. [27], jasno su ukazali na parcijalnu denervaciju/oštećenje mišića dna zdjelice nakon poroda, s uspješnim spontanom cijeljenjem (reinervacijom) u (tek) 80% slučajeva. Autori zaključuju da zaostala parcijalna denervacija dna zdjelice predstavlja prvi korak prema budućoj SUI i/ili prolapsu organa zdjelice. Ovo opažanje pogotovo je važno ako se sagleda uz DeLanceyjev zaključak da oštećenje mišića levatora anusa (i/ili pudendalnog živca) nastupa prilikom vaginalnog porođaja, nakon čega se njegova funkcija tek marginalno agravira s dobi, dok gubitak intrizičke uretralne kompetencije neminovno proporcionalno progredira sa starenjem [26]. Do tog važnog zaključka DeLancey je došao obrazlažući kontradiktorne rezultate svojih dvaju etioloških studija SUI; u jednoj, koja je istraživala kohortu mladih prvorodilja, ispad funkcije mišića levatora anusa ima snažnu prediktivnu vrijednost za prisustvo SUI [26], dok u drugoj, koja je zahvaćala posmenopauzalnu populaciju žena, isti ispad nije imao nikakav prediktivni značaj (ROSE studija) [132]. Drugim riječima, prezervacija inervacije nakon porođajne traume, odnosno promovirano cijeljenje neposredno po nastupu lezije (kao što je to u slučaju eksperimentalnog modela VD i terapije s BPC 157) moglo bi biti presudno za dugoročan ishod u patogenezi SUI. Oštećenje pudendalnog živca (nagnječenje, transekcija) u kontekstu SUI demonstrirano je i nekolicinom štakorskih modela [126], na platformi kojih stanovit uspjeh u oporavku LPP-a nakon simulirane porodne traume (nagnječenje pudendalnog živca) nedavno su postigli klivlendski autori koristeći neposredno nakon ozljede lokalnu

(dakle, direktno u ledirano područje) infuziju BDNF (u dozi 2 µg dnevno), kao terapiju kojom se promovira neuroregenerativni odgovor [142]. Ovakav vid peptidne terapije zahtijeva striktno perineuralnu aplikaciju, jer uz svoje neuroregenerativno djelovanje, BDNF ima inhibitoran učinak na diferencijaciju mioblasti i formiranje neuromuskularne spojnice [165]. Zbog nepraktičnosti administriranja terapije ovakav pristup nije primjenjiv u kliničkoj praksi, ali podcrtava potencijal ranog (npr. postpartalno) profilaktičkog/terapijskog pristupa kompleksnoj neuromuskularnoj ozljedi kao što je porodna trauma. S druge strane, BPC 157 uz opisane promotivne učinke na cijeljenje mišića [66,69,82,83,104,115,116,144] ima i snažne neuroregenerativne učinke [117,119] (npr. ubrzano cijeljenje ishijadičnog živca nakon transekcije), doprinoseći tako ranom povratu funkcije nakon ozljede. Za naglasiti je da su gubitak inervacije i atrofija mišića prisutni u oba modela (TU i VD) korištena u ovom istraživanju [126-129]. S obzirom da cijeljenje ozlijeđenog mišića [104,115,116,144] podrazumijeva i regeneraciju intramuskularnih ogranaka živca [140], može se zaključiti da se u uspješnom oporavku uz BPC 157 ovi paralelni procesi međusobno promoviraju [133].

Uz direktnu mehaničku ozljedu (pritisak, istezanje) mišića i živaca dna zdjelice i uretre, nastanku SUI nakon VD doprinosi i hipoksična ozljeda. Kao što su pokazali Cannon i sur., protrahirana dilatacija rodnice (u neprekidnom trajanju od jednog sata) u usporedbi s intermitentom (pet minuta dilatacije i pauze, naizmjenično kroz 30 minuta) uzrokuje značajan pad LPP-a, uz histološki dokaz jače disrupcije i stanjenja mišićnog sloja uretre koji je nastupio već četvrti dan nakon VD [128]. Upravo protrahirana dilatacija, kakva je korištena i u ovom

istraživanju (u neprekidnom trajanju od 2 sata), i koja odgovara prolongiranom drugom porodnom dobu u porođaju, predstavlja, dakle, izazov za cijeljenje hipoksičnih oštećenja. Naime, s obzirom da za razliku od susjednih organa nije fiziološki predviđena za rastezanje (za razliku npr. od rektuma, rodnice i mokraćnog mjehura), a uz to ima i najmanje redundantnu krvnu opskrbu u usporedbi sa susjednim organima koji su irigirani s više ogranaka velikih krvnih žila zdjelice [166], uretra je organ vrlo vulnerabilan na hipoksična oštećenja. Ovo opažanje je u eksperimentima s VD ilustrirano s najjačom ekspresijom hipoksijom inducibilnog faktora-1alfa (eng. *hypoxia-inducible factor1alpha* (HIF-1 α)) baš u uretri [167]. Inače, HIF-1 α je poznat kao ključni medijator koji nizvodno (eng. *downstream*) regulira produkciju VEGF-a i ostalih faktora bitnih za odgovor na hipoksiju tkiva [168]. S tim u vezi, prethodno dokumentirani angiogeni učinci terapije s BPC 157 [103,104], mogu objasniti u ovom istraživanju uočen porast gustoće krvnih žila u uretrama tretiranih životinja nakon TU i VD, koji je u konzistentan s očuvanim vrijednostima LPP-a i unaprijeđenom histološkom mišićnom prezentacijom. Naime, u raznim modelima terapije s BPC 157, osobito kod cijeljenja mišića [104,115,116], čak i u kortikosteroidima agraviranim uvjetima [144], kao i u hipovaskularnim tkivima (npr. tetiva) [104,120-123], uočen je rani „pomak u lijevo“ u neoangiogenezi, demonstriran ranom ekspresijom VEGF, CD34 i FVIII [104], koji je paralelan sa specifičnim učinkom na cijeljenje vezivnog tkiva [100] – ranom ekspresiju *egr-1* gena (kritično važnog induktora transaktivacije više srodnih gena u ranom procesu cijeljenja [101]), te njegovog ko-represora NAB2, s posljedičnim ranim odlaganjem i organizacijom kolagenog matriksa (tip III kolagena promptno zamijenjen tipom I, s rezultirajućim povećanjem tkivnog

