

# Terapijski efekt BPC 157 na ishemijsku leziju slezene štakora s reperfuzijskim efektom

---

Jelinčić, Željko

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:037116>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Željko Jelinčić**

**Terapijski efekt BPC 157 na ishemijsku  
leziju slezene štakora s reperfuzijskim  
efektom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2010.**

Posvećujem mojoj dragoj obitelji

Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor: Prof. dr. sc. Mate Majerović dr. med.

Najiskrenije se zahvaljujem Prof. dr. sc. Predragu Sikiriću i Prof. dr. sc. Svenu Seiwerthu na svesrdnoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

## SADRŽAJ:

Poglavlje	Naslov	Strana
	Naslovnica	1
	Zahvale	2
	Sadržaj	3
	Popis kratica	5
1.0.	Uvod	7
1.1.	Slezena	7
1.1.1.	Infarkt slezene	8
1.2.	BPC 157	11
1.2.1.	Terapijski efekti	12
1.2.2.	Citoprotektivna funkcija	13
1.2.3.	Ostala djelovanja	14
1.3.	L-arginin	14
1.4.	L-NAME	15
2.0.	Hipoteza	16
2.1.	Obrazloženje hipoteze	16
2.2.	Cilj rada	18
3.0.	Materijal i metode	19
3.1.	Prva grupa pokusa	19
3.1.1.	Koncentracija BPC 157 2 $\mu$ g/ml	19
3.1.2.	Koncentracija BPC 157 2ng/ml	22
3.1.3.	Interakcija s agensima NO sustava	24
3.2.	Druga grupa pokusa	26
3.3.	Priprema preparata	30
3.4.	Priprema otopina	30
3.5.	Utvrđivanje učinka i statistička obrada	30
4.0.	Rezultati	32
4.1.	Makroskopska analiza rezultata	32
4.2.	Histološka analiza rezultata	47
4.3.	Fisher's exact test	53
5.0.	Rasprava	54

6.0.	Zaključak	82
7.0	Kratki sadržaj	83
8.0	Abstract	84
9.0.	Literatura	85
10.0.	Biografija	110

**POPIS KRATICA**

ADP	adenozin difosfat
AMP	adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
AV	Atroventrikularno
BPC 157	body protect compound 157
CCK	Cholecystokinin
CRF	corticotropin-releasing factor
CT	kompjutorizirana tomografija
DNFB	dinitrofluorobenzen
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
GMP	gvanozin momofosfat
GTN	glyceryl trinitrate
EGF	Epidermal growth factor
HR	Puls
ITP	imunotrombocitopenija
L-NA	NG-nitro-L-arginin
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitin
L-NMMA	L-N <sup>G</sup> -monomethyl arginin
LTB4	Leukotriene B4
LVP	Tlak u lijevom ventriklu
MPO	Myeloperoxidase
MRI	magnetska rezonanca

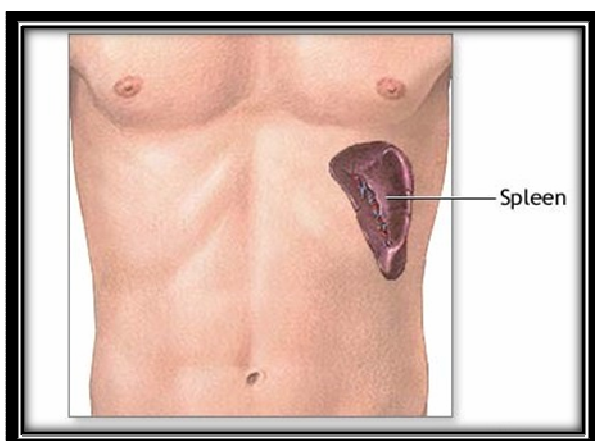
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMDA	N-metil-D-asparat
NO	dušikov oksid
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (neurotoksin)
NPY	Neuropeptide Y
NSAID	nesteroidini protuupalni lijekovi
Op. Priprema	operacijska pripreme
PGs	prostaglandini
Si	Stopa infarkciranosti
SNP	natrijev nitroprusid
SOD	superoksid dismutaza
TGF	Transforming growth factor
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonička kiselina
TXB2	Thromboxane B2
UZV	ultrazvuk

## 1.0. UVOD

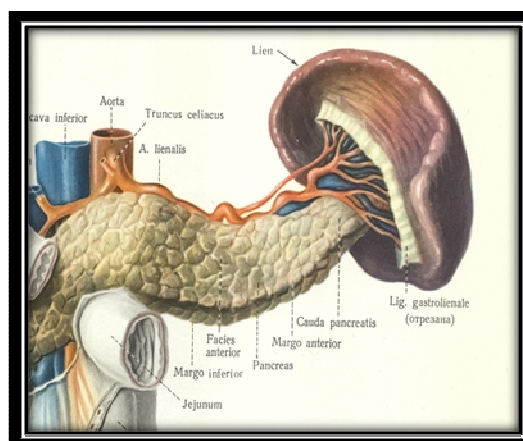
Ishemijske lezije i posljedični infarkt slezene vrlo su rijedak entitet. U literaturi se o ovom problemu ne nalazi mnogo podataka, osim kliničke slike koja se opisuje kao bolni sindrom u trbuhu ili akutni abdomen.<sup>1,2</sup>

### 1.1 SLEZENA

Slezena je organ smješten u lijevom gornjem abdomenu, naslonjena na dijafragmu, dužine oko 12 cm, širine 7 cm te teška u prosjeku 180g. Krvna opskrba joj je a. lienalis i aa. gastricae breves, a krv odvodi v. lienalis, koja se ulijeva u v. portae, koju tvori s v. mesetricom superior<sup>3,4</sup> (slika 1. i 2.). Histološki je građena od crvene i bijele pulpe o čijem rasporedu ovisi i dio funkcija slezene (slika 3.).



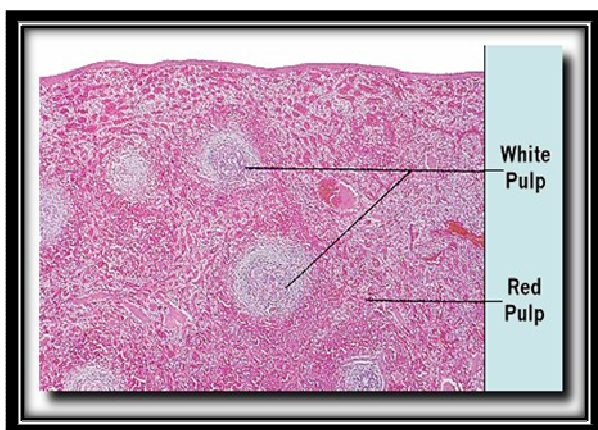
Sl. 1 Anatomski položaj slezene



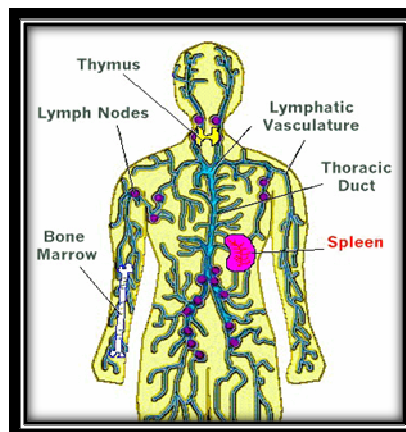
Sl. 2 Krvna opskrba slezene i odnos prema repu pankreasa

U funkcionalnom smislu slezena pripada hematopoetskom i imunološkom sustavu<sup>5</sup>. Normalna je hematopoeza u slezeni prisutna do petog mjeseca fetalnog života. Tada se njezin udio u eritropoezi smanjuje, a tu funkciju preuzima koštana srž. U daljnjem životu hematopoetska funkcija slezene očituje se u mogućnosti stvaranja eritroidnih stanica, megakariocitnih, monocitno-makrofagnih i limfoidnih stanica<sup>6,7</sup>. Ona je najveći limfopoezni organ i čini 25% limfoidne mase u čovjeka (slika 4.). Sa svojim limfnih tkivom slezena sudjeluje u staničnoj i humoralnoj imunosti<sup>8,9</sup>. Od ostalih funkcija treba navesti da je slezena spremnik za pohranu krvnih stanica i to uglavnom eritrocita i trombocita. Tako je oko trećina ukupne mase trombocita izdvojena iz cirkulacije i pohranjena u slezeni. Uklanjanje starih stanica iz krvi i njihovo "recikliranje" također je zadaća slezene<sup>10,11</sup>.





Sl. 3 Histološka slika slezene

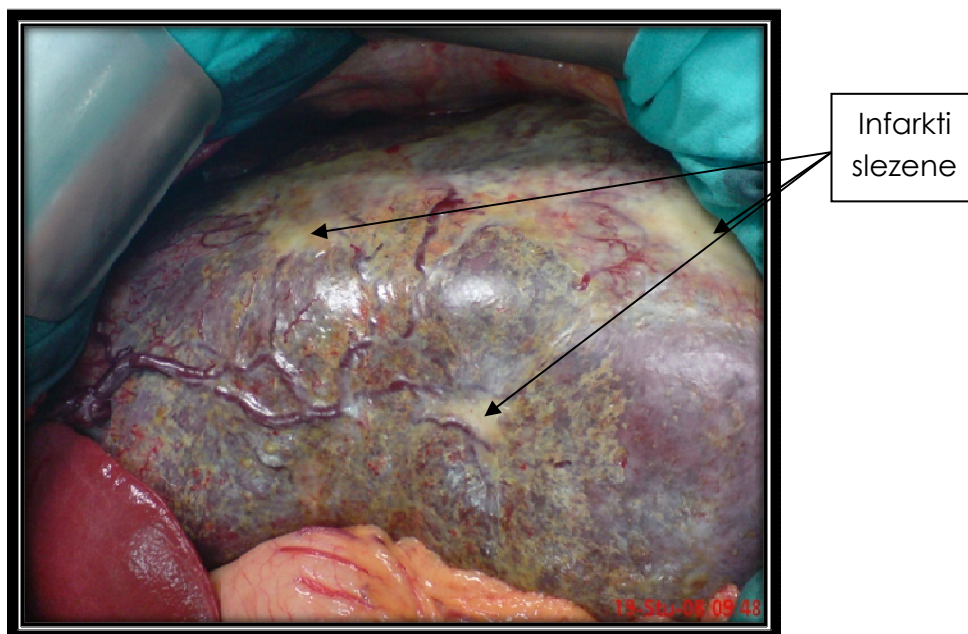


Sl. 4 Rasprostranjenost limfnog tkiva u ljudskom tijelu

Splenektomija je zahvat kojim se relativno često operacijski odstranjuje slezena. Indikacije za ovu operaciju su u prvom redu trauma te bolesti slezene ili stanja u kojima slezena dovodi do pogoršanja kliničke slike i općeg stanja bolesnika (ITP). Posljedice ovih operacija po organizam su: povišene vrijednosti trombocita (i do  $1000 \times 10^9/L$ ), tromboza prvenstveno lienalne vene, ali i drugih vena, s ekstenzijom tromba u portalnu i gornju mezenteričnu venu te povećana incidencija fulminantnih sepsi izazvanih Pneumokokima i Hemofilusom influence. Naravno ovdje treba ubrojiti i gubitak svih uobičajenih funkcija slezene<sup>1,2,6</sup>.

### 1.1.1. INFARKT SLEZENE

U etiologiji infarkta slezene (slika 5.) spominje se više grupa bolesti, koje su potanko navedene u tbl.1.



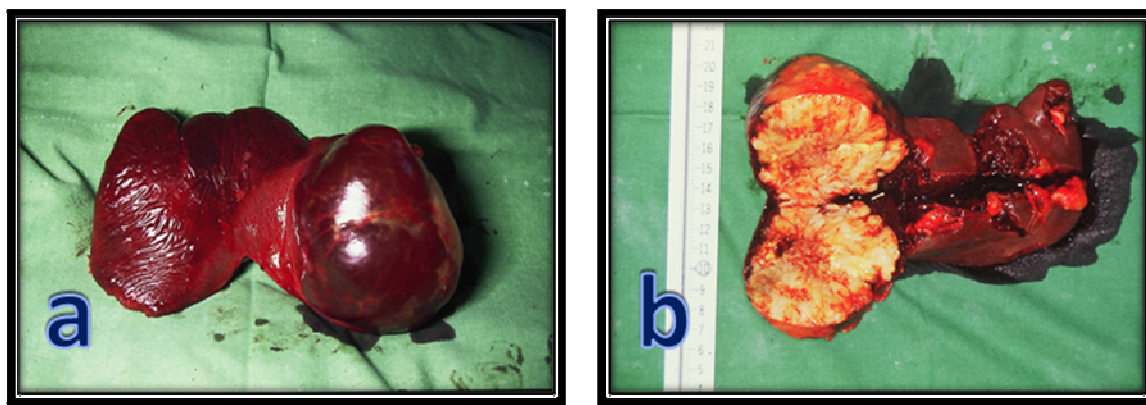
Sl.5 NHL s vidljivim infarktima slezene (strelica)

Tablica 1. Etiologija nastanka infarkta slezene

GRUPA UZROKA	STANJE ILI BOLEST
Maligne hematološke bolesti	Leukemia
	Lymphoma (Hodgkin i Non Hodgkin)
	Myelofibrosis
Benigne hematološke bolesti	Stanje hiperkoagulibilnosti (deficiti proteina C ili P, ...)
	Terapija eritropoetinom
	Idiopatska venska tromboza
	Policitemia vera
	Anemija srpastih stanica
Embolički poremećaji	Endokarditis
	Fibrilacija atrija
	Umjetna mitralna valvula
	Paradoksalna embolija iz desnog srca
	Muralni tromb iz lijevog ventrikla nakon infarkta miokarda
	Inficirani graft torakalne aorte
	HIV udružen s Tbc infekcijom
Vaskularni poremećaji	Vaskulitis
Autoimuni/kolageni vaskularni poremećaji	
Trauma	Tupa trauma
	Torzija mobilne slezene
	Kateterizacija lijevog srca kroz femoralnu arteriju
	Skleroterapija krvarećih žila želuca
	Infuzija petersina
	Embolizacija krvarenja iz slezene
Operativne procedure	Pankreatektomija
	Transplantacija jetre

Ostali uzroci	Tromboza splenične vene
	Peritonitis
	Pankreatitis
	Amiloidozis
	Sarkoidozis
	Karcinom pankreasa
	ARDS
	Sindrom postpartalnog toksičnog šoka
	Infekcija Epstein Bar virusom

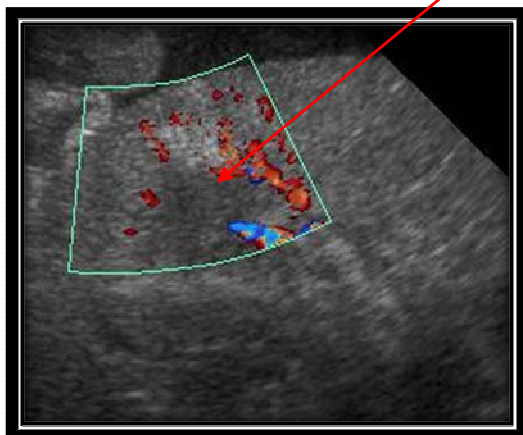
Od infektivnih bolesti potrebno je spomenuti infekciju Epstein Barr virusom<sup>12,13,14</sup>. Također i peritonitis kao i septičke komplikacije mogu dovesti do infarkta slezene. Obično su ovi infarkti praćeni nekim od hematoloških poremećaja, u pravilu u vidu hemolitičkih anemija<sup>1,6,12,15,16</sup>. Specifični hematološki poremećaji su najčešći uzrok infarkta<sup>1,5,6,7</sup>. U ovu grupu spadaju: sferocitoza i anemija srpastih stanica<sup>17,18,19,20</sup> koja je i ukupno najčešći uzrok infarktu slezene te policitemia vera<sup>1,5,6,7,15,16</sup>. U anemiji srpastih stanica infarkti su vrlo česti i ponavljaju se te dovode do sekvestracije slezene i njezine autoamputacije. Od malignih bolesti najčešći uzrok infarkta slezene je non Hodgkin lymphoma i metastatski tumori<sup>1,3,5,6,7</sup>. (slika 6. a i b).



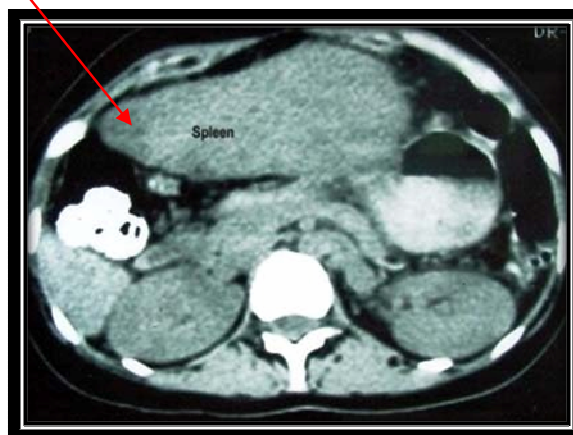
Sl. 6 a. i b. Karcinomska metastaza u slezeni

Klinička slika infarkta slezene karakterizirana je naglom snažnom boli u lijevom gornjem abdominalnom kvadrantu s čestom propagacijom boli u lijevo rame. Defans mišićne stjenke se ne opisuje, a u krvnim nalazima nije uočeno postojanje specifičnog testa, koji bi dijagnostički rasvijetlio ovo stanje. Od dijagnostičkih metoda, kojima se infarkt slezene može prikazati u upotrebi su UZV abdomena (slika 7), CT (slika 8) i rijetko MRI no nalazi svih ovih pretraga nisu specifični za infarkt slezene te se stanje često zamjenjuje s drugim bolestima i otkriva nakon splenektomije na patohistološkom nalazu<sup>1,2,6</sup>.

Infarkt



Sl.7 UZV: Infarkt slezene



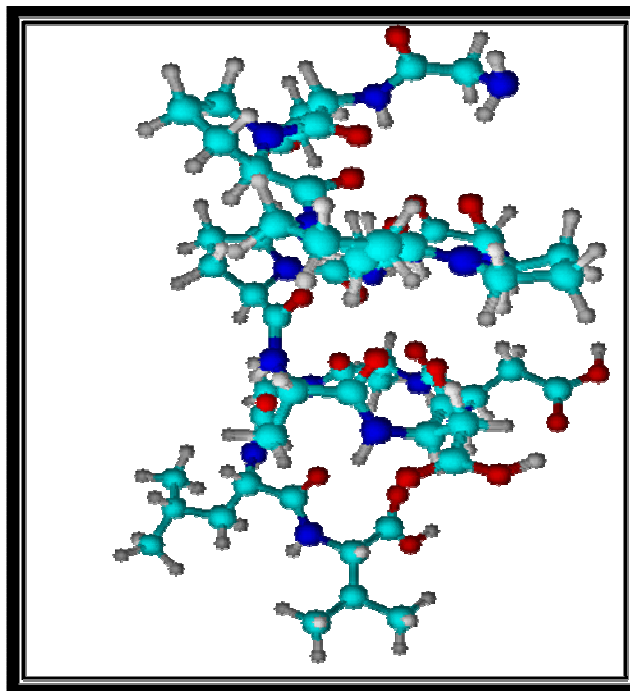
Sl. 8 CT: infarkt slezene

Iz svega navedenog jasno je da je slezena važan organ i da njezin gubitak ima posljedice na cijeli organizam. Pokušaj spašavanja slezene i njene funkcije u literaturi je opisan i sastoji se od prešivanja traumatskih lezija do parcijalne splenektomija u nekim specifičnim indikacijama (Mb Gaucher). Na žalost još uvijek se u nekim indikacijama splenektomija kao terapijska opcija ne može izbjeći<sup>1,6</sup>.

U dostupnoj literaturi samo jedan rad grupe iz Španjolske 2005.g. pokušava povećati preživljavanje slezene kod koje je ishemička lezija inducirana podvezivanjem krvnih žila slezene štakora. Životinje su bile izložene povišenom tlaku kisika kroz 11 dana, a 12. dan su bile žrtvovane. U zaključku se navodi da izlaganje povišenom tlaku kisika povećava učestalost održavanja ukupne mase slezene nakon simultane ligature splenične arterije i vene, ali ne povećava postotak vitalnih područja slezene iako su procesi cijeljenja u nekrotičnim područjima ubrzani<sup>21</sup>.

## 1.2. BPC 157

BPC 157 je stabilni polipeptid s lancem od 15 aminokiselina molekularne težine 1419. U prvom pregledu u literaturi u Journal of Physiology (Paris) 1993.g. opisana je identifikacija i aktivnost novog proteina izoliranog iz ljudskog želučanog soka<sup>22</sup>. Kodno ime tog spoja je bilo BPC (molekularna težina 40 000, utvrđena na gel kromatografiji). Aktivna komponenta ovog polipeptida građena je od 15 aminokiselina (Gly, Glu, Pro, Pro, Pro, Gly, Lys, Pro, Ala, Asp, Asp, Ala, Gly, Leu, Val), molekularne težine 1419, a dobio ime je BPC 157 (slika 9.) Od tada nije uočeno postojanje podudarnosti ovog peptida sa poznatim crijevnim peptidima pa se pojavila ideja da je ovaj pentadekapeptid odgovoran za aktivnost cijele molekule te su različiti njegovi protektivni efekti u gastrointestinalnom traktu i ostalim organima postali cilj istraživanja<sup>22,23,24,25,26</sup>.



Sl. 9 Strukturna formula BPC 157

Teoretski, prisutnost BPC-a 157 u želučanom soku i njegovo vodstvo u kreiranju korisnih efekata daje tom polipeptidu vodeću ulogu duž gastrointestinalnog trakta i abdomena, kao neuroendokrinog organa u organizaciji odgovora na stres oponašajuće nokse<sup>22,27</sup>. Prema dobro utemeljenoj Selyevoj teoriji stresa u trenucima kada je organizam pogođen stresnim događajem, ovaj pentadekapeptid možda ima fiziološki značaj kao medijator usmjeren protiv prijetećeg fenomena. Općenito, ovo bi trebalo voditi ponovnoj uspostavi homeostaze i/ili prevenciji razvoja lezije i pojačanom zarastanju svakog prisutnog oštećenja<sup>22,23,24,25,26,27</sup>.

Zahvaljujući radovima, koji su slijedili ova zapažanja, uočeno je postojanje mnogih korisnih efekata na gotovo svim organima. Svi ti efekti podjeljeni su u dvije grupe: terapijski i citoprotektivni efekti<sup>27</sup>.

### ***1.2.1. TERAPIJSKI EFEKTI***

BPC 157 je snažan antiulcerogeni faktor. Jednako je učinkovit bez obzira na dozu u  $\mu\text{g-ng/kg}$ , davan intragastrično, protiv niza gastrointestinalnih lezija izazvanih različitim ulcerogenim procedurama<sup>28</sup>. Na taj način, bez obzira na mehanizam, tako velika efikasnost sugerira moć za istovremenom interakcijom sa različitim sustavima, koji mogu biti potencijalno poremećeni aplikacijom ulcerogena (prostaglandini, dopamin, adrenergici)<sup>22,28</sup>. Ti odgovori snažno koreliraju sa onima dobivenim nakon sistemske aplikacije, kao i nakon akutne i kronične primjene pentadekapeptida. Ovo ukazuje da su isti sustavi uključeni u njegov lokalni (davan intragastrički) i sustavni efekt (davan intraperitonealno ili intramuskularno). Poštujući regularnu proceduru uspoređeno je djelovanje BPC-a 157 uz dodatak L-arginina prekursora

NO i N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl estera (L-NAME) blokatora NO sintetaze (L-arginin=hipotenzija, L-NAME=hipertenzija). Nađeno je da, davan sustavno, uz antiulkusno djelovanje BPC 157 blokira oba efekta; kako efekta NO agonista tako i NO antagonista. Uz to nađen je i jak učinak angiogeneze te direktna zaštita endotela<sup>28,29,30,31,32</sup>.

Dokazana je mogućnost korištenja BPC-a 157 u terapiji ulceroznog kolitisa<sup>28,33</sup>. Za razliku od sulfasalazina BPC 157 ne ublažuje samo leziju već u cystemein-kroničnom kolitis modelu sprečava recidive bolesti. U cystemein-duodenalnom pokusu sa sialoadenektomijom pentadekapeptid, čini se kontrolira funkciju žlijezda slinovnica<sup>34</sup>.

Također je uočeno djelovanje na aferentni živčani sustav, koji usko surađuje s NO sustavom<sup>28,35,36</sup>. U studiji s capsaicinom BPC 157 značajno oporavlja funkciju NO-sustava<sup>37</sup>. K tome on oporavlja blokadu središnjeg dopamin sustava (blokada inducirana s haloperidolom blokatorom središnje aktivnih dopaminski receptora). To je važno jer je poremećaj središnjeg dopaminskog sustava odgovoran za razvoj ulceracija u gastrointestinalnom traktu, a haloperidol u bolesnika direktno uzrokuje ulceracije<sup>28,35,36</sup>.

Važno je napomenuti da svi ovi efekti nisu kompromitirani s problemima, koji su uobičajeni u farmakologiji peptida. Prvo je ljudski želučani sok upotrebljavan za izolaciju BPC-a 157 te je imunohistokemijski dokazan u želučanoj mukozi i lumenu. Ovaj je peptid postojan u ljudskom želučanom soku duže od 24 sata, dok drugi standardni peptidi, kao EGF ili TGF-beta bivaju razgrađeni vrlo brzo<sup>28</sup>. Važno je napomenuti da su standardni crijevni peptidi izolirani iz drugih izvora (EGF urin trudne štakorice; bombesin iz ekstrakta kože dvije žabe; neurotension iz goveđeg hipotalamusa; somatostatin iz hipotalamusa ovce; itd), a ne iz gastrointestinalnog trakta. Snažan efekt zarastanja poslije peroralne kao i parenteralne primjene, bez obzira na vrlo niske doze, podupire predloženu fiziološku funkciju. Za razliku od ostalih standardnih polipeptida, koji su aktivni uz dodatak različitih nosača, ovaj postojani peptid je učinkovit bez njih<sup>28</sup>.

### ***1.2.2. CITOPROTEKTIVNA FUNKCIJA***

Rastezanje želuca ugrožava intergitet njegove sluznice. Sluznica i krvne žile rastezanjem bivaju istegnuti, a sfinkter je razvučen i naginje refluksu sadržaja<sup>38</sup>. U rastegnuti želudac ispunjen apsolutnim alkoholom (96%) davan je BPC 157 direktno u želudac i promatran njegov učinak tijekom rastezanja želuca i prateći odgovor krvnih žila<sup>28,39</sup>. U kontrolnom pokusu nakon 180 sek. samo je glavno stablo lijeve gastične arterije bilo vidljivo na stjenci želuca. Kod jedinki tretiranih BPC 157 nakon 180 sek. bio je upadljivo vidljivo glavno stablo lijeve gastične arterije s manjim ograncima, konkomitantnim venama, kapilarnom vasodilatacijom, crvenilom tkiva želuca te anastomoza sa desnom gastroepiploičnom arterijom. Danas se ovi fenomeni mogu promatrati iz kuta citoprotektivne teorije i efekta citoprotektivnih agensa. Nekolicina studija pokazuje da BPC 157 snažno inhibira alkoholne lezije želuca, kao i druge citotoksične lezije. U gastrektomiranog štakora svi standardni agensi su aktivni. Poslije sialoadenektomije samo BPC 157 je aktivan i najvažnije njegova antiulkusna aktivnost prati oporavak AMP-ADP-ATP sustava u mukozi želuca<sup>28,39,40,41</sup>.

Napominje se istaknuti učinak angiogeneze usporediv s efektom sukralfata, posebno s obzirom na formiranje granulacijskog tkiva. Pokazano je da je taj efekt vjerojatno udružen s osobitim generiranjem NO iz sluznice želuca. Nakon uništavanja sluznice želuca centrifugiranjem dokazano je da je novo formirani NO uočen samo nakon dodavanja BPC 157 dok je L-arginin bio bezuspješan. Ovaj BPC-om 157 formirani NO ponovo nije bio inhibiran s L-NAME. Otkako je ova pojava uočena u sluznici želuca i s obzirom na veliku sličnost u determiniranju NO sintetaze u želucu i ostalim tkivima za pretpostaviti je da BPC 157 ima istovrsnu aktivnost i u drugim organima. Dokazano je da je BPC 157 učinkovitiji od standardnih agensa, a Xue i sur. su ocijenili da je njegova snaga 50 puta veća od famotidina<sup>28,29,31,42,43,44,45,46</sup>.

U stresu alkohol izaziva šarenilo lezija. Osim inhibiranja nastanka lezija želučane sluznice među ostalim izazvanih i akutnim abuzusom alkohola, pentadekapeptid BPC 157 inhibira i učinke kroničnog konzumiranja alkohola: lezije želuca, lezije jetre i portalnu hipertenziju<sup>28,32,45</sup>.

Treba također navesti da koncept citoprotekcije vodi konceptu organoprotekcije. Izvorno organoprotektivni agensi (prostaglandini, somatostatin je prije imao citoprotektivnu ulogu na lezije želuca inducirane alkoholom) pokazuju korisni efekt jedino kada su dati profilaktički protiv akutnog pankreatitisa ili lezije jetre. BPC 157 ima oba djelovanja i profilaktičko i terapijsko<sup>23,28,45</sup>.

### ***1.2.3. OSTALA DJELOVANJA***

Sposobnost cijeljena rane ostaje izvan okvira originalnog koncepta citoprotekcije/ organoprotekcije. Mogućnost cijeljenja BPC-a 157 uključuje razne rane: duboke opekotine, lezije laserom, kožne rane, rane u dijabetičara, pseudoartroze, presječene tetive, presječene mišiće, presječene živce, otkidanje tetiva od kostiju, oštećenja rožnice, peritonitis, ileoilealne anastomoze, kolokolične anastomoze, plućne lezije...<sup>28</sup> U svim ovim terapijskim djelovanjima pentadekapeptid je efikasan bez obzira da li je primijenjen lokalno ili sistemski<sup>28,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59</sup>.

### ***1.3. L-arginin***

L-arginin je aminokiselina prekursor NO. Za ovu sintezu potrebno je više koenzima te uz molekularni kisik i NO sintetaza. Danas je NO prepoznat kao ubikvitarni biokemijski put koji je uključen u regulaciju kardiovaskularnog, središnjeg i perifernog nervnog sustava. NO inhibira enzime u ciljnim stanicama i može ući u interakciju s radikalima, koji su produkt oksidacije stvarajući toksične supstance. Također ima ulogu u imunološkoj obrambenoj reakciji domaćina i u patofiziologiji ozbiljnih kliničkih stanja (ahalazija, ciroza, vaskularna permeabilnost, modulacija adjuvantnog artritisa,...), sudjeluje u reguliranju plućnog i krvnog tlaka itd<sup>28,29,30,32,60</sup>.

Glavni mehanizam njegovog djelovanja je dilatacija krvnih žila, a inaktivira se u krvi u reakciji s oksihemoglobinom tvoreći dušični dioksid. Posljedica proširivanja krvnih žila je pad tlaka što je jedan od njegovih najvažnijih efekata<sup>28,29,60</sup>.

#### **1.4. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME)**

N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je analog L-arginina, čije je funkcija blokiranje NO sintetaze. Na taj način se iz L-arginina ne može sintetizirati NO te su svi efekti djelovanja L-arginina blokirani što L-NAME čini njegovim antagonistom<sup>28,29,60</sup>.



## **2.0. HIPOTEZA**

Hipoteza je da :

-BPC 157 može djelovati terapijski na ishemičke lezije slezene i to kao preventiva nastanka i kao terapija lezija u razvoju

-L-NAME i L-arginin mijenjaju tijek ishemičkih lezija slezene, te bi NO-sistem bio uključen u tijek ishemičkih lezija slezene

-BPC 157 će terapijski djelovati i u uvjetima blokade NO sintetaze (L-NAME) te aplikacije prekursora NO (L-arginina).

### **2.1. Obrazloženje hipoteze**

Dosadašnji radovi daju snažne dokaze da BPC 157 ima jaku antiinflamatornu aktivnost kako u akutnom tako i u kroničnom upalnom modelu, osjetno oslabljuje različite eksperimentalne lezija na mnoge organe, promiče cijeljenje rana i fraktura a zabilježen je i efekt na poremećeni krvni tlak u vidu njegove regulacije. Izložena je kompleksna interakcija s dopaminskim sistemom. Temeljeno na eksperimentu s neurotoksinom capsaicinom sugerirano je otpuštanje BPC 157 iz somatosenzornih neurona u studiji blokiranja nocioceptivnih receptora i u studiji crijevnih lezija<sup>22,28,29,60</sup>.

Shodno tome za očekivati je da BPC 157 ima pozitivni terapijski efekt na ishemičku leziju slezene izazvanu potpunim kleanjem hilusa slezene<sup>21,22</sup>.

Upotreba tvari koje pozitivno ili negativno utječu na NO sistem, davane zasebno ili u kombinaciji, mogu biti doprinos određivanju mogućih odnosa NO s drugim agensima i sustavima. Istraživani su pozitivni učinci BPC 157 na alkoholom induciranu leziju želučane sluznice i na održavanje krvnog tlaka i to u kombinaciji s L-NAME, kompetitivnim inhibitorom generiranja endotelnog NO i NO prekursorom L-argininom. Pokazano je da BPC 157 može obrnuti promjene inducirane L-NAME-om ili L-argininom. Kada su L-NAME i L-arginin bili davani zajedno njihov je učinak bio oslabljen. U homogeniziranom supernatantu želučane sluznice štakora, kao i L-arginin, BPC 157 inducira formiranje NO, ali njegov učinak nije oslabljen. Sinteza NO je bila oslabljena kada su upotrjebljeni BPC 157 i L-arginin zajedno. Od kad je bilo dokazano u eksperimentima in vitro i in vivo da BPC 157 može poništiti učinak L-NAME (esencijalnu točku koja ukazuje na L-arginin) počela se činiti prihvatljivom mogućnost interakcije s NO sustavom<sup>24,29,32,60,61,62</sup>.

Gledano iz perspektive BPC 157/L-arginin/NO sustav, nalaz ograničene kompeticije prema dosadašnjim stavovima može se tumačiti samo kao blizak međuodnos s NO sustavom. Primjedbu da učinak agensa može biti oslabljena L-arginin analogom i ponovo uspostavljena dodavanjem L-arginina L-arginin analogu (kao npr. L-NAME) ne treba nužno uzimati u korist esencijalne kompeticije sa samim L-argininom. Naime, za utvrditi kompeticiju između

navedenih agensa i samog L-arginin analoga bitno je uočiti inhibiciju učinaka tih agensa. U toj kombinaciji (standardni agens + L-arginin + L-arginin analog) L-arginin evidentno može lakše funkcionirati. Očito je da nesuprimirana aktivnost samog L-arginina, uz nedostatak direktnih studija, može biti snažan dokaz bliskog međudjelovanja između agensa i L-arginina, prekursora NO. Tako je jasno pokazano da BPC 157 može na specifičan način interferirati s učincima NO agensa i u slučaju integriteta sluznice želuca i u slučaju regulacije krvnog tlaka. U studijama u kojima je upotrebljavan homogenizirani supernatant želučane sluznice štakora dokazano je da je djelovanje BPC 157 na nastajanje NO izrazitije i/ili različito od efekta L-arginina. Sindrom plućne hipertenzije ili ascites u brojlera su bili izazvani kroničnom aplikacijom L-NAME dok je L-arginin imao štetan utjecaj na miokard. U ovom ozračju BPC 157 može zamjetno prevenirati pojavu lezija na raznim organima. Osim toga oba učinka, protektivni (niske doze agensa) i ulcerogeni (visoke doze agensa), tvari, koji oslobađaju NO, sugerira specifično NO posredovanje<sup>24,29,32,60,61,62</sup>.

S obzirom da do sada u ni jednoj studiji nije istražen učinak BPC 157, L-arginina i L-NAME, kao ni njihovo međudjelovanje, na ishemičku leziju slezene to je u svijetlu svega naprijed navedenog izvjesno da će ovo ispitivanje dovesti do značajnih novih znanstvenih spoznaja.

## 2.2. CILJ RADA

*Cilj rada je bio istražiti terapijski efekt BPC-a 157 na ishemičku leziju slezene štakora u ranoj i kasnijoj fazi njenog nastanka i praćenje ponašanja lezije u reperfuziji. Efekt BPC-a 157 će biti uspoređen s efektom L-NAME i L-arginina na isto tkivo i u istim okolnostima.*

### **3.0. METODE I MATERIJAL**

Ispitivanje je bilo provedeno na odraslim ženjkama bijelog štakora Wistar. Tijekom ispitivanja bilo je izvršeno 17 pokusa. Pokusi su bili podijeljeni u dvije grupe.

U prvoj grupi, od 1.-11. pokusa, su pokusi s trajanjem ishemije do 40 minuta. Pozicija slezene tijekom ovih pokusa je izvan trbušne šupljine uz otvoreni abdomen. Životinje ne mogu preživjeti uz otvorenu trbušnu šupljinu duže od sat vremena. Vrijeme od jednog sata nije dovoljno dugo da se u histološkom preparatu razvije tipična slika infarkta, koji je predmet ovog istraživanja, stoga su se ispitivanja nastavila drugom grupom pokusa.

U drugoj grupi pokusa, od 12.-17. pokusa, ishemija slezene je trajala 3, 6, 9, 12, 18 i 24 sata, ali uz zatvorenu trbušnu šupljinu. Ovom grupom pokusa pratio sam dinamiku razvoja histološke slike infarkta.

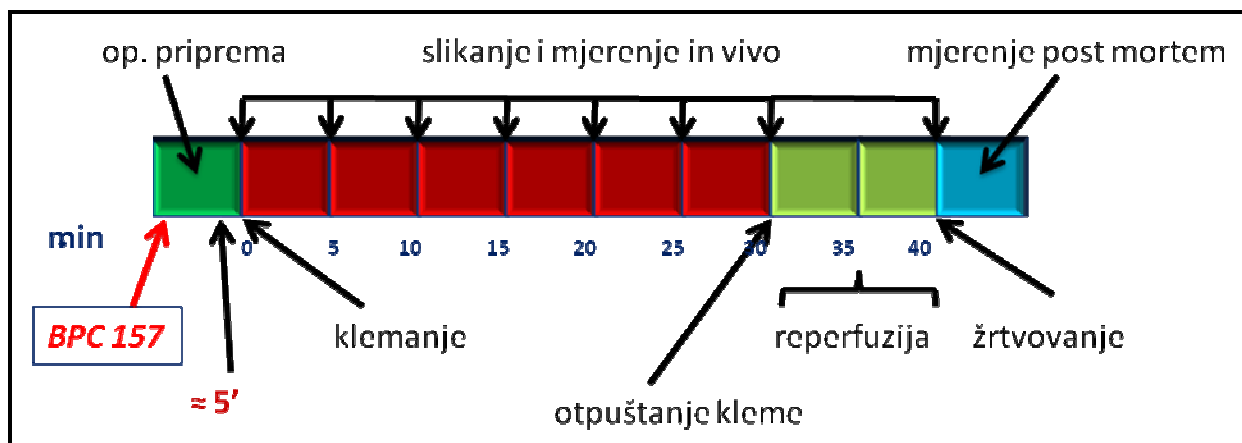
U svim pokusima anestezija su bili Tiopental 0,15 ml i Apaurin 0,2 ml i to intraperitonealno.