volumena) [100]. Istovremeno, *in vitro* studije pokazale su odgođenu endogenu ekspresiju γ -interferona u granulacijskom tkivu tretiranom BPC-em [100], koji inače, egzogeno apliciran, inhibira sintezu kolagena i maturaciju granulacijskog tkiva na mjestu ozljede [169]. Kako su u granulacijskom tkivu kolagen producirajući fibroblasti i njihova daljnja diferencijacija u funkciji formiranja novostvorenih krvnih žila [103], BPC-ev doprinos cijeljenju u tom smislu jasno je dokazan. I dok BPC 157 ne pokazuje angiogeni efekt na kulturama stanica [104], pojačana angiogeneza u svim *in vivo* modelima jasno je korelirala s biomehaničkom kvalitetom cijeljenja [98,115,116,144]. Konačno, ovdje je vrijedno podsjetiti da tlaku zatvaranja uretre, uz muskularnu, doprinosi i nemuskularna komponenta uretre, pod kojom se podrazumijeva doprinos vaskularnih pleksusa u adekvatnoj mukoznoj koaptaciji uretre [20] (a koji prema istraživanjima Ruda i sur. iznosi oko 28% ukupnog tlaka zatvaranja uretre [21]), stoga povećanje broja krvnih žila u uretrama tretiranih životinja u usporedbi s netretiranim može imati i zasebni doprinos održanju kontinencije nakon TU ili VD.

Nadalje, ovdje razložena medijatorsko-regulatorna uloga BPC 157 odnosi se na mehanizme procesa cijeljenja koji bi, prema recentnim spoznajama, mogli odgovarati onima uočenim u ekperimentalnim transplantacijama matičnih stanica u svrhu terapije SUI. Naime, suprotno izvornoj premisi terapijskog mehanizma djelovanja periuretralno transplantiranih prekurzorskih stanica [58,156], prema kojoj se one diferenciraju u različite tipove stanica i tako inkorporiraju u oštećeno tkivo, sve su uvjerljiviji dokazi da su njihovi terapijski učinci prije svega posljedica produkcije parakrinih medijatora poput peptidnih faktora rasta [58,59,157], napose VEGF-a [155,158], s pratećim porastom broja periuretralnih krvnih žila [154] i

konačnom regeneracijom oštećenog tkiva/organa. Sukladni s tim su i nalazi uspješnije terapije s tranplantiranim mioblastima uz simultanu lokalnu koaplikaciju primjerice PDGF-a [152], spram kojeg je BPC 157 u *in vitro* studijama pokazao superiorniji učinak u stimulaciji rane organizacije kolagena, te ranije sazrijevanje granulacijskog tkiva [100]. Dodatno, BPC 157 mogao bi imati i direktan učinak na mioblaste, analogno učincima koje ima na fibroblaste tetive, a koji su prema istraživanju tajvanskih autora posredovani aktivacijom FAK – paksilinskog puta [121].

Idući aspekt u promociji cijeljenja koji može biti relevantan za funkcionalni i histološki oporavak nakon TU i VD je antiinflamatorni učinak ovog peptida. Tako je uočeno da primjena BPC-a 157 smanjuje eksudaciju upalnih medijatora, leukotriena B₄ i tromboksana B₂ u serumu i tkivima te mijeloperoksidaze u području ozljede [105]. Na taj način dolazi do značajno manje eksudacije polimorfonukleara uz istovremeno pojačanu eksudaciju mononukleara u područje ozljede, čime je reducirana aktivnost kolagenaza, a povećana produkcija citokina u mononuklearnim fagocitima, bitnih za kvalitetan proces cijeljenja [66,105]. Nadalje, pentadekapeptid BPC-a 157 ima dokazan direktan učinak na sintezu i modulaciju sinteze dušikovog monoksida (npr. antagonizam učinaka snažnog kompetitivnog inhibitora endotelne NO sintaze, L-NAME) [77,106-108], što neposredno stimulira proces cijeljenja; u ranom razdoblju, NO posredovanim vazodilatacijskim učinkom, i kasnije, poticanjem sinteze kolagena [77,106-109], a što je specifično demonstrirano u studijama regeneracije mišića [110]. Jednako tako, nastavno na interakciju s NO sustavom, čije zatajenje dovodi do hiperprodukcije endotelina, uzrokujući razvoj fibroze, [111], na modelu doksorubicinskog oštećenja srčanog

mišića, demonstriran je antagonizirajući učinak BPC-a 157 na prekomjernu ekspresiju endotelina [112], što uz efekt direktne protekcije endotela (dokazan originalnim Szabovim protokolom za etanolska endotelna oštećenja [113]), te antitrombotskim djelovanjem (npr. na mjestu kreirane aortalne anastomoze [114]) u konjukciji s gore opisanim učincima upućuje na zaključak da pentadekapeptid BPC 157 inicira i održava proces cijeljenja u svim njegovim fazama [109].

Predloženi dokazi o uspješnom funkcionalnom i histološkom oporavku kontinencije u oba korištena modela uvjerljivo sugeriraju da bi se terapija s pentadekapeptidom BPC 157 mogla selektivno primijeniti u stanjima koja su etiološki i patofiziološki vezana uz SUI. Dakako, imajući u vidu očita ograničenja ovih (kao, uostalom, i svih ostalih) animiranih modela SUI, koja se prije svega odnose na činjenicu da ni jedan „akutni“ model ne može ocrtavati sve značajke kroničnog funkcionalnog sindroma, učinak BPC 157 na klasičnu kliničku prezentaciju SUI ostaje nerasvijetljen. No, iako je sedmodnevni period neusporediv s kliničkom situacijom u kojoj je lezija nastupila i dekadama ranije, relevantnost ovakvih modela [126-129] (i predloženih terapija, također) priznata je i u studijama kraćeg razdoblja, npr. u trajanju od samo 4 dana [24,49]. To i nije iznenađujuće, jer prema opće prihvaćenom shvaćanju, agravacija ili promocija cijeljenja u ranom tijeku mogu biti od presudnog značaja za dugoročni (čak i konačni) pozitivni ili negativni ishod neke lezije. Neovisno o tomu, u drugim relevantnim studijama s pentadekapeptidom BPC 157, uspješno su primjenjivani modeli i sa značajno dužim periodom induciranja lezije [75,76,84,92,94].

Drugim riječima, iako je ova studija više o prevenciji nego o terapiji SUI, važnost uočenih rezultata svakako ne bi trebala biti sporna. Naime, rezultati tretmana s BPC 157 nakon TU i VD održani su i nakon 24 sata od zadnje aplikacije (intraperitonealni režim), sugerirajući dugotrajan, odnosno konačan učinak terapije. S druge strane, usporediva učinkovitost peroralne administracije, (dokumentirana i u prethodnim eksperimentima [82,83,160]) svakako je s praktičnog aspekta u prednosti nad ostalim preventivnim/terapijskim strategijama za SUI. Nadalje, dobro poznate nuspojave vezane prije svega uz serotoninski efekt (mučnina, slabost, insomnija, kserostomija i sl.) kod danas relativno etabliranog farmakološkog pripravka za SUI, duloksetina (odobrenom za terapiju SUI u zemljama EU od 2004. [37,46], a zabranjenom u SAD 2005. godine [47]), te kod „*off-label*“ terapije imipraminom, razlog su visoke stope odustajanja od liječenja čime je dovedena u pitanje održivost takve terapije [35,37,46]. S tim u vezi, interesantno je napomenuti da periferna administracija pentadekapeptida BPC 157 selektivno modulira sintezu serotonina u štakorskom mozgu [93] i unapređuje bihevioralni odgovor u Porsoltovom testu (naspram imipramina) [94], sa specifičnim antagonizmom prema serotoninskom sindromu [95], koji je potencijalno fatalna komplikacija terapije sa SNRI [50]. K tome, za razliku od većine predloženih eksperimentalnih medikamentoznih terapija za SUI (npr. adrenergički lijekovi), kod kojih su kardiovaskularne nuspojave glavni problem [37,41-44], u *in vivo* modelima kardiovaskularne funkcije, terapija s BPC 157 dokazano ne mijenja krvni tlak niti srčanu akciju [77,107,112]. Napokon, toksikološke analize ukazuju na siguran terapijski profil (granični test negativan), bez uočenih nuspojava u kliničkim studijama [62,65], što dodatno opravdava daljnja istraživanja terapijske primjene ovog peptida

6. ZAKLJUČCI

- Terapija s pentadekapeptidom BPC 157 uspješno djeluje na oporavak stresne urinarne inkontinencije izazvane transabdominalnom uretrolizom i protrahiranom vaginalnom dilatacijom, što je urodinamski predočeno značajno višim vrijednostima LPP-a u tretiranih životinja, koje dostižu fiziološke vrijednosti
- Funkcionalni oporavak konzistentno korelira s unaprijeđenom mikroskopskom/imunohistekimijском prezentacijom i glatkog i poprečno-prugastog mišićnog tkiva praćenom u svim segmentima uretre, uključujući i porast gustoće krvnih žila u uretrama tretiranih životinja
- Pentadekapeptid BPC 157 nema učinka na vrijednosti LPP-a u zdravih životinja, niti alterira njihovu histološku prezentaciju
- Terapijski učinci pentadekapeptida BPC 157 postižu se i u mikrogramskim i nanogramskim režimima i pokazuju ovisnost o dozi
- Usporediva je terapijska učinkovitost BPC-a 157 u peroralnom i u intraperitonealnom režimu primjene
- Demonstrirani učinci mogu predstavljati osnov za buduće strategije terapijsko-prevenicijskog pristupa stresnoj urinarnoj inkontinenciji

7. SAŽETAK

Pozadina: Na osnovi prethodno ustanovljenih promotivnih učinaka stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 (PL 14736) na tkivno specifične procese cijeljenja, npr. skeletnih poprečno-prugastih te glatkih mišića gastrointestinalnog trakta, napose sfinktera, kao i živčanog tkiva, u ovom je radu istraživan njegov učinak na oporavak urodinamskog parametra LPP (eng. leak point pressure) u štakorskim modelima stresne urinarne inkontinencije (SUI) s transabdominalnom uretrolizom (TU) i protrahiranom vaginalnom dilatacijom (VD), uz praćenje histoloških promjena na uretrama eksperimentalnih životinja.

Materijali/ Metode: Tretman s pentadekapeptidom BPC157 proveden je u trajanju od 7 dana i kod zdravih i kod operiranih životinja (TU ili VD), i to (i) intraperitonealno, 10 µg/kg ili 10 ng/kg, (prva doza 30 minuta nakon operacije, posljednja 24 sata prije mjerenja LPP-a i žrtvovanja), ili (ii) peroralno, 10 µg/kg otopljen u vodi za piće (0.16 µg/mL, 12 mL po štakoru po danu). Kontrolne životinje primale su ekvolumno (5 mL/kg) intraperitonealno čistu fiziološku otopinu, odnosno, peroralno, standardnu vodu za piće. Vezikouretralni segmenti preuzeti su za imunohistokemijsku analizu.

Rezultati: Svi režimi terapije s BPC 157 spriječile su pad u vrijednostima LPP-a nakon TU i VD. Dodatno, pojedine skupine s mikrogramskim dozama (peroralno i intraperitonealno kod TU, te intraperitonealno kod VD) dostižu vrijednosti LPP-uočene kod zdravih životinja. U zdravih životinja, terapija s BPC 157 nije alterirala vrijednosti LPP-a. Imunohistokemijske analize uretri životinja tretiranih s BPC 157 pokazale su, u odnosu na kontrole, veću pozitivnost za dezmin (prikaz udjela poprečno-prugastih mišićnih vlakana), glatkomišićni aktin te

za CD34 (marker angiogeneze), kao i sačuvan omjer ukupnog mišićnog i vezivnog tkiva (bojanje Mallory trikrom metodom).