#### ***3.1. PRVA GRUPA POKUSA***

##### **3.1.1. Koncentracija BPC 157 2 $\mu$ g/ml.**

1. Vršilo se klemanja hilusa slezene u trajanju od 30 min te potom reperfuzija slezene u trajanju od 10 minuta. Radilo se u dvije grupe. Prva je bila kontrolna, a u drugo*j sam dao 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml kao kupku neposredno prije klemanja hilusa slezene, koje je bilo vršeno Peanovim stezaljkama. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 5 minuta i na kraju cijelog pokusa. Potom su životinje žrtvovane te im odstranjene slezena za histološku analizu i mjerenja težine životinja te težine i volumena slezene (slika. 10).*

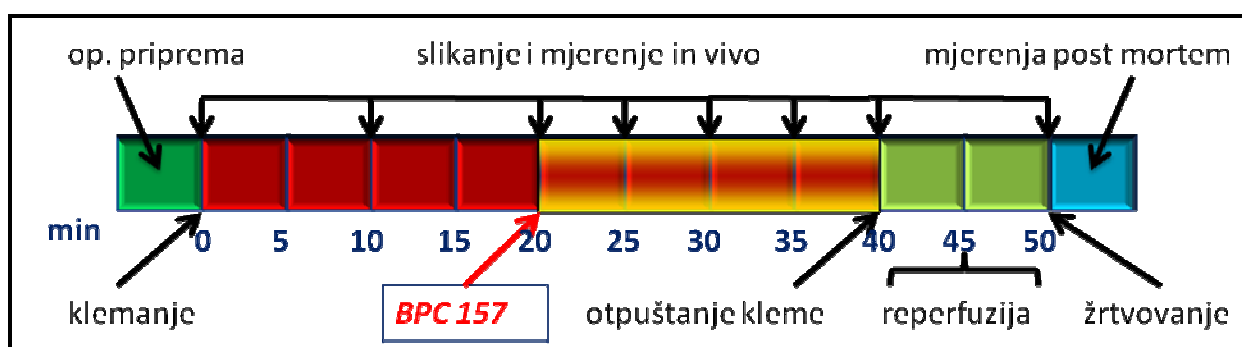
Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene i neumanjivanje nastale štete reperfuzijom tkiva.



Sl. 10 Shematski prikaz prvog pokusa

2. Vršilo se klemanje hilusa slezene, Peanovim stezaljkama, i izazivanje infarkta sa slikanjem u 10 i 20 min. Radilo se u dvije skupine kontrolna i BPC 157. Nakon 20 min jedinkama u BPC 157 skupini dodan je 1 ml BPC-a 157 u koncentraciji od  $2\mu\text{g/ml}$  kao kupka. Nadalje je rađeno mjerenje i dokumentiranje slikanjem u 25, 30, 35 i 40 min trajanja pokusa. Slijedi otpuštanje stezaljki i reperfuzija u trajanju 10 min po isteku kojih se ponovo vrši mjerenje i dokumentiranje slikanjem. Nakon toga se životinje žrtvuju, slikaju i mjere kao u prethodnom pokusu, a slezena upućuje na histološku analizu. (slika 11.)

Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od  $2\mu\text{g/ml}$  nakon 20 min trajanja nokse u zaustavljanju napredovanja razvijenih promjena, kao i prestanku pojavljivanja novih promjena te neučinkovitost reperfuzije u smanjenju nastalih oštećenja slezene.

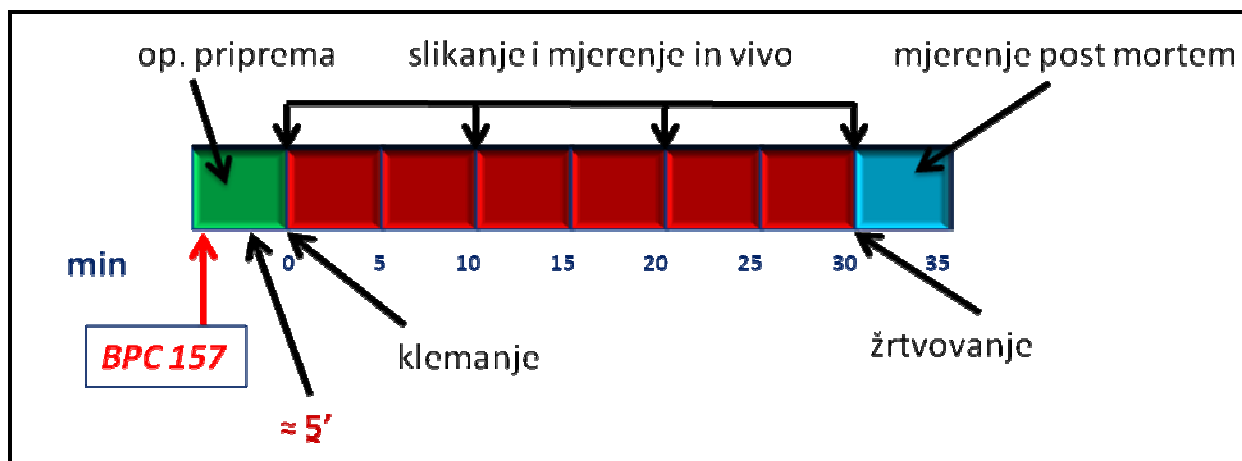


Sl.11. Shematski prikaz drugog pokusa

3. Vršilo se 30 minuta klemanja hilusa slezene. Radile su se dvije grupe. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dan 1 ml BPC 157 u koncentraciji od  $2\mu\text{g/ml}$  kao kupku neposredno prije klemanja hilusa. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju

cijelog pokusa. Po skidanju klema životinje su žrtvovane te su im odstranjene slezene za histološku analizu (slika. 12).

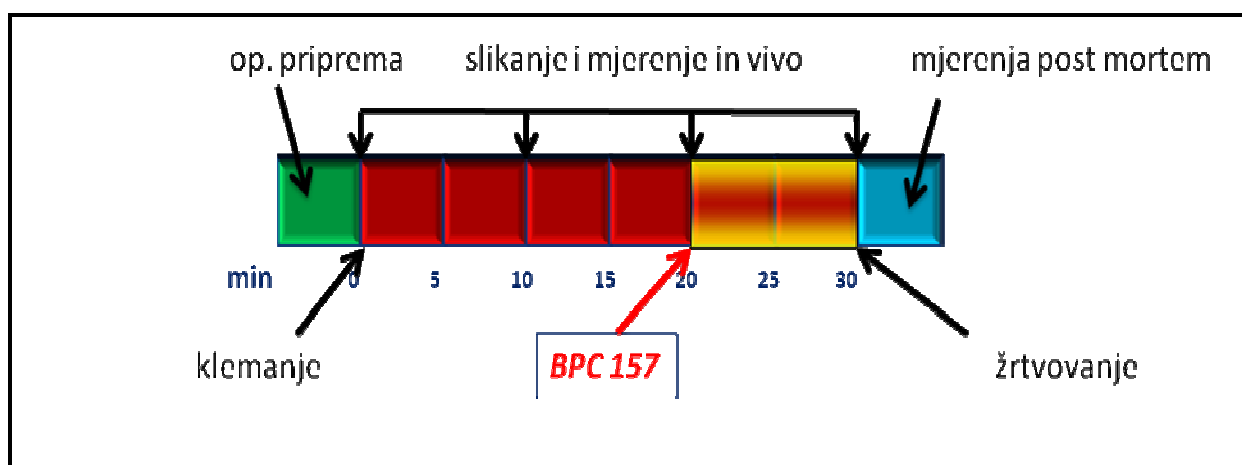
Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene.



Sl.12. Shematski prikaz trećeg pokusa

4. Vršilo se klemanje hilusa slezene Peanovim stezaljkama i izazivanje infarkta sa slikanjem u 10 i 20 min. Radilo se u dvije skupine kontrolnu i BPC 157. Nakon 20 min jedinkama u BPC 157 skupini dodan je 1 ml BPC-a 157 kao kupka u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml. Slikanje je bilo vršeno u 30 min. Potom se životinje žrtvuju, slikaju i mjere. (slika. 13).

Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml u zaustavljanju napredovanja promjena, kao i prestanku pojavljivanja novih promjena.

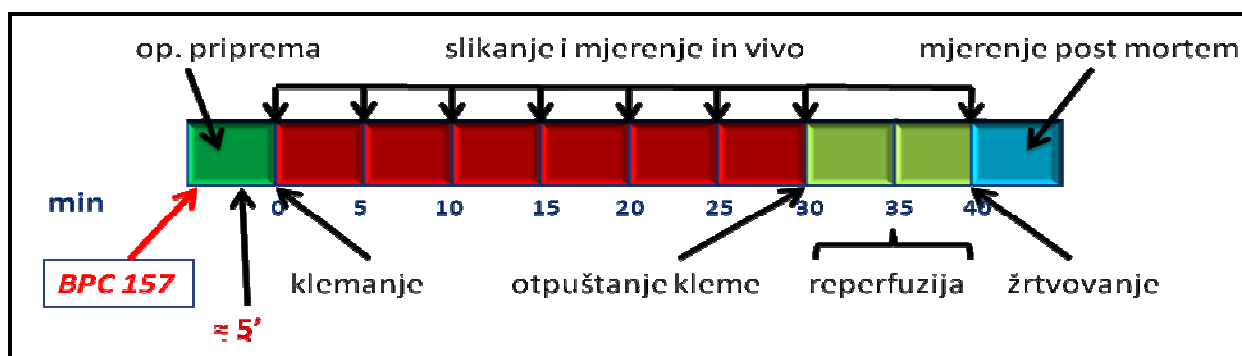


Sl. 13 Shematski prikaz četvrtog pokusa

### 3.1.2. Koncentracija BPC 157 2ng/ml.

5. Vršilo se klemanja hilusa slezene u trajanju od 30 min te potom reperfuzija slezene u trajanju od 10 minuta. Radilo se u dvije grupe. Prva je bila kontrolna, a u drugo sam dao 1 ml BPC 157 u koncentraciji od **2ng/ml** kao kupku neposredno prije klemanja hilusa slezene, koje je bilo vršeno Peanovim stezaljkama. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 5 minuta i na kraju cijelog pokusa. Potom su životinje žrtvovane te im odstranjene slezena za histološku analizu i mjerenja težine životinja te težine i volumena slezene (slika. 14).

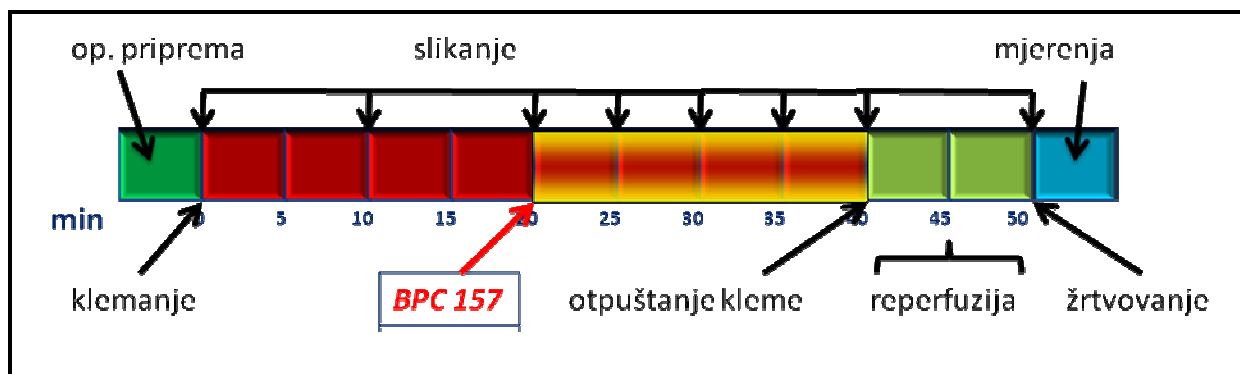
Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od **2ng/ml** neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene i neumanjivanje nastale štete reperfuzijom tkiva.



Sl.14 Shematski prikaz petog pokusa

6. Vršilo se klemanje hilusa slezene, Peanovim stezaljkama, i izazivanje infarkta sa slikanjem u 10 i 20 min. Radilo se u dvije skupine kontrolna i BPC 157. Nakon 20 min jedinkama u BPC 157 skupini dodan je 1 ml BPC-a 157 u koncentraciji od 2ng/ml kao kupka. Nadalje je rađeno mjerenje i dokumentiranje slikanjem u 25, 30, 35 i 40 min trajanja pokusa. Slijedi otpuštanje stezaljki i reperfuzija u trajanju 10 min po isteku kojih se ponovo vrši mjerenje i dokumentiranje slikanjem. Nakon toga se životinje žrtvuju, slikaju i mjere kao u prethodnom pokusu, a slezena upućuje na histološku analizu. (slika 15.)

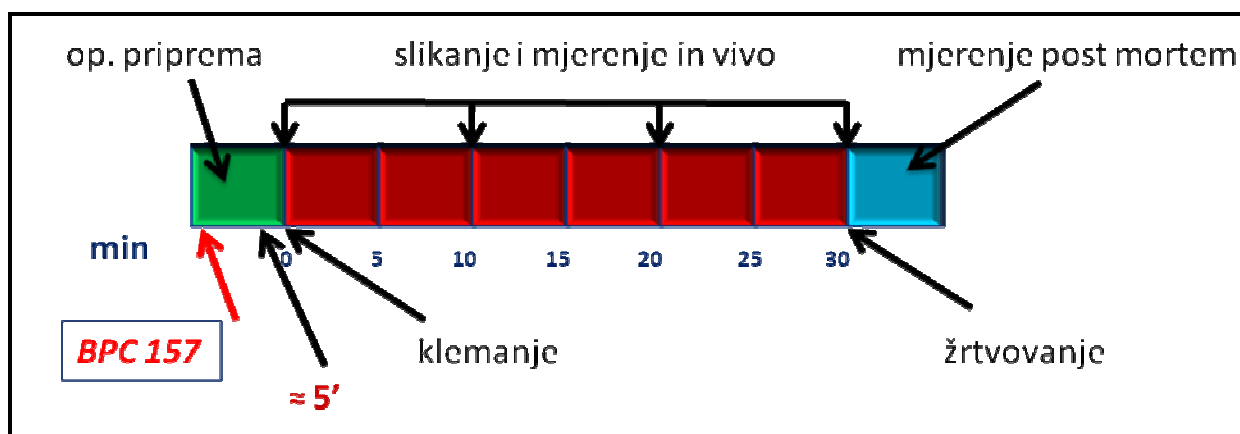
Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od **2ng/ml** nakon 20 min trajanja nokse u zaustavljanju napredovanja razvijenih promjena, kao i prestanku pojavljivanja novih promjena te neučinkovitost reperfuzije u smanjenju nastalih oštećenja slezene.



Sl.15 Shematski prikaz šestog pokusa

7. Vršilo se 30 minuta klemanja hilusa slezene. Radile su se dvije grupe. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dodan 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2ng/ml kao kupku neposredno prije klemanja hilusa. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa. Po skidanju klema životinje su žrtvovane te im odstranjene slezene za histološku analizu te obavljeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene (slika. 16).

Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2ng/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene.

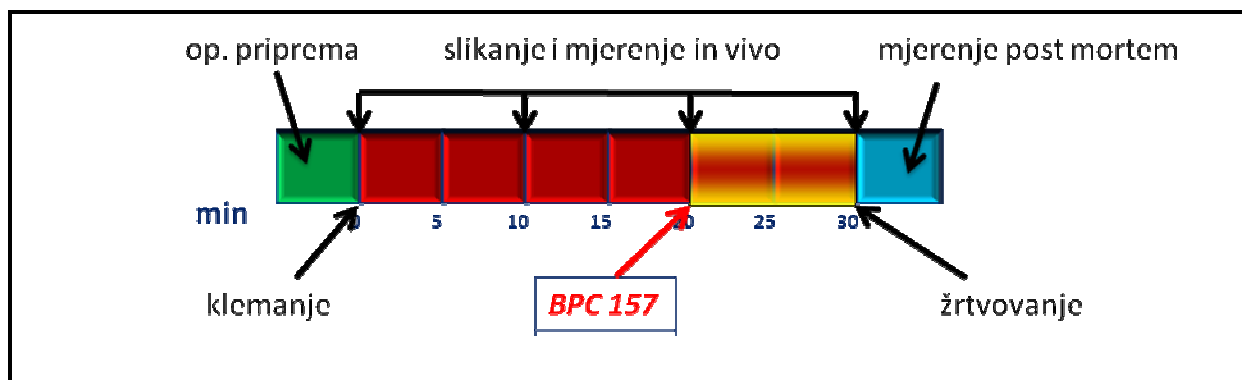


Sl. 16 Shematski prikaz sedmog pokusa

8. Vršilo se klemanje hilusa slezene Peanovim stezaljkama i izazivanje infarkta sa slikanjem u 10 i 20 min. Radilo se u dvije skupine kontrolnu i BPC 157. Nakon 20 min jedinkama u BPC 157 skupini dodan je 1 ml BPC-a 157 kao kupka u koncentraciji od 2ng/ml. Slikanje je bilo vršeno u 30 min. Potom se životinje žrtvuju, slikaju i mjere. (slika. 13).

Obrazloženje: Ovaj pokus istražuje efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2ng/ml u zaustavljanju napredovanja promjena, kao i prestanku pojavljivanja novih promjena.



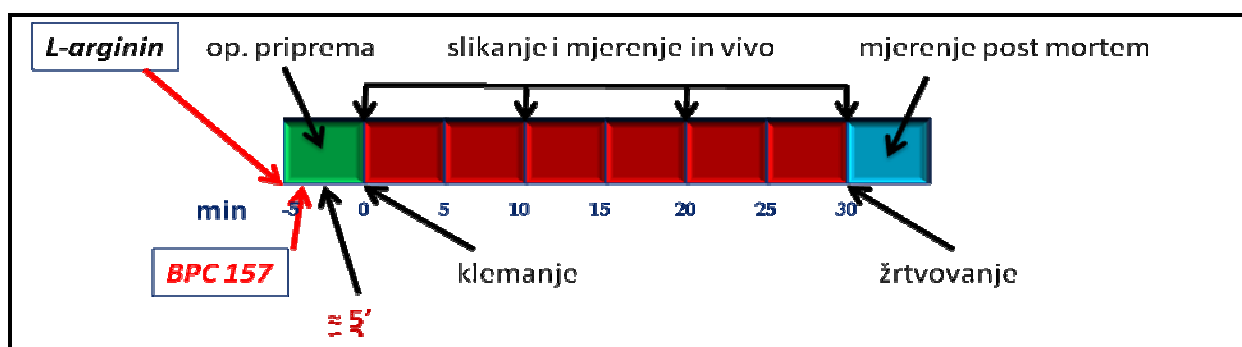


Sl. 17 Shematski prikaz osmog pokusa

### 3.1.3. Interakcija s agensima NO sustava

9. Vršilo se klemanja hilusa slezene u trajanju 30 minuta. Radile su se dvije grupe. Obje grupe su premedicinirane 5 min prije klemanja hilusa intraperitonealno s L argininom u dozi 200 mg/kg. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dan 1 ml BPC 157 u dozi od 2µg/ml neposredno prije klemanja hilusa i to kao kupku. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa. Skidanjem klema životinje su žrtvovane te im odstranjene slezene za histološku analizu te su obavljena mjerenja težine životinje te težine i volumena slezene (slika 18.).

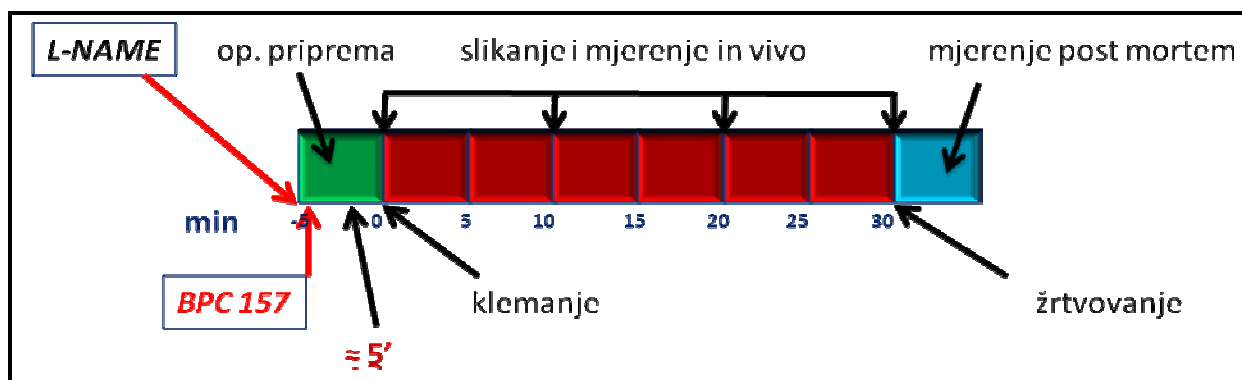
Obrazloženje: Cilj pokusa je bila usporedba djelovanja agonista NO sistema (L-arginin) s djelovanjem BPC-a 157.



Sl. 18 Shematski prikaz devetog pokusa

10. Vršilo se klemanja hilusa slezene u trajanju od 30 minuta. Radilo se u dvije grupe. Obje grupe su premedicinirane 5 min prije klemanja hilusa intraperitonealno s L-NAME u dozi 5 mg/kg. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dan 1 ml BPC 157 u dozi od 2µg/ml neposredno prije klemanja hilusa i to kao kupku. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa. Skidanjem klema životinje su žrtvovane, a slezene su im odstranjene za histološku analizu. Izvršena su i mjerenja težine životinje te težine i volumena slezene (slika 19).

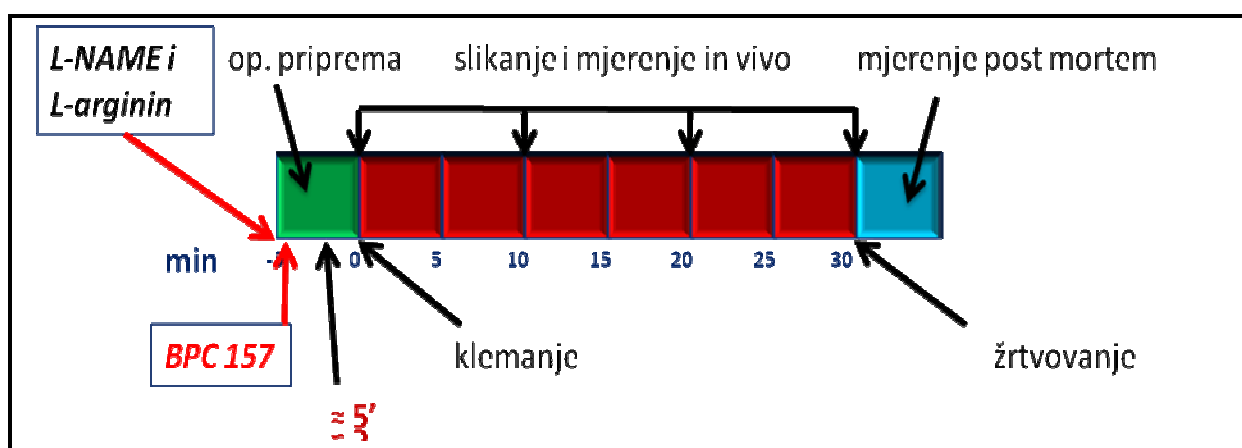
Obrazloženje: Cilj pokusa je bio usporedba djelovanja antagonista NO sistema (L-NAME) s djelovanjem BPC-a 157.



Sl. 19 Shematski prikaz desetog pokusa

11. Vršilo se klemanja hilusa slezene u trajanju od 30 minuta. Radile su se dvije grupe. Obje grupe su premedicinirane 5 min prije klemanja hilusa intraperitonealno s L-argininom u dozi od 200 mg/kg i L-NAME u dozi 5 mg/kg. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dan 1 ml BPC 157 u dozi od **2µg/ml neposredno prije klemanja** hilusa i to kao kupka. Promjene su dokumentirati slikanjem svakih 10 minuta i na kraju svega. Skidanjem klema životinje su žrtvovane te im odstranjena slezena za histološku analizu i izvršeno mjerenje težine životinje te težine i volumena slezene (slika 20.).

Obrazloženje: Cilj pokusa je bila usporedba zajedničkog djelovanja antagonista NO sistema (L-NAME) i agonista NO sistema (L-arginina) s djelovanjem BPC-a 157.



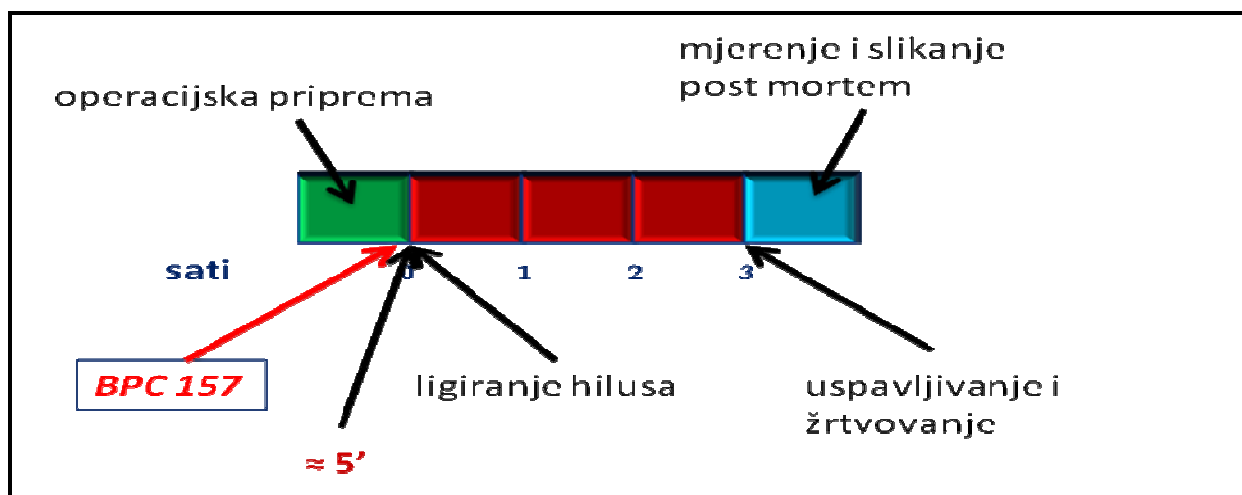
Sl. 20 Shematski prikaz jedanaestog pokusa

Svaki je od navedenih pokusa bio proveden na 5 pari životinja.

### 3.2. DRUGA GRUPA POKUSA

12. Nakon laparotomije vršeno je ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala **3 sata**, a potom su životinje žrtvovane. Promjene su dokumentirane slikanjem nakon žrtvovanja životinja po isteku tri sata ishemije slezene. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu te izvršeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene. (slika 21.).

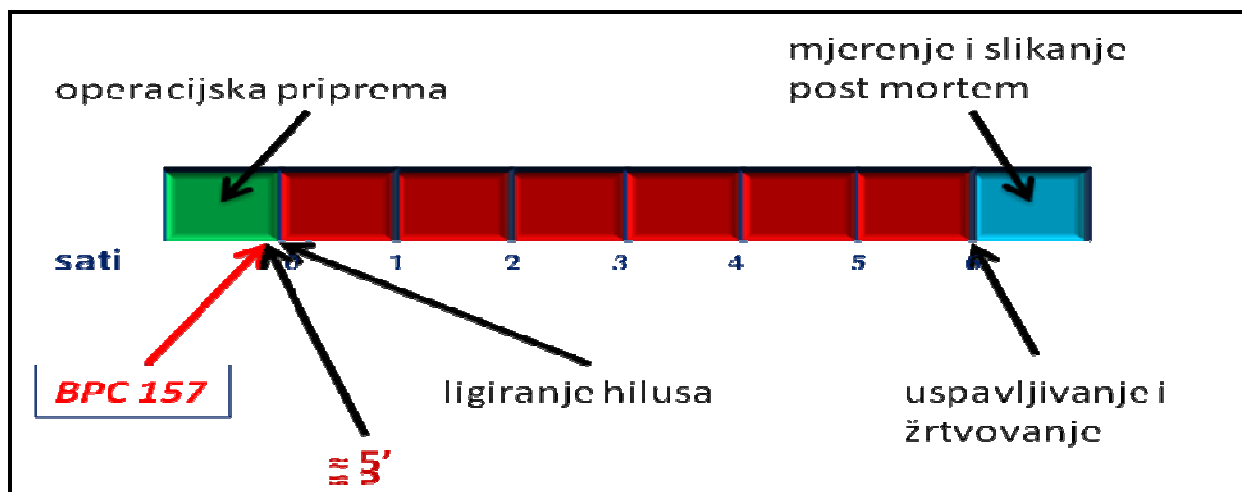
Obrazloženje: Ovim pokusom istražena je efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene nakon tri sata trajanja ishemije.



Sl. 21 Shematski prikaz dvanaestog pokusa

13. Nakon laparotomije vršeno je ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala **6 sati**, a potom su životinje žrtvovane. Promjene su dokumentirane slikanjem nakon žrtvovanja životinja po isteku šest sati ishemije slezene. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu te izvršeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene. (slika 22.).

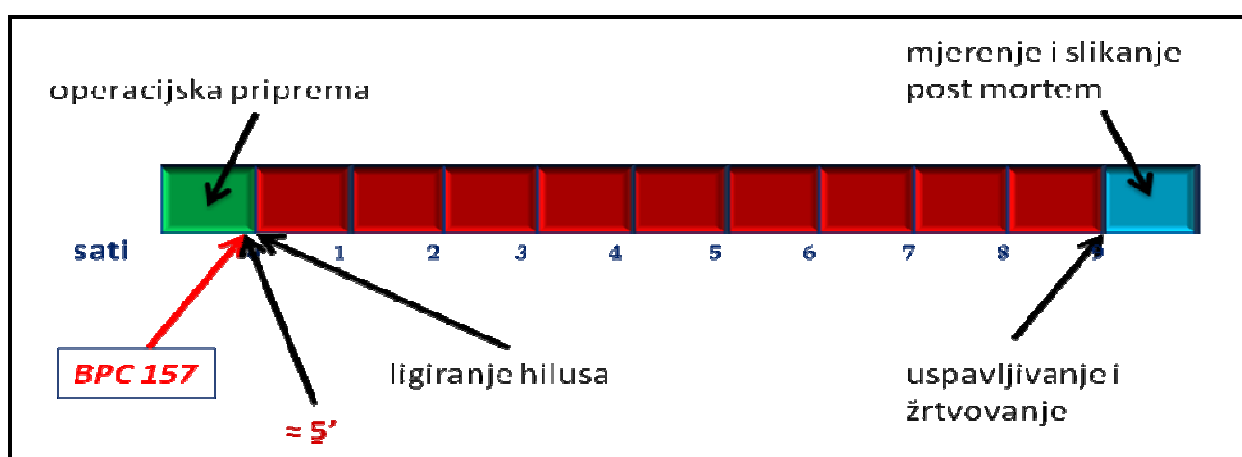
Obrazloženje: Ovim pokusom istražena je efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene nakon šest sati trajanja ishemije.



Sl. 22 Shematski prikaz trinaestog pokusa

14. Nakon laparotomije vršeno je ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od  $2\mu\text{g/ml}$  intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala **9 sati**, a potom su životinje žrtvovane. Promjene su dokumentirane slikanjem nakon žrtvovanja životinja po isteku devet sati ishemije slezene. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu te izvršeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene. (slika 23.).

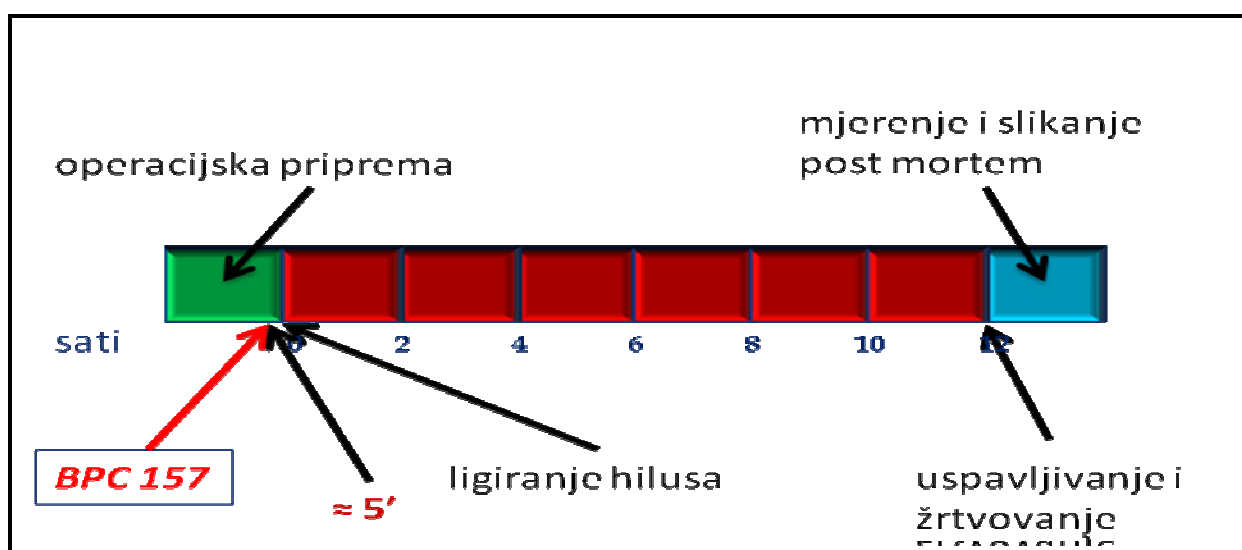
Obrazloženje: Ovim pokusom istražena je efikasnost terapije BPC 157 u dozi od  $2\mu\text{g/ml}$  neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene nakon devet sati trajanja ishemije.



Sl. 23 Shematski prikaz četrnaestog pokusa

15. Nakon laparotomije vršeno je ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala **12 sati**, a potom su životinje žrtvovane. Promjene su dokumentirane slikanjem nakon žrtvovanja životinja po isteku dvanaest sati ishemije slezene. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu te izvršeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene. (slika 24).

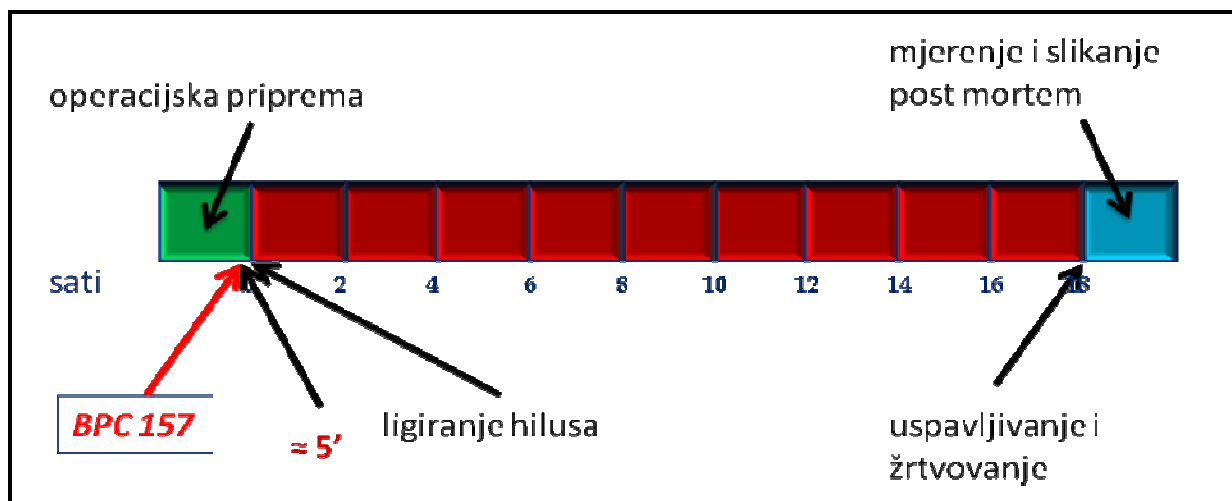
Obrazloženje: Ovim pokusom istražena je efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene nakon dvanaest sati trajanja ishemije.



Sl.24 Shematski prikaz petnaestog pokusa

16. Nakon laparotomije vršeno je ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala **18 sati**, a potom su životinje žrtvovane. Promjene su dokumentirane slikanjem nakon žrtvovanja životinja po isteku osamnaest sati ishemije slezene. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu te izvršeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene. (slika 25).

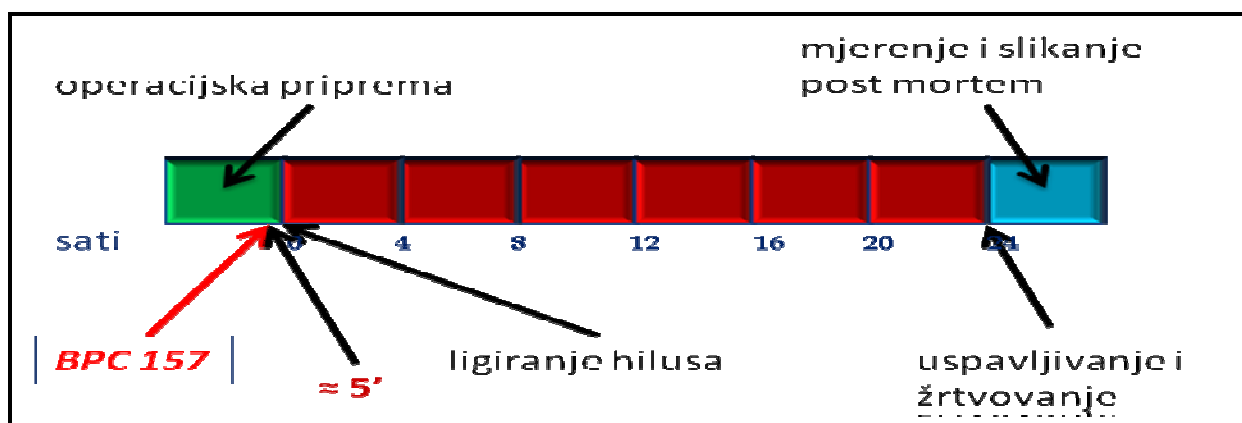
Obrazloženje: Ovim pokusom istražena je efikasnost terapije BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene nakon osamnaest sati trajanja ishemije.