Zaključci: Pentadekapeptid BPC 157 primijenjen peoralno ili intra-peritonealno ima terapijske učinke na SUI, funkcionalno i histološki korigirajući inače dertimentalan tijek nakon TU i VD. Demonstrirani učinci mogu predstavljati osnov za buduće strategije terapijsko-prevencijskog pristupa SUI

Ključne riječi: leak point pressure, pentadekapeptid BPC 157, štakorska uretra, stres urinarna inkontinencija

8. SUMMARY

THE EFFECTS OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 IN STRESS URINARY INCONTINENCE MODELS IN FEMALE RATS

Background: Since an originally anti-ulcer stable gastric penta-decapeptide BPC 157 (PL 14736) was shown to promote healing of injured striated muscle and also smooth muscle in the gastrointestinal tract, we explored its therapeutic potentials for leak point pressure (LPP) recovery in rat stress urinary incontinence (SUI) after transabdominal urethrolisis (TU) and prolonged vaginal dilatation (VD), along with urethral histology assessment.

Materials/Methods: During a 7-day period, TU-rats and VD-rats (or healthy rats) received BPC 157, either (i) intraperitoneally, 10 µg/kg or 10 ng/kg, once daily (first administration 30 min after surgery, last 24 h before LPP-testing and sacrifice), or (ii) per-orally, 10 µg/kg in drinking water (0.16 µg/mL, 12 mL/rat/day). Controls received only drinking water or an equal volume of saline (5 mL/kg, intraperitoneally). Vesicourethral segments were harvested for immunohistochemical evaluation.

Results: All BPC 157 regimens counteracted decrease of LPP values in TU-rats and VD-rats. Additionally, BPC 157-TU rats (µg-intraperitoneally or per-orally) and BPC 157-VD rats (µg intraperitoneally) reached LPP values originally noted in healthy rats. Conversely, in healthy rats, BPC 157 did not alter LPP. Immunohistochemical studies revealed higher desmin (delineates striated organization of skeletal muscle), smooth muscle actin, and CD34 (angiogenic marker) positivity within the urethral wall in BPC 157-treated rats vs. controls, as

well as overall preserved muscle/connective tissue ratio assessed with Mallory's trichrome staining.

Conclusions: Pentadecapeptide BPC 157, applied parenterally or orally, appears to ameliorate the SUI in rat models, improving the otherwise detrimental course of healing after VD and TU, which may be analogous to human injury. These beneficial effects may possibly be selectively used in future strategies for treatment of SUI.

Key words: leak point pressure, pentadecapeptide BPC 157, rat urethra, stress urinary incontinence

9. LITERATURA

1. Weber AM, Abrams P, Brubaker L, i sur. The standardization of terminology for researchers in female pelvic floor disorders. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001;12(3):178-86.
2. Herzog AR, Fultz NH. Prevalence and incidence of urinary incontinence in community-dwelling populations. *J Am Geriatr Soc* 1990;38(3):273-81.
3. Hannestad YS, Rortveit G, Sandvik H, Hunskaar S. A community-based epidemiological survey of female urinary incontinence: the Norwegian EPINCONT study. *Epidemiology of Incontinence in the County of Nord-Trondelag. J Clin Epidemiol* 2000;53(11):1150-7.
4. Cundiff GW. The pathophysiology of stress urinary incontinence: a historical perspective. *Rev Urol* 2004;6 Suppl 3:10-8.
5. Kelly HA, Dumm WM. Urinary incontinence in women, without manifest injury to the bladder: A report of cases. *Surg Gynecol Obstet* 1914;18:444–50.
6. Bonney V. On diurnal incontinence of urine in women. *J Obstet Gynecol Br Emp* 1923;30:358–65.
7. Jeffcoate TN, Roberts H. Observations on stress incontinence of urine. *Am J Obstet Gynecol* 1952;64(4):721-38.
8. Enhorning G. Simultaneous recording of intravesical and intra-urethral pressure. A study on urethral closure in normal and stress incontinent women. *Acta Chir Scand Suppl* 1961;Suppl 276:1-68.
9. Enhorning G, Miller ER, Hinman F jr. Urethral closure studied with cineroentgenography and simultaneous bladder-urethra pressure recording. *Surg Gynecol Obstet* 1964;118:507-16.
10. Greenwald SW, Thornbury JR, Dunn LJ. Cystourethrography as a diagnostic aid in stress incontinence. An evaluation. *Obstet Gynecol* 1967;29(3):324-7.
11. Kitzmiller JL, Manzer GA, Nebel WA, Lucas WE. Chain cystourethrogram and stress incontinence. *Obstet Gynecol* 1972;39(3):333-40.
12. Bump RC, Copeland WE jr, Hurt WG, Fantl JA. Dynamic urethral pressure/profilometry pressure transmission ratio determinations in stress-incontinent and stress-continent subjects. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159(3):749-55.
13. Snooks SJ, Badenoch DF, Tiptaft RC, Swash M. Perineal nerve damage in genuine stress urinary incontinence. An electrophysiological study. *Br J Urol* 1985;57(4):422-6.
14. Smith AR, Hosker GL, Warrell DW. The role of pudendal nerve damage in the aetiology of genuine stress incontinence in women. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96(1):29-32.
15. Blaivas JG, Olsson CA. Stress incontinence: classification and surgical approach. *J Urol* 1988;139(4):727-31.

16. Swift SE, Ostergard DR. A comparison of stress leak-point pressure and maximal urethral closure pressure in patients with genuine stress incontinence. *Obstet Gynecol* 1995;85(5 Pt 1):704-8.
17. Brading AF. The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp Physiol* 1999;84(1):215-21.
18. DeLancey JO. Correlative study of paraurethral anatomy. *Obstet Gynecol* 1986;68(1):91-7.
19. DeLancey JO. Structural aspects of the extrinsic continence mechanism. *Obstet Gynecol* 1988;72(3 Pt 1):296-301.
20. Raz S, Caine M, Zeigler M. The vascular component in the production of intraurethral pressure. *J Urol* 1972;108(1):93-6.
21. Rud T, Andersson KE, Asmussen M, Hunting A, Ulmsten U. Factors maintaining the intraurethral pressure in women. *Invest Urol* 1980;17(4):343-7.
22. Petros PE, Ulmsten UI. An integral theory of female urinary incontinence. Experimental and clinical considerations. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1990;153:7-31.
23. DeLancey JO. Stress urinary incontinence: where are we now, where should we go? *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(2):311-9.
24. DeLancey JO, Trowbridge ER, Miller JM, i sur. Stress urinary incontinence: relative importance of urethral support and urethral closure pressure. *J Urol* 2008;179(6):2286-90.
25. Rortveit G, Daltveit AK, Hannestad YS, Hunskaar S. Urinary incontinence after vaginal delivery or cesarean section. *N Engl J Med* 2003;348(10):900-7.
26. Delancey JO. Why do women have stress urinary incontinence? *Neurourol Urodyn* 2010;29 Suppl 1:13-7.
27. Allen RE, Hosker GL, Smith AR, Warrell DW. Pelvic floor damage and childbirth: a neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;97(9):770-9.
28. Rud T. Urethral pressure profile in continent women from childhood to old age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980;59(4):331-5.
29. Clobes A, DeLancey JO, Morgan DM. Urethral circular smooth muscle in young and old women. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198(5):587-95.
30. Verelst M, Maltau JM, Orbo A. Computerised morphometric study of the paraurethral tissue in young and elderly women. *Neurourol Urodyn* 2002;21(6):529-33.
31. Kim JK, Kim YJ, Choo MS, Cho KS. The urethra and its supporting structures in women with stress urinary incontinence: MR imaging using an endovaginal coil. *AJR Am J Roentgenol* 2003;180(4):1037-44.
32. Morrison J, Steers WD, Brading AF, i sur. Neurophysiology and neuropharmacology. U: Abrams P, Cardoza L, Khoury S, Wein A, ur. *Incontinence*. Plymouth: Health Publications; 2002, str. 86-163.

33. Daneshgari F, Moore C. Advancing the understanding of pathophysiological rationale for the treatment of stress urinary incontinence in women: the 'trampoline theory'. *BJU Int* 2006;98 Suppl 1:8-14.
34. Rovner ES, Wein AJ. Treatment options for stress urinary incontinence. *Rev Urol* 2004;6 Suppl 3:29-47.
35. Wilson PD, Bø K, Hay-Smith J, i sur. Conservative treatment in women. U: Abrams P, Cardoza L, Khoury S, Wein A, ur. Incontinence. Plymouth: Health Publications; 2002, str. 571-624.
36. Pesce F. Current management of stress urinary incontinence. *BJU Int* 2004;94 Suppl 1:8-13.
37. Smith AL, Wein AJ. Urinary incontinence: pharmacotherapy options. *Ann Med* 2011;43(6):461-76.
38. Gilling PJ, Wilson LC, Westenberg AM, i sur. A double-blind randomized controlled trial of electromagnetic stimulation of the pelvic floor vs sham therapy in the treatment of women with stress urinary incontinence. *BJU Int* 2009;103(10):1386-90.
39. Simunic V, Banovic I, Ciglar S, i sur. Local estrogen treatment in patients with urogenital symptoms. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;82(2):187-97.
40. Cody JD, Jacobs ML, Richardson K, Moehrer B, Hextall A. Oestrogen therapy for urinary incontinence in post-menopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD001405.
41. Alhasso A, Glazener CM, Pickard R, N'Dow J. Adrenergic drugs for urinary incontinence in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(3):CD001842.
42. Fleming GA. The FDA, regulation, and the risk of stroke. *N Engl J Med* 2000;343(25):1886-7.
43. Radley SC, Chapple CR, Bryan NP, Clarke DE, Craig DA. Effect of methoxamine on maximum urethral pressure in women with genuine stress incontinence: a placebo-controlled, double-blind crossover study. *Neurourol Urodyn* 2001;20(1):43-52.
44. Conlon K, Christy C, Westbrook S, i sur. Pharmacological properties of 2-((R-5-chloro-4-methoxymethylindan-1-yl)-1H-imidazole (PF-3774076), a novel and selective alpha1A-adrenergic partial agonist, in in vitro and in vivo models of urethral function. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;330(3):892-901.
45. Robinson D, Abrams P, Cardozo L, i sur. The efficacy and safety of PSD503 (phenylephrine 20%, w/w) for topical application in women with stress urinary incontinence. A phase II, multicentre, double-blind, placebo controlled, 2-way cross over study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;159(2):457-60.
46. Lucas MG, Bosch RJ, Burkhard FC, i sur. EAU guidelines on assessment and nonsurgical management of urinary incontinence. *Eur Urol* 2012;62(6):1130-42.
47. Lenzer J. FDA warns that antidepressants may increase suicidality in adults. *BMJ* 2005;331(7508):70.