Sl. 25 Shematski prikaz šesnaestog pokusa

17. Nakon laparotomije vršeno je ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od  $2\mu\text{g/ml}$  intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala **24 sata**, a potom su životinje žrtvovane. Promjene su dokumentirane slikanjem nakon žrtvovanja životinja po isteku dvadesetičetiri sata ishemije slezene. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu te izvršeno mjerenje težine životinja te težine i volumena slezene. (slika 26).

Obrazloženje: Ovim pokusom istražena je efikasnost terapije BPC 157 u dozi od  $2\mu\text{g/ml}$  neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene nakon dvadesetičetiri sata trajanja ishemije.



Sl. 26 Shematski prikaz sedamnaestog pokusa

Svaki je od navedenih pokusa bio proveden na 5 pari životinja.

Žrtvovanje pokusnih životinja bilo je obavljeno giljotiniranjem u anesteziji.

### 3.3. PRIPREME PREPARATA

Nakon žrtvovanja odstranjene slezene štakora bile su pohranjene u 4% otopini formaldehida. Slijedio je uobičajeni postupak fiksiranja parafinom i izrada HE preparata, kako je opisano.<sup>21</sup>

### 3.4. PRIPREMA OTOPINA

**BPC 157:** Pentadekapeptid BPC 157 je dio lanca peptida ljudskog želučanog soka BPC-a slobodno topiv u vodi na pH 7.0 i u fiziološkoj otopini. Upotrijebljen je peptid 99% čistoće i pripremljen kako je opisano<sup>22</sup>.

**L-arginin i L-NAME:** Proizvedeni u Sigma, St Louis, MO, USA rastopljeni su u fiziološkoj otopini kako je ranije opisano<sup>62</sup>.

Sve su otopine svježe pripravane neposredno prije same primjene u pokusu.

### 3.5. UTVRĐIVANJE UČINKA I STATISTIČKA OBRADA

Radi usporedbe rezultata i njihovog brojčanog izražavanja te mogućnosti statističke obrade podataka kao instrument mjerenja za makroskopsko utvrđivanje upotrijebiti ću **a. broj lezija, b. polumjer lezija, c. površinu lezija i d. stopu infarkciranosti (Si).**

Slezena štakora je vrlo mala i tanka, a njezin hilus je raspoređen duž cijele *facies visceralis*. Stoga je površina infarkta, koji se vidi na površini slezene, upravno razmjernan volumenu tkiva slezene zahvaćenim infarktom. Ova površina je zbog radijalnog širenja krvnih žila u slezeni uvijek, više ili manje, kružnog oblika. Prema tome što je površina lezije veća veći je i infarkt i što je veći broj vidljivih lezija to je oštećenje slezene veće. Stoga je formula za izračun stope infarkciranosti:

$$Si = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} r^2 \pi}{\text{broj slezena}}$$

U drugoj grupi pokusa veličina infarkta je mjerena na histološkim preparatima i to kao postotak površine vidnog polja pri istom povećanju, koji nije zahvaćen infarktom. Dakle mjerene su površine zdravog tkiva, a brojčane vrijednosti predstavljaju postotak površine vidnog polja, koji nije zahvaćen infarktom, kao posljedicom ishemije inducirane ligiranjem hilusa slezene. Mjerenje je bilo izvršeno na 10 vidnih polja svakog preparata.

S obzirom na distribuciju rezultata upotrijebljena su parametrijska i neparametrijska testiranja u okviru programa Statistica 7.1.



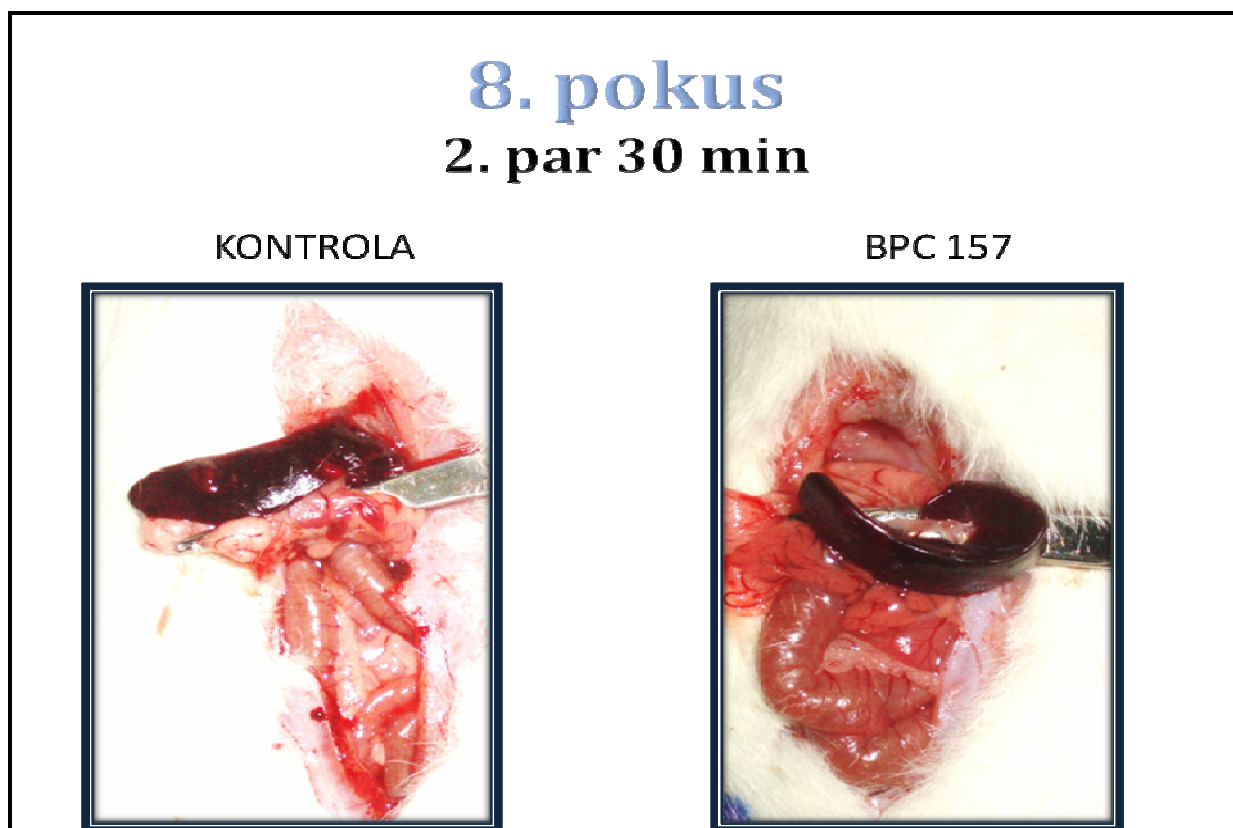
#### 4.0. REZULTATI

Za statističku analizu rezultata pokusa upotrijebljen je program Statistika 7.1. U okviru toga u svim pokusima za analizu distribucije podataka korišten je Kologorov-Smirnov test. Za grupe podataka koje su bile normalno distribuirane korišten je t-test, a za grupe podataka koji nisu bile normalno distribuirane korišten je Mann-Whitney U test. Za komparaciju broja životinja s infarktom i bez njega između grupa korišten je Fisher's exact test. Numerički podaci su prikazani kao  $\text{mean} \pm \text{standardna devijacija}$ , a kategorički podaci su prikazani kao  $\text{median} - \text{range}$  (razlika između maksimalne i minimalne vrijednosti). Razina signifikantnosti je u svim pokusima bila na vrijednosti  $p < 0.05$ , a za grafičku obradu podataka koristio se GraphPad Prism 5.0.

#### 4.1. Makroskopska analiza rezultata

U ovoj grupi pokusa mjereno je brojeva lezija u svakoj slezeni i veličina makroskopski vidljive lezije. Ove su lezije definirane jasno uočljivim promjenama boje *fascije visceralis* slezene. Oblik ove promjene boje uvijek je bio kružan te je mjereno polumjer lezije (slika 27.). Iz polumjera promjena i broja lezija izračunavane su površina lezija i stopa infarkciranosti.

Sl.27 Makroskopski izgled lezija

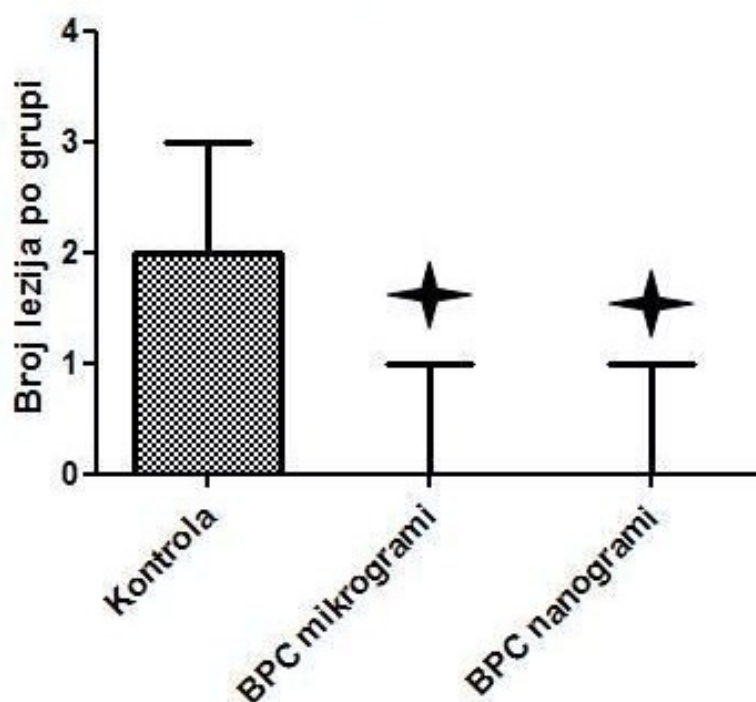


U pokusu pretretmana BPC 157 s reperfuzijom rađeno je klemanje hilusa slezene u trajanju od 30 minuta te potom reperfuzija slezene u trajanju od 10 minuta. Radilo se u dvije grupe. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je pokusnim životinjama dan 1 ml BPC 157 i to na jednoj grupi životinja u koncentraciji od 2  $\mu\text{g/ml}$  kao kupku neposredno prije klemanja hilusa slezene, a u drugoj grupi životinja u koncentraciji od 2 ng također kao kupku neposredno prije klemanja hilusa slezene. Klemanje je vršeno Peanovin stezaljkama. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 5 minuta i na kraju cijelog pokusa te su izvršena mjerenja broja lezija i njihovog polumjera.

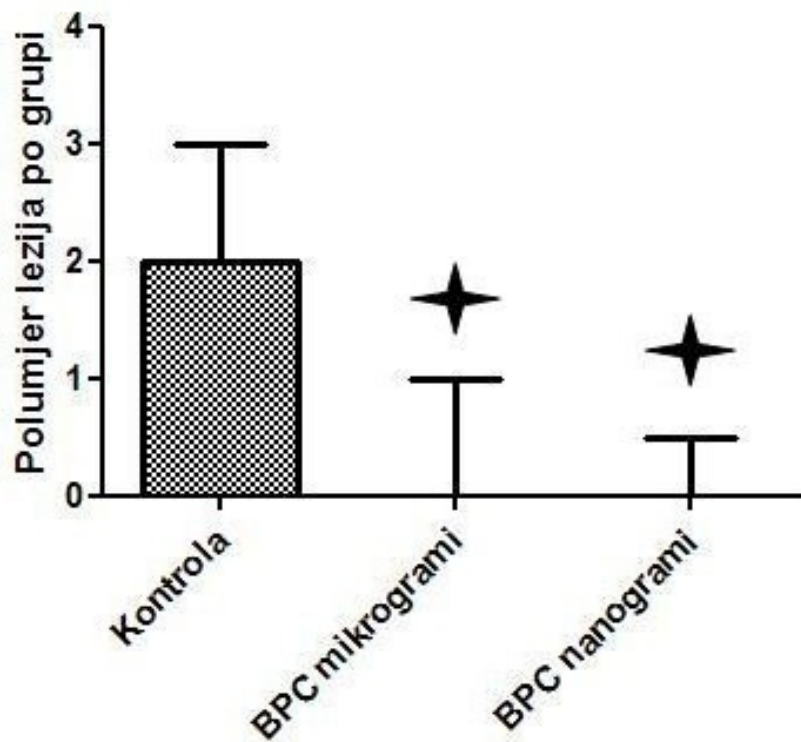
Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja u ovoj grupi pokusa normalno distribuirani te je upotrebljen t-test. Nakon statističke obrade rezultata u ovim je pokusima uočena statistički značajna razlika u veličini infarkta slezene koje su bile tretirane s BPC 157 prema kontrolnoj skupini bez BPC 157 te je time dokazana efikasnost terapije BPC 157 neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene. Tijekom trajanja reperfuzije i nakon nje nije došlo do smanjivanja broja i veličine infarkciranog područja u smislu umanjivanja štete nastale ishemijom tkiva slezene. Isti je pozitivni efekt BPC 157 zabilježen u obje grupe ispitivanih životinja bez obzira na apliciranu dozu od 2  $\mu\text{g/ml}$  odnosno 2 ng/ml. [(graf 1,2,3)legenda simbola slika 28].

Stopa infarkciranosti iznosila je u ovoj grupi pokusa za kontrola 38,631. U grupi životinja s BPC 157 u koncentraciji 2  $\mu\text{g/ml}$  1,046, a u grupi pokusnih životinja s koncentracijom BPC 157 od 2 ng/ml 1,57. (Tablica 2).

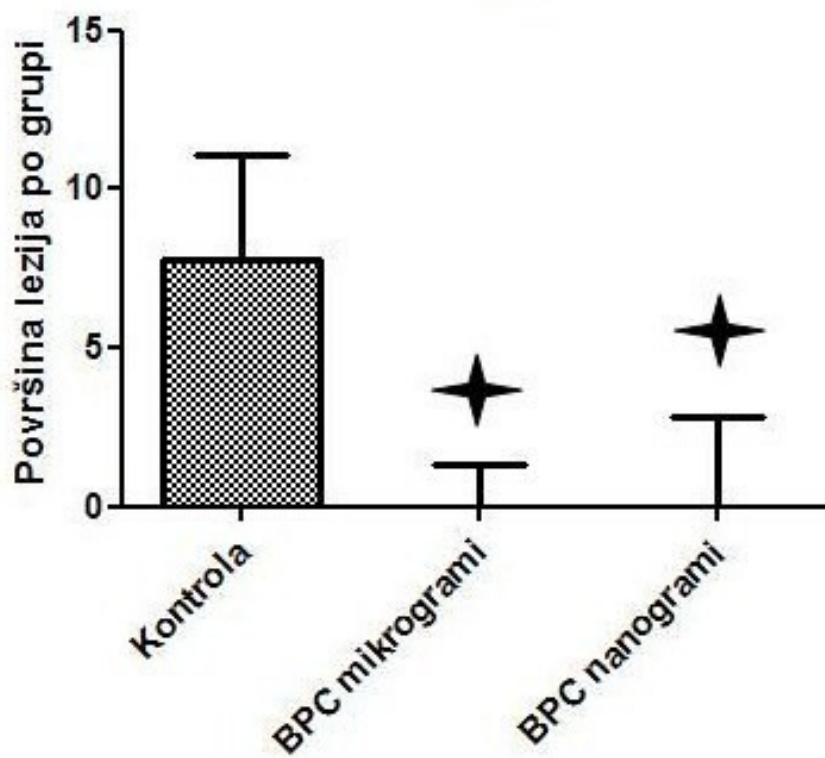
Graf 1. Broj lezija po grupama u pretretmanu BPC 157 s reperfuzijom



Graf 2 Polumjer lezija po grupama u pretretmanu BPC 157 s reperfuzijom



Graf 3. Površina lezija po grupama u pretretmanu BPC 157 s reperfuzijom

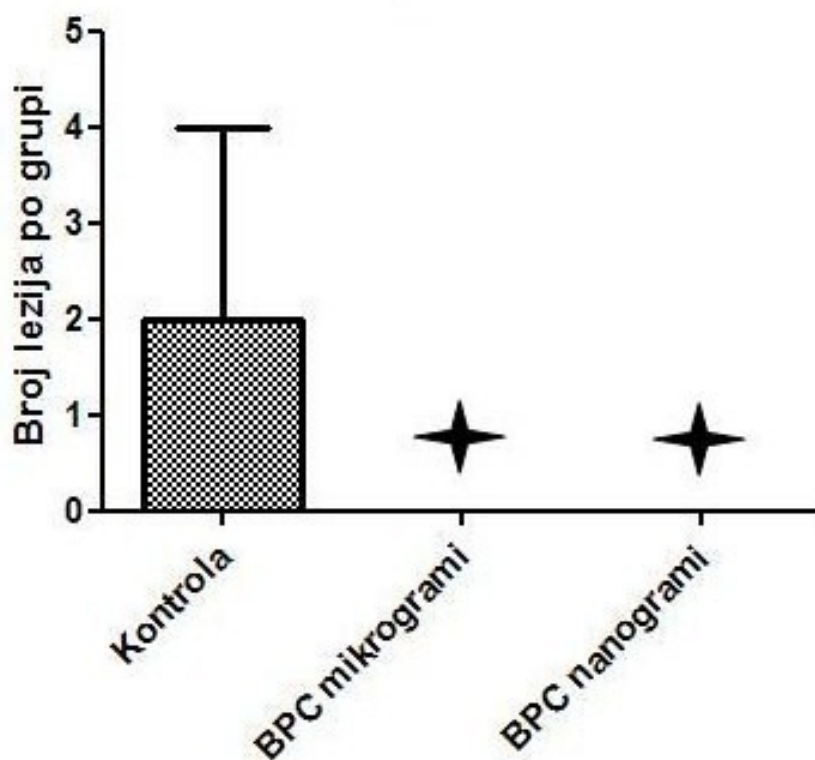


U pokusu posttretmana s reperfuzijom vršilo se klemanje hilusa slezene Peanovim stezaljkama, i izazivanje infarkta sa slikanjem u 10 i 20 min. Radilo se u tri skupine: kontrolna, BPC 157 u koncentraciji od  $2\mu\text{g/ml}$  i BPC u koncentraciji od  $2\text{ ng/ml}$ . Nakon 20 min jedinkama u BPC 157 skupinama dodan je 1 ml BPC-a 157 kao kupka u ranije navedenim koncentracijama. Nadalje je vršeno mjerenje i dokumentiranje slikanjem u 25, 30, 35 i 40 min trajanja pokusa. Slijedi otpuštanje stezaljki i reperfuzija u trajanju 10 min po isteku kojih se ponovo vrši mjerenje i dokumentiranje slikanjem.

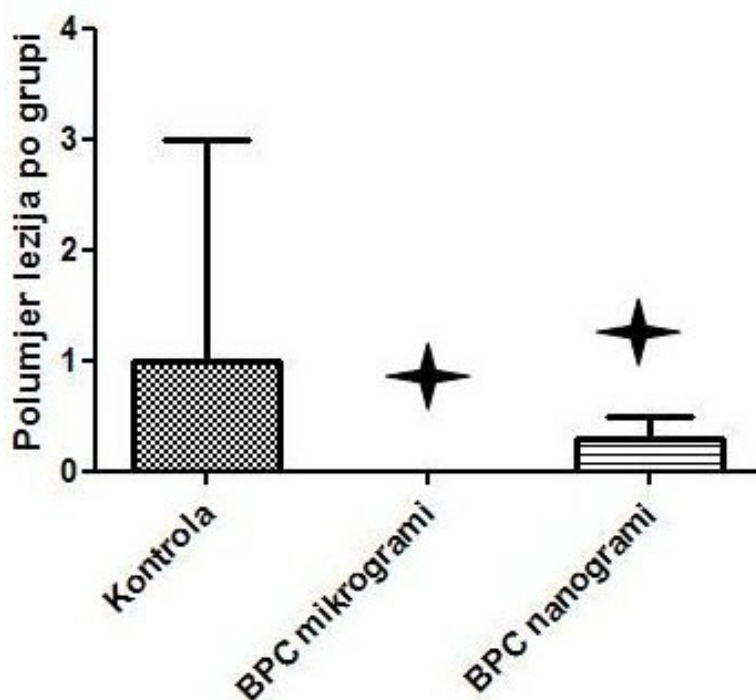
Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja ovih pokusa normalno distribuirani te je za analizu upotrebljen t-test. Nakon obrade rezultata dokazana je efikasnost terapije BPC 157 nakon 20 min trajanja nokse u zaustavljanju napredovanja razvijenih promjena, kao i prestanku pojavljivanja novih promjena te neučinkovitost reperfuzije u smanjenju nastalih oštećenja slezene. Prisutnost pozitivnog efekta BPC 157 dokazana je u obje grupe pokusnih životinja bez obzira na dozu BPC 157 u  $\mu\text{g}$  ili  $\text{ng}$  po mililitru. [(graf 4,5,6) legenda simbola slika 28].

Stopa infarkciranosti iznosila je u ovoj grupi pokusa za kontrolu 7,065. U grupi životinja s BPC 157 u koncentraciji  $2\mu\text{g/ml}$ , kao i u grupi pokusnih životinja s koncentracijom BPC 157 od  $2\text{ ng/ml}$  stopa infarkciranosti je bila 0 (Tablica 2).

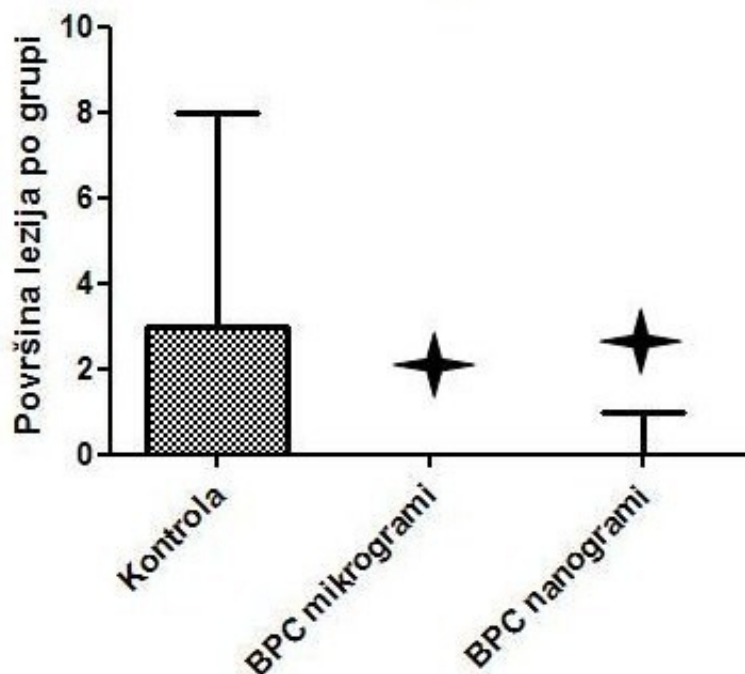
Graf 4 Broj lezija po grupama u posttretmanu BPC 157 s reperfuzijom



Graf 5 Polumjer lezija po grupama u posttretmanu BPC 157 s reperfuzijom



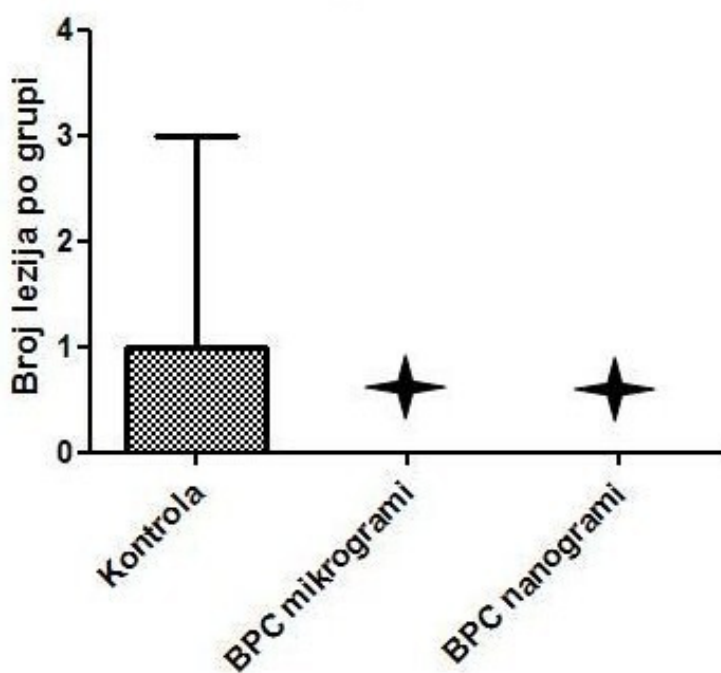
Graf 6 Površina lezija po grupama u posttretmanu BPC 157 s reperfuzijom



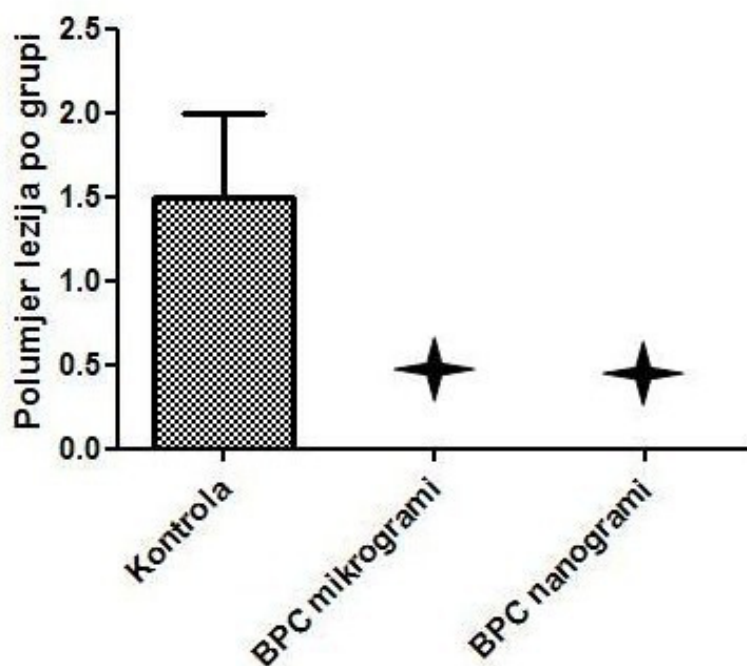
Pokusi pretretmana izvođeni su klemanjem hilusa slezene kroz 30 minuta. Radile su se tri grupe. Prva je bila kontrolna, a u druge dvije je dodan 1 ml BPC 157 kao kupka neposredno prije klemanja hilusa, i to u jednoj grupi pokusnih životinja u koncentraciji od 2  $\mu\text{g/ml}$ , a u drugoj grupi u koncentraciji od pokusu 2ng/ml. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa.

Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja ovih pokusa normalno distribuirani te je za obradu podataka upotrijebljen t-test. Isti je dokazao efikasnost terapije BPC 157 neposrednim premediciniranjem u prevenciji nastanka infarkta slezene kako u dozi od 2  $\mu\text{g/ml}$  tako i u dozi od 2ng/ml. [(graf 7,8,9) legenda simbola slika 28].

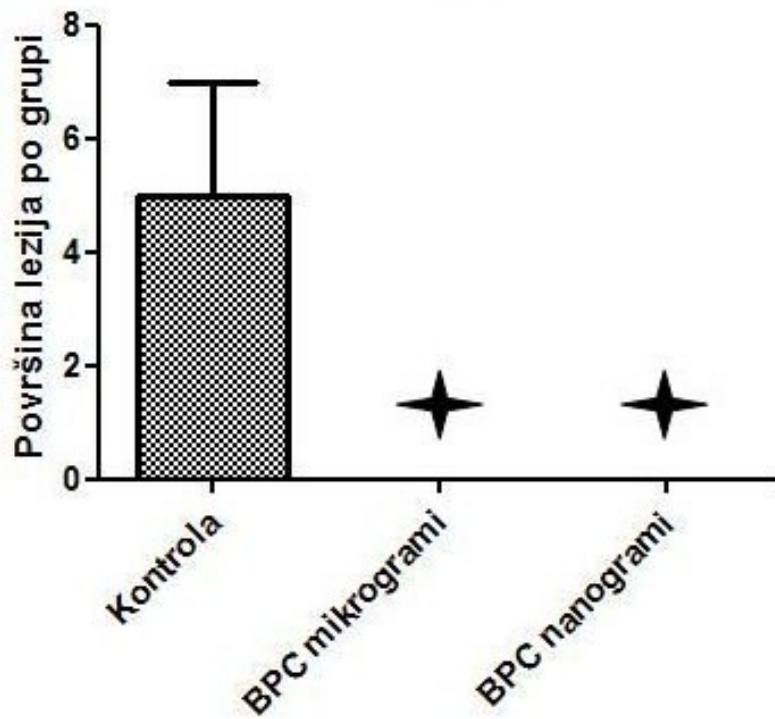
Graf 7 Broj lezija po grupama u pretretmanu BPC 157



Graf 8 Polumjer lezija po grupama u pretretmanu BPC 157



Graf 9 Površina lezija po grupama u pretretmanu BPC 157



U pokusima pretretmana s BPC 157 stopa infarkciranosti za kontrolnu skupinu iznosila 11,643, a u grupi životinja s apliciranim BPC 157 0 bez obzira na koncentraciju BPC 157 u  $\mu\text{g/ml}$  ili u  $\text{ng/ml}$ . (Tablica 2).

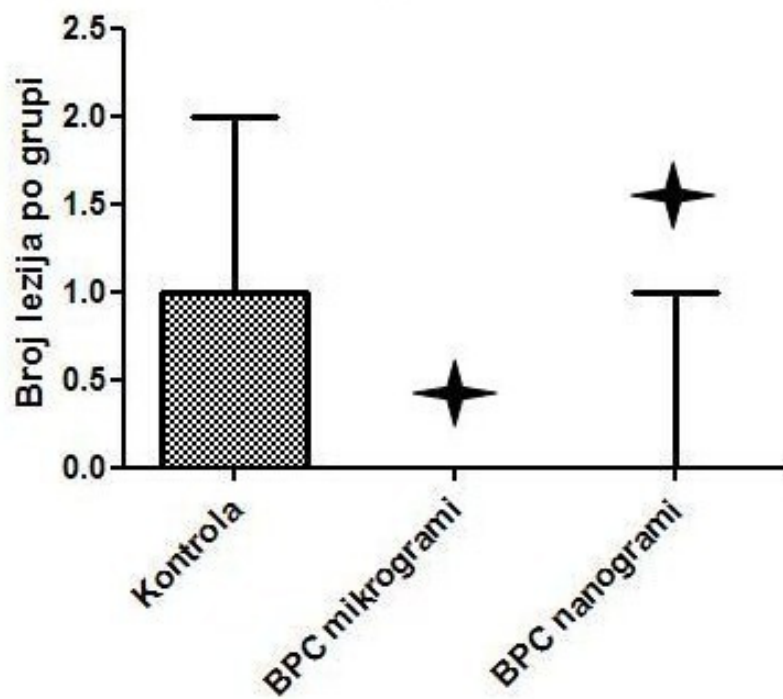
U pokusima posttretmana BPC 157 vršilo se klemanje hilusa slezene Peanovim stezaljkama i izazivanje infarkta sa slikanjem u 10 i 20 min. Radilo se u tri skupine. Prva je bila kontrolna, a u druge je dvije skupine nakon 20 min trajanja ishemije apliciran BPC 157 i to jednoj skupini u koncentraciji od 2  $\mu\text{g/ml}$ , a drugoj skupini u koncentraciji od 2  $\text{ng/ml}$  i to u obje grupe kao kupka. Slikanje je bilo vršeno u 30 min, a životinje su nakon mjerenja žrtvovane.

Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja ovih pokusa normalno distribuirani te je za provjeru signifikantnosti upotrijebljen t-test. Nakon obrade rezultata ovih pokusa dokazana je efikasnost terapije BPC 157 u obje promatrane doze u zaustavljanju napredovanja promjena koje su se pojavile, kao i prestanku pojavljivanja novih promjena. [(graf 10,11,12) legenda simbola slika 28].

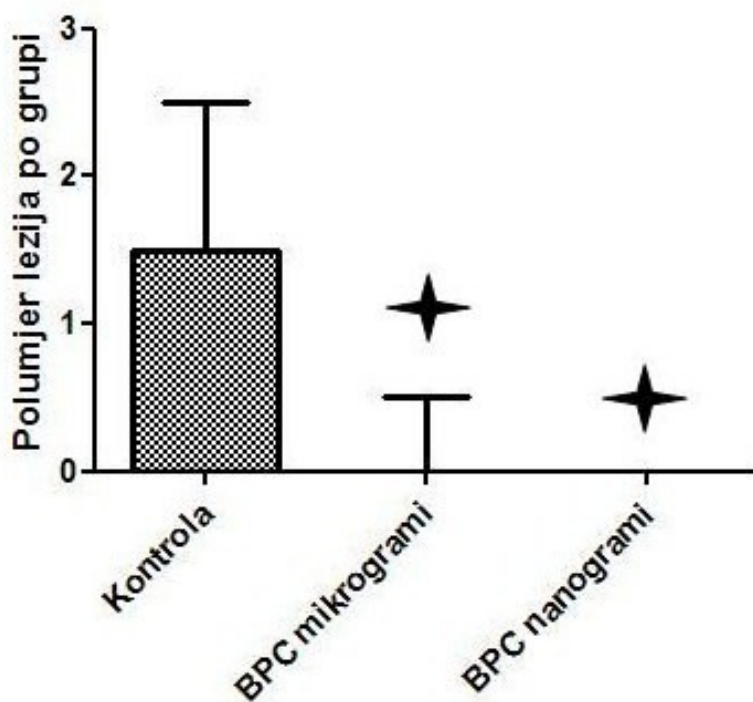
Stopa infarkciranosti je u četvrtom pokusu za kontrolnu skupinu iznosila 5,756, a u grupi životinja s apliciranim BPC 157 1,046. U osmom pokusu bila je zabilježena za kontrolnu skupinu Stopa 4,71 prema 0 za grupu životinja s BPC 157. (Tablica 2).



Graf 10 Broj lezija po grupama u posttretmanu BPC 157

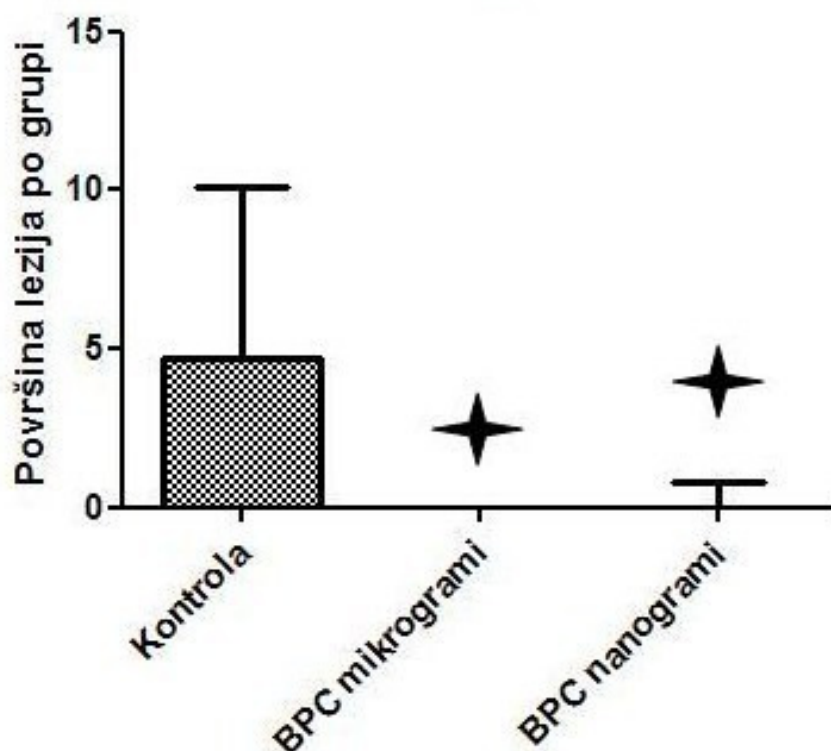


Graf 11 Polumjer lazija po grupama u posttretmanu BPC 157





Graf 12 Površina lezija po grupama u posttretmanu BPC 157

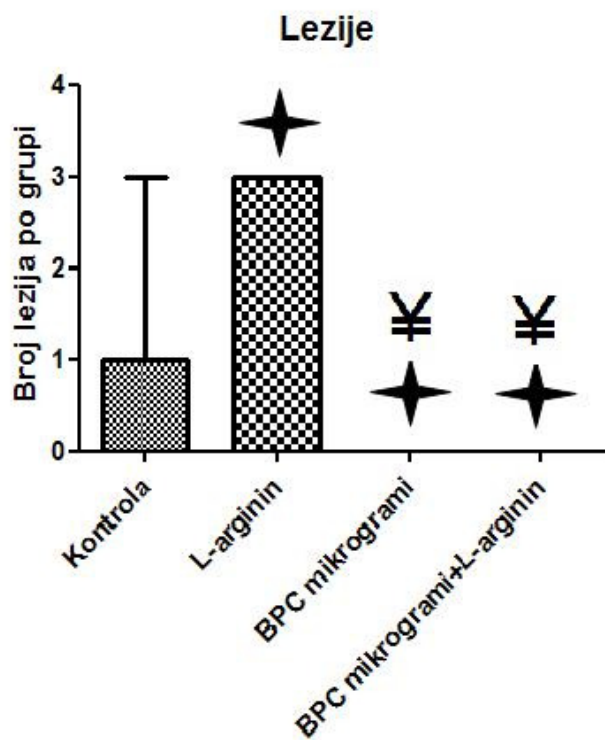


Cilj pokusa međudjelovanja agonista NO sustava, L-arginina, s BPC 157 je bio usporedba njihovog djelovanja među sobom i prema kontrolnoj skupini. U tu se svrhu vršilo klemanje hilusa slezene u trajanju 30 minuta. Radile su se tri grupe. Prva je grupa bila kontrolna, a druge dvije grupe su premedicinirane 5 min prije klemanja hilusa intraperitonealno s L-argininom u dozi 200 mg/kg. Nakon laparotomije jednoj od njih je dodan i 1 ml BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposredno prije klemanja hilusa i to kao kupku. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa.