48. Mehnert U, Boy S, Widmer-Simitovic S, Reitz A, Schurch B. The facilitatory effect of duloxetine combined with pelvic floor muscle training on the excitability of urethral sphincter motor neurons. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009;20(6):659-66.
49. Kitta T, Miyazato M, Chancellor MB, i sur. Alpha2-adrenoceptor blockade potentiates the effect of duloxetine on sneeze induced urethral continence reflex in rats. *J Urol* 2010;184(2):762-8.
50. Duloxetine: new drug. For stress urinary incontinence: too much risk, too little benefit. *Prescrire Int* 2005;14(80):218-20.
51. Diokno AC, Burgio K, Fultz n H, i sur. Prevalence and outcomes of continence surgery in community dwelling women. *J Urol* 2003;170(2 Pt 1):507-11.
52. Marshall VF, Marchetti AA, Krantz KE. The correction of stress incontinence by simple vesicourethral suspension. *Surg Gynecol Obstet* 1949;88(4):509-18.
53. Burch JC. Urethrovaginal fixation to Cooper's ligament for correction of stress incontinence, cystocele, and prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 1961;81:281-90.
54. Lucas MG, Bosch RJ, Burkhard FC, i sur. EAU guidelines on surgical treatment of urinary incontinence. *Actas Urol Esp* 2013;37(8):459-72.
55. Ulmsten U, Henriksson L, Johnson P, Varhos G. An ambulatory surgical procedure under local anesthesia for treatment of female urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1996;7(2):81-5.
56. The classic reprint. Concerning a subcutaneous prosthesis: Robert Gersuny. (Uber eine subcutane Prothese. *Zeitschrift f. Heilkunde Wien u Leipzig* 21:199, 1900.). Translated from the German by Miss Rita Euerle. *Plast Reconstr Surg* 1980;65(4):525-7.
57. Kirchin V, Page T, Keegan PE, i sur. Urethral injection therapy for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2:CD003881.
58. Lin CS, Lue TF. Stem cell therapy for stress urinary incontinence: a critical review. *Stem Cells Dev* 2012;21(6):834-43.
59. Lin CS, Lue TF. Adipose-Derived Stem Cells: Therapy through Paracrine Actions. U: Hayat MA, ur. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*. New York: Springer; 2012. str. 203–16.
60. Kleinert S, Horton R. Retraction--autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen [corrected] for treatment of stress urinary incontinence in women: a [corrected] randomised controlled trial. *Lancet* 2008;372(9641):789-90.
61. Vayleux B, Rigaud J, Luyckx F, i sur. Female urinary incontinence and artificial urinary sphincter: study of efficacy and risk factors for failure and complications. *Eur Urol* 2011;59(6):1048-53.
62. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Des* 2010;16(10):1224-34.

63. Sikiric P. The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). *Inflammopharmacology* 1999;7(1):1-14.
64. Sikiric P, Petek M, Rucman R, i sur. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris* 1993;87(5):313-27.
65. Sikiric P, Seiwert S, Rucman R, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 2011;17(16):1612-32.
66. Seiwert S, Sikiric P, Grabarevic Z, i sur. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris* 1997;91(3-5):173-8.
67. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18(15):2714-23.
68. Sikiric P, Seiwert S, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology* 2006;14(5-6):214-21.
69. Klicek R, Kolenc D, Suran J, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. *J Physiol Pharmacol* 2013;64(5):597-612.
70. Xue XC, Wu YJ, Gao MT, i sur. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10(7):1032-6.
71. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B, i sur. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut* 2003;51 Suppl 3:A309.
72. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M, Oreskovic K, Peterson J. Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL 14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005;128:A584.
73. Keremi B, Lohinai Z, Komora P, i sur. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:115-22.
74. Sikiric P, Jadrijevic S, Seiwert S, i sur. Long-lasting cytoprotection after pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, sucralfate or cholestyramine application in reflux oesophagitis in rats. *J Physiol Paris* 1999;93(6):467-77.
75. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, i sur. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci* 2007;104(1):7-18.
76. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, i sur. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci* 2006;102(3):269-77.
77. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Z, i sur. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-

- arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1997;332(1):23-33.
78. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, i sur. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig Dis Sci* 2009;54(1):46-56.
 79. Ilic S, Brcic I, Mester M, i sur. Over-dose insulin and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Attenuated gastric ulcers, seizures, brain lesions, hepatomegaly, fatty liver, breakdown of liver glycogen, profound hypoglycemia and calcification in rats. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:107-14.
 80. Bedekovic V, Mise S, Anic T, i sur. Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacol* 2003;477(1):73-80.
 81. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. *J Physiol Paris* 2001;95(1-6):261-70.
 82. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today* 2007;37(9):768-77.
 83. Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci* 2009;54(10):2070-83.
 84. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G, i sur. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *J Physiol Paris* 2001;95(1-6):315-24.
 85. Robert A. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979;77(4 Pt 1):761-7.
 86. Szabo S. Critical and timely review of the concept of gastric cytoprotection. *Acta Physiol Hung* 1989;73(2-3):115-27.
 87. Pawlik WW, Sikiric P, Brzozowski T, i sur. Acceleration of ulcer healing by pentadecapeptide BPC 157 in rats. Involvement of endogenous prostaglandins and gastric secretion. *Gastroenterology* 2004;126:A541.
 88. Mózsik G, Sikiric P, Seiwerth S. Pentadecapeptide BPC 157 (PLD116, PL14736, Pliva) influences ATP energy system and antagonizes 0.6 M HCl- and 96% ethanol-gastric lesion in rat. *Digestion* 2005;73:41.
 89. Wood JD. The first nobel prize for integrated systems physiology: Ivan Petrovich Pavlov, 1904. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:326-30.
 90. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, i sur. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the

- development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry* 1998;43(7):511-9.
91. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 1999;379(1):19-31.
 92. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates chronic amphetamine-induced behavior disturbances. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(5):412-22.
 93. Tohyama Y, Sikiric P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Sci* 2004;76(3):345-57.
 94. Sikiric P, Separovic J, Buljat G, i sur. The antidepressant effect of an antiulcer pentadecapeptide BPC 157 in Porsolt's test and chronic unpredictable stress in rats. A comparison with antidepressants. *J Physiol Paris* 2000;94(2):99-104.
 95. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *Eur J Pharmacol* 2005;512(2-3):173-9.
 96. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A, i sur. Anxiolytic effect of BPC-157, a gastric pentadecapeptide: shock probe/burying test and light/dark test. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22(3):225-30.
 97. Klicek R, Sever M, Radic B, i sur. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colcutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci* 2008;108(1):7-17.
 98. Mikus D, Sikiric P, Seiwert S, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001;27(8):817-27.
 99. Rao KS, Patil PA, Malur PR. Promotion of cutaneous wound healing by famotidine in Wistar rats. *Indian J Med Res* 2007;125(2):149-54.
 100. Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K, i sur. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol* 2007;570(1-3):212-21.
 101. Braddock M. The transcription factor Egr-1: a potential drug in wound healing and tissue repair. *Ann Med* 2001;33(5):313-8.
 102. Laato M, Heino J, Gerdin B, Kahari VM, Niinikoski J. Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. *Ann Chir Gynaecol* 2001;90 Suppl 215:19-23.
 103. Seiwert S, Brcic L, Vuletic LB, i sur. BPC 157 and Blood Vessels. *Curr Pharm Des* 2014;20(7):1121-5.
 104. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, i sur. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:191-6.

105. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, i sur. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272(1):417-22.
106. Turkovic B, Sikiric P, Seiwert S i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology* 2004;126:A287.
107. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, i sur. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009;156(1-3):83-9.
108. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, i sur. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris* 1997;91(3-5):139-49.
109. Sikiric P, Seiwert S, Rucman R, i sur. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157-NO-system Relation. *Curr Pharm Des* 2014;20(7):1126-35.
110. Rigamonti E, Touvier T, Clementi E, i sur. Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *J Immunol* 2013;190(4):1767-77.
111. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 1996;98(6):1381-8.
112. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, i sur. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci* 2004;95(1):19-26.
113. Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 1985;88(1 Pt 2):228-36.
114. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, i sur. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:161-5.
115. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006;24(5):1109-17.
116. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008;38(8):716-25.
117. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, i sur. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept* 2010;160(1-3):33-41.
118. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Z, i sur. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci* 1996;41(8):1604-14.

119. Tudor M, Jandric I, Marovic A, i sur. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul Pept* 2010;160(1-3):26-32.
120. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthop Res* 2003;21(6):976-83.
121. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Pang JH. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. *J Appl Physiol* (1985) 2011;110(3):774-80.
122. Krivic A, Majerovic M, Jelic I, Seiwerth S, Sikiric P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. *Inflamm Res* 2008;57(5):205-10.
123. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J Orthop Res* 2006;24(5):982-9.
124. Sebecic B, Nikolic V, Sikiric P, i sur. Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC-157, on the healing of segmental bone defect in rabbits: a comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone* 1999;24(3):195-202.
125. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33(5):381-94.
126. Jiang HH, Damaser MS. Animal models of stress urinary incontinence. *Handb Exp Pharmacol* 2011(202):45-67.
127. Gill BC, Moore C, Damaser MS. Postpartum stress urinary incontinence: lessons from animal models. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2010;5(5):567-80.
128. Cannon TW, Wojcik EM, Ferguson CL, i sur. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int* 2002;90(4):403-7.
129. Rodriguez LV, Chen S, Jack GS, i sur. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288(5):R1332-8.
130. Cannon TW, Damaser MS. Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat. *Life Sci* 2001;69(10):1193-202.
131. Damaser MS, Kim FJ, Minetti GM. Methods of testing urethral resistance in the female rat. *Adv Exp Med Biol* 2003;539(Pt B):831-9.
132. DeLancey JO, Trowbridge ER, Miller JM, i sur. Stress urinary incontinence: relative importance of urethral support and urethral closure pressure. *J Urol* 2008;179(6):2286-90.
133. Lin YH, Liu G, Li M, Xiao N, Daneshgari F. Recovery of continence function following simulated birth trauma involves repair of muscle and nerves in the urethra in the female mouse. *Eur Urol* 2010;57(3):506-12.

134. Damaser MS, Whitbeck C, Chichester P, Levin RM. Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J Appl Physiol* (1985) 2005;98(5):1884-90.
135. Prantil-Baun R, de Groat WC, Miyazato M, i sur. Ex vivo biomechanical, functional, and immunohistochemical alterations of adrenergic responses in the female urethra in a rat model of birth trauma. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(2):F316-24.
136. Bae JH, Moon DG, Lee JG. The effects of a selective noradrenaline reuptake inhibitor on the urethra: an in vitro and in vivo study. *BJU Int* 2001;88(7):771-5.
137. Kaiho Y, Kamo I, Chancellor MB, i sur. Role of noradrenergic pathways in sneeze-induced urethral continence reflex in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(2):F639-46.
138. Phull H, Salkini M, Escobar C, Purves T, Comiter CV. The role of angiotensin II in stress urinary incontinence: A rat model. *Neurourol Urodyn* 2007;26(1):81-8.
139. Kane DD, Kerns JM, Lin DL, Damaser MS. Early structural effects of oestrogen on pudendal nerve regeneration in the rat. *BJU Int* 2004;93(6):870-8.
140. Eisenberg HA, Hood DA. Blood flow, mitochondria, and performance in skeletal muscle after denervation and reinnervation. *J Appl Physiol* (1985) 1994;76(2):859-66.
141. Boyle R, Hay-Smith EJ, Cody JD, Morkved S. Pelvic floor muscle training for prevention and treatment of urinary and faecal incontinence in antenatal and postnatal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD007471.
142. Gill BC, Balog BM, Dissaranan C, i sur. Neurotrophin therapy improves recovery of the neuromuscular continence mechanism following simulated birth injury in rats. *Neurourol Urodyn* 2013;32(1):82-7.
143. Jiang HH, Gill BC, Salcedo LB, i sur. Effects of electrical stimulation on the pudendal nerve on expression of neurotrophins in Onuf's nucleus following simulated childbirth injury. *Neurourol Urodyn* 2010;29(2):254–255.
144. Pevec D, Novinscak T, Brcic L, i sur. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit* 2010;16(3):BR81-8.
145. Seveljevic-Jaran D, Cuzic S, Dominis-Kramaric M, i sur. Accelerated healing of excisional skin wounds by PL 14736 in alloxan-hyperglycemic rats. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19(5):266-74.
146. Daneshgari F, Moore C, Frinjari H, Babineau D. Patient related risk factors for recurrent stress urinary incontinence surgery in women treated at a tertiary care center. *J Urol* 2006;176(4 Pt 1):1493-9.
147. Kim JH, Huang X, Liu G, i sur. Diabetes slows the recovery from urinary incontinence due to simulated childbirth in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(2):R950-5.