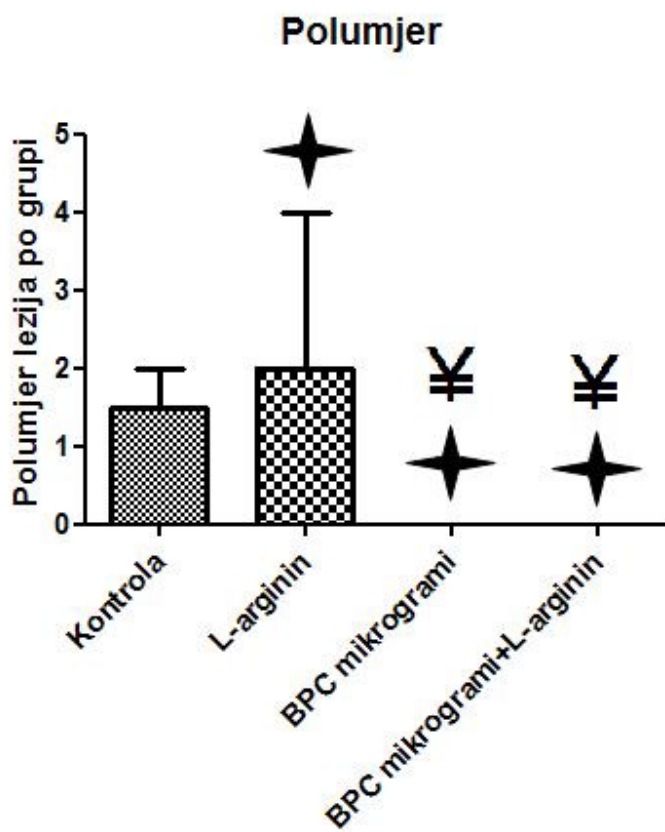
Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja ovog pokusa normalno distribuirani te je za statističku obradu upotrebljen t-test. Nakon statističke obrade rezultata dokazano je djelovanje BPC-a 157 u smislu protekcije tkiva od posljedica ishemije i u sprečavanju nastanka infarkta slezene u kombinaciji s L-argininom, agonistom NO sustava. Efikasnost agonista NO sistema (L-arginina) u sprečavanju nastanka infarkta nije potvrđena. Naprotiv ne samo da sam L-arginin nije uspio spriječiti nastajanje infarkta slezene već su rezultati ukazali da je nalaz na slezenama tretiranim samo L-argininom prema kontrolnoj skupini bio statistički značajno lošiji odnosno da su broj infarkta, njihov polumjer i površina bili veći. BPC 157 u potpunosti je spriječio nastajanje infarkta slezene kako sam, tako i u kombinaciji s L-argininom. [(graf 13,14,15) legenda simbola slika 28].

Stopa infarkciranosti u kontrolnoj skupini je bila 11,643, a u skupini životinja tretiranih samo s L-argininom 51,286. U skupini životinja tretiranih BPC 157 kao i u skupini životinja tretiranih s BPC 157 i L-argininom stopa infarkciranosti je bila 0.

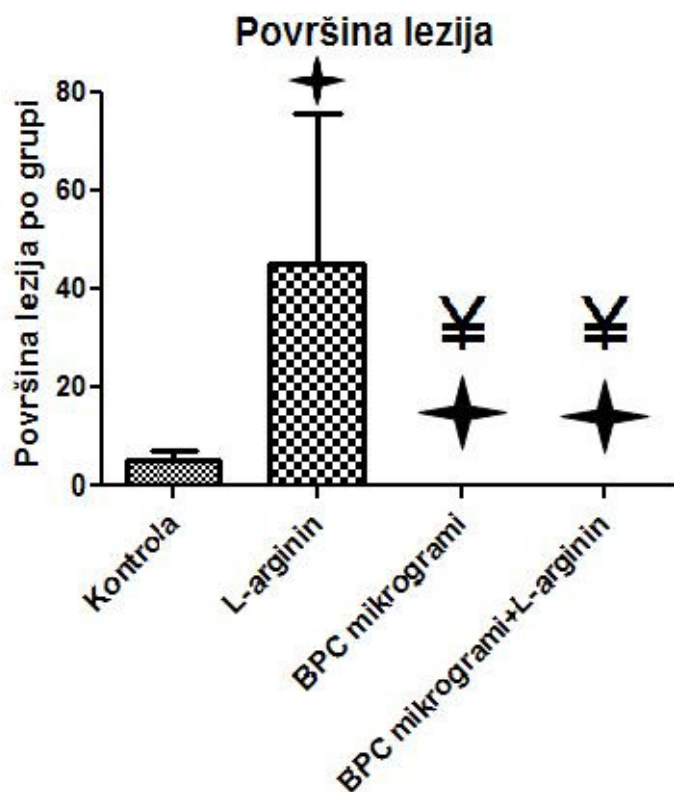
Graf 13 Broj lezija po grupama u usporedbi L-arginina i BPC 157



Graf 14 Polumjer lezija po grupama u usporedbi L-arginina i BPC 157



Graf 15 Površina lezija po grupama u usporedbi L-arginina i BPC 157

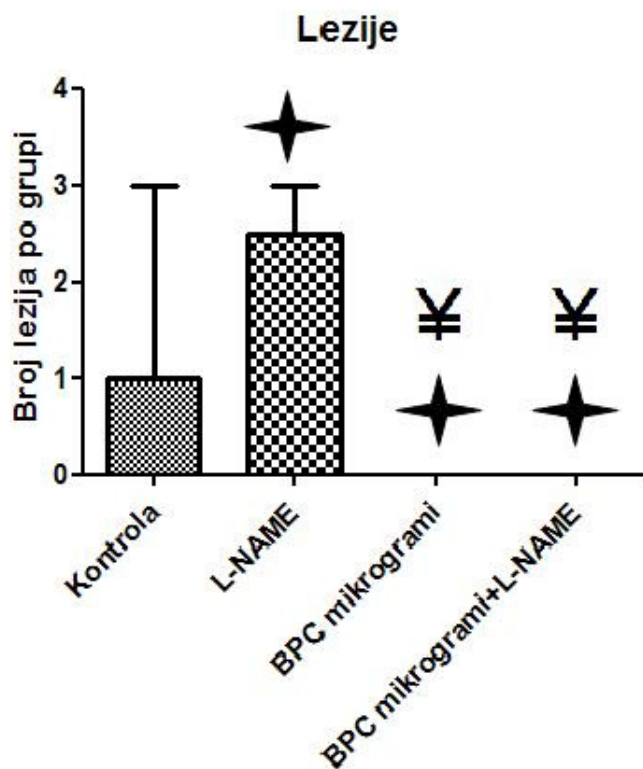


Cilj pokusa međudjelovanja antagonista NO sustava, L-NAME, s BPC 157 je bio usporedba njihovog djelovanja među sobom i prema kontrolnoj skupini. U tu se svrhu vršilo klemanje hilusa slezene u trajanju 30 minuta. Radile su se tri grupe. Prva je grupa bila kontrolna, a druge dvije grupe su premedicinirane 5 min prije klemanja hilusa intraperitonealno s L-NAME u dozi od 5 mg/kg. Nakon laparotomije jednoj od njih je dodan i 1 ml BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposredno prije klemanja hilusa i to kao kupka. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa.

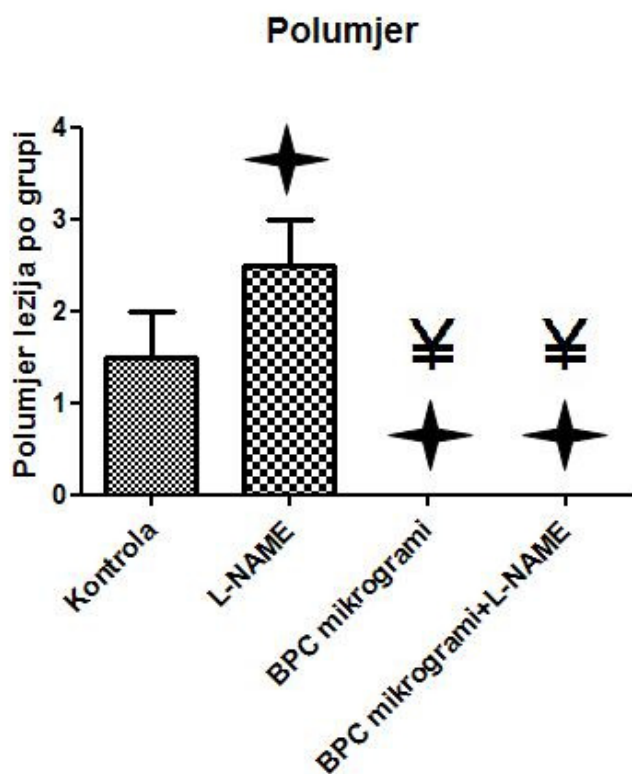
Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja ovog pokusa normalno distribuirani te je za statističku obradu upotrijebljen t-test. Nakon statističke obrade rezultata dokazano je djelovanje BPC-a 157 u smislu protekcije tkiva od posljedica ishemije i u sprečavanju nastanka infarkta slezene u kombinaciji s L-NAME, antagonistom NO sustava. Efikasnost antagonista NO sistema (L-NAME) u sprečavanju nastanka infarkta nije potvrđena. Čak što više, ne samo da sam L-NAME nije uspio spriječiti nastajanje infarkta slezene već su rezultati ukazali da je nalaz na slezenama tretiranim samo s L-NAME prema kontrolnoj skupini bio statistički značajno lošiji odnosno da je broj infarkta, njihov polumjer i površina bili veći. BPC 157 u potpunosti je spriječio nastajanje infarkta slezene kako sam tako i u kombinaciji s L-NAME. [(graf 16,17,18) legenda simbola slika 28].

Stopa infarkciranosti u kontrolnoj skupini je bila 11,643, a u skupini životinja tretiranih samo s L-NAME 24,073. U skupini životinja tretiranih BPC 157 kao i u skupini životinja tretiranih s BPC 157 i L-NAME stopa infarkciranosti je bila 0.

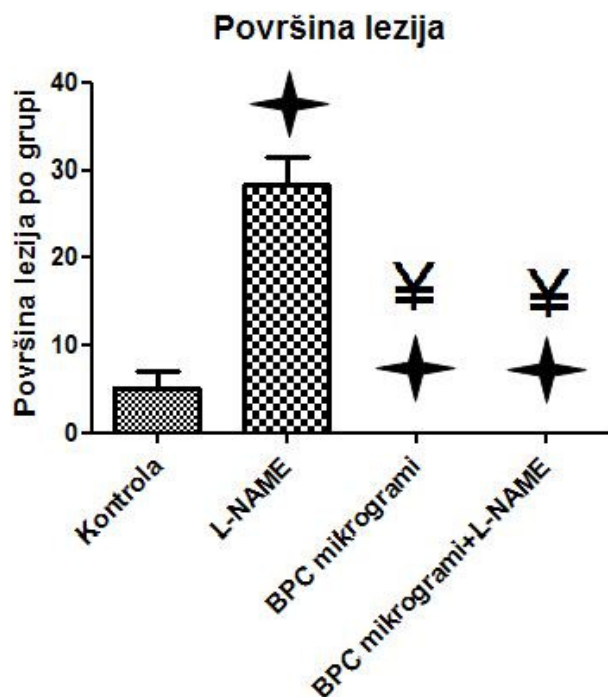
Graf 16 Broj lezija po grupama u usporedbi L-NAME i BPC 157



Graf 17 Polumjer lezija po grupama u usporedbi L-NAME i BPC 157



Graf 18 Površina lezija po grupama u usporedbi L-NAME i BPC 157

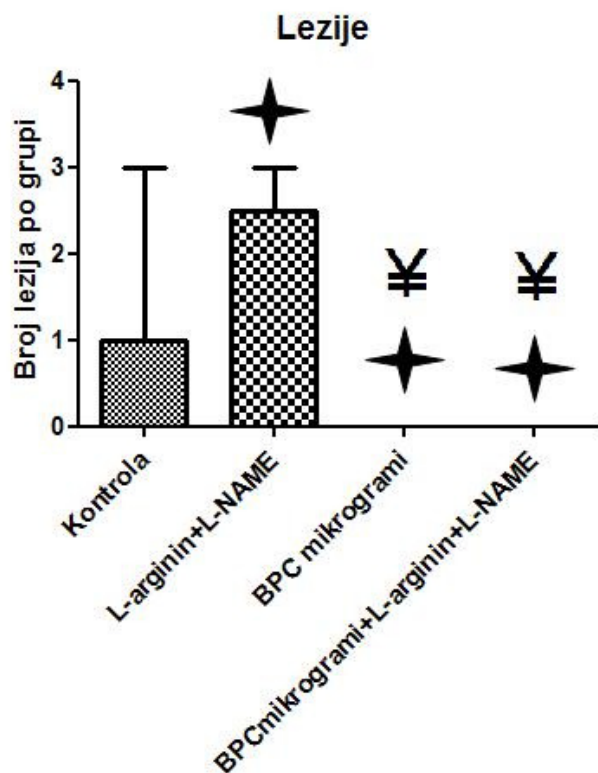


Cilj pokusa međudjelovanja antagonista i agonista NO sustava, L-NAME i L-arginina, s BPC 157 je bio usporedba njihovog djelovanja između agensa NO sustava i BPC 157 prema kontrolnoj skupini. U tu se svrhu vršilo klemanje hilusa slezene u trajanju 30 minuta. Radile su se tri grupe. Prva je grupa bila kontrolna, a druge dvije grupe su premedicinirane 5 min prije klemanja hilusa intraperitonealno s L-NAME u dozi od 5 mg/kg i L-argininom 200 u dozi od mg/kg. Nakon laparotomije jednoj od njih je dodan i 1 ml BPC 157 u dozi od 2 $\mu$ g/ml neposredno prije klemanja hilusa i to kao kupka. Promjene su dokumentirane slikanjem svakih 10 minuta i na kraju cijelog pokusa.

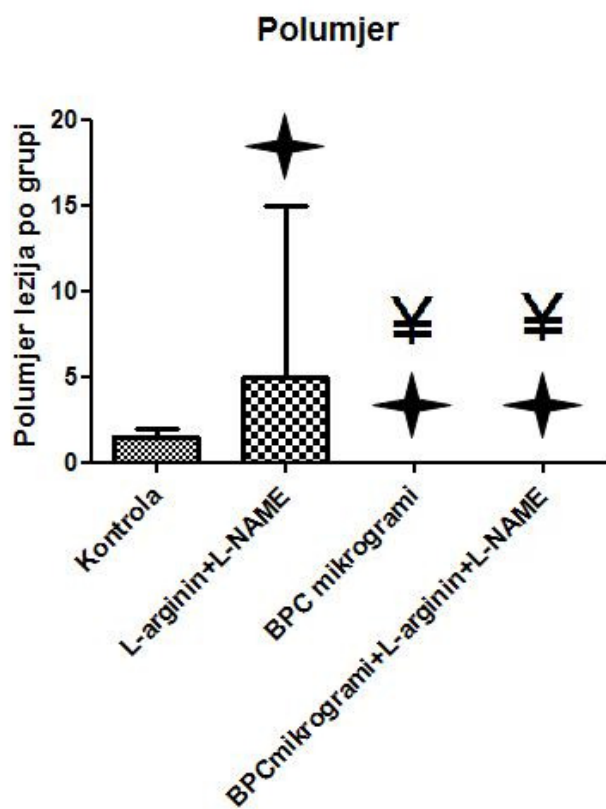
Kologorov-Smirnov test ukazao je da su rezultati mjerenja ovog pokusa normalno distribuirani te je za statističku obradu upotrijebljen t-test. Nakon statističke obrade rezultata dokazano je djelovanje BPC-a 157 u smislu protekcije tkiva od posljedica ishemije i u sprečavanju nastanka infarkta slezene u kombinaciji s L-NAME, antagonistom NO sustava i L-argininom, agonistom NO sustava. Efikasnost antagonista NO sistema (L-NAME) i agonista NO sustava L-arginina u sprečavanju nastanka infarkta nije potvrđena. Čak što više ne samo da sami L-NAME L-arginin nisu uspjeli spriječiti nastajanje infarkta slezene već su rezultati ukazali da je nalaz na slezenama tretiranim samo s agensima NO sustava prema kontrolnoj skupini bio statistički značajno lošiji, odnosno da su broj infarkta, njihov polumjer i površina bili veći. BPC 157 u potpunosti je spriječio nastajanje infarkta slezene kako sam, tako i u kombinaciji s agensima NO sustava. [graf 19,20,21) legenda simbola slika 28].

Stopa infarkciranosti u kontrolnoj skupini je bila 11,643, a u skupini životinja tretiranih s L-argininom i L-NAME 365,81. U skupini životinja tretiranih BPC 157 kao i u skupini životinja tretiranih s BPC 15, L-argininom i L-NAME stopa infarkciranosti je bila 0.

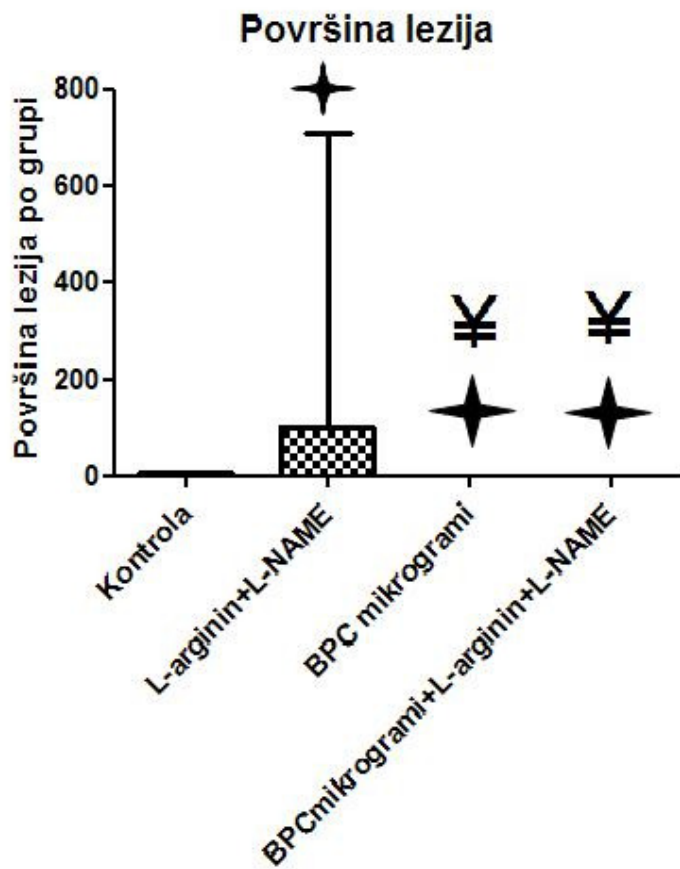
Graf 19 Broj lezija po grupama u usporedbi L- arginina, L-NAME i BPC 157



Graf 20 Polumjer lezija po grupama u usporedbi L- arginina, L-NAME i BPC 157



Graf 21 Površina lezija po grupama u usporedbi L- arginina, L-NAME i BPC 157



Slika 28 Legenda simbola za sve grafove

✦	statistički značajna razlika prema kontrolnoj skupini
¥	staistički značajna razlika prema grupi životinja tretiranih agensima NO sustava

Tablica 2

## STOPA INFARKCIRANOSTI ZA SVE POKUSE

Vrsta pokusa	Kontrola	BPC 157 $\mu\text{g/ml}$	BPC 157 $\text{ng/ml}$
Pretretman BPC 157 s reperfuzijom	38,631	1,046	1,57
Posttretman BPC 157 s reperfuzijom	7,065	0	0
Pretretman BPC 157	11,643	0	0
Posttretman BPC 157	5,283	1,046	0

Vrsta pokusa	Kontrola	BPC 157	NO sustav	BPC 157+NO sustav
Pretretman L-arginin i BPC 157	11,643	0	51,286	0
Pretretman L-NAME i BPC 157	11,643	0	24,073	0
Pretretman L-arginin, L-NAME i BPC 157	11,643	0	365,81	0

## 4.2. Histološka analiza rezultata

U ovoj grupi pokusa veličine infarkta mjerene su na histološkim preparatima pri istom povećanju i to kao postotak površine vidnog polja koji nije zahvaćen infarktom. Dakle mjerene su površine zdravog tkiva, a brojčane vrijednosti predstavljaju postotak površine vidnog polja, koji nije zahvaćen infarktom, kao posljedicom ishemije inducirane ligiranjem hilusa slezene. Mjerenje je izvršeno na 10 vidnih polja svakog preparata.

Histološki se u različito velikim područjima vidi nekroza parenhima, kao izraz infarkta, uz dijelom očuvana područja pretežito bijele pulpe (slika 29).



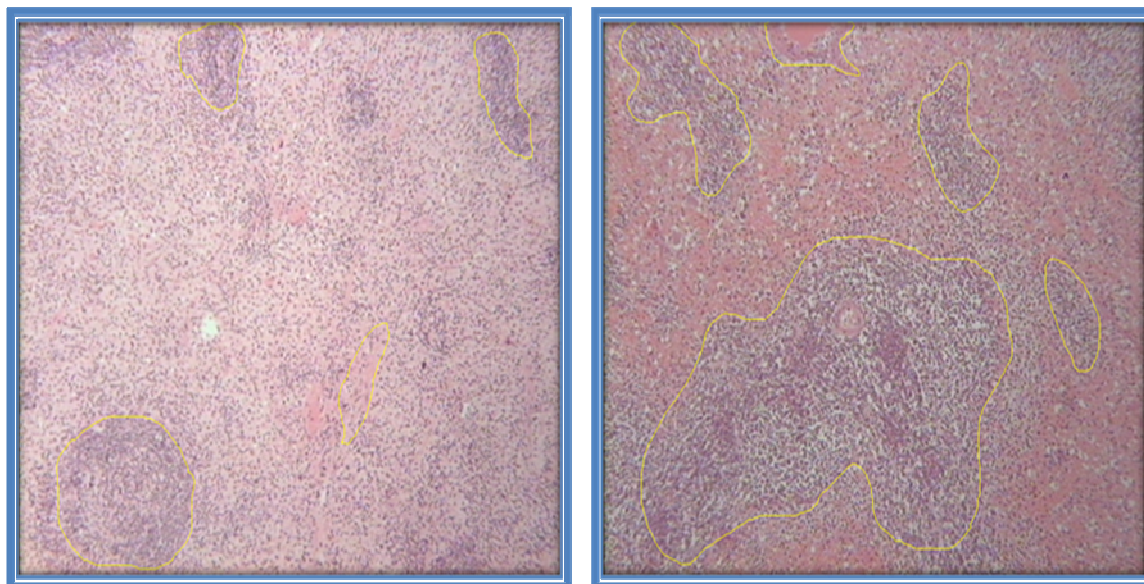
Slika 29

# HISTOLOŠKA SLIKA INFARKTA SLEZENE

XV pokus 12 sati ishemije

KONTROLA

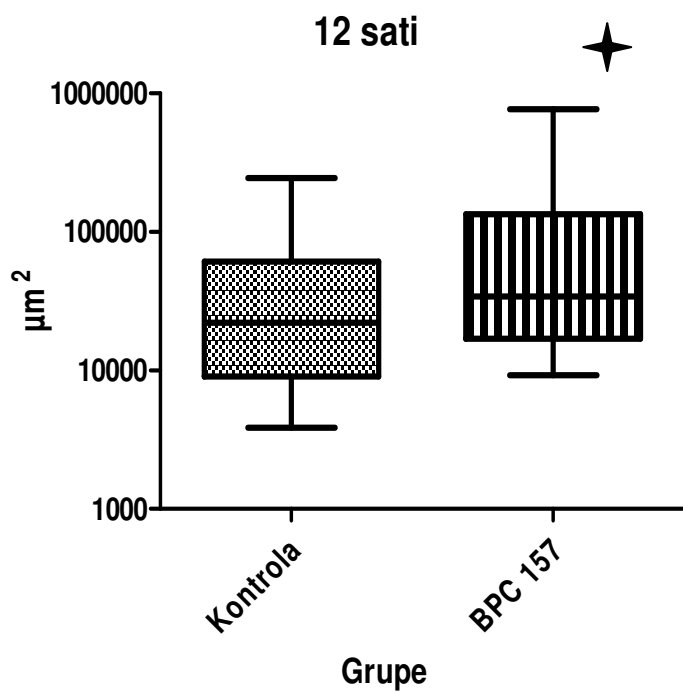
BPC 157



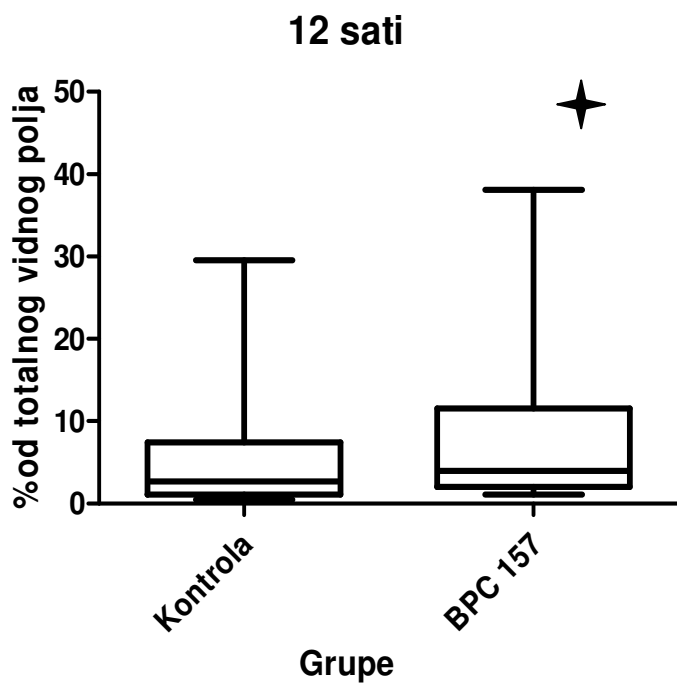
U ovim je pokusima nakon laparotomije vršeno ligiranje hilusa slezene te potom zatvaranje trbušne šupljine u dva sloja. Radile su se dvije grupe životinja. Prva je bila kontrolna, a u drugoj je dat 1 ml BPC 157 u koncentraciji od 2 $\mu$ g/ml intraperitonealno neposredno prije laparotomije. Ishemija je trajala progresivno 12, 18 i 24 sata, a potom su životinje žrtvovane. Žrtvovanim su životinjama odstranjene slezene za histološku analizu, a rezultati se dokumentiraju slikanjem. Za analizu slikovnih podataka korišten je ISSA sustav za obradu i pohranu slika, VAMS teh, Zagreb.

Kologorov-Smirnov test ukazao je da rezultati mjerenja ovih pokusa nisu normalno distribuirani te je za analizu upotrijebljen Mann-Whitney U test. Nakon obrade rezultata dokazana je efikasnost terapije BPC 157 u sprečavanju razvoja infarkta nakon isteka svih promatranih vremena, dakle nakon 12, 18 i 24 sata trajanja nokse. [(graf 22,23,24,25,26,27) legenda simbola slika 28].

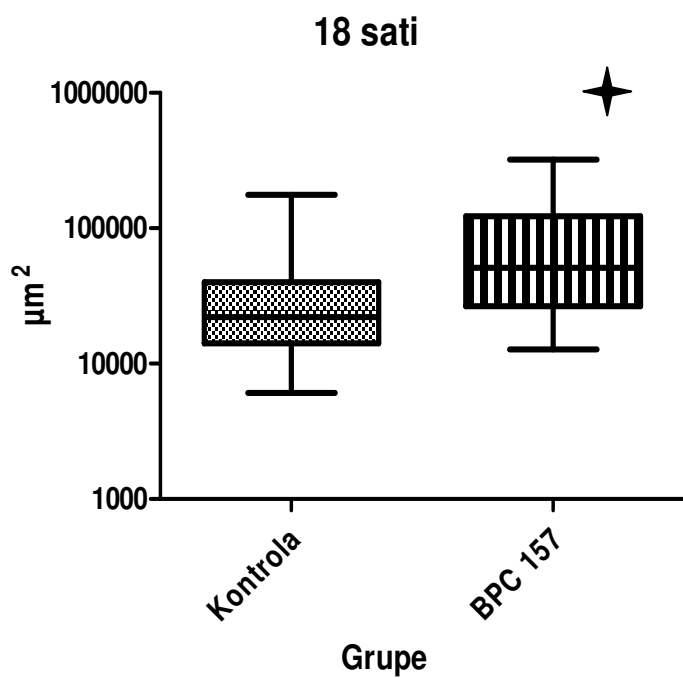
Graf 22 Površina zdravog tkiva nakon 12 sati ishemije



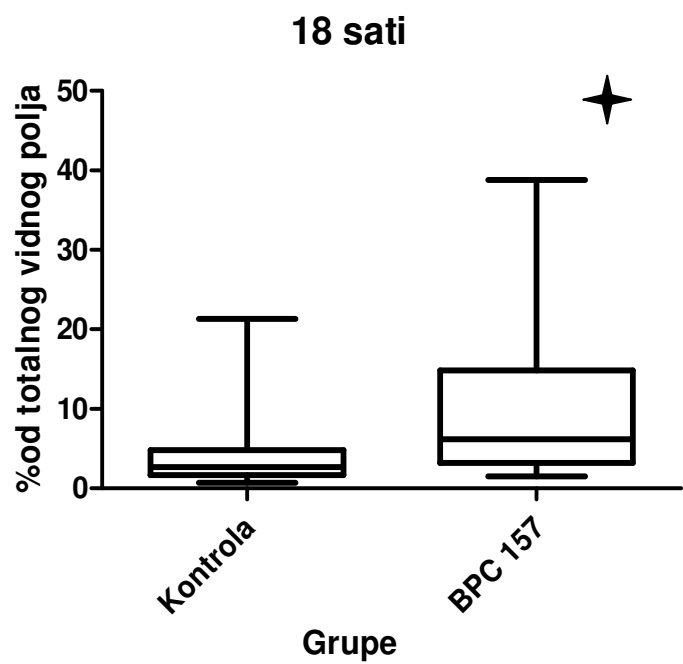
Graf 23 Postotak zdrave površine nakon 12 sati ishemije



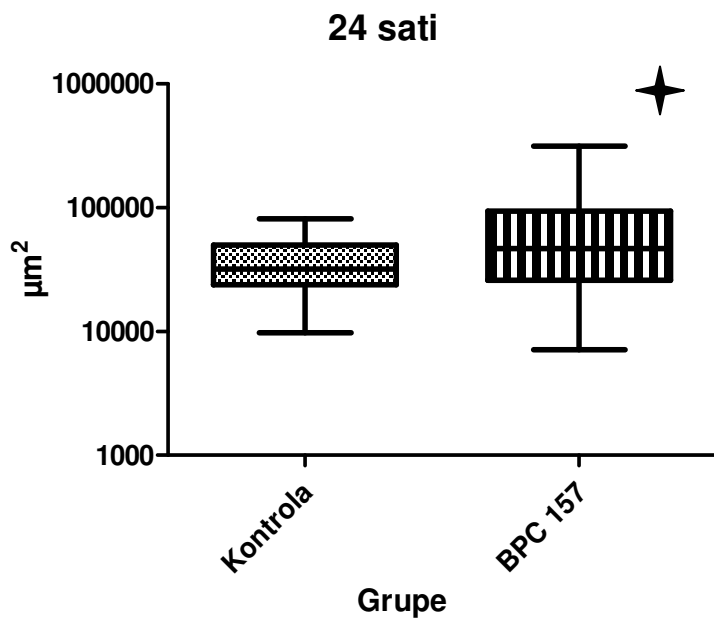
Graf 24 Površina zdravog tkiva nakon 18 sati ishemije



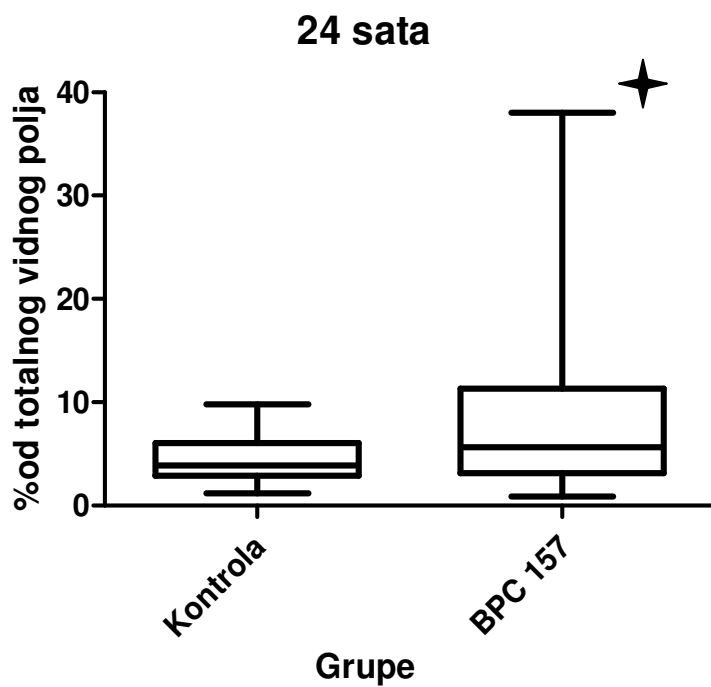
Graf 25 Postotak zdrave površine nakon 18 sati ishemije



Graf 26 Površina zdravog tkiva nakon 24 sati ishemije



Graf 27 Postotak zdrave površine nakon 24 sati ishemije



Ako se prate površine očuvanog tkiva u promatranim vremenskim odsječcima uočava se pad udjela zdravog tkiva po svakom promatranom odsječku vremena zasebno. Tako je udio zdravog tkiva u kontrolnoj skupini nakon 12 sati ishemije 5,25%, nakon 18 sati ishemije 4,67% i nakon 24 sata ishemije 3,96%. U skupinama pokusnih životinja, koje su tretirane s BPC 157 udjeli zdravog tkiva su nakon 12 sati 11,60%, nakon 18 sati 10,41% i nakon 24 sata 8,69%.

### 4.3. Fisher's exact test

Fisher's exact test korišten je za usporedbu broja životinja po grupama koje su razvile infarkt slezene i kod kojih infarkta nije bilo (tbl 3). Ukupno je u prvoj grupi pokusa p bio manji od 0,001\* što je statistički značajna razlika i ukazuje na djelotvornost BPC 157 u sprečavanju nastanka infarkta slezene štakora u ranoj fazi.

Kao što je bilo i za očekivati, u drugoj grupi pokusa s obzirom na vrijeme ishemije koje je bilo dugačko, sve su životinje razvile infarkt.

U ukupnom zbroju Fisher's exact test ukazuje na statistički značajan potencijal BPC 157 u sprečavanju nastanka infarkta slezene štakora induciranog ligaturom splenične arterije ( $p < 0,001$ \*). Ovo opažanje je prisutno bez obzira na dozu BPC 157 koja je upotrijebljena ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  ili  $\text{ng}/\text{kg}$ ), vrijeme apliciranja pentadekapeptida BPC 157 (pretretman ili posttretman) te ukupno vrijeme trajanja pokusa. Uvođenjem NO sistema u pokus (L-arginin kao NO donor i blokator NO sintetaze L-NAME kao njegov antagonist) nisu doprinijeli promjeni krajnjeg efekta ishemije na tkiva. U svim tim pokusima došlo je do razvoja infarkta u kontrolnih životinja, a u životinja tretiranih BPC 157 nisu nađeni znaci infarkta u promatranom vremenu.

Uspoređujući veličinu infarkta u kontrolnih životinja tretiranih L-argininom, L-NAME i istim preparatima zajedno s veličinom infarkta kontrolnih životinja koje nisu tretirane nikakvim preparatima uočava se značajno veći infarkt u kontrolnih životinja tretiranih agensima NO sistema (Si za kontrolu je 15,643 prema Si za agense NO sistema 147,356).

Tablica 3

## Fisher's exact test

<b>Pokus br.</b>	<b>Kontrola Pozitivni/ br. životinja</b>	<b>BPC 157 Pozitivni/ br. životinja</b>	<b>Fisher's exact test p-vrijednost</b>
1	5/5	1/5	p=0.476*
2	5/5	0/5	p<0.001*
3	5/5	0/5	p<0.001*
4	5/5	2/5	p=0.166
5	5/5	5/5	p=1.0
6	5/5	0/5	p<0.001*
7	5/5	0/5	p<0.001*
8	5/5	0/5	p<0.001*
9	5/5	0/5	p<0.001*
10	5/5	0/5	p<0.001*
11	5/5	0/5	p<0.001*
<b>Suma</b>	<b>55/55</b>	<b>8/55</b>	<b>p&lt;0.001*</b>

<b>Pokus br.</b>	<b>Kontrola Pozitivni/ br. životinja</b>	<b>BPC 157 Pozitivni/ br. životinja</b>	<b>Fisher's exact test p-vrijednost</b>
15	5/5	5/5	p=1.0
16	5/5	5/5	p=1.0
17	5/5	5/5	p=1.0
<b>Suma</b>	<b>15/15</b>	<b>15/15</b>	<b>p=1.0</b>

## UKUPNA SUMA SVIH POKUSA ZAJEDNO

SUMA	70/70	23/70	p<0.001*
------	-------	-------	----------

## 5.0. RASPRAVA

Koncept stresa i organoprotekcije središte je zanimanja mnogih znanstvenih istraživanja. Na tragu tradicionalne Selye-ve hipoteze o osovini hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda široko je prihvaćeno da je CRF ključni peptid u kreiranju odgovora na stres<sup>63</sup>. S druge strane postoji mnoštvo dokaza da prostaglandini (PGs), somatostatin i dopamin osiguravaju snažnu zaštitu mnogih organa<sup>64</sup>. Tek nedavno je prihvaćeno mišljenje da gotovo svi organi u tijelu mogu biti napadnuti stresnim faktorima i reagirati na stres. U svjetlu ovih fizioloških rješenja zaštita tjelesnih organa shvaćena je kao rezultat oba ova fiziološka mehanizma<sup>22</sup>.

Posvemašnje prisutstvo prostaglandina, somatostatina i dopamina u tijelu, u fiziološki značajnim količinama, osnažilo je hipotezu o njihovoj sveobuhvatnoj ulozi i mogućoj aplikaciji u stresu<sup>22,65,66</sup>. Želudac je, u Selyejevoj teoriji stresa prepoznat kao poseban, ali isključivo pasivni cilj, postao žarište interesa istraživača. Ovaj je interes zasnovan na dva uvjerljiva dokaza. Prvo: među svim protektivnim efektima spominjanim ranije, gastroprotekcija je bila prepoznata prva, i drugo: funkcija medijatora organoprotekcije čini se da je od krajnje važnosti posebno u gastrointestinalnom traktu<sup>22,67</sup>.

Mogućnost da je želudac, koji je pogođen stresom, sposoban inicirati protu-odgovor na stres nije donedavno bila razmatrana u teorijama stresa. Zahvaljujući zapažanjima predloženo je da je želudac, kao najosjetljiviji dio gastrointestinalnog trakta i najveći neuroendokrini organ u tijelu, od iznimne važnosti za pokretanje odgovora na stres protiv svih ubitačnih uzroka. Krajnji rezultat bio bi snažna zaštita svih organa od 'napada stresa'<sup>68</sup>. U skladu s ovom pretpostavkom, stres oponašajući odgovor najbolje je objašnjen terminom "organoprotekcija". Endogeni organoprotektori (npr. prostaglandini, somatostatin, dopamin) su predloženi kao posrednici<sup>67</sup>. Takvim endogenim tvarima, koje se odupiru stresu, dodijeljena je prikladna uloga u očuvanju homeostaze<sup>22</sup>.

Odmičući se od tradicionalnog pogleda na stres sugerirano je da je želudac esencijalan za tjelesne aktivnosti u stresu. Konfrontirajući želudac s općim stresom, koji vodi prema želučanom stresnom poremećaju, želudac je sam u mogućnosti inicirati, posredovati i organizirati povratni odgovor protiv svih štetnih noksi kao posebni organoprotektivni „stres oponašajući odgovor“<sup>68</sup>. Ovo endogeno odupiranje („stres oponašajući odgovor“) može biti pojačano prikladnom aplikacijom odgovarajućih organoprotektivnih tvari i poremećena homeostaza će biti uspostavljena. U drugu se ruku gastroprotekcija, ako je prihvaćamo na ovaj način, pojavljuje kao specifična i esencijalna početna točka u mogućnosti organizma da se nosi s tvarima koje uzrokuju stres<sup>68,22</sup>.

Hipoteza da ovaj stres oponašajući odgovor može biti organiziran iz želuca potkrepljena je svakodnevno rastućim brojem dokaza. Čini se da želudac ima centralnu poziciju i dobru povezanost s mnogo različitih organa dobro definiranom osovinom<sup>69,70</sup>. U usporedbi s ostalim organima želudac ima specifičnu inervaciju i posebno vezu s mozgom kao i najveću

reprezentacijsku površinu na moždanoj kori<sup>22,70</sup>. Zanimljivo je za napomenuti da je isti neuralni greben izvorno odgovoran za sekreciju moždanih i crijevnih stanica tzv. moždano-crijevnih peptida. Oni se pojavljuju vrlo rano tijekom evolucije, već u vrlo ranoj filogenezi. Izgleda da je koncentracija ovih peptida dosljedno viša u gastrointestinalnom traktu nego u mozgu<sup>71</sup>. Mogući funkcionalni značaj ovog nalaza još više je naglašen posebnim promjenama dopaminskog sistema u početku životno ugrožavajućih događanja tijekom stresa<sup>22</sup>.

U skladu s postavljenom hipotezom da je želudac inicijalna točka stres oponašajućeg odgovora, samo u želučanoj sluznici je u stresu nađen povećani broj dopaminskih receptora, dok je nasuprot tome u isto vrijeme broj receptora u područjima mozga za koje se smatralo da su važni za ovaj proces bio nepromijenjenim<sup>72</sup>. Želučanoj je sluznici nemoguće održavati anaerobni metabolizam, čak i kraći period. On zahtijeva konstantnu opskrbu glukozom i kisikom, što je, uz mozak, posve jedinstveno u organizmu<sup>73</sup>. Iako prividno tek dio mnogo kompleksnijeg odgovora ovi podaci zajedno osiguravaju uvid u mehanizme kako organizam prepoznaje životno ugrožavajuće uslove i inicira njima oponašajući odgovor<sup>68</sup>. Naime, radi specifičnih metaboličkih obrazaca i centralizacije krvotoka, koji na taj način zaobilazi želučanu sluznicu, za razliku od drugih organa, želučana je sluznica snažno aficirana u najranijoj fazi stresa. Ovaj bi događaj mogao biti okidač za inicijaciju „stres oponašajućeg odgovora“ (npr. porast broja dopaminskih receptora u želučanoj sluznici)<sup>22,68</sup>.

Koliko su prostaglandini, dopamin i somatostatin korisno upotrebljivi kao organoprotektni agensi ostaje da se istraži u daljnjim radovima i nije predmet ovog rada. Iako je dopamin široko primjenjiv u životno ugrožavajućim stanjima šoka i njegova superiornost prema drugim klasičnim preparatima dobro dokumentirana, njegov je „organoprotektivni kapacitet“ vrlo ograničen<sup>68</sup>. Posljedično, potraga za dodatnim posrednicima definiranog "stres oponašajućeg odgovora" u ovim se uvjetima činila potpuno opravdanom.<sup>22,68</sup>

Slijedeći ovu hipotezu uskoro je izoliran novi želučani peptid molekularne težine 40 000 nazvan BPC. Uočeno je da je 15 aminokiselinski odsječak (Gly, Glu, Pro, Pro, Pro, Gly, Lys, Pro, Ala, Asp, Asp, Ala, Gly, Leu, Val) ključan za aktivnost cijele molekule te je u potpunosti obrađen<sup>22,68</sup>. Nazvan je BPC 157. Zbog ogromnog raspona različitih organoprotektivnih efekata i njegovog izvora iz želuca, BPC je bio predložen kao presudan posrednik želučanog "stres oponašajućeg odgovora". Ovi efekti postignuti su u više vrsta životinjskih modela (štakori, pilići, zečevi, ...) koristeći vrlo niske doze (uglavnom mikrogrami i nanogrami /kg) nakon intraperitonealne primjene, peroralne ili intramukozne (lokalne) primjene. Efekt je bilo očit već nakon prve primjene. Izolirani pentadekapeptid BPC 157 je pokazao i dugotrajno djelovanje, a bio je vrlo učinkovit i u primijeni istovremeno s štetnim agensom ili u već uznapređovalim kroničnim patološkim uvjetima. Čini se da terapija BPC-om 157 ne dijeli bilo koje od do sada poznatih ograničenja za "konvencionalne organoprotektore". Nije uočena toksičnost, a na različite bazalne parametre bio je bez učinka. Ovi nalazi osigurali su prodor u teoriji stresa. BPC 157 se zahvaljujući ovim saznanjima, kao mogući endogeni slobodni radikal i posrednik organoprotekcije, predstavio kao koristan prototip nove klase organoprotektivnih lijekova.<sup>22,68</sup>



S obzirom na porijeklo BPC 157 prvo žarište interesa istraživanja su bili povoljni efekti novog pentadekapeptida na želučanu sluznicu<sup>74</sup>. Uzduž cijelog gastrointestinalnog trakta pored različitih ulcerogenih faktora kao što su stres, etanol (intragastrično), NSAID (nesteroidni protuupalni lijekovi), cistamin, DNFB (dinitrofluorobenzen), TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonička kiselina), jodacetamid, ezofagojejunalna anastomoza, kolokolična anastomoza itd., BPC157 je pokazao snažno suprotstavljanje induciranju lezija i u slučaju nastanka njihovom brzom cijeljenju<sup>27</sup>. Njegova je aktivnost bila uočena i u eksperimentima izvođenim u uvjetima posebnih izazova kao što su aplikacija neurotoksina capsaicina, blokada NO sintetaze<sup>30</sup>, inhibicija sinteze prostaglandina<sup>23,75</sup> i blok blokade dopaminskog i kateholaminskog sistema<sup>76</sup>. S obzirom da je svaki od ovih izazova proučavan odvojeno nameće se zaključak da BPC 157 konkurira sa svakim od njih na njihovom specifičnom planu. Sveukupno, ovo omogućava donošenje zaključka o raznovrsnosti poremećaja i važnosti sistema, koji se mogu zajednički odraziti na aktivnost BPC 157. U svjetlu ovoga pentadekapeptid BPC 157 može osigurati (ne)specifičan lijek koji djeluje neovisno o specifičnosti poremećaja na svaki sistem ponaosob. Teoretski, ovaj paralelni sistem može sam po sebi (ne)specifično djelomično zamijeniti dijelove drugih funkcija ili sistema; ili *vice versa* on može (ne)specifično unaprijediti svako stanje koje se inače pojavljuje kao posljedica dobro poznatih specifičnih regulatornih poremećaja npr. blokade prostanglandina<sup>64</sup> ili NO sintetaze<sup>77,78</sup>, iscrpljenosti somatosenzornih neurona s capsaicinom itd<sup>79,80</sup>. U kombinaciji s po život opasnim stanjima, kao što je teški akutni pankreatitis, koji može biti izazvan na razne načine, ali uvijek uključuje i izraženi stres, ovakav kompleks aktivnosti može biti važan i odgovoran za uočene korisne efekte (npr. slabljenje gastroduodenalnih lezija u štakora s akutnim pankreatitisom, zajedno s zaliječivanjem samog akutnog pankreatitis)<sup>23,27</sup>.

Predloženo međusobno djelovanje između štetne nokse i aktivnosti pentadekapeptida BPC 157<sup>74</sup> može biti ilustrirano efektom capsaicina<sup>23,79,80</sup>. Na primjer, uočen je oslabljeni odgovor na jednokratnu primjenu BPC 157 nakon administracije capsaicina; dok je također pokazana promjena smjera capsaicinskog efekta pentadekapeptidom BPC 157. Nađeno je da kontinuirana dnevna aplikacija BPC 157, kao nadomjestak, ponovno uspostavlja gastroprotektivni efekt BPC 157 u capsaicinom tretiranih štakora, ako je prethodno ovaj efekt bio ukinut<sup>23</sup>. Isto tako identični obrasci mogu biti uočeni i vezani uz NO sustav. S pozornošću na sintezu NO u preparatu tkiva *in vitro* (homogenat tkiva želučane sluznice štakora), efekt pentadekapeptida BPC 157, koji je davan u istoj dozi (100µM) kao i L-arginin (uobičajeno upotrebljavan kao NO donor) ne može biti inhibiran s N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metilesterom (L-NAME) (poznat kao vrlo snažan endotelni inhibitor NO-sintetaze) iako je davan u deset puta većim dozama od onih koje su potrebne za inhibiciju efekta L-arginina<sup>29</sup>. Na temelju ovoga se može zaključiti da pentadekapeptid BPC 157 sam po sebi izaziva odgovarajuću produkciju NO<sup>29</sup>. Čak što više jasno je pokazano da ,upotrebom originalnog Szabo-ovog protokola za endotelna etanolska oštećenja, BPC 157 štiti endotel i ima angiogeni efekt. Zajedno s efektom na NO sistem, zaštita endotela mogla bi biti odlučujući čimbenik za citoprotektivni i/ili organoprotektivni efekt BPC-a 157.<sup>27,81</sup>

Učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 može biti viđena kako u akutnim stanjima tako i u kroničnim. Svojom učinkovitošću BPC 157 može prevenirati razvoj lezija, ali i imati značajan

iscjeliteljni efekt u već etabliranih lezija, čak ako je primijenjen oralno, npr. primijenjen redovito u pitkoj vodi štakora s refluks ezofagitisom daje stalan pozitivan efekt<sup>26,27</sup>. Na taj način, održavanje integriteta želučane sluznice za, razmatrano u svijetlu ukupnih efekata čemu su pripojeni posebno porijeklo BPC-a 157 i njegova stabilnost u želučanom soku, sugeriraju da pentadekapeptid BPC 157, boraveći trajno u želučanom soku, može uvjerljivo zaštititi sluznicu od razvoja oštećenja<sup>22</sup>. I doista on ne samo da štiti endotel već ga brani i od uništavajućeg učinka etanola: oslabljuje želučane lezija *in vivo*, jednako kao što i *in vitro* sprečava uništenje stanica želučane sluznice, pokazujući direktan citoprotektivni efekt koji nije ovisan o kiseloj želučanoj sekreciji. Nema utjecaj na sekretornu aktivnost želučane sluznice, kao ni na motilitet gastrointestinalnog trakta<sup>22,23,24,26,27</sup>.

U ovoj fazi istraživanja bilo je potrebno primijetiti da bitna uloga BPC-a 157 u održavanju integriteta želučane sluznice nije bila u potpunosti dokazana. U prisutstvu različitih agensa mnogi su peptidi već bili predloženi kao nosioci i pokretači održavanja integriteta želučane sluznice<sup>67,79</sup>. S druge strane, činilo se da su efekti pentadekapeptida BPC 157 superiorni efektima drugih crijevnih peptida (npr. sekretin, glukagon, somatostatin, CCK i NPY) ili konvencionalnim preparatima (dopaminski preparati, antagonisti H<sub>2</sub> receptora) koji su upotrijebljeni kao referalni standardi. Nedavno su reanalizom Robertsove citoprotektivne i adaptivne citoprotektivne reakcije pruženi snažni dokazi da je pentadekapeptid BPC 157 uključen u obje ove reakcije<sup>82</sup>. Pri tom je posebna pažnja poklonjena aktivnosti spojeva za koje se tradicionalno mislilo da su citoprotektivni. Interesantno je navesti, da je osim BPC-a 157 samo još omeprazol bio uključen u obje ove reakcije dok su ostali agensi bili očigledno ograničeni samo na citoprotektivnu reakciju<sup>27</sup>. Konačno, u prilog ovoj funkciji BPC-a 157 govori i da, ovisno o dozi, on može reducirati LTB<sub>4</sub> u ljudskoj krvi stimuliranoj s A23187<sup>27</sup>. Uz to je dokazano da BPC 157 blokira i druge medijatore upale kao što su MPO i TXB<sub>2</sub> kako u životinjskom modelu tako i u upalno promijenjenoj ljudskoj sluznici. BPC 157 može djelovati lokalno bez obzira na poziciju upale u gastrointestinalnom traktu; osim već opisanog djelovanja na stanice želučane sluznice, upotrijebljen u području kolo-količne anastomoze, ubrzava njeno cijeljenje.<sup>27</sup>

Jasni i važni pozitivni učinci BPC-a 157 u gastrointestinalnom traktu te interakcija s više bitnih regulacijskih sistema (somatosenzornim neuronskim, endotelnim i NO sistemom) za koje je zajednički esencijalni značaj za organizam, osigurali su jasnu pozadinu za uočene korisne učinke na ostala oštećenja organa.<sup>27</sup>

No djelovanja BPC-a157 nisu ograničena samo na želudac i želučanu sluznicu. Radovi koji su slijedili ukazali su na čitavu paletu aktivnosti ovog pentadekapeptida, potvrdivši njegovu značajnu citoprotektivnu i terapijsku ulogu u gotovo cijelom organizmu.

Dokazi da protektivni efekti BPC 157 u pretretmanu mogu biti upotrebljivo prošireni prema njegovom terapijskom djelovanju (npr. djelotvornost u uvjetima dokazanog akutnog pankreatitisa) zaslužuju posebnu pažnju. U pankreasu su antisekretorna i citoprotektivna aktivnost jednako kao i djelovanje u smislu odstranjivanja slobodnih radikala obuhvaćeni u zaštitu od akutnog pankreatitisa<sup>83,84</sup>. Njihova slaba aktivnost u posebnim uvjetima razvijenog

akutnog pankreatitisa čini vjerojatnim postojanje dodatnih faktora u iscjeljivanju lezije akutnog pankreatitisa<sup>23,27</sup>.

Uočeni su statistički značajne razlike u morfologiji akutnog pankreatitisa između kontrolne grupe i grupe životinja tretiranih s BPC 157. U kontrolnoj je grupi, za razliku od grupe u kojoj je administriran BPC 157, uočena jača infiltracija granulocitima kao znak produženog ili povratnog oštećenja, značajan edem i nekroza te kasnije pojavljivanje mononuklearnih stanica, konstantno manje polimorfonuklearnih stanica i više mononuklearnih upalnih stanica<sup>23,27</sup>. Faktori koji upravljaju intenzitetom upalnog odgovora u akutnom pankreatitisu slabo su poznati pa se pretpostavka da bi to mogao biti BPC 157 čini razumnom to više što je njegov modulirajući učinak na upalne stanice kao što su polimorfonukleari, čija je supresija u pokusu jasno uočena, i mononukleari, čije je privlačenje u istom pokusu jasno prikazano, snažno dokazan. Nadalje ovo bi mogla biti posljedica ranije navedenog smanjenja  $LTB_4$  i  $TXB_2$  u serumu i upalnom tkivu jednako kao i sadržaja MPO u upalnom tkivu što će zahtijevati daljnja istraživanja. Upotrebom BPC 157 dokazano je poboljšanje akutnog pankreatitisa izazvanog ligiranjem glavnog žučovoda bez obzira da li je pentadekapeptid primjenjen peroralno ili parenteralno. Ovo je poboljšanje praćeno mjerenjem razine serumske amilaze, a učinci su evidentirani u profilaktičkom kao i u terapijskom režimu pokusa. Kao što je i za pretpostaviti s obzirom na porijeklo pentadekapeptida, isti pozitivni efekti zabilježeni su i na želučane i duodenalne lezije u sklopu akutnog pankreatitisa<sup>27</sup>.

S obzirom na rezultate pokusa, koji su konstantno pokazivali pozitivne učinke nakon administracije BPC 157, istraženi su efekti pentadekapeptida na razne hepatotoksične procedure (npr. ligiranje glavnog žučnog voda i jetrene arterije, ograničavanje stresa, primjena  $CCl_4$ )<sup>85</sup>. Razmatrajući različite faktore uključene u razvoj hepatalnih lezija (ishemija i kolestaza u ligiranju glavnog žučnog voda i hepatalne arterije, ekscesivno prekoračenje razine kortikosteroida u prolongiranom snažnom stresu, oštećenja koja rezultiraju aktivnošću slobodnih radikala nakon administracije  $CCl_4$ ) moguće je nagađati da pentadekapeptid BPC 157 možda ima široki raspon sukladnih hepatoprotektivnih učinaka<sup>27,85</sup>.

Zahvaljujući svom predloženom antiinflamatornom učinku, BPC 157 je bio učinkovit u modelima akutne/subakutne upale i upalne/neupalne boli (npr. u bolnim sindromima izazvanim terpentinom, octenom kiselinom, karageninom,  $MgSO_4$ , ...) <sup>27</sup>. Interesantno je za navesti da BPC 157 nije djelovao na snažnu žareću bol koju je bilo moguće kupirati morfinom i njemu sličnim spojevima<sup>86,87,88</sup>. Proučavajući somatosenzorne neurone u uvjetima kada je njihovo konačno oštećenje već bilo ostvareno i u proteinskoj depleciji, pentadekapeptid BPC 157 nije djelovao na alodiniju. S druge strane, ako je bio davan u redovitim dnevnim dozama nakon administracije capsaicina, bio je u stanju prevenirati razvoj capsaicinske alodinije na način da je sprečavao oštećenje somatosenzornih neurona i depleciju peptida (ovi nalazi uvjerljivo koreliraju s rezultatima uočenim u capsaicinskom pokusu s oštećenjima želučane sluznice). U odnosu na referalne standarde (npr. aspirin, indometacin), BPC 157 je bio učinkovit u značajno nižim dozama ( $\mu g/kg$  ili  $ng/kg$  prema  $mg/kg$ ). Uz to je također uočena i antipiretska aktivnost BPC 157 pa se prema tome može zaključiti da u svom djelovanju BPC 157 ima značajan antiinflamatorni kapacitet<sup>22,27</sup>.

S obzirom na mogućnost djelovanja BPC 157 na odgođenu hipersenzitivnost uočeni su također pozitivni učinci. Radi proučavanja ovog efekta razvijen je novi model upalnih bolesti debelog crijeva u miševa<sup>89</sup>. Osim efekta iritacije istraživane doze 2,4-dinitrofluorobenzen primijenjene u lumenu crijeva rezultirale su specifičnim T-limfocitno posredovanim oštećenjem sluznice tankog i debelog crijeva. Poput metilprednizolona, široko rasprostranjenog lijeka u liječenju ovakvih poremećaja, BPC 157, upotrijebljen u odgovarajućoj dozi, značajno reducira ulceracije, hemoragiju, edem i posebno infiltraciju mononuklearnim stanicama upalno promijenjenog crijeva<sup>89</sup>. Poput toga, u drugim modelima akutne i kronične upale kolona, aplikacija trinitrobenzensulfonične kiseline (TNBS) ili jodoacetamida u štakora, pokazana je znatna redukcija lezija u životinja tretiranih BPC 157. Kao što je već ranije navedeno i u ovim modelima dokazano je smanjenje LTB4 i TXB2 u serumu i u upalnom tkivu kao i povišenje vrijednosti MPO u upalnom tkivu.<sup>27,90</sup>

Poput pozitivnih efekata BPC 157 u akutnoj i subakutnoj upali<sup>75</sup> uočena je mogućnost pozitivnog djelovanja BPC 157 i u kroničnim upalnim modelima. U studijama stečenog artritisa (aplicirano je 0.2 ml Freundove otopine u rep štakora kroz 14 dana, 30 dana ili jednu godinu), BPC 157 (doze 10 µg/kg ili 10 ng/kg) bio je davan jednokratno (jedan sat prije ili poslije aplikacije Freundove otopine) ili jednom dnevno kroz 14 dana, 30 dana ili tijekom jedne godine. Nakon jednokratne primjene lezije su bile značajno manje razvijene, a u životinja dnevno tretiranih BPC 157 bile su čak još više oslabljene. U terapiji već formiranog stečenog artritisa, BPC 157 terapijski efekt je bio evidentan nakon dva tjedna po početku njegove aplikacije te ga je bilo moguće jasno pratiti i nakon jedne godine od početka apliciranja<sup>27</sup>.

Analogno tome, terapijski efekti BPC 157 u modelu stečenog artritisa štakora (npr. blaži sinovitis, artritis i periartritis, manja infiltracija mononuklearima, slabije izražen periostitis s formiranjem priostealne nove kosti, manje izražen otok šapica, manje čvorova i slabija ukočenost) također bi mogli biti interpretirani kao vjerojatna posljedica pozitivnih utjecaja na neke tipove odgođene hipersenzitivne reakcije<sup>27,75</sup>.

Formiranje granulacijskog tkiva, angiogeneza i sinteza kolagena, od esencijalne su važnosti u procesima cijeljena. Pri istraživanju učinaka BPC 157 u ovom području posebna je pažnja posvećena utjecaju BPC 157 na granulacijsko tkivo i formiranje kolagena, na angiogenezu te na razvoj vlačne snage tkiva<sup>25</sup> i to upotrebljavajući tri eksperimentalna modela štakora: 1. kožne incizijske rane, 2. kolon-kolon anastomoze i 3. model angiogeneze s implantacijom sintetske spužve. Uzorci su bili pregledavani histološki i to za kolagen, retikulin i krvne žile upotrebljavajući razvijene skorove i morfometriju. U svim je pokusima dokazana statistički značajna razlika između životinja tretiranih BPC 157 i životinja u kontrolnim skupinama te je na taj način promovirana ideja o značajnoj involviranosti BPC 157 u procese cijeljenja. Pokazalo se da ovi efekti cijeljenja mogu biti postignuti bez obzira na način primjene BPC 157 uključujući peroralnu i lokalnu primjenu, što čini BPC 157 upotrebljivim snažnim lijekom<sup>27</sup>. Osnajući ovu tvrdnju nedavno je dokazano da lokalna primjena BPC 157 osjetno

poboljšava cijeljenje oštećenja rožnice<sup>27</sup>. Čak što više, pokazalo se da uz svoje efekte na cijeljenje rana, ovaj pentadekapeptid pospješuje zarastanje fraktura u štakora zajedno s ranije navedenim efektom angiogeneze<sup>22</sup>. Ovaj učinak nije neočekivan kada se ima na umu da gastrektomija značajno povećava učestalost osteoporoze, metaboličkih poremećaja i rizika za nastanak prijeloma, pa se sama od sebe nameće ideja o postojanju želučanog peptida s osteogenom aktivnošću<sup>91,92</sup>. Na sreću, u svijetlu sugerirane značajne uloge želuca u održavanju koštane homeostaze te bazirano na mogućoj važnosti primijećenih učinaka pentadekapeptid BPC 157 je mogući ozbiljni kandidat za daljnja istraživanja. Također je važno napomenuti da BPC 157 može zaštititi gastrektomirane životinje te da stoga može biti promišljeno upotrijebljen u svrhu odstranjivanja posljedica gastrektomije<sup>27,93</sup>.

Utjecaji pentadekapeptida BPC 157 su ispitivani i na efekte srčane elektrofiziologije za vrijeme globalne hipoksije i oporavka funkcije nakon reoksigenacije na izoliranim srcima svinja<sup>94</sup>. Mjereni su: spontani HR, AV vrijeme, LVP, koronarni protok, tlak O<sub>2</sub> te incidencija i trajanje disritmija. Iako BPC 157 nije imao utjecaja na HR i LVP prije ili nakon perioda ishemije on je u usporedbi s kontrolom povećao potrošnju kisika za vrijeme reoksigenacije do 17%. K tome je signifikantno skratio trajanje fibrilacije sa 4.05 na 0.25 min po srcu i AV disocijaciju za 39% tijekom reperfuzije. Uz to je i produžio trajanje sinusnog ritma za vrijeme reperfuzije sa 7 na 18 min. Prema tome je jasno dokazano da BPC 157 smanjuje incidenciju i trajanje disritmija tijekom hipoksije i reoksigenacije srca uz napomenu da ovi protektivni efekti nisu utjecali na redukciju srčane funkcije<sup>27,94</sup>.

Uz ove efekta na srce i njegovu funkciju uočeno je da BPC 157 može imati određen učinak na poremećeni krvni tlak i to bez djelovanja na normalne bazalne vrijednosti. To je jasno pokazano u studijama s NO sistemom<sup>24</sup> gdje je upotrijebljen BPC 157 sam ili zajedno s L-argininom i L-NAME. Administracija L-NAME izazvala je promptni doseg maksimuma već nakon 10 min i stalni porast krvnog tlaka za vrijeme cijelog 90 minutnog trajanja eksperimenta. U slučaju kada je pentadekapeptid BPC 157 bio davan 15 minuta prije L-NAME, L-NAME-om izazvani porast krvnog tlaka je bio zamjetno slabiji. Ako je BPC 157 bio davan u posttretmanu, u trenucima maksimalnog porasta tlaka izazvanog L-NAME-om, bilo je moguće uočiti jasan pad krvnog tlaka. Upotrebom L-arginina 10 minuta nakon aplikacije L-NAME uočen je također jasan pad tlaka. Sam L-arginin uzrokuje umjereni pad tlaka, dok je pad tlaka izazvan upotrebom BPC 157 u pretretmanu znatan<sup>24,27</sup>.

Zahvaljujući blokadi NO sistema apliciranjem L-NAME<sup>60,61</sup>, ukazano je na mogućnost da je modulirajući efekt BPC 157 prisutan neovisno u NO sintetazi s obzirom da je ovo djelovanje bilo prisutno usprkos blokadi NO sintetaze s L-NAME-om. Alternativno, BPC 157 bi mogao biti poseban supstrat za NO sintetazu, vjerojatno potentniji od L-arginina i stoga sposoban modulirati aktivnost NO sistema i u trenucima izrazito snažne aktivnosti (kao nakon aplikacije samog L-arginina) ili inaktivnosti (npr. nakon administriranja same L-NAME). Kao što je bilo i za pretpostaviti, u želučanoj sluznici iz homogenata tkiva želuca štakora, došlo je do ograničenja NO sinteze kada su upotrijebljeni kombinirani BPC 157 i L-arginin. Pentadekapeptid BPC 157 sam za sebe inducira stvaranje NO koje je komparabilno sa efektom L-arginina na produkciju NO. S obzirom na važnost NO supstrata, što može biti pretpostavljeno inhibicijom ili ne inhibicijom s L-NAME, NO otpuštanje izazvano BPC-om

157, koji je davan u istoj dozi (100  $\mu\text{M}$ ) kao i L-arginin, nje bilo moguće spriječiti s L-NAME, koji je poznati snažni endotelni inhibitor NO sintetaze. Ovo se događalo i kada je L-NAME bila davana u koncentracijama koja je bila 10 puta veća (100  $\mu\text{M}$  i 1000  $\mu\text{M}$ ) od onih potrebnih za blokadu efekta L-arginina. Za napomenuti je da je isti efekt bilo moguće vidjeti i u pokusu integriteta želučane sluznice<sup>24,27,95</sup>.

I na kraju, kada je riječ o BPC 157, uz sve ostalo, treba spomenuti njegovu interakciju s dopaminskim i/ili kateholaminskom sustavom posebno u centralnom živčanom sustavu<sup>76</sup>. Iako studije, dizajnirane da pokažu vezu između BPC 157 i dopaminskih receptora, dugo nisu uspjele potkrijepiti njeno postojanje te usprkos ne postojanju utejcaja na ukupno ponašanje normalnih životinja, dokazano je da BPC 157 može blokirati stereotipe izazvane agonistom dopamina amfetaminom<sup>96</sup>. Što više, on može prevenirati pojavu amfetaminskih stereotipa, ali i djelovati reverzibilno na stereotipe, koji su već etablirani<sup>96</sup>. Njegova blokirajuća funkcija također pojačava efekt amfetamina nakon aplikacija antagonista dopamina haloperidola. Zajedno s ovim, pokazano je da pentadekapeptid BPC 157 može poboljšati poremećaje motorike izazvane neurotoksinom MPTP, Parkinsogenim neurotoksinom, djelujući na nigrostriatni dopamin ili reserpin koji je depletor intraneuronskih dopaminskih granula<sup>27,97,98</sup>.

Jedan od predloženih mehanizama djelovanja BPC 157 za koji postoje snažni dokazi, a s kojim smo se susreli i u ovom pokusu, je preko NO sistema<sup>24,26,27,29,30,32,95</sup>.

Godine 1987. dokazivanje formiranja NO specifičnim enzimom u vaskularnim endotelnim stanicama otvorio je potpuno novu stranicu u biološkim i biokemijskim istraživanjima. NO, koji je objašnjavao biološka svojstva EDRF-a (endothelium-derived relaxing factor) je endogeni stimulator otopljene guanilat ciklaze i k tome djelatna molekula oslobođena od makrofaga miševa i drugih stanica nakon imunološke aktivacije<sup>61</sup>.

NO se sintetizira iz aminokiselina L-arginin uz sudjelovanje enzima NO sintetaze. Postoje dva tipa NO sintetaze. Prvi tip je konstitutivan i oslobađa se u kratkom vremenu kao odgovor na podražaj receptora ili fizikalne stimulacije<sup>61</sup>. NO oslobođen ovim enzimom služi kao transdukcijski mehanizam zasnovan na nekoliko fizioloških odgovora. Drugi tip enzima djeluje nakon aktivacije makrofaga, endotelnih stanica i brojnih drugih stanica preko citokina<sup>61</sup>. Jednom izlučen on dugoročno sintetizira NO, a njegova je indukcija inhibirana s glukokortikoidima. Za sada jedina jasno dokazana uloga ovog NO je citotoksičnost u napadu na mikroorganizme i tumorske stanice. No uz ovo postoje snažni dokazi da enzimsko oslobađanje NO ima i druge biološke posljedice uključujući i patološku vazodilataciju te oštećenje tkiva<sup>61</sup>.

Godine 1980. demonstrirana je vaskularna relaksacija inducirana s acetilholinom, koja je bila ovisna o prisutnosti endotela i posredovana labilnim humoralnim faktorom, kasnije nazvanim ERDF (endothelium-derived relaxing factor)<sup>99</sup>. Ova o endotelu ovisna relaksacija kasnije je dokazana u mnogim vaskularnim pokusima i to na svim vrstama žila, a događala se kao odgovor na podražaj različitih supstanci kao što su acetilholin, adenin nukleotid, trombin, supstanca P, bradikinin,... Također je uočeno da i drugi stimulansi kao hipoksia, električna

stimulacija, porast protoka kroz krvne žile, ... uzrokuju o endotelu ovisnu relaksaciju vaskularnog tkiva *in vitro*<sup>100,101,102</sup>.

Humoralna priroda ERDF-a je bila otkrivena upotrebom niza farmakoloških primjena u kojima se biološka aktivnost supstance u biopokusu prenosila s donora na detektora<sup>103</sup>. Na taj je način prikazano da je ERDF vrlo kratko živuća supstanca s poluvremenom raspadanja u oksigeniranoj slanoj fiziološkoj otopini od samo sekunde<sup>102,103</sup>. Dokazano je oslobađanje ERDF-a ne samo nakon stimulacije, npr. acetilholinom, već i u bazalnim uvjetima<sup>104</sup>. Uočeno je da su efekti ERDF-a inhibirani hemoglobinom, metilenskim plavilom, hidrokininom, ... , a posredovani stimulacijom otopljene gvanilat-ciklaze s posljedičnim porastom razine intracelularnog cikličkog GMP<sup>105</sup>. Nađeno je također da superoksidni anioni ( $O_2^-$ ) doprinose nestabilnosti ERDF-a, s obzirom da je efekt ERDF-a produžen s SOD-om (SOD: superoksid dismutaza), a inhibiran s  $Fe^{2+}$  i hiperoksijom<sup>77</sup>. Kasnije je zasječno da većina otopina koje su opisane kao inhibitori ERDF-a djeluju generiranjem  $O_2^-$  kao rezultatom njihovog redoks potencijala<sup>77</sup>.

ERDF se u pokusima također pokazao kao inhibitor agregacije trombocita<sup>106</sup>, disagregator agregiranih trombocita te da sinergistički djeluje s prostaciklinom u obje ove reakcije<sup>77,107</sup>. Također on inhibira adherenciju trombocita na endotel, ekstracelularni matriks i fibrinske niti<sup>77,108,109</sup>.

Nakon ovih pronalazaka počelo se postavljati pitanje prirode ERDF-a. Postojalo je mnoštvo teorija o porijeklu i prirodi same aktivne tvari. Prvi dokaz da je stvaranje NO iz stanica endotela sisavaca prava priroda ERDF-a došao je iz pokusa u kojemu su u identifikaciji NO upotrijebljena kemijska sredstva. Naime, NO je moguće direktno mjeriti kao hemiluminiscentan produkt njegove reakcija s ozonom<sup>110</sup>. Otpuštanje NO iz vaskularnih endotelnih stanica drugih životinjskih vrsta i u brojnim vaskularnim pokusima, u količinama suficijentnim za njegovu biološku aktivnost, također je bilo dokazano<sup>111</sup>. Svi dokazi, do kojih se došlo u brojnim pokusima, snažno su podupirali prijedlog da je ERDF po svojoj kemijskoj prirodi NO.

Usprkos nagomilanim dokazima da je ERDF kemijski NO nekoliko pravaca istraživanja sumnjalo je u taj zaključak. Ove sumnje su izazvale opservacije o različitom poluvremenu raspadanja ERDF-a, različitoj povezanosti ERDF-a i NO na stupcu anionskog izmjenjivača, različitoj aktivnosti u pokusima s glatkom muskulaturom, stabilizaciji ERDF-a i slaboj korelaciji između biološke aktivnosti i sadržaja NO detektibilnog kemijskim metodama<sup>61</sup>. U istraživanjima koja su slijedila priroda ERDF-a u vidu NO bila je dokazana na više nivoa, a samim tim i njegova sinteza i fiziološke uloga<sup>61</sup>.

Rani su radovi vrlo brzo prekrížili mogućnost da su  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_3$  i hidroksilamin izvor NO<sup>77</sup>. Dokazno je da je aminokiselina L-arginin prekursor za sintezu NO u endotelnim vaskularnim stanicama. Kultura endotelnih stanica bez prisutnosti L-arginina kroz 24 sata prije pokusa jasno je izražavala pad u količini sintetiziranog ERDF-a čija je sinteza bila inducirana bradikininom i A23187. Sintezu je bilo moguće obnoviti dodavanjem L-arginina, ali

ne i D-arginina<sup>112</sup>. Ovo povećanje produkcije bilo je moguća samo uz infuziju L-arginina što je sugeriralo da je formiranje NO ovisno samo o slobodnom L-argininu<sup>61,112</sup>.

Navedeni su pokusi osigurali dokaze samo na temelju indicija da je L-arginin prekursor sinteze NO. Definitivni su dokazi dobiveni u pokusima koji su upotrebljavali mass spektrometriju i [<sup>15</sup>N]L-arginin. U tim je pokusima pokazano formiranje <sup>15</sup>NO iz terminalnog atoma dušika L-arginina kad je bio podražen s bradikininom<sup>112</sup>. Konverzija L-arginina u NO je specifična s obzirom da njegovi brojni analozi, uključujući i D-arginin nisu bili u stanju sintetizirati NO<sup>77,112</sup>.

Daljnijim je pokusima pokazano postojanje spojeva koji inhibiraju djelovanje NO sintetaze potrebne za produkciju NO iz L-arginina<sup>113</sup>. U pokusima *in vitro* L-NMMA se pokazala kao kompetitivni inhibitor<sup>114</sup>, a njezin učinak na druge enzime koji metaboliziraju L-arginin nije bio uočen<sup>115</sup>. L-NMMA inhibira oslobađanje NO i iz endotelnih stanica<sup>113</sup> i iz vaskularnog tkiva<sup>116</sup>. Ovaj se spoj pokazao kao upotrebljiv alat za istraživanje biološkog značaja L-arginina odnosno njegovih putova djelovanja u kardiovaskularnom sustavu<sup>77</sup>.

L-NMMA izaziva o endotelu ovisnu konstrikciju aortnog prstena u zečeva ukazujući na kontinuirano otpuštanje NO, koji u ovom tkivu održava opuštajući tonus<sup>113</sup>. Na ovaj je način bilo moguće ukloniti bazalno održavanje tonusa u svih proučavanih životinjskih vrsta. No L-NMMA nije djelovala samo na relaksaciju izazvanu L-argininom već i na opuštanje tonusa izazvano acetilholinom, A23187 i supstance P<sup>113,117</sup>. Sve ove efekte je bilo moguće vratiti u prvotno stanje dodavanjem L-arginina. U daljnjem je tijeku pokusa pokazano da L-NMMA, u perfundiranoj aorti zeca, inhibira s acetilholinom NO induciranu relaksaciju, što je u potpunosti specifičan proces i reverzibilan s L-argininom, ali ne i s D-argininom<sup>117</sup>. L-NMMA inhibicija o endotelu ovisne relaksacije pulmonalne arterije hrčaka, koja je bila izazvana histaminom i acetilholinom, također je bila reverzibilna s L-argininom<sup>118</sup>. Zahvaljujući ovim saznanjima L-NMMA se počela upotrebljavati za istraživanje uloge L-arginina i, kao što je ranije navedeno, njegovih putova djelovanja *in vitro* ne samo na aortama zečeva već i na aortama štakora, moždanim arterijama pasa<sup>61</sup> pa i arterijama i venama humane populacije<sup>77</sup>.

Porast tlaka induciran s L-NMMA praćen je sa sniženjem protoka krvi kroz bubrege, mezenterij, karotide i vaskularnu ložu zadnjeg dijela tijela štakora, koji su bili podvrgnuti kroničnom tretmanu<sup>119</sup>. Ovi su efekti bili stalni ako je davanje infuzije L-NMMA bilo produženo na 6 sati što ukazuje ne samo na odlučujuću ulogu NO u održavanju opuštenog tonusa i dilatacije u svim promatranima vaskularnim ložama već i na činjenicu da su regulatorni mehanizmi u žilama bili u nemogućnosti reaktivirati krvni protok prema nivou prije administracije L-NMMA<sup>77</sup>. U budnih kronično instrumentiranih pasa, L-NMMA inducira o dozi ovisnu, a L-argininom reverzibilnu, konstrikciju koronarne cirkulacije i redukciju protoka krvi kroz koronarne arterije u fazi odmora srca<sup>120</sup>. Također je uočeno da je koronarna dilatacija, koja slijedi vagalnu stimulaciju, najvjerojatnije isto tako ovisna o NO<sup>121</sup>.

Pokazano je da vazodilatacija inducirana s acetilholinom ili bradikininom, ali ne ona izazvana s GTN, može u studijama, u kojima je L-NMMA davan infuzijski u ljudske brahijalne arterije ili dorzalne vene šake, biti oslabljena<sup>122,123</sup>. Nadalje, dok u brahijalnoj arteriji L-NMMA



inducira direktnu vazokonstrikciju, na vene šake on nema takav direktni efekt. To ukazuje na činjenicu da se na arterijskoj strani cirkulacije odvija stalno oslobađanje NO, čega na venskoj strani cirkulacije nema. Da arterijska strana cirkulacije oslobađa veće količine NO od venske strane sugerirano je činjenicom da se acetilholinom inducirana dilatacija u venama s povećanjem doze brzo transformirala u konstrikciju<sup>77,123</sup>.

Mnogi su drugi analozi L-arginina opisani kao inhibitori generiranja NO u žilnom tkivu. Tako je L-NA (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin) inhibitor NO sintetaze, koji *in vitro* ima iste efekte na žilno tkivo kao i oni efekti koji su opisani za L-NMMA<sup>124</sup>. L-NIO (N-iminoetil-L-oritin), L-NA i njegov metil ester L-NAME izazivaju u potpunosti iste specifične učinke na žilno tkivo, koji su opisani za L-NMMA<sup>125</sup>. Oni inhibiraju endotelnu NO sintetazu, a njihova različita snaga djelovanja može biti posljedica različitog unosa, distribucije ili metabolizma spojeva. Dvoje od ovih spojeva, L-NMMA i L-NAME su aktivni i u peroralnoj primjeni s obzirom da induciraju porast krvnog tlaka kada su dati peroralnim putem Brattleboro štakorima (genetski vasopresin deficijentni štakori)<sup>126</sup>.

Mnoge su fiziološke posljedice postojanja NO posredovane vazodilatacije. Važeći koncept mehanike smatra žilno stablo ili kao sistemom žila koje pružaju otpor srčanom pumpanju krvi ili rezistentnim sistemom žila čija je aktivnost posredovana djelovanjem neuralnih ili humoralnih vasokonstriktornih i vasodilatatornih utjecaja<sup>61</sup>.

Fiziološki stimuli koji generiranja NO nisu u potpunosti istraženi, no čini se da su dvije najznačajnije odrednice pulsirajući valovi krvnog protoka i smični stres krvnih žila<sup>127</sup>. O endotelu ovisna i krvnim protokom inducirana vazodilatacija opisana je u provodnim arterijama *in vitro* i *in vivo*<sup>128,129</sup>. Kronično povećanje krvnog protoka uzrokovano arteriovenskom fistulom stražnjih udova u psa pokazalo je pojačanu o endotelu ovisnu relaksaciju nakon administriranja acetilholina<sup>129</sup>. Istraživači su također izvijestili da je u rezistentnim intaktnim arterijama zečjih ušiju o endotelu ovisna vazodilatacija kao odgovor na stimulaciju acetilholinom bila povećana u povišenom protoku. Ova su istraživanja naknadno pokazala da je aktivnost endogenog NO veća u velikim arterijama, u kojima su hidraulički tlak i smični stres jači<sup>77</sup>.

Dilatacija izazvana krvnim protokom u epikardijalnim arterijama pasa nakon reaktivne hiperemije je bila značajno ublažena nakon ogoljivanja žila od endotela<sup>130</sup>. U kulturi endotelnih stanica NO se oslobađao u upravnoj ovisnosti o razini protoka<sup>131</sup>. Iako bradikininom izazvano oslobađanje NO iz perfundiranog srca hrčaka povećava i unapređuje krvni protok, to nema utjecaja na promjene u tlaku perfuzije<sup>131</sup>. O protoku ovisna dilatacija pokazana je i u ljudskoj populaciji<sup>132</sup>. Uloga ostalih faktora kao što je simpatička i parasimpatička inervacija u fiziološkom generiranju NO ili mogućnost da neke endotelne stanice oslobađaju vazoaktivne supstance, koje tijekom svog djelovanja izazivaju oslobađanje NO, nije do sada još rasvijetljena<sup>133,134,135</sup>.

Stoga se čini da je na današnjem nivou znanja o NO ovisna vazodilatacija u potpunosti lokalno regulirana, kao i da je jedan od najjednostavnijih i najvažnijih adaptivnih mehanizama u kardiovaskularnom sistemu<sup>77</sup>.

U farmakološkom smislu, dostupni dokazi ukazuju da je kardiovaskularni sustav u stalnom stanju aktivne vazodilatacije ovisne o generiranju NO. Stoga NO sada može biti smatran endogenim nitrovasodilatatorom<sup>136</sup>.

Nitrovazodilatacija je u kliničkoj upotrebi već više od 100 godina i još uvijek je u širokoj upotrebi u stanjima kao što su angina pectoris, kongestivne srčane greške, hipertenzivne krize, plućna hipertenzija, fibrinoliza, perkutana koronarna angioplastika i komplikacije nakon kateterizacije srca<sup>137</sup>. No malo je bilo poznato u načinima djelovanja ove vrste spojeva. Slijedila su istraživanja koja su pokazala da svi nitrovazodilatatori i NO aktiviraju otoplenu gvanilat ciklazu. Stoga je danas široko rasprostranjeno mišljenje da aktivacijom gvanilat ciklaze nitrovasodilatatorima dolazi do posljedičnog porasta cikličkog GMP-a što inducira niz fosforilacija proteina rezultirajući relaksacijom glatke muskulature<sup>138,139,140,141</sup>.

Točan način kako nitrovazodilatatori aktiviranu otoplenu gvanilat ciklazu bio je predmet mnogih rasprava. Bilo je predloženo da su slobodni radikali, uključujući NO, stvarni aktivatori otopljene gvanilat ciklaze<sup>139</sup>. Alternativno je bila iznesena hipoteza da  $\text{NO}_2^-$  oslobođen metabolizmom nitrovazodilatatora reagira s tiolnom grupom tvoreći S-nitrosotiol, koji u daljnjem tijeku aktivira otoplenu gvanilat ciklazu<sup>142</sup>. Nadalje je dokazano da vazodilatatori također generiraju NO u neenzimskoj reakciji s cisteinom<sup>143</sup> i da je stimulacija otopljene gvanilat ciklaze sa ovim spojem ovisna o generiranju NO<sup>143,144</sup>. U ovoj reakciji koncentracija nitrovazodilatatora koja inducira polumaksimalnu stimulaciju gvanilat ciklaze izaziva jednako otpuštanje NO<sup>143</sup>.

Neki vazodilatatori, kao na primjer SNP (natrijev nitroprusid), otpuštaju NO spontano, drugi, kao organski nitrati, zahtijevaju prije otpuštanja NO interakciju s tiolom te otpuštaju NO kao posljedicu bazalno katalizirane hidrolize<sup>77</sup>. Ovi podaci, promišljeni zajedno, snažno podupiru tvrdnju da je NO krajnja zajednička aktivna molekula svih nitrovazodilatatora, koji aktiviraju otoplenu gvanilat ciklazu<sup>77</sup>.

Postojanje o NO ovisnog vazodilatativnog tonusa vodi također do pojave odstranjivanja ovog tonusa posljedičnim povećanjem broja receptora za NO, što rezultira povećanjem osjetljivosti na stimulare otopljene gvanilat ciklaze, odnosno vazodilatatore, a događa se stimuliranjem ovog enzima<sup>145</sup>. Povećana je osjetljivost na ove vazodilatatore, što je bilo pokazano *in vitro* odstranjenjem endotela<sup>146</sup> ili nakon tretmana nespecifičnim<sup>147</sup> ili specifičnim<sup>148,149</sup> inhibitorima sinteze NO, bila pripisana nekolicini različitih mehanizama. Danas je poznato da je ovo povećanje osjetljivosti na nitrovazodilatatore, prisutno i *in vivo* i da je *in vitro* praćeno povećanim stvaranjem cikličkog GMP, kao odgovora na vazodilatatore<sup>145</sup>.

Odstranjenje bazalnog NO tonusa u kardiovaskularnom sistemu dovodi do fenomena srodnog denervacijskoj supersenzitivnosti, u kojoj mehanička ili kemijska prevencija oslobađanja neurotransmitera vodi povećanju osjetljivosti na djelovanje tih neurotransmitera upotrjebljenih egzogeno<sup>150</sup>. U ovom slučaju posljedica je uspostavljena, ako se nakon nekoliko dana tretmana s inhibitorima NO sinteze razvije više kronični tip supersenzitivnosti, kao učinak *de novo* sintentizirane otopljene gvanilat ciklaze. Ako se to dogodi, tada supersenzitivnost na egzogeni NO treba sličiti denervacijskoj supersenzitivnosti s akutnim i kroničnim karakteristikama<sup>77</sup>.

U tom se kontekstu čini interesantnim da je u venskom tkivu<sup>151</sup> i venskoj cirkulaciji ljudske populacije *in vivo*<sup>123</sup> bazalno otpuštanje NO manje i da je osjetljivost na nitrovazodilatatore u usporedbi s arterijskom stranom cirkulacije veća. Moguće je da je ova povećana osjetljivost vena na nitrovazodilatatore rezultat ili otopljene gvanilat ciklaze koja je senzitivnija na stimulaciju egzogenim NO ili da venski glatki mišići sadrže veću količinu gvanilat ciklaze<sup>61</sup>.

Koncept promijenjene vaskularne reaktivnosti, koja je posljedica promjena u bazalnom NO tonusu može također objasniti neke aspekte tolerancije na nitrovazodilatatore, što je uočeno tijekom zadnjeg stoljeća od kad su ovi spojevi u redovitoj kliničkoj upotrebi<sup>77</sup>. Iako je tolerancija na GTN (gliceril trinitrat) posljedica djelomičnog oštećenja njegovog metabolizma prema NO<sup>142</sup>, češći obrazac ove tolerancije je posljedica gubitka osjetljivosti otopljene gvanilat ciklaze na djelovanje NO<sup>152</sup>. I doista, ova tolerancija je suprotnost supersenzitivnosti i stoga slična postsinaptičkoj subsenzitivnosti, koja prati porast razine neurotransmitera<sup>153</sup>. Kao rezultat ovoga moguće je da dugotrajni tretman s nitrovazodilatatorima deregulira otopljenu gvanilat ciklazu ili čak i sintezu NO, što je i dokazano u pokusu kroničnog tretmana zečeva s molsidominom rezultirajući sniženjem otpuštanja NO iz grudne aorte na podražaj acetilholinom<sup>77</sup>.

Endogeni NO ovisni opuštajući tonus i koncept promijenjene vaskularne osjetljivosti na nitrovazodilatatore nakon odstranjenja NO mogu također biti signifikantni za neka patofiziološka zapažanja. Zbog fenomena supersenzitivnosti, patološka stanja u kojima je smanjena sinteza ili otpuštanje NO mogu biti ujedinjeni sa pojačanom sposobnosti za udovoljavanje zahtjevima nitrovazodilatatora, osim ako nije pridružen i defekt u mehanizmu efektoru, koji nije povezan s otopinom gvanilat ciklaze<sup>77</sup>.

Moguće je da je gubitak NO posredovanog vazodilatatornog tonusa u konačnici bitan čimbenik u esencijalnoj hipertenziji ili u vazospastičnom fenomenu kao što su ih ranije prepoznali neki vazokonstriktorni faktori. U tom kontekstu, dijetna nadopuna s kalcijem je pokazala pad krvnog tlaka u životinja, ali i u ljudskoj populaciji s hipertenzijom<sup>154</sup> kao i kod žena s hipertenzijom koja se pojavila u trudnoći<sup>155</sup>. U okvirima fizioloških granica, bazalno i stimulirano otpuštanje NO iz perfundiranog segmenta aorte zeca je osjetljivo na promjene koncentracije Ca<sup>2+</sup><sup>156</sup>. Iz ovoga dakle proizlazi, da bi na stjeci žila mogla postojati paradoksalna situacija kojom bi Ca<sup>2+</sup> ovisno otpuštanje NO iz stanica endotela moglo biti antagonizirano s Ca<sup>2+</sup>, nadmećući se na nivou glatke muskulature za postizanje kontrakcije<sup>77</sup>.

U bolesnika s esencijalnom hipertenzijom vazodilatatorni odgovor na infuziju acetilholinom u brahijalnoj arteriji je bio reduciran, dok je odgovor na SNP (natrijev nitroprusid) bio u istih pacijenata nepromijenjen ili pojačan<sup>157</sup>. Pogoršana o endotelu ovisna relaksacija također je bila uočena na krvnim žilama genetski uvjetovanih dijabetičnih štakora<sup>158</sup> i u nekim<sup>159</sup>, ali ne svim, radovima u kojima su se koristile krvne žile štakora s medikamentozno induciranim dijabetesom<sup>160</sup>. U animalnim modelima hipertenzije, nekoliko je grupa istraživača uočilo redukciju o endotelu ovisnog vaskularnog odgovora<sup>161,162</sup>, koji je u nekim slučajevima bio praćen sniženom razinom cikličkog GMP<sup>162</sup>. Interesantno je navesti da su se obje ove vrijednosti vratile na normalu nakon što su se na normalu vratile i vrijednosti krvnog tlaka<sup>162</sup>. Uočena je statistički značajna korelacija između smanjenja o endotelu ovisne relaksacije i

visine i trajanja hipertenzije na različito visokim vrijednostima spontano hipertoničnih štakora<sup>163</sup>. Drugi su istraživači izvijestili o nepostojanju promjena<sup>164</sup> ili o porastu o endotelu ovisne relaksacije na arterijama hipertenzivnih životinja<sup>165</sup>. Svi ovi eksperimenti nisu u potpunosti kompatibilni zbog upotrebe različitih vaskularnih prepariranja i različitih životinjskih vrsta, koje su bile stimulirane različitim agonistima. Stoga se na području hipertenzije iskazuje potreba za sistematičnom studijom, koja će poručiti efekte o endotelu ovisne relaksacije.

Redukcija u otpuštanju ERDF iz endotela krvnih žila ili smanjenje o endotelu ovisne relaksacije prikazana je na žilnom tkivu zečeva u kojih je izazvana ateroskleroza<sup>166,167</sup> i u aterosklerotski promijenjenim koronarnim krvnim žilama ljudske populacije<sup>168</sup>. Uništenje endotela izazvalo je porast bazalnog tonusa i pojačan odgovor na vazokonstriktorne supstance<sup>169</sup>. Odgovor koronarne cirkulacije na acetilholin u ljudskoj je populaciji bio smanjen u pacijenata s bolešću koronarnih arterija<sup>170</sup>, a arterije dobivene iz srca takvih pacijenata su pokazivale reducirano bazalno i stimulirano oslobađanje NO<sup>171</sup>.

Ovaj je proces moguće objasniti na dva načina. Oksidacijom dobiveni radikali i lipidna peroksidaza uključeni su u razvoj ateroskleroze te se akumuliraju u monocitima, koji stoga mogu generirati i otpuštati  $O_2^-$ . Druga je mogućnost da oksidirani low-density lipoproteini (poznati faktor rizika za razvoj aterosklerotske koronarne bolesti) doprinose disfunkciji endotela u aterosklerotičnim arterijama s obzirom da je dokazano da inhibiraju o endotelu ovisnu relaksaciju<sup>172</sup>.

Inhibicija NO s hemoglobinom sljedeći je faktor koji može imati ulogu u razvoju vazospazma koji slijedi subarahnoidalnu hemoragiju, za koju se već dugo sumnja da je posredovana nekim produktima raspada eritrocita<sup>77</sup>. Suvremene studije basilarne arterija pasa *in vitro* pokazale su da je o endotelu ovisna relaksacija inducirana s A23187 inhibirana s hemoglobinom i sa cerebrospinalnim likvorom dobivenim od bolesnika s subarahnoidalnom hemoragijom<sup>173</sup>. Injekcija hemoglobina u moždane komore svinja izazvala je o koncentraciji ovisnu vazokonstrikciju u intratekalnim arterijama<sup>174</sup>. S obzirom da je NO i inhibitor aktivacije trombocita, oštećenje njihove aktivacije u stjenci krvne žile neće samo povećati sklonost vazokonstrikciji već također i sklonost adheziji, agregaciji i posljedično tome otpuštanje vazokonstiktornih tvari što će pogoršati tendenciju k vazospazmu. U tom kontekstu, produkti aktivnosti trombocita koji se otpuštaju za vrijeme agregacije *in vitro* kontrahirati će koronarnu arteriju psa kojoj je uništen endotel, dok će u prisutnosti endotela izazvati relaksaciju<sup>175</sup>. Smanjena će proizvodnja NO voditi pojačanoj adheziji trombocita za stjenke krvnih žila, što je pokazano u okolnostima ateroskleroze i dijabetesa jednako kao što je pokazano i da je nedostatak NO uključen u razvoj restenoze što se ponekad događa nakon angioplastike<sup>176</sup>.

Smanjena sinteza NO može doprinijeti i nastanku stanja kao što su ateroskleroza i hipertenzija; npr. dokazano je da endogeni NO inhibira sintezu renina<sup>77</sup>. NO oslobađajući vazodilatatori inhibiraju proliferaciju glatkih mišićnih stanica u žilama procesom posredovanim cikličkim GMP<sup>177</sup>. U literaturi se navodi da NO inhibira oslobađanje mitogenih faktora iz stimuliranih ljudskih trombocita<sup>178</sup>, a da SNP produžuje fibrinolizu, vjerojatno prevenirajući oslobađanje inhibitora tkivnog aktivatora plazminogena iz trombocita<sup>179</sup>.

Istraživanja formiranja NO u zidovima krvnih žila i njegove uloge kao endogenog nitrovazodilatatora pokrenula su istraživanja za novim spojevima koji će moći ili imitirati ulogu NO ili povećati njegovo stvaranje u kardiovaskularnom sistemu<sup>77</sup>.

Osim djelovanja na krvne žile NO djeluje i na trombocite, živčani sustav, kao djelatna molekula u imunološkoj reakciji na makrofage, neutrofile, Kupfferove stanice te ulazi u interakciju s glukokortikoidima u imunološkim reakcijama<sup>77</sup>.

ERDF koji je u prvo vrijeme bio definiran svojim odnosom prema vaskularnoj relaksaciji pokazao se djelotvornim i kao inhibitor agregacije trombocita<sup>180</sup>. NO inhibira agregaciju trombocita mehanizmom ovisnim o cikličkom GMP<sup>181</sup>. Također inhibira adheziju trombocita na vlakna kolagena, endotelni stanični matriks i na jednoslojni endotel također mehanizmom posredovanim cikličkom GMP. Aktivnost prostaciklina, koji također ima slabi inhibični učinak na adheziju trombocita, također je posredovana s cikličkim GMP<sup>108,109</sup>.

Agregacija trombocita je praćena s povišenjem razine cikličkog GMP-a u trombocitima<sup>182,183</sup>. Prvotno se smatralo da je to mehanizam koji posreduje agregaciju trombocita<sup>184</sup> suprotstavljajući se aktivnosti cikličke AMP<sup>185</sup>. Nalazi da nitrovazodilatatori i NO, koji podiže razinu cikličkog GMP-a, popratno inhibiraju agregaciju trombocita doveli su do pretpostavke da je u stvari ciklički GMP odgovoran za inhibiciju trombocita<sup>181</sup>. Novija istraživanja ukazuju da trombociti također produciraju NO i da je L-arginin u stvari put kako NO negativnom povratnom spregom regulira agregaciju trombocita<sup>186</sup>. Stvaranje NO iz L-arginina u citoplazmi trombocita ovisno je o koncentraciji slobodnog  $Ca^{2+}$  što ukazuje da je sinteza NO u trombocitima ovisna o  $Ca^{2+}$ <sup>186</sup>. L-arginin ne povisuje bazalnu razinu cikličkog GMP-a u nestimuliranim trombocitima, ali čini to kada su oni stimulirani s kolagenom. I drugi spojevi koji potiču agregaciju trombocita kao što su ADP i arahidonična kiselina, također stimuliraju sintezu NO u trombocitima. Agregacija inducirana tim tvarima inhibirana je L-argininom, dok je D-arginin inaktivan<sup>187</sup>. Analogi L-arginina L-NMMA, L-NAME i L-NIO pojačavaju kolagenom induciranu agregaciju trombocita u istom opsegu i s istom snagom. Hemoglobin ne poništava učinak L-arginina u opranim trombocitima<sup>187</sup>. S duge strane on je najjači inhibitor porasta razine cikličke GMP u citoplazmi trombocita, što ukazuje da hemoglobin ne može efikasno penetrirati membranu trombocita te da se stvaranje NO u stanicama trombocita odvija kao autokrino regulirani sistem<sup>187</sup>. Stoga je u trombocitima L-arginin put djelovanja NO kao autokrino mehanizma negativne sprege za regulaciju ponovnog djelovanja. Čini se da je agregacija trombocita i *in vivo* regulirana NO iz trombocita jednako kao i prostaciklinima oslobođenim iz endotela žila. Zajedničko djelovanje ova dva posrednika može rezultirati sinergističkom supresijom porasta intracelularnog  $Ca^{2+}$  i inhibicijom agregacije trombocita<sup>107</sup>.

Već dugo se znalo da je neurotransmisija spojevima, kao što su acetilholin, glutamat i glicin udružena u mozgu, a posebno u malom mozgu, s porastom nivoa cikličkog GMP<sup>61</sup>. Još davno je dokazano da NO stimulira otopljenu gvanilat ciklazu u homogenatu moždane kore miša<sup>188</sup>. U isto je vrijeme dokazano da topiva frakcija prednjeg mozga štakora sadrži supstancu male molekularne težine, koja aktivira otopljenu gvanilat ciklazu i čija je aktivnost inhibirana s hemoglobinom<sup>189</sup>. Nakon toga je izoliran L-arginin kao aktivator otopljene gvanilat ciklaze u

stanicama neuroblastoma<sup>190</sup>. Sva ova opažanja zajedno, a posebno otkriće L-arginina, puta djelovanja NO u endotelu žila, vodila su istraživanju postojanja ovog fiziološkog puta u centralnom živčanom sustavu<sup>77</sup>.

Dodavanje L-arginina u citosol sinapsi štakora u prisutnosti NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) rezultiralo je stvaranje NO i citrulina i bilo je praćeno sa stimulacijom otopljene gvanilat ciklaze<sup>191</sup>. Stimulacija živčanih stanica štakora s NMDA (N-metil-D-asparat) prouzročila je porast razine cikličkog GMP-a, što je bilo udruženo s oslobađanjem tvari slične ERDF-u<sup>192</sup>. K tome stanice koje su oslobađale ovu ERDF-u sličnu tvar nisu bile ciljne stanice u kojima je razina cikličkog GMP-a bila povišena. Pokazalo se da je pojačani odgovor cikličkog GMP-a na stimulaciju NMDA-om<sup>193</sup> i kainatom<sup>194</sup> u režnjevima malog mozga štakora moguće postići s L-argininom i inhibirati s L-NMMA na način da se njegov učinak poništi L-argininom. Ovo je bio dokaz da je ovaj odgovor doista posredovan s NO<sup>77,194</sup>. Nađeno je da fiziološka razina Ca<sup>2+</sup>, koja je esencijalna za djelovanje NO sintetaze, u mozgu inhibira gvanilat ciklazu<sup>191</sup>. Ovo je možde kontrolni mehanizam kojim se gvanilat ciklaza ne aktivira u svim stimuliranim stanicama već samo u ciljnim stanicama, koje se djelatelne<sup>191</sup>. Sinteza NO u mozgu kompetitivno je inhibirana s L-NMMA, L-NA i L-NIO. Kao i u stanicama endotela i u trombocitima, za sintezu NO u mozgu potreban je kofaktor NADPH<sup>195</sup>.

Prepariranjem citoplazme raznih regija u mozgu pokazano je da je najviša koncentracija NO sintetaze u malom mozgu, zatim u hipotalamusu i srednjem mozgu, stratumu i hipokampusu, dok je najniža aktivnost nađena u produženoj moždini<sup>196</sup>. Lučenje NO odvija se i u astrocitima nakon podražaja s bradikininom i A23187<sup>197</sup>. Specifične lokalizacije enzima u malom mozgu i ostalim regijama mozga zahtijevaju daljnja istraživanja. NO sistem vjerojatno ima ulogu i u patologiji centralnog nervnog sistema<sup>198</sup>. Povećani priljev Ca<sup>2+</sup>, koji prati produženu aktivaciju NMDA (N-metil-D asparat) receptora, je udružen s degeneracijom neurona<sup>199</sup>. Ekscesivna aktivacije NMDA receptora, s posljedičnim povišenjem Ca<sup>2+</sup>, doprinosi neurotoksičnosti glutamata mehanizmom povišene produkcije NO<sup>199</sup>. Visoka razina cikličkog GMP također uzrokuje destrukciju fotoreptornih stanica u retini, gdje je sinteza NO dokazana imunocitokemijskim metodama<sup>200</sup>. Ovaj efekt bi mogao objasniti porijeklo nekih inherentarnih oboljenja retine<sup>201</sup>. Također se pretpostavlja da ciklički GMP ima ulogu u napadima konvulzija, s obzirom da je u različitim moždanim regijama prije lijekovima izazvanih konvulzija zabilježen porast razine ovog nukleotida<sup>202</sup>.

U perifernom živčanom sistemu živci čiji transmiteri nisu niti acetilholin niti noradrenalin, čine važnu komponentu autonomne inervacije glatkih mišića u gastrointestinalnom traktu, zdjelničnim organima, dišnim putovima, kao i nekim drugim sistemima<sup>77</sup>. Priroda transmitera, koje otpuštaju ovi živci predmet je mnogih rasprava. Kao predloženi mogući kandidati za transmitere navedeni su: purini kao što su adenozin i ATP, neuropeptidi kao vazoaktivni intestinalni peptid i supstanca P te inhibitorni faktor izoliran iz bovinog mišića retraktora penisa. Novija su istraživanja ukazala da je NO mogući transmiter bar u nekim od ovih živaca dok je u drugima vrlo vjerojatno posrednik<sup>77</sup>. Za analgetski efekt acetilholina postoji opravdana pretpostavka da je posredovan s NO. Acetilholin, L-arginin i SNP su u mogućnosti

proizvesti efekt analgezije u animalnom modelu, a L-NMMA je sposobna spriječiti pojavu analgezije u istim modelima<sup>203</sup>.

Zaključno se može reći da je otkriće stvaranja NO u tkivima sisavaca i rasvjetljavanje nekih njegovih bioloških učinaka u zadnjih 20-tak godina bacilo novo svjetlo na mnoga područja istraživanja. Pod fiziološkim uvjetima NO se oslobađa kao odgovor na stimulaciju membranskog receptora jednog enzima, koji je konstitutivan i o  $\text{Ca}^{2+}$  ovisan. L-arginin je fiziološki put djelovanja NO u transdukcijskom mehanizmu za otoplenu gvanilat ciklazu i kao takav je mehanizam preko kojeg različite stanice reguliraju svoju funkciju i komuniciraju s drugim stanicama<sup>61</sup>.

U kardiovaskularnom sistemu otpuštanje NO predstavlja generalni adaptivni mehanizam preko kojeg žilni endotel odgovara na promjene u svom okruženju, regulira krvni protok i tlak krvi djelujući na glatku muskulaturu krvnih žila. K tome NO regulira interakciju između endotela i trombocita i vjerojatno novostvorenih krvnih stanica, što omogućuje kontrolu proliferacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila. NO također djeluje kao autokrini regulatorni sustav, koji u slučaju trombocita izgleda ne prenosi NO na druge trombocite ili stanice, ali zato usmjerava i modulira njihovu mogućnost agregacije produkcijom NO. U ovom trenutku ne postoji drugi primjer ovakve autokrine funkcija u organizmu. Čini se da je povišenje nivoa cikličkog GMP-a, koje prati stimulaciju receptora u nekim stanicama, vrlo vjerojatno ovisno o produkciji NO u istim tim stanicama<sup>77</sup>.

Važnost L-arginina, fiziološkog puta djelovanja NO u živčanom sustavu, treba i dalje istraživati, iako se već sada pouzdano zna da je povezan s stimulacijom specifičnih receptora preko ekscitatornih amino kiselina. S obzirom da su sinteza NO i otopljena gvanilat ciklaza široko i nejednako rasprostranjeni u mozgu, vrlo je vjerojatno da je ovaj fiziološki put djelovanja udružen s drugim posredničkim sistemima ne samo u centralnom živčanom sustavu već i u oba područja perifernog živčanog sustava: senzornom i motornom. Prisutnost NO dokazana je i u srži nadbubrežnih žlijezda i u retini, gdje je involviran u oslobađanje kateholamina i u ulazni mehanizam na svjetlo osjetljivih neurona<sup>77</sup>.

Oslobađanje NO, koje je posredovano specifičnim enzimom može biti regulator funkcija i drugih stanica. Dosad je ovaj enzim nađen u stanicama kore nadbubrežne žlijezde i u nekim epitelnim stanicama sugerirajući svoje sudjelovanje u regulaciji sekrecije ili djelovanju drugih hormona. NO se oslobađa i nakon imunološke stimulacije enzima, što je moguće inducirati u procesu, koji je  $\text{Ca}^{2+}$  neovisan. Ovaj enzim, koji je izvorno opisan u makrofagima, oslobađa NO kao dio obrambene reakcije domaćina, a djeluje citotoksično ili citostatično na stanice tumora i invazivne mikroorganizme. S obzirom da je indukcija ovog enzima dokazana i u drugim stanicama i tkivima, koja ne pripadaju retikuloendotelnom sustavu, postoji pretpostavka da NO možda ima i neke druge biološke posljedice uključujući i patološku vazodilataciju i oštećenje tkiva<sup>61</sup>.

Rezistencija na infekciju i karcinom se mogu tretirati i na nespecifične načine upotrebom produkata metabolizma bakterija, što je činjenica poznata duže od jednog stoljeća (npr. Fehleisen 1882.g. i Coley je 1893.g. su s ograničenim uspjehom upotrebljavali streptokok izazivajući erizipel kao terapiju bolesnika s karcinomom). Biološka baza ovog fenomena

povezana je s funkcijom makrofaga<sup>204</sup>. Danas dostupni dokazi ukazuju da je ovaj nespecifični imunitet povezan s indukcijom sinteze NO. Iz ovog proizlazi da je o NO ovisni nespecifični imunitet generalizirani fenomen u organizmu, koji ne zahvaća samo retikuloendotelni sustav već i druga tkiva, posebno endotel krvnih žila, koje su najrasprostranjenije tkivo u cijelom organizmu. U tom kontekstu, uloga pluća i jetre u o NO ovisnoj nespecifičnoj imunnoj reakciji je ključna, s obzirom da su oba ova organa u organizmu sa stajališta cirkulacije strateški pozicionirana, i namijenjena da služe kao imunološki filtri<sup>77</sup>.

Nalaz da glukokortikoidi inhibiraju indukciju sinteze NO je od posebnog značaja s obzirom da može objasniti terapijske i toksične učinke ovih spojeva te može otkriti važnost NO u različitim uvjetima. Inhibicija indukcije NO sinteze objašnjava antieritematozni i antiedematozni učinak glukokortikoida jednako kao i njihov povoljan učinak na endotoksični šok, astmu i reumatoidni artritis, stanja u kojima je NO vjerojatno odgovoran za patološku vazodilataciju i oštećenje tkiva. Nadalje inhibicija stvaranja NO može pomoći u objašnjenju zašto glukokortikoidi pomažu u širenju infekcije i maligne bolesti te zašto preveniraju posljedice odgođene preosjetljivosti u stanjima kao što su reakcija odbacivanja transplantata i vaskulitis<sup>77,205,206,207</sup>.

Način na koji se L-arginin čini dostupnim za potrebe fiziologije NO i, u usporedbi s drugim putovima, relativna važnost ovih metaboličkih pravaca zahtjeva posebnu pozornost. *In vivo* i *in vitro* stanice posjeduju dovoljnu količinu slobodnog L-arginina sposobnog da opskrbe o  $Ca^{2+}$  ovisnu sintezu NO. U slučajevima kada su stanice bile stimulirane za produkciju NO *in vitro* uočena je mogućnost egzogene opskrbe L-argininom<sup>208,209</sup>. U realnim fiziološkim okolnostima ovo se vjerojatno odvija u stanicama endotela krvnih žila, trombocitima i neutrofilima. Endotelne stanice, koje su iscrpile svoje zalihe L-arginina, u mogućnosti su sintetizirati ovu aminokiselinu koristeći endogene izvore, što ukazuje na činjenicu, u normalnim okolnostima, dobre reguliranosti raspoloživih količina L-arginina<sup>208,209</sup>.

Upotreba tvari koje pozitivno ili negativno utječu na NO sistem, davane zasebno ili u kombinaciji, mogu biti doprinos određivanju mogućih odnosa NO s drugim agensima i sustavima. Istraživani su pozitivni učinci BPC 157 na alkoholom induciranu leziju želučane sluznice i na održavanje krvnog tlaka i to u kombinaciji s L-NAME, kompetitivnim inhibitorom generiranja endotelnog NO i NO prekursorom L-argininom. Pokazano je da BPC 157 može obrnuti promjene inducirane L-NAME-om ili L-argininom. Kada su L-NAME i L-arginin bili davani zajedno njihov je učinak bio oslabljen. U homogeniziranom supernatantu želučane sluznice štakora, kao i L-arginin, BPC 157 inducira formiranje NO, ali njegov učinak nije oslabljen. Sinteza NO je bila oslabljena kada su upotrijebljeni BPC 157 i L-arginin zajedno. Od kad je bilo dokazano u eksperimentima *in vitro* i *in vivo* da BPC 157 može poništiti učinak L-NAME (esencijalnu točku koja ukazuje na L-arginin) počela se činiti prihvatljivom mogućnost interakcije BPC 157 s NO sustavom<sup>24,29,32,60,61,62</sup>.

Gledano iz perspektive BPC 157/L-arginin/NO sustav, nalaz ograničene kompeticije prema dosadašnjim stavovima može se tumačiti samo kao blizak međudnos s NO sustavom. Primjedbu da učinak agensa može biti oslabljena L-arginin analogom i ponovo uspostavljena dodavanjem L-arginina L-arginin analogu (kao npr. L-NAME) ne treba nužno uzimati u korist



esencijalne kompeticije sa samim L-argininom. Naime, za utvrditi kompeticiju između navedenih agensa i samog L-arginin analoga bitno je uočiti inhibiciju učinaka tih agensa. U toj kombinaciji (standardni agens + L-arginin + L-arginin analog) L-arginin evidentno može lakše funkcionirati. Očito je da nesuprimirana aktivnost samog L-arginina, uz nedostatak direktnih studija, može biti snažan dokaz bliskog međudjelovanja između agensa i L-arginina, prekursora NO. Tako je jasno pokazano da BPC 157 može na specifičan način interferirati s učincima NO agensa i u slučaju integriteta sluznice želuca i u slučaju regulacije krvnog tlaka. U studijama u kojima je upotrebljavan homogenizirani supernatant želučane sluznice štakora dokazano je da je djelovanje BPC 157 na nastajanje NO izrazitije i/ili različito od efekta L-arginina. Sindrom plućne hipertenzije ili ascites u brojlera su bili izazvani kroničnom aplikacijom L-NAME dok je L-arginin imao štetan utjecaj na miokard. U ovom ozračju BPC 157 može zamjetno prevenirati pojavu lezija na raznim organima. Osim toga oba učinka, protektivni (niske doze agensa) i ulcerogeni (visoke doze agensa), tvari, koje oslobađaju NO, sugerira specifično NO posredovanje<sup>24,29,32,60,61,62</sup>.

U svijetlu sveg do sada navedenog zapazili smo mogućnost djelovanja BPC 157 preko NO sustava na ishemičke lezije. Za istraživanje učinkovitosti ovog pentadekapeptida u sprečavanju nastanka i terapiji ishemičkih lezija izabran je model ishemičke lezije slezene štakora, odnosno infarkta slezene induciranog ligiranjem njenog hilusa.

Uzrok infarkta slezene pripisuje se okluziji njezini krvnih žila, što vodi u ishemiju parenhima i posljedičnu nekrozu tkiva slezene. On može biti segmentalan ili globalan konzumirajući cijeli organ. Prvi opis infarkta datira iz 1896.g., kada je viđen na histološkom preparatu slezene nakon splenektomije, koja je bila indicirana endokarditisom (vjerojatno posljedica septičkog embolusa). Često je klinička slika infarkta slezene „nijema“ i najčešće udružena s hematološkim oboljenjima. Usprkos tome dvije novije studije navode učestalost infarkta slezene od 50% u bolesnika s mieloičkom leukemijom i 72% u bolesnika s mielofibrozmom. U današnje se vrijeme infarkt slezene dijagnosticira sve češće, čemu su doprinijeli u prvom redu tehnički napredak dijagnostičkih metoda i učestaliji radiološki pregledi bolesnika, što je uobičajeni postupak neoperativnog vođenja pacijenata s tupom traumom abdomena, ali i učestalije izvođenje angiografske embolizacije povrijeđenih žila slezene<sup>210</sup>.

Uzroci nastanka infarkta slezene su navedeni u tablici 1 na str.6.

Infiltrativne hematološke bolesti uzrokuju kongestiju cirkulacije u slezeni svojim abnormalnim stanicama. Npr. mehanizam infarkta slezene u anemiji srpastih stanica se pripisuje kristalizaciji abnormalnog hemoglobina tijekom hipoksije ili acidoze. Kao posljedica toga rigidni eritrociti tvore srpaste formacije, koje okludiraju spleničku cirkulaciju. U homozigotnih bolesnika s anemijom srpastih stanica već tijekom djetinjstva kao posljedica multiplih infarkta slezene javlja se ožiljno promijenjena, skvrčena, autoinfarkcirana slezena. Heterozigotni bolesnici s anemijom srpastih stanica su u nešto boljem položaju s obzirom da je za razvoj infarkta slezene potreban znatno jači podražaj u vidu izloženosti niskom parcijalnom tlaku kisika (što se npr. događa tijekom leta u avionu čiji tlak u kabini nije uredno reguliran) ili tijekom vrlo energičnih aktivnosti što se događa npr. tijekom skijanja na velikim visinama. U oba slučaja bolesno stanje, odnosno infarkt slezene, nastaje na ranije opisani

način. U mijelofibrozi je parenhima slezene infiltrirana ekstramedularnom hematopoezom, što uzrokuje zastoj u spleničkoj cirkulaciji i infarkt.<sup>5,6,7,13,210</sup>

Kod malignih oboljenja slezene (npr. kronična mijeloička leukemija) javlja se povećana potreba slezene za kisikom, koja je posljedica izrazitog povećanja mase slezene. Infarkt je jedini mogući ishod stanja, kad se ova značajno povećana masa slezene pripojuje smanjenoj mogućnosti dotoka kisika, što je posljedica anemije u sklopu hipersplenizma koji je dio kliničke slike u kroničnoj mijeloičkoj leukemiji.<sup>5,6,7,13,210</sup>

Tromboembolički incidenti su sljedeći po učestalosti uzrok infarkta slezene. U ovom slučaju embolizacija krvnih žila slezene je posljedica mnoštva kardiovaskularnih stanja među kojima su najčešće: atrijalni ili ventrikularni muralni tromb formiran nakon infarkta miokarda ili fibrilacije atrijske, komplikacije nakon kateterizacije srca ili bakterijskog endokarditisa. U literaturi se navodi izvještaj koji spominje 19% incidencije u nastanku infarkta slezene u bolesnika kod kojih je u terapiji endokarditisa rađena valvularna kirurgija. Kod gotovo polovice ovih bolesnika dijagnoza je postavljena incidentalno na CT-u.<sup>5,6,7,13,210</sup>

Sljedeći mehanički uzrok infarktu slezene može biti ubrizgavanje bilo kontrasta ili sklerozansa u krvne žile želuca tijekom neke od angiografskih procedura radi krvarenja iz želučanih krvnih žila ili portalne hipertenzije.<sup>210</sup>

Stanja hiperkoagulabilnosti također mogu uzrokovati infarkt u slezeni kao npr. prirodni deficit proteina C može biti uzrok infarktu slezene. U ovom smislu među stečena stanja s hiperoagulabilnošću ubrajaju se i poremećaji mieloproliferacije, antikoagulantni u lupusu i terapija eritropoetinom. Infarkt slezene se može javiti i u sindromu postpartalnog toksičnog šoka, dok je tromboza lienalne vene najčešće posljedica pankreatitisa ili kirurških zahvata, a što može dovesti do venskih infarkta slezene.<sup>210</sup>

Među rjeđe uzroke infarkta slezene ubrajaju se malarija, infekcija Epstein Bar virusom, pankreatitis, konzumiranje kokaina i vrlo rijetko nakon transplantacije jetre. Kao izolirani slučajevi opisani su infarkti slezene uslijed torzije mobilne slezene oko njenog hilusa i posljedične okluzije krvnih žila te nakon tupe traume abdomena i razvoja abdominalnog kompartimenta, koji je doveo do pritiska na vene i prekida cirkulacije kroz slezenu i također posljedičnog razvoja infarkta. Ovaj mehanizam nastanka infarkta slezene moguć je i nakon opsežnih kirurških zahvata u abdomenu naročito onih indiciranih akutnim abdomenom s posljedicom razvoja abdominalne sepe.<sup>210</sup>

S obzirom na sve navedeno model ishemičke lezije slezene štakora činio se vrlo povoljnim za vrednovanje efikasnosti BPC 157 u preveniranju nastanka njenih ishemičkih oštećenja, kao i u terapiji istih. Precizno definirana krvna opskrba i mogućnost jednostavnog kirurškog pristupa i potpune okluzije hilusa slezene štakora omogućili su točno i uspješno provođenje predviđenih pokusa. Za razvoj histološke slike infarkta potrebno je najmanje 12 sati te su pokusi stoga bili podijeljeni u dvije grupe. U prvoj grupi, od 1.-11. pokusa, su pokusi s trajanjem ishemije do 40 minuta. Pozicija slezene tijekom ovih pokusa je bila izvan trbušne šupljine uz otvoreni abdomen. Životinje ne mogu preživjeti uz otvorenu trbušnu šupljinu duže od sat vremena te su se tijekom ovih pokusa promatrali učinci BPC-a 157 u kratkom vremenu,

a mjerenja su bila obavljena na temelju makroskopski vidljivih promjena. U drugoj grupi pokusa, od 12.-17. pokusa, ishemija slezene je trajala 3, 6, 9, 12, 18 i 24 sata, ali uz zatvorenu trbušnu šupljinu. Ovom grupom pokusa praćena je dinamiku razvoja histološke slike infarkta slezene. Veličina infarkta mjerena je na histološkim preparatima i to kao postotak površine zdravog tkiva u vidnom polju pri istom povećanju, dakle mjereno je tkivo koje nije bilo zahvaćeno infarktom. Mjerenje je izvršeno na deset vidnih polja svakog preparata, a histološke su se karakteristike infarkta slezene očitovale nekrozom parenhima slezene uz djelom očuvana područja pretežito bijele pulpe.

U prvoj je grupi pokusa nakon statističke obrade rezultata uočen snažan pozitivan efekt BPC 157 na razvoj ishemičkih lezija slezene, kako u pokusima u kojima je BPC 157 dan kao premedikacija tako i u pokusima u kojima je BPC 157 dodavan naknadno, dakle u posttretmanu. U pokusima u kojima je BPC 157 davan naknadno njegovo je djelovanje bilo terapijsko i to prvenstveno sprečavajući povećavanje već nastalih lezija dok su lezije u kontrolnih životinja nastavile rasti kako u svom broju tako i u površini. Ovi su efekti bili prisutni bez obzira na koncentraciju BPC 157 koja je primjenjivana u pokusu. Dakle, koncentracije BPC 157, bilo da je davan u  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ili u  $\text{ng}/\text{kg}$ , nisu imale utjecaj na efikasnost ovog pentadekapeptida. U svim je pokusima Stopa infarkciranosti nedvojbeno ukazivala na učinkovitost BPC 157, kao i vrijednosti t-testa.

Vrlo su zanimljivi, po svojim rezultatima, pokusi u prvom dijelu, u kojima se efekt BPC 157 uspoređuje s efektima NO sistema. Od preparata upotrijebljenih za usporedbu s NO sistemom korišteni su L-arginin i L-NAME njegov kompetitivni antagonist. Usporedba djelovanja BPC 157 i L-arginina pokazala je superiornost BPC-157 u zaštiti ishemiziranog tkiva slezene prema L-argininu. Stope infarkciranosti su bile 51,286 za grupu životinja tretiranih s L-argininom, a 0 za grupu životinja tretiranih L-argininom i BPC-157, kao i samim BPC 157. S obzirom da je L-arginin davan u obje grupe pokusnih životinja jasno se nameće zaključak da je zaštiti ishemiziranog tkiva slezene u promatranom vremenu pridonio BPC 157. Ova je zaštita očito bila snažna što potkrepljuju i podaci o stopi infarkciranosti, kao i rezultati statističke obrade mjerenja u pokusu. Čak što više sam L-arginin ne samo da nije uspio zaštititi tkivo slezene od razvoja infarkta već je u grupi pokusnih životinja koje su medicinirane samo s L-argininom oštećenje slezene izazvao ishemijom bilo jače izraženo. Ovo je jače oštećenje bilo statistički značajno pa se sam od sebe nameće zaključak da L-arginin učestvuje u razvoju ishemičkih lezija slezene, no na žalost ne sprečavajući ih već ih pojačavajući. Mehanizam ovog djelovanja L-arginina nije u potpunosti jasan te će zahtijevati daljnja istraživanja.

U sljedećem je pokusu djelotvornost BPC 157 uspoređivana s učincima L-NAME, koji je antagonist L-arginina i spoj koji inhibira djelovanje NO sintetaze. Stopa infarkciranosti ovog pokusa je za kontrolnu grupu pokusnih životinja koje su primile samo L-NAME bila 24,073, dok je za grupu životinja koje su primile L-NAME i BPC 157 Stopa infarkciranosti bila 0. I u ostalim mjerenim parametrima potvrđena je statistički značajna učinkovitost BPC 157 ukazujući na nemogućnost supresije učinka BPC 157 L-NAME-om. S obzirom da je iz literature znano da je predmnijevani mehanizam djelovanja BPC 157 preko NO sustava i indukcije NO što je i dokazano, jasno je da je potentnost BPC 157 značajno veća od

moгуćnosti inhibicijskog učinka L-NAME. No kao i u ranijem pokusu i ovdje je došlo do jaćih oštećenja tkiva slezene u grupi pokusnih životinja, koje su tretirane samo s L-NAME prema kontrolnoj skupini. S obzirom da L-NAME blokira NO sintetazu ovaj je rezultat u svijetlu ranijih spoznaja bio za očekivati.

Zadnji pokus iz serije pokusa u kojima je uspoređivana djelotvornost BPC 157 s učinkovitošću NO sustava uključio je oba preparata i L-arginin i L-NAME, koji su davani u obje grupe životinja, a samo je jedna grupa dobila BPC 157. Poznato je da se efekti L-arginina i L-NAME danih zajedno u odgovarajućim kolićinama, u tkivima poništavaju. Na ovaj je način praktićno jedini aktivni supstrat u pokusnim životinjama bio BPC 157. Davani zajedno L-arginin i L-NAME su oćito iscrpili tkivne zalihe zaštitnih elemenata od ishemićkih lezija te su stoga infarkti u ovoj grupi pokusnih životinja bili po svojoj brojnosti i velićini izrazito opsežni. U grupi životinja s administriranim BPC 157, bilo sam ili u kombinaciji s agensima NO sustava, infarkta u promatranom vremenu nije bilo. Ovi su podaci vidljivi i iz vrijednosti Stope infarkciranosti za ovaj pokus, koja za kontrolnu grupu iznosi 11,643, dok za grupu životinja kojim su dani agensi NO sustava iznosi 365,81, a za grupu životinja s administriranim BPC 157, bilo sam ili u kombinaciji s agensima NO sustava, iznosi 0.

Ako se promatra izolirane učinke NO sustava na tkivo slezene štakora u ishemiji uoćavaju se znatno veće promjene u grupi životinja tretiranih agensima NO sustava. Ishemićke su leziju u ovoj grupi veće i po svom broju i po svojoj površini. Uzimajući sve kontrolne skupine, u kojima pokusne životinje nisu primile nikakvu medikaciju, kao jedinstvenu kontrolnu skupinu, dobiva se Si 15,634. Stopa infarkciranosti za grupu životinja tretiranih L-argininom je 51,286; za grupu životinja tretiranih s L-NAME je 24,073, a za pokusne životinje tretirane s L-argininom i L-NAME je 365,81. Ovi podaci jasno ukazuju da agensi NO sustava nisu sami u stanju efikasno prevenirati oštećenja slezene u ishemiji niti sami niti kada su zajedno administrirani donator NO i inhibitor NO sintetaze.

U kombinaciji s ovim agensima NO sustava BPC 157 je potentniji organoprotektivni i citoprotektivni agens, što je jasno pokazano rezultatima pokusa u kojem, u promatranom vremenu, nije uoćeno postojanje promjena izazvanih ishemijom kao posljedicom ligiranja hilusa slezene. Iz istih je pokusa moguće zakljućiti da sami agensi NO sustava znatno pogoršavaju posljedice ishemije na tkivo slezene (ukupni Si za NO sustav 147,056 prema Si za kontrolne životinje 15,643). Samim tim razvidno je da agensi NO sustava mijenjaju tijekom ishemićkih lezija slezene u smislu njihovog pogoršavanja, a shodno tome je vjerojatna i interakcija NO sustava s tkivnim metabolizmom u razvoju infarkta kao posljedice inducirane ishemije slezene. U ovoj su interakciji biokemijski procesi, ćija je funkcija zaštita tkiva od ishemije, gubitnici, što je samo od sebe interesantan rezultat, koji propituje efikasnost, dugotrajnost i dostupnost NO sustava u metabolićki kriznim stanjima organizma. Primjedbe, koje su rezultat ovih pokusa zaslućuju opsežna daljnja istraživanja i evaluaciju, u biokemijskom i farmakološkom smislu kako osnovnih tako i eventualnih alternativnih pravaca djelovanja NO sustava u ishemićkom tkivu. U literaturi se na ovu temu ne nalaze odgovarajući radovi što otvara put potpuno novom pravcu istraživanja s obećavajućim uzbudljivim rezultatima, koji bi mogli imati svoju implementaciju u mnogim po život

ugrožavajućim stanjima čija je osnova ishemija kako pojedinih tkiva, tako i cijelog organizma (infarkti organa, embolije, gušenje, utapanje, trovanje s CO, ...).

Nakon interpretacije ovih rezultata i očite snažne učinkovitosti pentadekapeptida BPC 157 samo od sebe se nameće pitanje mogućeg mehanizma njegovog djelovanja u modelu ligaturom inducirane ishemičke lezije slezene štakora.

Poznato je da upotreba tvari, koje utječu na NO sustav bez obzira na prirodu njihovog utjecaja i da li su davane zasebno ili odvojeno, može pomoći steći uvid u odnos NO sustava s drugim tvarima ili regulacijskim sustavima. Ovaj pristup iako dobro poznat nije do danas ekstenzivnije upotrebljavan, a čini se da bi nam u rasvjetljavanju pozitivnih efekata BPC 157 i njegove interakcije s NO sistemom mogao biti od koristi. Vjerno je pokazano da BPC 157 može obrnuti tijek promjena prema kontrolnim bazalnim vrijednostima bez obzira da li su ove promjene inducirane s L-NAME ili s L-argininom. Kad su L-NAME i L-arginin primijenjeni zajedno njihov je učinak oslabljen ili čak poništen. U homogeniziranom supernatantu želučane sluznice štakora kao i L-arginin, pentadekapeptid BPC 157 inducira formiranje NO, ali njegov efekt nije oslabljena dodavanjem L-NAME. Sinteza NO je bila oslabljena nakon što su L-arginin i BPC 157 bili kombinirani zajedno. Istraživani su pozitivni učinci BPC 157 na alkoholom induciranu leziju želučane sluznice i na održavanje krvnog tlaka i to u kombinaciji s L-NAME, kompetitivnim inhibitorom generiranja endotelnog NO i NO prekursorom L-argininom. S obzirom da BPC 157 zahvaća sintezu NO u oba pravca, pozitivnom i negativnom, bilo je moguće djelomično dokazati interakciju BPC 157 s NO sustavom.

Uopćeno uzevši u ova dva posebna *in vivo* pokusa, u kojima su upotrijebljene iste testne doze BPC 157 i NO agensa dobiveni su srodni nalazi. Čini se da učinci izazvani kombinacijom pentadekapeptida BPC 157 i tvari koje pozitivno (L-arginin) ili negativno (L-NAME) utječu na NO sustav nisu slučajno indicirane specifične radnje posebno u svjetlu generiranja NO u sluznici želuca što je zabilježeno nakon administriranja pentadekapeptida BPC 157 u homogenat tkiva sluznice želuca štakora.

Posebno interesantna točka izvornog pozitivnog učinka BPC 157 ne bi trebala biti samo mogućnost ponovne uspostave bazalne vrijednosti nakon dodavanja kombinacije L-arginina i L-NAME. Više od toga, nakon dodavanja L-arginina L-NAME njegov je učinak bio značajno oslabljen (želučane lezije) i gotovo potpuno nestao (krvni tlak). S obzirom na NO sistem, čini se da je kombinacija stimulatora (L-arginin) i inhibitora (L-NAME) mogla oslabiti aktivnost pentadekapeptida. U ovoj bi kombinaciji vjerojatno trebalo posvetiti veću pažnju učincima L-arginina što je u istraživanjima farmakoloških djelovanja bilo djelomično zanemareno.

Računajući da pripravak kao što je L-NAME inhibira NO sintetazu posredstvom kompeticije sa L-argininom postavlja se mogućnost postojanja iste ili slične kompeticije s pentadekapeptidom. Nalazi mnogih ranijih *in vitro* eksperimenata potvrđuju ovu pretpostavku. Stvaranje NO bilo je oslabljeno u slučajevima kada su L-arginin i BPC 157 bili davani zajedno, a u odvojenoj primjeni oba su inicirali aktivnost NO sintetaze. Ova se kompeticija između BPC 157 i L-arginina pojavljivala ne samo *in vitro* već i *in vivo* i to također ako je dostupnost NO sintetaze bila ograničena kao npr. kad je bila izrazito inhibirana

upotrebom L-NAME. Ovo može biti objašnjeno daljnjom inhibicijom aktivnosti BPC 157 u slučajevima kada je L-arginin bio dodavan L-NAME što je jasno viđeno u oba pokusa: u pokusu s želučanim lezijama i u pokusu s krvnim tlakom.

Već je navedeno da se gledano iz perspektive BPC 157/L-arginin/NO sustav, nalaz ograničene kompeticije prema dosadašnjim stavovima može tumačiti samo kao blizak međuodnos s NO sustavom. S obzirom da su  $\text{Ca}^{2+}$  i o NADPH ovisna NO sintetaza prisutni u želučanom tkivu u endotelu malih krvnih žila i kapilara te da su vjerojatno prisutni i u drugim stanicama želučane sluznice, ali i u stanicama drugih tkiva kao što je slezena koja je bogata endotelom, točna lokalizacija djelovanja BPC 157 zahtijevati će daljnja istraživanja. Bazirano na gotovo istoj određenosti NO sintetaze u želučanom soku i drugim tkivima, kao što su npr.: krvne žile, pluća i jetra, i pentadekapeptid BPC 157 bi trebao imati ista djelovanja na ta tkiva. Ovo je osnova za razumijevanje mnoštva efekata pentadekapeptida BPC 157, koji su dodani osnovnom protektivnom efektu, kako u želučanoj sluznici tako i u drugim tkivima. S obzirom na tvari koje svojim dvojnim efektom djeluju na NO sintetazu i važnost signalne uloge NO u održavanju integriteta želučane sluznice te održavanje krvnog tlaka moguća posrednička uloga BPC 157 bila bi uvelike korisna.

No sve ovo još uvijek u potpunosti ne objašnjava zaštitnu funkciju BPC 157 u ishemičkim lezijama. U ranijem tekstu je navedeno da je redukcija u otpuštanju ERDF iz endotela krvnih žila ili smanjenje o endotelu ovisne relaksacije prikazana u pokusu u kojem je izazvana ateroskleroza i u aterosklerotski promijenjenim koronarnim krvnim žilama ljudske populacije. Uništenje endotela izazvalo je porast bazalnog tonusa i pojačan odgovor na vazokonstriktorne supstance. Odgovor koronarne cirkulacije na acetilholin u ljudskoj je populaciji bio smanjen u pacijenata s bolešću koronarnih arterija, a arterije dobivene iz srca takvih pacijenata su pokazivale reducirano bazalno i stimulirano oslobađanje NO.

Ovaj je proces moguće objasniti na dva načina. Oksidacijom dobiveni radikali i lipidna peroksidaza uključeni su u razvoj ateroskleroze te se akumuliraju u monocitima, koji stoga mogu generirati i otpuštati  $\text{O}_2^-$ . Druga je mogućnost da oksidirani low-density lipoproteini (poznati faktor rizika za razvoj aterosklerotske koronarne bolesti) doprinose disfunkciji endotela u ateroskerotičnim arterijama s obzirom da je dokazano da inhibiraju o endotelu ovisnu relaksaciju. Dodavanjem BPC 157 u ova tkiva podražaj NO sistema bi bio potentniji i učinkovitiji u svojoj protektivnoj funkciji.

Sličan proces mogao bi se odvijati i u slučaju ishemičkih lezija gotovo svih tkiva, a pogotovo slezene. Oksidacijom dobiveni radikali se zbog prekida cirkulacije, koji je izazvan ligiranjem hilusa slezene, zadržavaju i podražuju NO sistem. U monocitima, koji su prisutni u tkivu slezene u velikoj količini, aktivira se lipidna peroksidaza i dolazi do oslobađanja dodatnih količina  $\text{O}_2^-$ . Ovaj radikal bi svojim oksidacijskim potencijalom bio u mogućnosti privremeno zaštititi tkivo u kojem se razvio od pogubnih posljedica ishemije. Naravno da ovakva zaštita ne može trajati u nedogled i da se rezerve reaktanata potrebnih za ovu reakciju brzo iscrpljuju. Ipak ova protekcija iako ne može biti trajna, može pomoći premostiti akutnu fazu ishemije i umanjiti štetu koju će ista donijeti tkivima na koja djeluje. Također bi ovaj

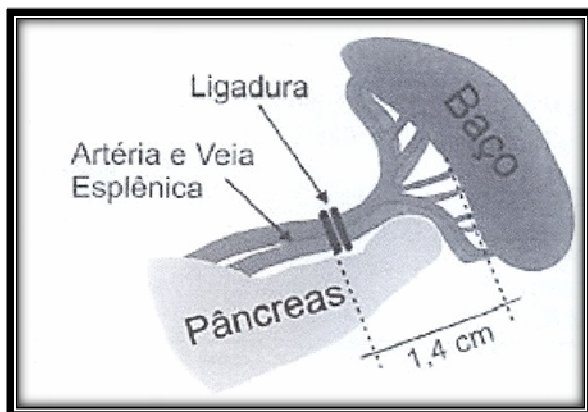
model protekcije tkiva od štetnog djelovanja ishemije bio u mogućnosti usporiti nastanak definitivnog infarkta sa svim njegovim štetnim posljedicama.

Potvrda za ovo mišljenje dobivena je u drugoj grupi pokusa. U njoj je ishemija trajala 3, 6, 9, 12, 18 i 24 sata. Vrijeme potrebno da se razvije histološka slika infarkta slezene, odnosno nekroze tkiva kao patohistološkog izričaja infarkta, je više od 10 sati neprekidnog trajanja ishemije. U ovoj grupi pokusa postoci zdrave površine tkiva slezene na histološkim preparatima nakon 12 sati ishemije su bili u kontrolnoj skupini životinja 5,25%, a u grupi životinja s BPC 157 11,60%. Nakon 18 sati ishemije postotak zdrave površine u kontrolnoj skupini i u skupini životinja tretiranih BPC 157 i dalje se smanjuje, ali je postotak zdrave površine statistički značajno zveći u grupi životinja tretiranih s BPC 157. Isti se trend nastavlja i nakon 24 sata trajanja ishemije. S obzirom da su u svim pojedinačnim pokusima grupe životinja bila izložene istom vremenu trajanja ishemije, a razlika među njima je bila samo dodatak BPC 157, za pretpostaviti je da je pozitivan učinak u vidu veće zdrave površine posljedica upotrebe ovog pentadekapeptida. Također je iz ovih podataka jasno da iako potentan terapijski i citoprotektivni preparat BPC 157, što je i bilo za očekivati, ne može trajno spriječiti nastanak infarkta u tkivu, koje je potpuno ishemizirano, odnosno u kojem je cirkulacija u potpunosti prekinuta.

U literaturi se nalazi samo jedan rad, koji inducira ishemiju tkiva slezene na tehnički sličan način kao i u ovom radu. Radi se o izvještaju španjolske grupe autora u kojem je bio cilj provjeriti učinak podvezivanja glavnih krvnih žila slezene u štakora i utjecaj terapije hiperbaričnim kisikom nakon podvezivanja. U tu su svrhu operacijski pripremili 69 mužjaka laboratorijskih štakora, tipa albino Wistar, mase od 285 g do 375 g. Životinje su slučajnim odabirom podijeljene u tri skupine: skupina 1: četiri štakora s funkcijom simulacije operacijskih efekata na tkivo slezene štakora; skupina 2: 34 štakora, istovremeno podvezivanje arterije i vene slezene u hilusu (odnosno kontrolna skupina); skupina 3: 31 štakor, podvezivanje arterije i vene u hilusu slezene i terapija hiperbaričnim kisikom tijekom 11 dana nakon operacije. Na životinjama iz skupine 1 napravljen je uzdužni rez, kože i potkožnog tkiva, približne dužine od 2,5 cm, s početkom 0,5 cm ispod ksifoida u smjeru pubisa. Potom je otvorena linea alba i peritoneum. Obavljena je eksploracija trbušne šupljine i provjerena intaktnost slezene. Potom je abdominalni zid zatvoren u dva sloja: aponeuroza s "mononylonom" 4-0, produžnim šavom te koža s 4-0 također produžnim šavom. Na životinjama 2. i 3. skupine izvedena je srednja uzdužna laparotomija, u istoj dužini kao i kod skupine 1 te je nakon eksploracije trbušne šupljine, izdvojena glavna grana lienelne žile. Oko 1,4 cm od ruba slezene, napravljen je istodoban podvez lienalne arterije i vene na dva mjesta (slika 30.)

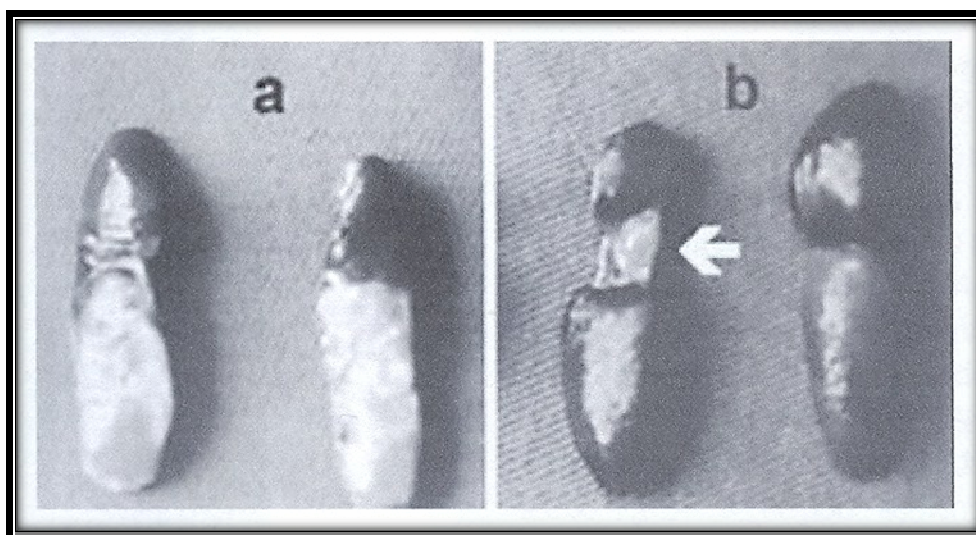
Štakori su dvanaesti dan žrtvovani, a slezena je izvađena i sačuvana u 5%-tnoj otopini formalina, a potom u parafinu radi patohistološke analize. U rezultatima se navodi da je slezena bila normalna u 8,82% životinja u skupini koja nije bila tretirana hiperbaričnim kisikom ( $p=0,01$ ) i u 45,16% u skupini tretiranoj kisikom (slika 31.). Postotak funkcionalne mase tkiva slezene u slezenama koje su pretrpjele infarkt u odnosu na tjelesnu masu životinja nije se razlikovala u skupinama 2 i 3. Patohistološki izgled slezena pokazivao je očuvanu građu na dijelu koji nije bio zahvaćen infarktom u obje skupine, a neoformacija vezivnog

tkiva i krvnih žila te ciktrizacija u skupini tretiranoj hiperbaričnim kisikom bila je naglašenija. Zaključak ovog rada je bio da terapija hiperbaričnim kisikom, u postoperativnom periodu, nakon istovremenog podvezivanja arterije i vene slezene, uvelike reducirala učestalost infarkta, a da pri tom nije izmijenila udio funkcionalne mase slezene u slučajevima kada je došlo do infarkta, te da je povišeni tlak kisika ubrzao proces ciktrizacije uz povećanu proizvodnju fibroblasta i vaskularnog tkiva.



Sl. 30 Mjesto podvezivanja arterije i vene slezene

Preuzeto iz: Paulo DN, Kall M, Grillo Junior LS et al: Viability of the spleen in rats after ligation of the splenic vessels: effects of hyperbaric oxygen therapy. Revista Da Associacao Medica Brasileira, Jan-Feb 2005; 51(1):46-50.



Sl. 31 Makroskopski izgled slezene nakon istodobnog podvezivanja arterije i vene slezene: a) Bijeli infarkti lokalizirani na donjoj polovici; b) Bijeli infarkti lokalizirani na srednjem dijelu organa (strelica).

Preuzeto iz: Paulo DN, Kall M, Grillo Junior LS et al: Viability of the spleen in rats after ligation of the splenic vessels: effects of hyperbaric



oxygen therapy. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, Jan-Feb 2005; 51(1):46-50.

Rezultati ovog pokusa grupe iz Španjolske nisu usporedivi s rezultatima pokusa koji su opisani u ovom radu s obzirom da u njihovom pokusu nije izvršena potpuna okluzija krvne opskrbe slezene. U radu španjolske grupe se navodi: „istovremeno podvezivanje lienalnih žila dovelo je do djelomičnog bijelog infarkta, češće u donjoj polovici organa, u 84,7% životinja. To pokazuje da je kolateralna cirkulacija u slezeni kod nekih životinja bila učinkovita u održavanju funkcionalnosti cijelog organa. Prema Petroianu, cirkulacija gornjeg pola slezene može biti uspješno nadomještena aa. gasticama breves. Međutim, najveći dio gornjeg pola slezene je bio funkcionalan, što pokazuje da osim arterija gastrika breves ima i drugih kojima se kod štakora prenosi, za održavanje funkcionalnosti slezene, dovoljna količina krvi. Zapravo, tijekom podvezivanja žila i kod skupine 1, zamijećene su žile koje su izlazile iz lienalne arterije, na točkama prije mjesta podvezivanja i vodile do gornjeg dijela slezene (podaci nisu navedeni). Infarkt na srednjem dijelu organa, s očuvanjem krajnjih gornjih i donjih rubova, pokazuje da raspodjela i učinkovitost kolateralne cirkulacije nije uniformna. U tim slučajevima, kolateralne grane koje napajaju rubna područja gornjeg i donjeg dijela nadomještale su cirkulaciju, ne dozvoljavajući da dođe do nekroze tih područja.“

Ova činjenica, koju navode autori citiranog rada iz Španjolske, uočena je i tijekom pokusa koji se opisuju u ovom rad. Krvne žile slezene štakora poput kista napuštaju glavno stablo lienalne arterije mnogo prije 1,4 cm opisanih u radu kolega iz Vitorije osiguravajući opskrbu ne samo gornjeg pola već i donjeg pola slezene. Uz to arterija gastrike breves, koje se u štakora vrlo teško mogu uočiti makroskopski, jasno su vidljive gledane pod jačim povećalom ili operacijskim mikroskopom, a njihova krvna opskrba, s obzirom na volumen slezene, uopće nije zanemariva. To je razlog relativno malih inshemičkih lezija u vidu infarkta slezene, odnosno preživljavanju slezene i očuvanju njene funkcije. Hiperbarična primjena kisika povećala je oksigeniranost krvi te omogućila otapanje dodatnih količina kisika u palzmi što je potpomoglo preživljavanju dijela tkiva slezena i to na dva načina. Prvo: ova povećana količina kisika opskrbila je tkivo slezene i omogućila mu preživljavanje u akutnoj fazi te drugo: usprkos dodatnim količinama kisika tkivo slezene je bilo izloženo ishemiji, koja je inducirala umnožavanje krvnih žila unutar slezene ili otvaranje i proširivanje već postojećih krvnih žila u slezeni tvoreći na taj način anastomoze, koje su osigurale ne samo preživljavanje tkiva slezene već i brz razvoj ožiljaka te smirivanje stanja na novoj zadovoljavajućoj razini ravnoteže između kompenzacije krvotoka i oksigeniranosti s obzirom na tkivne potrebe.

Imajući tijekom dizajna ovog rada na umu sve ove činjenice odlučili smo se za potpuni prekid cirkulacije slezene čime smo osigurali u potpunosti nezavisnost ovog ispitivanja od učinaka promjenjivih krvnih žila unutar slezene i njihovih potencijalnih međusobnih anastomoza, koje bi bile u mogućnosti nekontrolirano dostavljati kisik na krajnju periferiju slezene. Eventualna primjedba o nepostojanju dokaza o uspješnosti potpunog prekida cirkulacije u provedenim pokusima otpada samom činjenicom razvoja infarkta difuzno u cijeloj slezeni, dok su zdravi dijelovi tkiva također difuzno otočasto raspoređeni po cijelom vidnom polju svih patohistoloških preparata. Postojanje fokusa zdravog tkiva u izoliranim dijelovima slezene moglo bi upućivati na postojanje zaostale neprekinute cirkulacije krvi kroz slezenu, no to se

nije dogodilo s obzirom da je zdravo tkivo vidljivo tek mikroskopskim metodama pretraživanja i stacionirano u malenim otočićima, koji su zasebno manji od vidnog polja mikroskopa pri velikom povećanju. Na ovaj se način statistički značajna razlika u veličini zdravih površina tkiva slezene između životinja tretiranih s BPC 157 i kontrolne grupe, a koja je vidljiva na patohistoloških preparatima u pokusima 15-17 u potpunosti može pripisati pozitivnom učinku BPC 157 te ranije navedenoj njegovoj interakciji s NO sustavom.

Rezultati ovog rada otvaraju mogućnost novih istraživanja efekata BPC 157 i to naročito u dijelu koji se odnosi na njegovu interakciju s NO sustavom. S obzirom da je poznato da NO sustav najjače djeluje na nivou endotela krvnih žila postoji li mogućnost njegovog značajnijeg oslobađanja i djelovanja nakon podražaja s BPC 157 ili oslobađanjem NO od BPC 157 i u drugim tkivima? Da li je otpuštanje NO, pokazano u ranijim radovima na više životinjskih modela, moguće inhibirati nekim drugim agensima, a koji nisu L-NAME odnosno analozi L-arginina? Da li u smislu citoprotekcije funkcije postoji mogućnost djelovanja BPC 157 na membranu stanice u svrhu pobuđivanja specifičnih biokemijskih citoprotektivnih odgovora? Poznato je da svi regulatorni mehanizmi imaju neku vrstu kontrole i/ili autokontrole u vidu antagonista ili povratnih sprega. Postoji li takav mehanizam i za BPC 157? Pozitivan odgovor na ova pitanja omogućio bi dodatni uvid u fiziološke putove BPC 157, a samim tim nas približio i kontroli njegove aktivnosti, bilo u vidu pojačavanja željenog efekta ili s druge strane slabljenja nepoželjnog učinka. Također bi daljnja istraživanja, od kojih su neka u tijeku, trebala dati odgovor na pitanje o djelotvornosti BPC 157 i u drugim ishemičkim modelima, kao npr: ishemija srca, pluća, bubrega, jetre, ..., ali i okluzije arterija ekstremiteta, što bi sve moglo imati značajne implikacije u vidu razvoja potpuno novih farmakoloških pripravaka. Precizni odgovori na ova, ali i mnoga druga pitanja koja nisu ovdje navedena, bili bi u mogućnosti pojasniti biokemijske putova BPC 157 i vrlo vjerojatno ukazati na potpuno novi biokemijski regulacijski put u organizmu, koji s obzirom na raznolikost učinaka BPC 157, zahvaća gotovo sve organske sustave te moćno sudjeluje u održavanju homeostaze cijelog organizma.

## 6.0. ZAKLJUČAK

Tijekom izvođenja pokusa i statističke obrade njihovih rezultata potvrđene su sve tri hipoteze. (1) BPC 157 djeluje terapijski na ishemičke lezije slezene štakora i to kao preventiva nastanka i kao terapija lezija u razvoju; (2) L-NAME i L-arginin mijenjaju tijek ishemičkih lezija slezene, te je samim tim NO-sistem uključen u tijek ishemičkih lezija i (3) BPC 157 terapijski djeluje i u uvjetima blokade NO sintetaze (L-NAME) te aplikacije prekursora NO (L-arginina).

Ovi su zaključci u potpunosti u skladu s podacima poznatim iz ranijih pokusa, u kojima je dokazana snažna protektivna aktivnost BPC 157 u raznim životinjskim modelima kako u pretretmanu tako i u posttretmanu. Njegova je učinkovitost potvrđena i u miligramskim i u nanogramskim dozama. Zahvaljujući u ovom radu prezentiranim rezultatima, u protektivne mogućnosti BPC 157 moguće je uz ostalo ubrojiti i zaštitu od ishemijskih oštećenja tkiva, a efekti interakcije s djelovanjem NO sustava odnosno moguće djelovanje BPC 157 preko ovog sustava postavlja nove izazove za daljnja istraživanja.

## 7.0 KRATKI SADRŽAJ

Infarkt slezene je rijetko stanje u pravilu praćeno ozbiljnim komorbiditetom. Literatura dobro dokumentira protektivno i terapijsko djelovanje pentadekapeptida BPC 157 u mnogim patološkim stanjima uključujući i ona inducirana ishemijom. Predložen je model djelovanja BPC 157 preko NO sustava.

**Cilj:** Cilj rada je bio istražiti terapijski efekt BPC-a 157 na ishemičku leziju slezene štakora u ranoj i kasnijoj fazi njenog nastanka i praćenje ponašanja lezije u reperfuziji. Efekt BPC-a 157 je bio uspoređen s efektom L-NAME i L-arginina na isto tkivo i u istim okolnostima.

**Materijal i metode:** Materijal su bile ženke Wistar štakora težine od 200-300 g, a izvedeni su pokusi s potpunim prekidom cirkulacije kroz slezenu na način da je jednoj grupi u svakom pokusu davan BPC 157 (10mg, 10 ng/kg) dok je druga grupa bila kontrola. Nakon toga su slijedile makroskopske i mikroskopske analize rezultata.

**Rezultati:** Rezultati makroskopskih mjerenja prikazali su veličine infarkciranih površina slezene (30 minuta ishemije), a na mikroskopskim se preparatima (12,18 i 24 sata ishemije) očitavao postotak zdrave površine na 10 mikroskopskih vidnih polja. Razina signifikantnosti je u svim pokusima bila na vrijednosti  $p < 0.05$ . BPC 157 davan u obje doze singifikantno je smanjio infarkcirano područje i povećao udio zdravih područja slezene u štakora u kojih su krvne žile slezene bile ligirane.

**Zaključak:** BPC 157 djeluje terapijski na ishemičke lezije slezene štakora i kao preventiva nastanka i kao terapija razvijene lezije; L-NAME i L-arginin mijenjaju tijek ishemičkih lezija slezene; i BPC 157 terapijski djeluje i u uvjetima blokade NO sintetaze (L-NAME) te aplikacije prekursora NO (L-arginina).

## 8.0 ABSTRACT

**Title: Therapeutic effect BPC 157 on ischemic lesion rat's spleen with reperfusion effect**

**Mr. sc. Željko Jelinčić dr. med., 2010.**

Infarction of the spleen is a rare condition accompanied by serious comorbidity. In literature protective and therapeutic effect of pentadecapaptid BPC 157 is well documented in many pathological conditions including ischemia induced states. It is suggested that the model of action of BPC 157 through the NO system.

**Aim:** The aim was to explore the therapeutic effect of BPC 157 on ischemic lesion of rat spleen in early and late phase of their development and monitoring evolution of the lesion in reperfusion. The effect of BPC 157 was compared with the effect of L-NAME and L-arginine on equal tissue and in the same circumstances.

**Material and methods:** The material was Wistar rat females weight 200-300g and the trials were carried out with the circulation cut off in the spleen in a way that in each trial a group was given BPC 157 (10 µg, 10ng/kg i.p.), and the second group was control. After that followed a macroscopic and microscopic analysis of results.

**Results:** The macroscopic measurements represented the value of the spleen's infarcted area (30 minutes of ischemia) and microscopic preparation (12, 18 and 24 hours of ischemia) took measurements of healthy area per 10 visual microscopic fields. In all trials  $p < 0,005$ . BPC 157 given in both doses significantly decreased the infarcted area and enlarged the percentage of healthy spleen area in rats whose spleen's blood vessels were ligated.

**Conclusion:** BPC 157 has an effect on ischemic lesion in rat spleena, as prevention of leasion development and as therapy of an advanced lesion; L-NAME and L-arginine changes the evolution of the ischemic lesion of the spleen; and BPC 157 has a therapeutic effect in conditions of NO synthase blockade (L-NAME) and application NO precursor (L-arginine).

## 9.0 LITERATURA:

- 1.Schwartz SI: Spleen, in Maingot's abdominal operations, Appleton and Lange, 1997.;2031-2060.
- 2.Opačić M: Slezena. U: Vucelić B: Gastroenterologija i hepatologija, Medicinska naklada, Zagreb 2002; 315.
- 3.Krmpotić-Nemanić J, Marušić A: Primarni limfni organi. U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A: Anatomija čovijeka II. Dio, Medicinska naklada, Zagreb 202;305.
- 4.Krmpotić-Nemanić J, Marušić A: Sekundarni limfni organi. U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A: Anatomija čovijeka II. Dio, Medicinska naklada, Zagreb 202;305-6.
- 5.Labar B, Hauptman E et all: Hematopoezni sustav. U Labar B, Hauptman E: Hematologija, Školska knjiga, Zagreb 2007; 1-7.
- 6.Labar B, Hauptman E et all: Učinak splenektomija na krvnu sliku. U Labar B, Hauptman E: Hematologija, Školska knjiga, Zagreb 2007;241.
- 7.Labar B, Hauptman E et all: Anemije. U: Labar B, Hauptman E: Hematologija, Školska knjiga, Zagreb 2007;102-58.
- 8.Guyton IH: I. Leukociti, granulociti, monocitno makrofagni sustav i upala. U Guyton IH: Medicinska fiziologija, deseto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2003; 392-401.
- 9.Guyton IH: Otpornost organizma na infekciju: II. Imunost i alergije. U Guyton IH: Medicinska fiziologija, deseto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2003; 402-12.
- 10.Guyton IH: Eritrociti, anemija i policitemija. U Guyton IH: Medicinska fiziologija, deseto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2003; 328-91.

11. Guyton IH: Funkcije vena kao spremnika krvi. U Guyton Medicinska fiziologija, deseto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2003; 159-160.

12. van Hal S, Senanayake S, Hardiman R: Splenic infarction due to transient antiphospholipid antibodies induced by acute Epstein-Barr virus infection. *Journal of clinical virology* Mar 2005; 32(3):245-7.

13. Symeonidis A, Papakonstantinou C, Seimeni U et al: Non hypoxia-related splenic infarct in a patient with sickle cell trait and infectious mononucleosis. *Acta Haematologica* 2001;105(1):53-6.

14. Trevenzoli M, Sattin A, Sgarabotto D et al: Splenic infarct during infectious mononucleosis. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, 2001;33(7):550-1.

15. Chambon JP, Ribet M, Quandalle P et al: Splenic complications of chronic pancreatitis. Clinical and experimental study. *Apr 1987;124(4):253-7.*

16. Toth PP, Reuter RK, MacDonald J: Spontaneous splenic infarction secondary to diabetes-induced microvascular disease. *Archives of Family Medicine*, Feb 2000;9(2):195-7.

17. Dulman RY, Buchanan GR, Ginsburg H and all: Splenic infarction due to concomitant hereditary spherocytosis and sickle cell trait. *J Pediatric Surg*, Dec 2007;42(12):2129-31.

18. Abdulwahab A, Almoallim H, Khan N: Isolated eosinophilic mesenteric vasculitis with extensive thrombosis and splenic infarction in a 13-year-old boy. *Clinical Rheumatology*, Feb 2007; 26(2):254-7.

19. Chamberland DL: Splenic infarction in an African-American male with sickle cell trait. *American Journal of Hematology*, Jan 2007; 82(1):86-7.

20.Yavasoglu I, Kadikoylu G, Bolaman Z: Recovery of splenic infarction with anti-platelet treatments and platelet-apheresis in polycythemia vera. *Transfusion and apheresis science* , Apr 2006; 34(2):199-202.

21.Paulo DN, Kall M, Grillo Junior LS et all: Viability of the spleen in rats after ligation of the splenic vessels: effects of hyperbaric oxygen therapy. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, Jan-Feb 2005; 51(1):46-50.

22.Sikirić P, Petak M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M, Lang N: A new gastric juice peptide, BPC-an overview of stomach-stress-organoprotection hypothesis and BPC beneficial effects. *J Physiol (Paris)*, 1993; 87:313-27.

23.Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z et all: Salutary and profilactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci*, 1996; 41:1518-26.

24.Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Ž et all: The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *European J Pharmacology*, 1997; 332:23-33.

25.Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, Coric V, Konjevoda P, Petek M, Rucman R, Turkovic B, Perovic D, Mikus D, Jandrijevic S, Medvidovic M, Tadic T, Romac B, Kos J, Peric J, Kolega Z: BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris*. 1997 May-Oct;91(3-5):173-8.

26.Sikirić P, Seiwerth S, Dešković S et all: New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *European J Pharmacology*. 1999;364:23-31.

27.Sikiric P: The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). *Inflammopharmacology*. 1999;7(1):1-14.

28.Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, Klicek R, Radic B, Keller N, Sipos K, Jakir A, Udovicic M, Tonkic A, Kokic N, Turkovic B, Mise S, Anic T: Stable



gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology*. 2006 Dec;14(5-6):214-21.

29. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Mise S, Zorčić I, Konjevoda P, Perović D, Jurina L, Separović J, Hanzevacki M, Artuković B, Bratulić M, Tisljar M, Gjurasin M, Miklić P, Stancić-Rokotov D, Slobodnjak Z, Jelovac N, Marović A: 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 Jul 30;332(1):23-33.

30. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, Sikiric P, Peric J, Geres D, Kos J: The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris*. 1997 May-Oct;91(3-5):139-49.

31. Sikiric P, Separovic J, Anic T, Buljat G, Mikus D, Seiwerth S, Grabarevic Z, Stancic-Rokotov D, Pigac B, Hanzevacki M, Marovic A, Rucman R, Petek M, Zoricic I, Ziger T, Aralica G, Konjevoda P, Prkacin I, Gjurasin M, Miklic P, Artukovic B, Tisljar M, Bratulic M, Mise S, Rotkvic I: The effect of pentadecapeptide BPC 157, H2-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris*. 1999 Dec;93(6):479-85.

32. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romić Z et al: The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med Sci Monit*, 2006; 12(1):1-10.

33. Vuksić T, Zorčić I, Brcić L, Sever M, Klicek R, Radic B, Cesarec V, Berkopic L, Keller N, Blagaic AB, Kokic N, Jelic I, Geber J, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P: Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials of inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today*, 2007;37(9):768-77.

34. Bedekovic V, Mise S, Anic T, Staresinic M, Gjurasin M, Kopljar M, Kalogjera L, Drvis P, Boban Blagaic A, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P: Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacol*. 2003 Sep 5;477(1):73-80.

35. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Anic T, Dubovecak M, Staresinic M, Seiwert S, Sikiric P: Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005 Apr 11;512(2-3):173-9.

36. Tohyama Y, Sikirić P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Sci.* 2004 Dec 3;76(3):345-57.

37. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Marovic A, Perovic D, Seiwert S, Mise S, Turkovic B, Dodig G, Miklic P, Buljat G, Prkacin I: Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol.* 1999 Aug 20;379(1):19-31.

38. Mise S, Tonkic A, Pesutic V et al: The presentation and organization of adaptive cytoprotection in the rat stomach, duodenum and colon. *Med Sci Monit*, 2006; 12(4):146-53.

39. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, Batelja L, Sever M, Kokic N, Tonkic A, Zoricic I, Mise S, Staresinic M, Radic B, Jakir A, Babel J, Ilic S, Vuksic T, Jelic I, Anic T, Seiwert S, Sikiric P: Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157. *Pharmacol Sci.* 2007 May;104(1):7-18. Epub 2007 Apr 24.

40. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, Batelja L, Kokic N, Tonkic A, Mise S, Baotic T, Staresinic M, Radic B, Jakir A, Vuksic T, Anic T, Seiwert S, Sikiric P: An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2006 Nov;102(3):269-77.

41. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P: The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur J Pharmacol.* 2004 Sep 24;499(3):285-90.

42. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, Stancic-Rokotov D, Ziger T, Anic T, Sikiric P, Seiwerth S, Staresinic M, Mise S, Rotkvic I, Jagic V, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Marovic A, Sjekavica I, Sebecic B, Boban-Blagaic A, Ivasovic Z: Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris*. 2001 Jan-Dec;95(1-6):295-301.

43. Petek M, Sikiric P, Anic T, Buljat G, Separovic J, Stancic-Rokotov D, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Mikus D, Zoricic I, Prkacin I, Sebecic B, Ziger T, Coric V, Turkovic B, Aralica G, Rotkvic I, Mise S, Hahn V: Pentadecapeptide BPC 157 attenuates gastric lesions induced by alloxan in rats and mice. *J Physiol Paris*. 1999 Dec;93(6):501-4.

44. Sikiric P, Jadrijevic S, Seiwerth S, Sosa T, Deskovic S, Perovic D, Aralica G, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, Turkovic B, Ziger T, Rotkvic I, Mise S, Zoricic I, Sebecic B, Patrlj L, Kocman B, Sarlija M, Mikus D, Separovic J, Hanzevacki M, Gjurasin M, Miklic P, et al: Long-lasting cytoprotection after pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, sucralfate or cholestyramine application in reflux oesophagitis in rats. *J Physiol Paris*. 1999 Dec;93(6):467-77.

45. Prkacin I, Separovic J, Aralica G et al: Portal hypertension and liver lesion 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;95:315-24.

46. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A, Dodig G, Staresinic M, Anic T, Zoricic I, Ferovic D, Aralica G, Buljat G, Prkacin I, Lovric-Bencic M, Separovic J, Seiwerth S, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Ziger T: Anxiolytic effect of BPC-157, a gastric pentadecapeptide: shock probe/burying test and light/dark test. *Acta Pharmacol Sin*. 2001 Mar;22(3):225-30.

47. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S, Kokic N, Batelja L, Brcic L, Boban-Blagaic A, Zoric Z, Ivanovic D, Ajduk M, Sebecic B, Patrlj L, Sosa T, Buljat G, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res*. 2006 May;24(5):1109-17.

48. 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 May;24(5):982-9.

49.Lazić R, Gabrić N, Dekaris I, Bosnar D, Boban-Blagaić A, Sikirić P: Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. *Coll Antropol.* 2005 Jun;29(1):321-5.

50.Bilic M, Bumber Z, Blagaic AB, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P: The stable gastric pentadecapeptide BPC 157, given locally, improves CO2 laser healing in mice. *Burns.* 2005 May;31(3):310-5. Epub 2005 Jan 20.

51.Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L, Jadrijevic S, Suknaic S, Perovic D, Aralica G, Zarkovic N, Borovic S, Srdjak M, Hajdarevic K, Kopljar M, Batelja L, Boban-Blagaic A, Turcic I, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P: Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthop Res.* 2003 Nov;21(6):976-83.

52.Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, Borovic S, Gjurasin M, Boban-Blagaic A, Batelja L, Rucman R, Anic T: Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. *Burns.* 2003 Jun;29(4):323-34.

53.Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A, Dodig G, Staresinic M, Anic T, Zoricic I, Rak D, Perovic D, Aralica G, Buljat G, Prkacin I, Lovric-Bencic M, Separovic J, Seiwerth S, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Ziger T, Boban-Blagaic A, Bedekovic V, Tonkic A, Babic S: Pentadecapeptide BPC 157 attenuates chronic amphetamine-induced behavior disturbances. *Acta Pharmacol Sin.* 2002 May;23(5):412-22.

54.Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, Rucman R, Petek M, Pigac B, Perovic D, Kolombo M, Kokic N, Mikus S, Duplancic B, Fattorini I, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Prkacin I, Konjevoda P, Stambuk N, Anic T: Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice.*Burns.* 2001 Dec;27(8):817-27.

55.Stancic-Rokotov D, Slobodnjak Z, Aralica J, Aralica G, Perovic D, Staresinic M, Gjurasin M, Anic T, Zoricic I, Buljat G, Prkacin I, Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Kokic N, Jagic V, Boban-Blagaic A: Lung lesions and anti-ulcer agents beneficial effect: anti-ulcer agents pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, omeprazole and atropine ameliorate lung lesion in rats. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):303-8.

56. Stancic-Rokotov D, Sikiric P, Seiwerth S, Slobodnjak Z, Aralica J, Aralica G, Perovic D, Anic T, Zoricic I, Buljat G, Prkacin I, Gjurasin M, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Ivasovic Z, Jagic V, Staresinic M, Boban-Blagaic A: Ethanol gastric lesion aggravated by lung injury in rat. Therapy effect of antiulcer agents. *J Physiol Paris*. 2001 Jan-Dec;95(1-6):289-93.

57. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G, Perovic D, Staresinic M, Anic T, Gjurasin M, Prkacin I, Separovic J, Stancic-Rokotov D, Lovric-Bencic M, Mikus D, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Rucman R, Petek M, Ziger T, Sebecic B, Ivasovic Z, Jagic V, Komericki L, Balen I, Boban-Blagaic A, Sjekavica I: Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. *J Physiol Paris*. 2001 Jan-Dec;95(1-6):283-8.

58. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Balen I, Aralica G, Gjurasin M, Komericki L, Perovic D, Ziger T, Anic T, Prkacin I, Separovic J, Stancic-Rokotov D, Lovric-Bencic M, Mikus D, Staresinic M, Aralica J, DiBiaggio N, Simec Z, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Rucman R, Petek M, Sebecic B, Ivasovic Z, Boban-Blagaic A, Sjekavica I: 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 Jan-Dec;95(1-6):261-70.

59. Sikiric P, Seiwerth S, Miše S, Starešinić M, Bedeković V, Zarkovic N, Borovic S, Gjurasin M, Boban-Blagaic A, Batelja L, Rucman R, Anic T: Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice, *Burns*, 2003.; 29:323-34.

60. White BRJ, Boughton-Smith NK, Moncada S: Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide in gastric mucosa. *Ann NY Acad Sci*, 1992;664:126-39.

61. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1993; 43:109.

62. Takeuchi K, Obuchi T, Miyake H, Niki S, Okabe S: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on duodenal alkaline secretion in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol*, 1993; 231:135.

63. Axelrod J, Reisine : Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 1984;224:452-9.

64. Szabo S, Glavin GB: Hans Selye and the concept of biologic stress. Ulcer pathogenesis as a historical paradigm. *Ann NY Acad Sci*, 1990;597:14-16.

65. Sikirić P, Geber J, Ivanović D, Suchanek E, Gjuris V, Tućan-Foretić M, Mise S, Cvitanović B, Rotkvić I: Dopamine antagonists induce gastric lesions in rats. *Eur J Pharmacol*. 1986 Nov 12;131(1):105-9.

66. Sikirić P, Rotkvić I, Mise S, Krizanac S, Gjuris V, Jukić J, Suchanek E, Petek M, Udovičić I, Kalogjera L, et al. The influence of dopamine agonists and antagonists on indomethacin lesions in stomach and small intestine in rats. *Eur J Pharmacol*. 1988 Dec 6;158(1-2):61-7.

67. Szabo S, Usadel KH: Cytoprotection – organoprotection by somatostatin: gastric and hepatic lesions. *Experientia*. 1982 Feb 15;38(2):254-6.

68. Sikirić P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, Jagić V, Turković B, Mildner B, Duvnjak M, et al: The significance of the gastroprotective effect of body protection compound (BPC): modulation by different procedures. *Acta Physiol Hung*. 1992;80(1-4):89-98.

69. Enochs MR, Johnson LR. Effect of hypophysectomy and growth hormone on serum and antral gastrin levels in the rat. *Gastroenterology*. 1976 May;70(5 PT.1):727-32.

70. Grijalva CV, Novin D: The role of the hypothalamus and dorsal vagal complex in gastrointestinal function and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*, 1990;597:207-22. Review.

71. Krieger TD: Brain peptides: what, where and why? *Science*, 1983; 222:975-85.

72. Hernandez DE: Neuroendocrine mechanisms of stress ulceration: focus on thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Life Sci*. 1986 Jul 28;39(4):279-96. Review.

73. Menguy R, Desbaillets L, Masters YF: Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology*. 1974 Jan;66(1):46-55. No abstract available.

74. Sikirić P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, Turković B, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M, et al: A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *Physiol Paris*. 1993;87(5):313-27.

75. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Mise S, Zoricic I, Konjevoda P, Perovic D, Simicevic V, Separovic J, Hanzevacki M, Ljubanovic D, Artukovic B, Bratulic M, Tisljar M, Rekić B, Gjurasin M, Miklic P, Buljat G. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris*. 1997 May-Oct;91(3-5):113-22.

76. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Mise S, Zoricic I, Jurina L, Konjevoda P, Hanzevacki M, Gjurasin M, Separović J, Ljubanović D, Artuković B, Bratulić M, Tisljar M, Miklić P, Sumajstorčić J: Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. *Dig Dis Sci*. 1997 Mar;42(3):661-71.

77. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.

78. Whittle BJ, Boughton-Smith NK, Moncada S. Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;664:126-39

79. Holzer P: Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1992;121:49-146.

80.Holzer P: Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):143-201.

81.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 Jan;88(1 Pt 2):228-36.

82.Robert A: Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology.* 1979 Oct;77:761-7.

83.Geokas MC, Baltaxe HA, Banks PA, Silva J Jr, Frey CF: Acute pancreatitis. *Ann Intern Med.* 1985 Jul;103(1):86-100.

84.Pár A: Mechanism of free radicals in gastrointestinal and liver diseases. *Orv Hetil.* 1993 Mar 28;134(13):675-83.

85.Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Rotkvic I, Turkovic B, Jagic V, Mildner B, Duvnjak M: Hepatoprotective effect of BPC 157, a 15-amino acid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl<sub>4</sub> administration. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci.* 1993;53(18):PL291-6.

86.Damas J, Deflandre E: The mechanism of the anti-inflammatory effect of turpentine in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1984 Sep;327(2):143-7.

87.Winter CA, RisleyEA, Nuss GW: Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962 Dec;111:544-7.

88.Gyires K, Fürst S, Miklya I, Budavari I, Knoll J: Analysis of the analgesic and anti-inflammatory effects of rimazolium, a pyrido-pyrimidine derivative, compared with that of prostaglandin synthesis inhibitors and morphine. *Drugs Exp Clin Res.* 1985;11(8):493-500.



89.Brkić T, Banić M, Anić B, Grabarević Z, Rotkvić I, Artuković B, Duvnjak M, Sikirić P, Troskot B, Hernandez DE: A model of inflammatory bowel disease induced by 2,4-dinitrofluorobenzene in previously sensitized BALB-c mice. *Scand J Gastroenterol.* 1992;27(3):184-8.

90.Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Jan;272(1):417-22.

91.Klinge B, Lehto-Axtelius D, Akerman M, Håkanson R: Structure of calvaria after gastrectomy. An experimental study in the rat. *Scand J Gastroenterol.* 1995 Oct;30(10):952-7.

92.Kobayashi S, Takahashi C, Kuroda T, Sugeno A, Iida F, Katoh K. Calcium regulating hormones and bone mineral content in patients after subtotal gastrectomy. *Surg Today.* 1994;24(4):295-8.

93.Sikirić P, Mikus D, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, Turković B, Rotkvić I, Mise S, Zorčić I, Perić J, Konjevoda P, Perović D, Jurina L, Hanzevacki M, Separović J, Gjurasin M, Jadrijević S, Jelovac N, Miklić P, Buljat G, Marović A: Pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, bromocriptine, and atropine effect in cysteamine lesions in totally gastrectomized rats: a model for cytoprotective studies. *Dig Dis Sci.* 1997 May;42(5):1029-37.

94.Bosnjak ZJ, Graf BM, Sikiric P: Protective effects of newly isolated gastric peptide following hypoxic and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *FASEB J*, 1994; 8 A 129.

95.Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, Sikiric P, Peric J, Geres D, Kos J. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris.* 1997 May-Oct;91(3-5):139-49.

96.Jelovac N, Sikirić P, Rucman R, Petek M, Perović D, Konjevoda P, Marović A, Seiwerth S, Grabarević Z, Sumajstorčić J, Dodig G, Perić J. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry.* 1998 Apr 1;43(7):511-9.

97.Masuda Y, Murai S, Saito H, Abe E, Fujiwara H, Kohori I, Itoh T. The enhancement of the hypomotility induced by small doses of haloperidol in the phase of dopaminergic supersensitivity in mice. *Neuropharmacology*. 1991 Jan;30(1):35-40.

98.Adams JD Jr, Odunze IN: Biochemical mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Could oxidative stress be involved in the brain? *Biochem Pharmacol*. 1991 Apr 15;41(8):1099-105.

99.Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

100.Furchgott RF: The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984;24:175-97.

101.Busse R, Trogisch G, Bassenge E: The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol*. 1985 Sep-Oct;80(5):475-90.

102.Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH: The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*. 1984 Apr 12-18;308(5960):645-7.

103.Cocks TM, Angus JA, Campbell JH, Campbell GR: Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J Cell Physiol*. 1985 Jun;123(3):310-20.

104.Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol*. 1985 Jul;249(1 Pt 2):H95-101.

105.Rapoport RM, Murad F: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through Cgmp. *Circ Res*. 1983 Mar;52(3):352-7.

106.Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol*. 1986 Jun;88(2):411-5.

107.Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987 Nov;92(3):639-46.

108.Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: The role of nitric oxide and Cgmp in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Nov 13;148(3):1482-9.

109.Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987 Nov 7;2(8567):1057-8.

110.Downes MJ, Edwards MW, Elsey TS, Walters CL. Determination of a non-volatile nitrosamine by using denitrosation and a chemiluminescence analyser. *Analyst.* 1976 Sep;101(1206):742-8.

111.Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

112.Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.

113.Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Jun 30;153(3):1251-6.

114.Palmer RM, Moncada S: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Jan 16;158(1):348-52.

115.Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT: Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest.* 1990 Jan;85(1):264-73.

116.Rees DD, Palmer RM, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(9):3375-8.

117.Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S: A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*. 1989 Feb;96(2):418-24.

118.Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R: Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(22):8664-7.

119.Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S: Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*. 1990 May;15(5):486-92.

120.Chu A, Chambers DE, Lin CC, Kuehl WD, Palmer RM, Moncada S, Cobb FR: Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs. *J Clin Invest*. 1991 Jun;87(6):1964-8.

121.Brotan TP, Miyashiro JK, Moncada S, Feigl EO: Role of endothelium-derived relaxing factor in parasympathetic coronary vasodilation. *Am J Physiol*. 1992 May;262(5 Pt 2):H1579-84.

122.Vallance P, Collier J, Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989 Oct 28;2(8670):997-1000.

123.Vallance P, Collier J, Moncada S: Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res*. 1989 Dec;23(12):1053-7.

124.Schmidt HH, Klein MM, Niroomand F, Böhme E: Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide? *Eur J Pharmacol*. 1988 Mar 29;148(2):293-5.

125.Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990 Nov;101(3):746-52.

126.Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S: Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol.* 1990 Sep;101(1):10-2.

127.Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM: Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986 Jun;250(6 Pt 2):H1145-9.

128.Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E: Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension.* 1986 Jan;8(1):37-44.

129.Miller VM, Vanhoutte PM: Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. *Am J Physiol.* 1988 Sep;255(3 Pt 2):H446-51.

130.Inoue T, Tomoike H, Hisano K, Nakamura M: Endothelium determines flow-dependent dilation of the epicardial coronary artery in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 1988 Jan;11(1):187-91.

131.Kelm M, Feelisch M, Deussen A, Strauer BE, Schrader J: Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow. *Cardiovasc Res.* 1991 Oct;25(10):831-6.

132.Drexler H, Zeiher AM, Wollschläger H, Meinertz T, Just H, Bonzel T. Flow-dependent coronary artery dilatation in humans. *Circulation.* 1989 Sep;80(3):466-74.

133.Parnavelas JG, Kelly W, Burnstock G: Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature.* 1985 Aug 22-28;316(6030):724-5.

134.De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary

circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(24):9797-800.

135.Hopwood AM, Lincoln J, Kirkpatrick KA, Burnstock G: Adenosine 5'-triphosphate, adenosine and endothelium-derived relaxing factor in hypoxic vasodilatation of the heart. *Eur J Pharmacol*. 1989 Jun 20;165(2-3):323-6.

136.Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*. 1988 Oct;12(4):365-72. Review.

137.Abrams J: Glyceryl trinitrate (nitroglycerin) and the organic nitrates. Choosing the method of administration. *Drugs*. 1987 Sep;34(3):391-403.

138.Schultz KD, Schultz K, Schultz G: Effects of manganese on cyclic GMP levels in the rat ductus deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1977 Jul 18;298(3):197-204.

139.Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F: Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1977 Feb;3(1):23-35.

140.Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H: Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1978;9:145-58. Review.

141.Kukovetz WR, Holzmann S, Wurm A, Pösch G: Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1979 Dec;310(2):129-38.

142.Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981 Sep;218(3):739-49.

143. Feelisch M, Noack EA: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol.* 1987 Jul 2;139(1):19-30.

144. Feelisch M, Noack E, Schröder H. Explanation of the discrepancy between the degree of organic nitrate decomposition, nitrite formation and guanylate cyclase stimulation. *Eur Heart J.* 1988 Jan;9 Suppl A:57-62.

145. Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM: Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15;88(6):2166-70.

146. Shirasaki Y, Su C: Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur J Pharmacol.* 1985 Aug 7;114(1):93-6.

147. Alheid U, Dudel C, Förstermann U: Selective inhibition by gossypol of endothelium-dependent relaxations augments relaxations to glyceryl trinitrate in rabbit coeliac artery. *Br J Pharmacol.* 1987 Sep;92(1):237-40.

148. Busse R, Pohl U, Mülsch A, Bassenge E: Modulation of the vasodilator action of SIN-1 by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14 Suppl 11:S81-5.

149. Lüscher TF, Richard V, Yang ZH: Interaction between endothelium-derived nitric oxide and SIN-1 in human and porcine blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14 Suppl 11:S76-80.

150. Cannon WB, Rosenblueth A: The supersensitivity of denervated structures, Macmillan, New York, 1949.

151. Seidel CL, LaRochelle J: Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. *Circ Res.* 1987 Apr;60(4):626-30.

152. Waldman SA, Rapoport RM, Ginsburg R, Murad F: Desensitization to nitroglycerin in vascular smooth muscle from rat and human. *Biochem Pharmacol.* 1986 Oct 15;35(20):3525-31.

153. Fleming WW, McPhillips JJ, Westfall DP: Postjunctional supersensitivity and subsensitivity of excitable tissues to drugs. *Ergeb Physiol.* 1973;68:55-119.

154. Sowers JR, Zemel MB, Standley PR, Zemel PC: Calcium and hypertension. *J Lab Clin Med.* 1989 Oct;114(4):338-48.

155. López-Jaramillo P, Narváez M, Weigel RM, Yépez R: Calcium supplementation reduces the risk of pregnancy-induced hypertension in an Andes population. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Jun;96(6):648-55.

156. Lopez-Jaramillo P, Gonzalez MC, Palmer RM, Moncada S: The crucial role of physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol.* 1990 Oct;101(2):489-93.

157. Linder L, Kiowski W, Bühler FR, Lüscher TF: Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation.* 1990 Jun;81(6):1762-7.

158. Durante W, Sen AK, Sunahara FA: Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1988 Jun;94(2):463-8.

159. Kamata K, Miyata N, Kasuya Y: Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1989 Jun;97(2):614-8.

160. Kappagoda T, Jayakody L, Rajotte R, Thomson AB, Senaratne MP: Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the aorta of streptozotocin induced diabetic-rat and the BB-diabetic rat. *Clin Invest Med.* 1989 Jun;12(3):187-93.



161. Winquist RJ, Bunting PB, Baskin EP, Wallace AA: Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *J Hypertens*. 1984 Oct;2(5):541-5.

162. Otsuka Y, DiPiero A, Hirt E, Brennaman B, Lockette W: Vascular relaxation and Cgmp in hypertension. *Am J Physiol*. 1988 Jan;254(1 Pt 2):H163-9.

163. Sunano S, Osugi S, Shimamura K: Blood pressure and impairment of endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Experientia*. 1989 Aug 15;45(8):705-8.

164. Hagen EC, Webb RC. Coronary artery reactivity in deoxycorticosterone acetate hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1984 Sep;247(3 Pt 2):H409-14.

165. Konishi M, Su C: Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*. 1983 Nov-Dec;5(6):881-6.

166. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, Van Hove CE, Coene MC, Herman AG: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. 167. *Circ Res*. 1986 Apr;58(4):552-64.

167. Guerra R Jr, Brotherton AF, Goodwin PJ, Clark CR, Armstrong ML, Harrison DG: Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis: implications for altered autocrine and paracrine functions of EDRF. *Blood Vessels*. 1989;26(5):300-14.

168. Förstermann U, Neufang B. The endothelium-dependent vasodilator effect of acetylcholine: characterization of the endothelial relaxing factor with inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Eur J Pharmacol*. 1984 Aug 3;103(1-2):65-70.

169. Shimokawa H, Tomoike H, Nabeyama S, Yamamoto H, Araki H, Nakamura M, Ishii Y, Tanaka K: Coronary artery spasm induced in atherosclerotic miniature swine. *Science*. 1983 Aug 5;221(4610):560-2.

170. Drexler H, Zeiher AM, Wollschläger H, Meinertz T, Just H, Bonzel T: Flow-dependent coronary artery dilatation in humans. *Circulation*. 1989 Sep;80(3):466-74.

171. Chester AH, O'Neil GS, Moncada S, Tadjkarimi S, Yacoub MH: Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet*. 1990 Oct 13;336(8720):897-900.

172. Jacobs M, Plane F, Bruckdorfer R: Inhibition of endothelium-derived nitric oxide and atherosclerosis. U: Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system. Ed. by. S Moncada and EA Higgs, 1990, Elsevier, Amsterdam, 107-14.

173. Kanamaru K, Waga S, Kojima T, Fujimoto K, Niwa S: Endothelium-dependent relaxation of canine basilar arteries. Part 2: Inhibition by hemoglobin and cerebrospinal fluid from patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1987 Sep-Oct;18(5):938-43.

174. Byrne JV, Griffith TM, Edwards DH, Harrison TJ, Johnston KR: Investigation of the vasoconstrictor action of subarachnoid haemoglobin in the pig cerebral circulation in vivo. *Br J Pharmacol*. 1989 Jul;97(3):669-74.

175. Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM: Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium-dependent relaxations to platelets. *Am J Physiol*. 1985 Mar;248(3 Pt 2):H389-95.

176. Sinzinger H, Fitscha P, O'Grady J, Rauscha F, Rogatti W, Vane JR: Synergistic effect of prostaglandin E1 and isosorbide dinitrate in peripheral vascular disease. *Lancet*. 1990 Mar 17;335(8690):627-8.

177. Garg UC, Hassid A: Nitric oxide-generating vasodilators inhibit mitogenesis and proliferation of BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 31;171(1):474-9.

178. Barrett ML, Willis AL, Vane JR: Inhibition of platelet-derived mitogen release by nitric oxide (EDRF). *Agents Actions*. 1989 Jun;27(3-4):488-91

179.Korbut R, Lidbury PS, Vane JR. Prolongation of fibrinolytic activity of tissue plasminogen activator by nitrovasodilators. *Lancet*. 1990 Mar 17;335(8690):669.

180.Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol*. 1986 Jun;88(2):411-5.

181.Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ: Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*. 1981 May;57(5):946-55.

182.Böhme E, Jung R, Mechler I: Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol*. 1974;38:199-202.

183.Steer ML, Salzman EW: Cyclic nucleotides in hemostasis and thrombosis. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1980;12:71-92.

184.Glass DB, Gerrard JM, Townsend D, Carr DW, White JG, Goldberg ND: The involvement of prostaglandin endoperoxide formation in the elevation of cyclic GMP levels during platelet aggregation. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1977 Feb;3(1):37-44.

185.Mills DC, Smith JB: The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in platelets. *Biochem J*. 1971 Jan;121(2):185-96.

186.Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(13):5193-7.

187.Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol*. 1990 Oct;101(2):325-8.

188.Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K: Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977 Apr 25;75(4):851-6.

189.Deguchi T: Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem.* 1977 Nov 10;252(21):7617-9.

190.Deguchi T, Yoshioka M: L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1982 Sep 10;257(17):10147-51.

191.Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5159-62.

192.Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 1988 Nov 24;336(6197):385-8.

193.Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 1989 Oct 17;172(4-5):413-6.

194.Garthwaite J, Southam E, Anderton M: A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem.* 1989 Dec;53(6):1952-4.

195.Schmidt HH, Wilke P, Evers B, Böhme E: Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Nov 30;165(1):284-91.

196.Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F: Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Apr 30;168(2):727-32.

197. Murphy S, Minor RL Jr, Welk G, Harrison DG: Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide. *J Neurochem.* 1990 Jul;55(1):349-51.
198. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989 Jun 1;38(11):1709-15.
199. Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988 Oct;1(8):623-34.
200. Ross CA, Bredt D, Snyder SH: Messenger molecules in the cerebellum. *Trends Neurosci.* 1990 Jun;13(6):216-22.
201. Lolley RN, Farber DB, Rayborn ME, Hollyfield JG: Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: simulation of an inherited disease. *Science.* 1977 May 6;196(4290):664-6.
202. Ferrendelli JA, Blank AC, Gross RA: Relationships between seizure activity and cyclic nucleotide levels in brain. *Brain Res.* 1980 Oct 27;200(1):93-103.
203. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 1990 Sep 21;186(2-3):289-93.
204. Old LJ, Benacerraf B, Clarke DA, Carswell EA, Stockert E: The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.* 1961 Oct;21:1281-300.
205. Schaffner A, Schaffner T: Glucocorticoid-induced impairment of macrophage antimicrobial activity: mechanisms and dependence on the state of activation. *Rev Infect Dis.* 1987 Sep-Oct;9 Suppl 5:S620-9.

206.Schultz RM, Nanda SK, Altom MG. Effects of various inhibitors of arachidonic acid oxygenation on macrophage superoxide release and tumoricidal activity. *J Immunol.* 1985 Sep;135(3):2040-4.

207.Conn DL: Update on systemic necrotizing vasculitis. *Mayo Clin Proc.* 1989 May;64(5):535-43.

208.Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggård EE, Vane JR: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov;87(21):8612-6.

209.Sessa WC, Hecker M, Mitchell JA, Vane JR: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov;87(21):8607-11.

210.Manish P, Leon HP, Stewart GD: Splenic infarct. <http://emedicine.medscape.com/article/193718-overview>

## 10.0 BIOGRAFIJA

Rođen sam 23.02.1958.g. u Zagrebu, gdje sam završio osnovnu školu i gimnaziju prirodoslovno matematičkog smjera.

Godine 1976.g. upisao sam studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Promoviran sam u zvanje doktora medicine 19.10.1982.g.

Tijekom specijalizacije, a s obzirom na ratna zbivanja, sudjelovao sam u radu mobilnih kirurških ekipa Kriznog stožera ministarstva zdravstva. U okviru ovih aktivnosti radio sam dva mjeseca u Ratnoj bolnici Vukovar, gdje sam bio zarobljen i kasnije razmjenjen. Slijedom toga nosioc sam više visokih državnih odlikovanja (Spomenica domovinskog rata, Spomenica Danice hrvatske s likom Katarine Zrinske, Red hrvatskog trolista, Spomenica Vukovar).

Specijalistički ispit položio sam 31.05.1993.g., a 13.04.2005. položio sam subspecijalistički ispit i stekao naslov subspecijalist digestivne (abdominalne) kirurgije.

U dva sam navrata boravio na klinikama u inozemstvu i to: četiri tjedna na Zavodu za jetrenu kirurgiju i transplantaciju Kirurške klinike Eppendorf, Hamburg i šest tjedana na StMark's hospital, London, gdje sam tijekom boravka završio postdiplomski tečaj iz koloproktologije i koloproktološke kirurgije.

Sudionik sam i pozivni predavač na više domaćih i međunarodnih simpozija. U tijeku dodiplomske nastave na Medicinskom fakultetu držim vježbe u okviru kolegija Kirurška propedeutika i surađujem u nastavi Malog izbornog predmeta: Mogućnosti endoskopske kirurgije.