148. Xue XC, Wu YJ, Gao MT. Study of the protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on wounds in small type pigs. *Chin New Drugs J* 2004;12:602-4.
149. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, i sur. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)* 2003;39(10):787-800.
150. Takahashi S, Chen Q, Ogushi T, i sur. Periurethral injection of sustained release basic fibroblast growth factor improves sphincteric contractility of the rat urethra denervated by botulinum-a toxin. *J Urol* 2006;176(2):819-23.
151. Burdzinska A, Bartoszek U, Orzechowski A. Preincubation with bFGF but not sodium ascorbate improves efficiency of autologous transplantation of muscle-derived cells into urethral wall. *Urology* 2009;73(4):736-42.
152. Yanagiuchi A, Miyake H, Nomi M, Takenaka A, Fujisawa M. Modulation of the microenvironment by growth factors regulates the in vivo growth of skeletal myoblasts. *BJU Int* 2009;103(11):1569-73.
153. Zhao W, Zhang C, Jin C, i sur. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells with controlled-release nerve growth factor for the treatment of stress urinary incontinence in a rat model. *Eur Urol* 2011;59(1):155-63.
154. De Coppi P, Delo D, Farrugia L, i sur. Angiogenic gene-modified muscle cells for enhancement of tissue formation. *Tissue Eng* 2005;11(7-8):1034-44.
155. Li GY, Zhou F, Gong YQ, i sur. Activation of VEGF and ERK1/2 and improvement of urethral function by adipose-derived stem cells in a rat stress urinary incontinence model. *Urology* 2012;80(4):953 e1-8.
156. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, i sur. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008;180(4):2581-7.
157. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296(6):H1888-97.
158. Liu G, Wang X, Sun X, i sur. The effect of urine-derived stem cells expressing VEGF loaded in collagen hydrogels on myogenesis and innervation following after subcutaneous implantation in nude mice. *Biomaterials* 2013;34(34):8617-29.
159. Veljaca M, Chan K, Guglietta A. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-157 in human gastric juice. *Gastroenterology* 1995;108:761.
160. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res* 2010;28(9):1155-61.
161. Fukushima K, Badlani N, Usas A, i sur. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med* 2001;29(4):394-402.
162. Brading AF, McCloskey KD. Mechanisms of Disease: specialized interstitial cells of the urinary tract--an assessment of current knowledge. *Nat Clin Pract Urol* 2005;2(11):546-54.

163. Lyons AD, Gardiner TA, McCloskey KD. Kit-positive interstitial cells in the rabbit urethra: structural relationships with nerves and smooth muscle. *BJU Int* 2007;99(3):687-94.
164. von Heyden B, Jordan U, Hertle L. Neurotransmitters in the human urethral sphincter in the absence of voiding dysfunction. *Urol Res* 1998;26(5):299-310.
165. Mousavi K, Jasmin BJ. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci* 2006;26(21):5739-49.
166. Netter FH. Pelvis and perineum. U: Netter FH, ur. *Atlas of human anatomy*. Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 2006, str. 351-417.
167. Wood HM, Kuang M, Woo L, i sur. Cytokine expression after vaginal distention of different durations in virgin Sprague-Dawley rats. *J Urol* 2008;180(2):753-9.
168. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, i sur. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998;12(2):149-62.
169. Laato M, Heino J, Gerdin B, Kahari VM, Niinikoski J. Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. *Ann Chir Gynaecol* 2001;90 Suppl 215:19-23.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 18. siječnja 1976. godine u Slavonskom Brodu, gdje sam završio osnovnu školu i matematičku gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao sam 18. siječnja 2001. godine. Obvezni liječnički staž obavio sam u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“, u Slavonskom Brodu, gdje nakon položenog državnog ispita i regulirane vojne obveze započinjem sa specijalizacijom iz ginekologije i porodništva. Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ upisao sam u ak. god. 2005/2006., za vrijeme kojeg specijalizantski staž provodim na Klinici za ginekologiju i porodništvo, KB „Sestre milosrdnice“ i na Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb. Specijalistički ispit položio sam u veljači 2008. godine, nakon čega nastavljam rad na Odjelu za ginekologiju i porodništvo brodske bolnice. U razoblju od 2011.-2013. godine obavljao sam staž uže specijalizacije iz područja humane reprodukcije u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, a subspecijalistički ispit položio u veljači 2013. godine.

Uz sudjelovanje na domaćim i međunarodnim stručnim i znanstvenim skupovima, završio sam više poslijediplomskih tečajeva I. kategorije te bio autor i koautor nekolicine znanstvenih i stručnih članaka objavljenih u međunarodno recenziranim časopisima, od kojih su tri indeksirana u Current Contentsu. Član sam Hrvatskog društva za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju, Hrvatskog društva za menopauzu, Hrvatskog društva za ginekološku endoskopiju, a od 2013. član sam i Upravnog odbora Hrvatskoga društva za ginekologiju i opstetriciju HLZ-a. Aktivno se koristim engleskim jezikom u govoru i pismu i posjedujem napredne informatičke vještine.

Dobrog sam psihofizičkog zdravlja, oženjen i otac jedne kćeri.

11. POPIS KRATICA

ADSC	eng. <i>adipose-derived stem cells</i>
bFGF	eng. <i>basic fibroblast growth factor</i>
BDNF	eng. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CGRP	eng. <i>calcitonin gene related peptide</i>
egr-1	eng. <i>early growth response-1 (gene product)</i>
EMG	elektromiografija
FDA	eng. <i>Food and Drug Administration</i>
GABA	eng. <i>gamma-aminobutyric acid</i>
h-EGF	eng. <i>human epidermal growth factor</i>
h-TGF	eng. <i>human transforming growth factor</i>
HPLC	eng. <i>high pressure liquid chromatography</i>
ICS	eng. <i>International Continence Society</i>
L-NAME	N ⁶ -nitro-L-arginin metil ester
MDSC	eng. <i>muscle-derived stem cells</i>
MSC	eng. <i>mesechymal stromal cells</i>
NAB2	eng. <i>nerve growth factor 1-A binding protein-2</i>
NGF	eng. <i>nerve growth factor</i>
NPY	neuropeptid Y
PDGF	eng. <i>platelet-derived growth factor</i>
SNRI	eng. <i>serotonine and norepinephrine reuptake inhibitor</i>
SUI	stresna urinarna inkontinencija
TU	tranabdominalna uretroliza
VD	vaginalna dilatacija
VEGF	eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid