

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Tatjana Pavelić Turudić

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 i
uloga sustava dušikova oksida na
oštećenje stijenke maternice
cisteaminom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Tatjana Pavelić Turudić

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 i
uloga sustava dušikova oksida na
oštećenje stijenke maternice
cisteaminom**

DISERTACIJA

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Zagreb, 2015.

**UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF MEDICINE**

Tatjana Pavelić Turudić

**The effect of pentadecapeptide BPC
157 and the role of nitric oxide system
on uterus damaged by cysteamine**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Zagreb, 2015.

Ova disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Predraga Sikirića, a u sklopu poslijediplomskog studija „Biomedicina i Zdravstvo“ Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvale

Zahvaljujem svojem mentoru, prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, dr. med. na savjetima i stručnoj pomoći koju mi je pružio pri izradi ovoga rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Svenu Seiwerthu i kolegici dr. Lovorki Batelji na uloženom trudu, vremenu i stručnoj pomoći pri izradi patohistoloških preparata.

Kolegi dr. Marku Severu zahvaljujem na pomoći pri statističkoj obradi podataka, a Mirjani i Zvonimiru na lektorskoj i informatičkoj pomoći.

Hvala Jeleni i Nikoli, Ivanu i Nikolini i mojem Ivanu, ovaj rad posvećujem njima.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA
1.0. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Svrha rada.....	2
1.2. Pregled dosadašnjih spoznaja	2
1.2.1. Unutarmaternične priraslice	4
1.2.1.1. Klasifikacija unutarmaterničnih priraslica	5
1.2.1.2. Etiologija	7
1.2.1.3. Simptomatologija	8
1.2.1.4. Dijagnostika	9
1.2.1.5. Liječenje	9
1.2.1.6. Prevencija recidiva	10
1.2.2. Cisteamin.....	12
1.2.3. Pentadekapeptid BPC 157.....	12
1.2.4. Sustav dušik oksida	15
2.0. HIPOTEZA.....	17
3.0. CILJEVI RADA	17
3.1. Opći cilj	17
3.2. Specifični ciljevi.....	17

4.0. MATERIJALI I METODE	18
4.1. Eksperimentalne životinje	19
4.2. Lijekovi	21
4.3. Eksperimentalni protokol	21
4.4. Makroskopija	22
4.5. Histološka analiza	23
4.6. Statistička analiza	23
5.0. REZULTATI	24
5.1. Rana primjena terapije	25
5.1.1. Oštećenje stijenke matenice cisteaminom-makroskopske promjene.....	25
5.1.2. Mikroskopska analiza rezultata	32
5.2. Kasna primjena terapije	37
5.2.1. Makroskopska i mikroskopska analiza rezultata	37
6.0. RASPRAVA	42
7.0. ZAKLJUČCI	47
LITERATURA	51
ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM LITERATURE	60

Popis oznaka i kratica

NO	dušik oksid
NOS	dušik oksid sintetaza
nNOS	neuronalna dušik oksid sintetaza
eNOS	endotelijalna dušik oksid sintetaza
iNOS	inducibilna dušik oksid sintetaza
L-NAME	N-dušik-L-arginin-metilester
BPC 157	– želučani pentadekapeptid BPC 157
i.p.	– intraperitonealno
p.o.	– per os, peroralno
FO	– fiziološka otopina (0,9% NaCl)

1.0. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Svrha rada

Cisteamin ima ulcerogeni učinak na sluznicu duodenuma i kolona (1-3), a nije poznat učinak na sluznicu maternice. Shodno tome, odlučili smo ispitati utjecaj cisteamina na sluznicu maternice te očekujemo da ćemo dobiti lezije koja će nam poslužiti za proučavanje oštećenja sluznice maternice. Nakon oštećenja sluznice maternice mogu se pojaviti unutarmaternalne priraslice koje su značajni problem u ginekologiji. U prethodnim istraživanjima uvidjelo se da pentadekapeptid BPC 157 inhibira lezije i duodenuma i kolona (1-3) te očekujemo da će imati koristan učinak i na maternicu. Isto tako, pentadekapeptid BPC 157 antagonizira učinak inhibicije NO-sustava (primjena blokatora NOS-a, L-NAME) i hiperstimulacije NO-sustava (primjena substrata NOS-a, L-arginin) te ima značajni učinak na NO-sustav na modelima različitih lezija (4, 5). Stoga je vjerojatno da bi koristan učinak BPC 157 na cisteaminske lezije sluznice maternice bio također posredovan djelovanjem na inhibiciju NOS-a (primjena blokatora NOS-a, L-NAME) i na hiperstimulaciju NO-sustava (substrat NOS-a, L-arginin).

Svrha ovog istraživanja je pokazati da cisteamin oštećuje stijenku maternice i da BPC 157 inhibira nastajanje lezija i ubrzava cijeljenje već postojećih i da taj učinak zavisi o NO-sustavu. Nadalje će se pokazati da BPC 157, ovisno o dozi, sprječava oštećenje stijenke maternice. Pokazat će se i učinak primjene blokade NO-sintetaze primjenom L-NAME i učinak primjene substrata za NO-sintetazu, L-arginina. Međudjelovanje L-NAME i/ili L-arginina s pentadekapeptidom BPC 157 također je jedan od ciljeva ovog rada.

1.2. Pregled dosadašnjih spoznaja

Maternica je jedan od unutarnjih organa ženskog spolnog sustava. Anatomske i funkcionalne razlike su: a) tijelo maternice b) materični tjesnac i c) vrat maternice, cilindrični donji dio s donjim krajem koji se izbočuje u rodnicu.

Sluznica maternice ili endometrij oblaže šupljinu tijela maternice. Građen je od bazalnog sloja, koji izravno naliježe na mišićje maternice te funkcionalnog sloja, koji se dijeli na superficijalni ili kompaktni sloj te duboki ili spongiozni sloj. Sluznica maternice sastoji se od

epitela, vezivnog sloja i žlijezda. Epitel je jednoslojan i čine ga cilindrične stanice. Vezivni sloj čini oskudna mreža vezivnih vlakana između žljezdanih vodova gdje se nalazi mnoštvo vezivnih stanica, fibroblasta i limfocita. Maternične žlijezde mnogobrojne su i cjevaste tvorbe, a čine ih stanice koje se nalaze i na površini sluznice. Iz bazalnog sloja, koji u normalnim uvjetima ne reagira na hormone, obnavlja se endometralna sluznica nakon menstruacije. Funkcionalni sloj izrazito je podložan hormonalnim podražajima i tijekom reproduktivne dobi se ciklički ljušti i obnavlja (6).

Menstruacijski ciklus podijeljen je ovulacijom u dvije faze: proliferacijsku i sekrecijsku. Proliferacijsku fazu (preovulacijska, folikularna) obilježava proliferacija žlijezda, strome te endotelnih stanica vaskularnih prostora, a pod utjecajem je estrogena. U ranoj proliferacijskoj fazi (peti do sedmi dan ciklusa), jednostavne tubularne žlijezde obložene kubičnim do niskim cilindričnim epitelom s malenim jezgrama koje su okružene gustom stromom građenom od sitnih vretenastih stanica, postaju voluminoznije i izvijuganije s visokim cilindričnim epitelom i rahlom stromom. U srednjoj proliferacijskoj fazi (osmi do deseti dan ciklusa), izražena je mitotička aktivnost epitela i strome, dok su u kasnoj proliferacijskoj fazi (11. do 14. dan ciklusa) žlijezde izvijugane, a epitel pseudoslojevit, s velikim jezgrama, brojnim mitozama, te gustom stromom, krupnijih stanica (6).

Sekrecijska faza (postovulacijska ili luteinska) pod utjecajem je progesterona iz žutog tijela jajnika. Morfološke promjene u ovoj su fazi specifične te je moguće odrediti dan ciklusa uz odstupanje od jedan do dva dana. Nakon ovulacije (14. do 15. dan) morfološki se endometriji ne razlikuje od onog u kasnoj proliferacijskoj fazi ciklusa. Zatim se javljaju bazalne vakuole u oko polovice stanica žljezdanog epitela funkcionalnog sloja. Inače, epitel je visok, pseudoslojevit, a žlijezde su pojačano izvijugane (16. dan), odnosno jezgre su potisnute prema lumenu žlijezda, zaokružene i mjehuraste (17. dan, da bi 18. dan bile smještene bazalno s izraženom vakuolizacijom iznad njih te početnom sekrecijom - 19. dan), odnosno jasno izraženom sekrecijom u lumen žlijezda (20. dan), s «nagriženim» rubom stanica prema lumenu (21. dan). Nakon toga, izražen je jak edem strome (22. dan) s početnom diferencijacijom stanica strome u velike predecidualne stanice i endometrijske granulocite (22. dan), odnosno diferencijacija stromalnih stanica ispod epitela površine u predecidualne stanice, dok se u endometralnim granulocitima primjećuju floksifilna granula (24. dan). U cijelom području zone kompaktne stanice strome su predecidualno promijenjene (25. dan), jasno se dijeli funkcionalni sloj u kompaktnu i spongioznu s početnim kolapsom žlijezda (26.

dan). Uz kolaps žlijezda javljaju se i žarišta nekroze i krvarenja (27. dan) te disocijacija stanica strome, izrazita hemoragija i nekroza (28. dan) (6).

1.2.1. Unutarmaternične priraslice

Unutarmaternične priraslice prvi je opisao Fritsch 1894. godine (7). Asherman je 1948. godine u nekoliko radova opisao učestalost, etiologiju i simptome unutarmaterničnih priraslica pa se od tada upotrebljava termin Ashermanov sindrom da bi se opisala ta bolest. Originalna definicija Ashermanova sindroma je prisustvo unutarmaterničnih priraslica u dijelu maternice ili kompletna obliteracija šupljine maternice i/ili cervikalnog kanala prouzročena traumom endometrija, a za posljedicu ima neuredno menstrualno krvarenje, neplodnost i ponovljene gubitke trudnoće (8-10).

Pojam unutarmaterničnih priraslica uključuje stvaranje fibroznog tkiva koje može rezultirati stvaranjem fibroznih priraslica između zidova stjenke maternice. Međutim, sama fibroza bez stvaranja unutarmaterničnih priraslica može biti još jedan aspekt iste bolesti. Fibroza može biti blaga i površinska ili jaka i duboka, koja prodire i do mišićnog sloja, ali bez stvaranja priraslica između dva zida maternice.

Histološki Ashermanov sindrom je stanje u kojem endometrij postaje fibrozan. Endometralna stroma uglavnom je zamijenjena fibroznim tkivom, a žlijezde su obložene neaktivnim kubičnim i cilindričnim epitelom. Razlika između funkcionalnog i bazalnog sloja endometrija se izgubila i funkcionalni sloj je zamijenjen jednoslojnim epitelom koji ne odgovara na hormonsku stimulaciju (11).

1.2.1.1. Klasifikacija unutarmaternih priraslica

Da bi se mogao procijeniti opseg priraslica, odrediti najprikladnije liječenje i predvidjeti rezultate liječenja, potrebna je pravilna klasifikacija bolesti.

Godine 1988. Američko društvo za neplodnost razvilo je objektivan sustav bodovanja za klasifikaciju unutarmaternih priraslica u korelaciji s menstrualnim krvarenjem, histeroskopskim i histerosalpingografskim nalazom (Tablica 1.).

Tablica 1. Klasifikacija unutarmaternih priraslica, 1988. Američko društvo za neplodnost

KLASIFIKACIJA UNUTARMATERNIČNIH PRIRASLICA, 1988.			
AMERIČKO DRUŠTVO ZA NEPLODNOST			
Veličina priraslica (prema šupljini maternice)	<1/3 1	1/3-2/3 2	>2/3 3
Vrsta priraslica	tanke 1	tanke do guste 2	guste 4
Menstruacija	normalna 1	oskudna 2	izostala 4
STUPANJ I	Blagi (1-4)		
STUPANJ II	Umjereni (5-8)		
STUPANJ III	Jaki (9-12)		

S druge strane, Europsko društvo za histeroskopiju i Europsko društvo za ginekološku endoskopiju usvojilo je klasifikaciju Histeroskopskog centra u Nizozemskoj (Tablica 2.), (12).

Tablica 2. Klasifikacija unutarmaternih priraslica, 1995. Europsko društvo za ginekološku endoskopiju, Europsko društvo za histeroskopiju

KLASIFIKACIJA UNUTARMATERNIČNIH PRIRASLICA, 1995. EUROPSKO DRUŠTVO ZA GINEKOLOŠKU ENDOSKOPIJU, EUROPSKO DRUŠTVO ZA HISTEROSKOPIJU	
TIP	Opseg unutarmaternih priraslica
I	Tanke priraslice Mogu se riješiti samo histeroskopom Uredna tubarna ušća
II	Guste priraslice Priraslice povezuju zidove maternične šupljine Moguća vizualizacija oba tubarna ušća Ne mogu se riješiti samo histeroskopom
IIa	Priraslice samo u području unutarnjeg ušća maternice Šupljina maternice uredna
III	Višestruke guste priraslice Povezuju odvojena područja maternične šupljine

Zatvoreno jedno tubarno ušće	
IV	Ekstenzivne guste priraslice s djelomičnim zatvaranjem maternične šupljine
Va	Ekstenzivna endometralna fibroza u kombinaciji s Tip1 ili Tip 2 priraslicama Izostala ili oslabljena menstruacija
Vb	Ekstenzivna endometralna fibroza Tip 3 ili Tip 4 priraslice i izostanak menstruacije

Obje klasifikacije su vrlo temeljite, ali su prilično složene i komplicirane za svakodnevnu upotrebu. U novije vrijeme poboljšava se sustav klasifikacija, jer se u obzir uzimaju i klinički simptomi, histeroskopski nalazi, ali i reproduktivno zdravlje (13).

1.2.1.2. Etiologija

Unutarmaternalna oštećenja mogu dovesti do stvaranja unutarmaternalnih priraslica. Oko 90 posto unutarmaternalnih priraslica nastaje kao posljedica kiretaža materijata zbog komplikacija u trudnoći kao što su zadržani ili nekompletni pobačaj (14), zaostalo tkivo posteljice (15), postporođajna krvarenje (16).

Schenker i Margalioth pregledali su 1856 slučajeva Ashermanova sindroma (17) i ustanovili da je trudnoća bila dominantni predisponirajući čimbenik u 90,8 % slučajeva, i to u 66,7 % slučajeva Ashermanov sindrom se javio zbog kiretaža nakon pobačaja, a u 21,5 % nakon postporođajnih kiretaža, u 2 % nakon carskog reza i 0,6 % nakon mole.

Oštećenja maternice i izvan trudnoće također mogu dovesti do pojave priraslica. Na prvom mjestu su dijagnostičke kiretaže (17), zatim histeroskopske operacije mioma, polipa i septuma maternice (18).

Infekcija također može biti uzrok unutarmaternih priraslica, iako su stavovi istraživača različiti. Neki autori smatraju infekciju glavnim razlogom nastanka unutarmaternih priraslica, i to posebice kronične i subakutne upale maternice (19-21), dok drugi smatraju da ista ne igra značajnu ulogu u stvaranja priraslica (22).

Pretpostavlja se da upalni proces zajedno s traumom sluznice maternice dovodi do stvaranja priraslica (23, 24).

1.2.1.3. Simptomatologija

S obzirom na sve gore navedeno, oštećenje maternice kao trajnu posljedicu može imati poremećaj menstruacije u vidu oslabljene menstruacije ili izostanka menstruacije, ponovljene gubitke trudnoće i konačno neplodnost (17, 25).

Menstrualni poremećaji u obliku oskudne menstruacije i izostanak menstruacije i dalje je najučestalija klinička značajka povezana s unutarmaternim priraslicama. Ponovljeni gubici trudnoća još su jedan od simptoma unutarmaternih priraslica. Iako teški stupanj unutarmaternih priraslica uzrokuje opstrukciju maternične šupljine i u konačnici neplodnost, blaži stupanj unutarmaternih priraslica može biti povezano s ponovljenim gubitcima trudnoća. U moguće etiološke čimbenike za ponovljene gubitke trudnoća možemo uključiti stezanje maternične šupljine zbog unutarmaternih priraslica, smanjenje površina normalnog endometralnog tkiva koji je potreban za implantaciju i razvoj posteljice i nedostatna prokrvljenost endometralnog tkiva kao posljedice fibroze endometrija (25).

Još jedan simptom unutarmaternih priraslica je neplodnost. Smatra se da je temeljni mehanizam neplodnosti zbog unutarmaternih priraslica opstrukcija koja može biti u području vrata maternice, u području tubarnih ušća i u šupljini maternice. Sve to za posljedicu može imati oslabljenu migraciju spermija, smanjenu migraciju embrija u šupljinu maternice te lošu implantaciju embrija zbog slabe receptivnosti endometrija (26).

1.2.1.4. Dijagnostika

Histerosalpingografija je jednostavna metoda probira za unutarmaternične priraslice, poglavito u neplodnih pacijenata, zbog dodatne informacije koje se mogu dobiti o prohodnosti jajovoda, ali ima i niz nedostataka. Prvo, ona ne može otkriti samu endometralnu fibrozu kao u slučajevima kad je sama fibroza prisutna, a priraslica nema te ima visoku stopu lažno pozitivnih rezultata (27-29).

Transvaginalni ultrazvuk je neinvazivna metoda koja se upotrebljava u rutinskoj praksi. Ultrazvukom možemo procijeniti razvoj endometrija, možemo identificirati područja kalcifikacije unutar endometrija, kao i hiperehogeno područja koja mogu biti znak gustih priraslica. Međutim, senzitivnost tranvaginalnog ultrazvuka je oko 52 % (30).

Sonohisterografija u odnosu na histerosalpingografiju i transvaginalni ultrazvuk pokazala se točnija u otkrivanju unutarmaterničnih priraslica, sa sentitivnošću oko 75 % (29).

1.2.1.5. Liječenje

Histeroskopska kirurgija je zlatni standard u liječenju unutarmaterničnih priraslica. Ona omogućuje direktan pogled u šupljinu maternice, a prednost joj je to što se danas može izvoditi i ambulantno. Direktan pogled na priraslice pod većim povećanjem omogućuje precizan i siguran tretman. Kada su priraslice tanke, i samo širenje maternice može biti dovoljno da se priraslice razriješe (31). Ipak, liječenje teških i gustih priraslica ostaje veći izazov. U tim slučajevima, šupljina može biti potpuno sraštena ili preuska da bi zahvat uopće bilo moguće izvesti.

U većini slučajeva, razrješavanje priraslica se može učiniti uz pomoć histeroskopskih škara. Općenito, tanke i centralno smještene priraslice treba uvijek prve ukloniti, a čvrste i marginalne priraslice treba odstranjivati pažljivo radi veće mogućnosti perforacije maternice. Histeroskopskim škarama ili hladnom nožu uvijek dajemo prednost u odnosu na druge metode, laser ili struja, jer bi se na taj način trebalo spriječiti toplinsko oštećenje preostalog endometrija i smanjiti stopa perforacija tijekom postupka (32, 33).

Histeroskopsko liječenje unutarmaternih priraslica nudi dobre rezultate i rješava menstrualne poremećaje u većini slučajeva (34). Podaci koji se odnose na reproduktivni ishod u većinom su rezultat nerandomiziranih studija. Plodnost nakon histeroskopskog liječenja priraslica ovisi o težini priraslica i ponovnom javljanju istih nakon zahvata (35, 36).

1.2.1.6. Prevenција recidiva

Kao što je već spomenuto, povratak priraslica nakon operacije je jedan od najvažnijih faktora koji mogu ometati reproduktivni ishod. Povratak priraslica je znatno češći u onim slučajevima kada su priraslice bile jače i gušće (36, 37).

Predloženo je nekoliko metoda za sprječavanje povratka unutarmaternih priraslica.

Jedna od metoda je postavljanje unutarmaterničnog uložka, no postotak recidiva je i dalje veliki (38, 39), ali su priraslice obično tanje i nježnije (40). Upotreba unutarmaternih uložaka kako bi se spriječilo ponovno stvaranje priraslica nakon zahvata bio je jedan od prvih pokušaja dokumentiranih u literaturi (41).

Unutarmaternični balon je također opisan kao metoda za mehaničko sprječavanje ponovnih stvaranja priraslica nakon uklanjanja istih s dobrim rezultatima (42). To je silikonski balon, trokutastog oblika koji se uklapa u oblik šupljine maternice. U jednom radu pokazani su dobri rezultati glede stope trudnoće od 61,6 % i spontanijih pobačaja od 15,6 %, nakon upotrebe unutarmaterničnog balona nakon uklanjanja priraslica (42).

Hijaluronska kiselina je jedna od najraširenijih tvari u ljudskom tkivu i uključena je u mnoge biološke funkcije, kao što su mehanička potpora, migracija i proliferacija stanica. U posljednjih nekoliko desetljeća, proizvodi od hijaluronske kiseline upotrebljavaju se nakon ginekoloških operacije kako bi se spriječilo nastajanje i intraperitonealnih i unutarmaternih priraslica (43-45). Mehanizam po kojem se ovi proizvodi djeluju nije do kraja razjašnjen. Hijaluronska kiselina stvara privremenu barijeru između organa koji mehanički priječi stvaranje priraslica, a osim toga, ovi proizvodi utječu na popravak tkiva povećanjem brzine proliferacije stanica mesotela (46).

Kako bi se obnovio endometrij, više autora je predložilo hormonsku terapiju (31, 47). Predloženi su različiti tretmani, ali ne postoji konsenzus o vremenu upotrebe (prije operacije

i/ili poslije operacije) i vrsti terapije (estradiol ili kombinacija estradiola i progesterona). Glavna ideja je brza regeneracija endometrija odmah nakon operacije sa svrhom sprječavanja nastanka novih priraslica.

Upotreba sildenafil citrata intravaginalno jedna je od metoda farmakološkog liječenja debljine endometrija. Ovaj lijek je specifični inhibitor fosfodiesteraze koji pojačava vazodilatatorni učinak dušikovog oksida čije su izoforme sintetaze također pronađene u maternici (48). Sildenafil citrat u kombinaciji s estradiolom poboljšava prokrvljenost endometrija i njegovu debljinu (49).

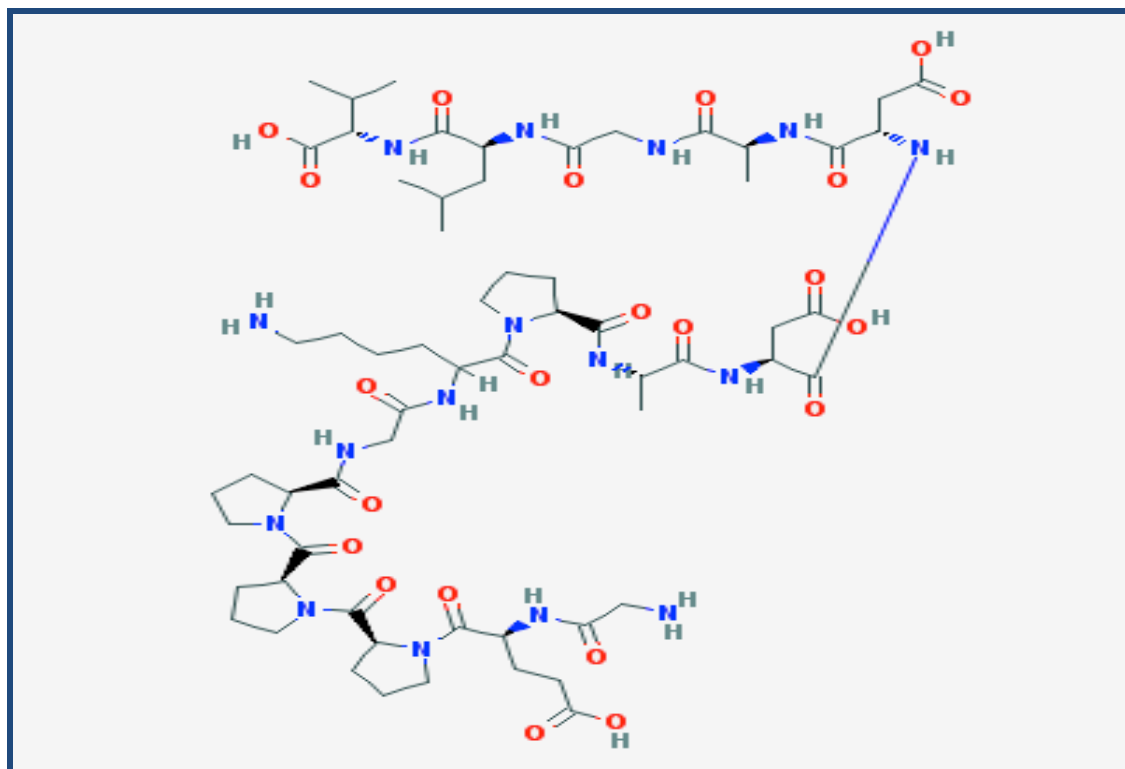
Nijedna od ovih metoda ne daje dovoljno dobre rezultate u prevenciji i liječenju oštećenja sluznice maternice. Stoga je intencija ovog rada da ispita jedan farmakološki pripravak koji bi mogao pomoći u rješavanju ovog problema.

1.2.2. Cisteamin

Cisteamin ima ulcerogeni učinak na sluznicu duodenuma i kolona. Prethodne studije koje su se oslanjale na Robertov koncept citoprotekcije (50-53), kao i na cisteaminska istraživanja (3, 54), predložen je model citotoksičnog oštećenja (1-3, 54-56) koji se pokazao posebnim u odnosu na ostale, jer izravno uzrokuje oštećenje sluznice, neovisno o želučanoj sekreciji (57), za koju se dugo smatralo da je izvorna noksa za oštećenje sluznice probavnog sustava. U početku je korišten kao ulcerogeni model za indukciju duodenalnog ulkusa (2, 3), no ubrzo se na temelju tih rezultata pretpostavilo kako bi on mogao djelovati ulcerogeno i na sluznicu ostalih segmenata gastrointestinalnog sustava (2), između ostalih i na sluznicu debelog crijeva (3), što je i dokazano.

Shodno gore navedenim djelovanjima, odlučili smo ispitati djelovanje cisteamina na sluznicu maternice štakora.

1.2.3. Pentadekapeptid BPC 157



Slika 1. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV) jest sekvenca proteina BPC izoliranog iz želučanog soka, sintetski proizveden sa 99-postotnom čistoćom postignutom visokotlačnom tekućom kromatografijom (Slika 1.). Odlikuje se topljivošću u vodi i fiziološkoj otopini pri pH 7.0, koji djeluje sam bez nosača pa se po tome razlikuje od standarnih peptida, u rasponu od nanogramske do mikrogramske doze. Djelovanje pentadekapeptida BPC 157 nije ograničeno isključivo na lokalnu primjenu, već je brojnim eksperimentalnim modelima pokazan i potvrđen učinak i pri sistemske primjeni. U ispitivanjima toksičnosti nije pronađen toksični učinak, te do sada nisu utvrđene nuspojave vezane uz primjenu pentadekapeptida BPC 157 (58, 59).

BPC 157 se pokazao uspješan u terapiji upalne bolesti crijeva (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva) (58, 59) i u cijeljenju rana (60, 61). U organizmu pokazuje organoprotektivnu aktivnost. Istraživanja su pokazala citoprotektivni učinak BPC 157 na sluznicu želuca štakora izloženu oštećenjima npr. alkoholom i nesteroidnim protuupalnim lijekovima (62, 63). Pokazao se učinkovitim u cijeljenju ileo-ilealnih (50), jejuno-ilealnih anastomoza nakon resekcije $\frac{3}{4}$ tanakog crijeva (64) te kolon-kolon anastomoza (65).

Pentadekapeptid BPC 157 pokazao se učinkovitim i u cijeljenju lezija cisteaminom inducirano kolitisa, pri čemu je morfološkom evaluacijom makroskopski i mikroskopski verificirano smanjenje broja i površine lezija sluznice debelog crijeva (3, 54). Učinak BPC 157 kao mogućeg organoprotektivnog medijatora zapažen je u brojnim studijama koje su istraživale farmakodinamičke učinke BPC 157 na različitim modelima oštećenja tkiva i organa. Posebice, BPC 157 antagonizira cisteaminske lezije na duodenumu (1, 2, 54) i nakon gastrektomije i nakon salivarijektomije. Isto tako, BPC 157 antagonizira i cisteaminom izazvane lezije kolona i u akutnoj i kroničnoj primjeni (3, 54).

Za ovaj je pentadekapeptid nedavno dokazano da potiče ekspresiju erg-1 gena (early growth response gene-1) te njegovog represora nab-2 (nerve growth factor 1-A binding protein-2) u Caco-2 stanicama. Erg-1 inducira stvaranje citokina i faktora rasta te formaciju ranog ekstracelularnog matriksa te posljedično tome djeluje pozitivno na cijeljenje rana (66).

Kod prekomjerne doze paracetamola, inducirana je progresivna hepatička encefalopatija s generaliziranim konvulzijama u štakora. BPC 157 bio je učinkovit i u nanogramskoj i mikrogramskoj dozi i profilaktički i terapijski. Oba učinka impliciraju da je BPC 157 vrlo

učinkovit paracetamolski antidot čak i kod uznapredovalih oštećenja uzrokovanih aplikacijom prekomjerne doze paracetamola (67).

Kombinirana gastrointestinalna, jetrena i moždana toksičnost inducirana diklofenakom u štakora dovela je do ozbiljnih želučanih, intestinalnih i jetrenih lezija s povišenim serumskim vrijednostima bilirubina, AST-a i ALT-a te hepatičkom komom. BPC 157 bio je i ovdje vrlo učinkovit, djelujući kao antidot diklofenaku (62). Kod akutnog pankreatitisa, pokazan je pozitivan utjecaj BPC-a 157 na razvoj želučanih i duodenalnih lezija kod štakora s ligaturom žučovoda u predtretmanu i posttretmanu (68).

S obzirom na sve gore navedeno, pokazano je da pentadekapeptid BPC 157 pozitivno djeluje na mnoge organske sustave. Djelovanje BPC 157 na sluznicu maternice još nije pokazano te stoga ova disertacija to prvi puta prikazuje.

1.2.4. Sustav dušik oksida

Dušik oksid se stvara u tkivima iz L-arginina putem dušik oksid sintetaze (NOS). Postoje tri izoforme dušik oksidaze: neuronalna (nNOS), endotelijalna (eNOS) i inducibilna (iNOS). eNOS primarno je smještena na membrani endotelnih stanica krvnih žila te u trombocitima i nekim živčanim stanicama mozga. nNOS primarno je smještena u citosolu živčanih stanica središnjeg i perifernog živčanog sustava. iNOS sintetiziraju makrofazi i leukociti aktivirani vanjskim čimbenicima, kao što su endoksini bakterija, medijatori upale i različiti citokini. nNOS i eNOS su odgovorne za sintezu NO u fiziološkim uvjetima, dok je iNOS odgovorna za sintezu NO u patofiziološkim stanjima poput upale (69, 70).

NO se može stvarati i neovisno o NOS, npr. putem ksantin oksidaze u hipoksičnim uvjetima redukcijom nitrata (NO_3^-) u nitrite (NO_2^-), zatim unosom nitrata hranom, redukcijom u usnoj šupljini putem bakterijske reduktaze, te na kraju, anaerobne bakterije stvaraju NO u crijevima koristeći nitrite i nitrate kao supstrat. L-NAME inhibira NOS, dok je supstrat NOS-a, L-arginin (71).

Pokazano je da NO ima ključnu ulogu u brojnim fiziološkim, ali i patološkim procesima. Kontinuirano stvaranje NO-a u endotelnim stanicama krvnih žila dovodi do relaksacije glatkih mišićnih stanica stjenke krvnih žila i vazodilatacije te se NO smatra jednim od najvažnijih regulatora tonusa krvnih žila (72).

Također je pokazano da NO inhibira agregaciju trombocita te i na taj način sudjeluje u regulaciji protoka krvi (73). Nadalje, dušikov monoksid je važan neurotransmiter u perifernom živčanom sustavu. Nalazimo ga u živcima gastrointestinalnog i urogenitalnog sustava gdje sudjeluje u regulaciji motiliteta. U središnjem živčanom sustavu NO također ima ulogu neurotransmitera te sudjeluje u procesima pamćenja i regulacije boli (74).

Aktivacija imunskog sustava, posebno makrofaga, za posljedicu ima stvaranje velikih količina NO-a nužnog za obranu organizma od različitih patogenih uzročnika. Također je potrebno istaknuti središnju ulogu dušikova oksida u septičkom šoku, a ne treba zaboraviti ni ulogu NO-a, odnosno njegovih metabolita kao slobodnih radikala (75, 76).

U trudnoći je NO važan za inhibiciju kontraktilnosti mišića maternice, regulaciju protoka krvi kroz posteljicu kao i protoka krvi fetusa (77).

NOS je opisana u endometriju brojnih vrsta, sugerirajući da NO može biti uključen u funkciju endometrija. U ljudskom endometriju, eNOS i iNOS su nađeni u žljezdanom epitelu sluznice maternice. Smatra se da NO sudjeluje u pokretanju i kontroli menstrualnog krvarenja. Nadalje, NO igra važnu ulogu u inhibiciji agregacije trombocita u endometriju za vrijeme menstrualne hemostaze. NO u maternici može smanjiti miometrijsku kontraktilnost (78).

Hipoteza, da BPC 157 (budući da se konstitutivno stvara u želučanoj sluznici, da je stabilan u želučanom soku), ima jedan široki učinak, da uspješno kompetira i s analogima L-argininina (npr. L-NAME) i s L-argininom i da taj učinak ima određeno fiziološko značenje (stvaranje NO-a), kasnije je praktički potvrđena. Njegovi dobrobitni učinci koji ilustriraju međusobnu povezanost (s primjenom L-arginin/L-NAME, samostalno ili zajedno) potvrđeni su u želučanoj sluznici i protekciji mukoze nakon alkoholnih lezija i kod regulacije krvnog tlaka (4), kod kardiovaskularnih poremećaja i kroničnom srčanom zatajenju (79), plućnoj hipertenziji (80), aritmijama (81), kod poremećaja nakon hipokalemije (82) i hiperkalijemije (83) i konačno u kompleksnoj nemogućnosti cijeljenja, dokazanoj s cijeljenjem fistula, kolokutane (5) i ezofagokutane (84). Ostaje, međutim, za pokazati kako prednost potencijalne modulacije NO-sustava (primjerice, učinak na eNOS-gen) može biti prebačena u kliničku primjenu.

2.0. Hipoteza

Cisteamin izaziva oštećenje stijenka maternice, a BPC 157 primijenjen parenteralno i peroralno inhibira nastajanje lezija i ubrzava cijeljenje već postojećih, što je posredovano NO-sustavom.

3.0. Ciljevi rada

3.1. Opći cilj

Pokazati da cisteamin oštećuje stijenku maternice i da BPC 157 inhibira nastajanje tih lezija i ubrzava cijeljenje već postojećih. Pokazati da taj učinak zavisi o NO-sustavu.

3.2. Specifični ciljevi

Pokazati da BPC 157 ovisno o dozi spriječava oštećenje stijenke maternice. Pokazati učinak primjene blokade NO-sintetaze primjenom L-NAME te učinak primjene substrata za NO-sintetazu, L-arginina. Pokazati međudjelovanje L-NAME i/ili L-arginina s pentadekapeptidom BPC 157.

4.0. Materijali i metode

4.1. Eksperimentalne životinje

Ovo istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Provedeno je na 225 ženki Wistar soja štakora, tjelesne mase 200-220g (vidi Tablicu 3). Životinje su bile smještene u vivarij, dobivale su vodu i hranu ad libitum, u kontroliranim laboratrijskim uvjetima temperature i vlažnosti zraka te 12-satnim ciklusom svjetla i tame. Prije pokusa životinje su bile usklađene u menstrualnom ciklusu (diestrus) te randomizirane u skupine po pet životinja.

Tablica 3. Prikaz životinja po skupinama. Svaka grupa od pet životinja je dobila cisteamin u oba roga uterusa. Nakon toga svaka pojedina grupa je dobila određenu medikamentoznu terapiju navedenu u tablici. Učinak se utvrđivao nakon dva sata, tri i sedam dana.

	MEDIKACIJA	Utvrđivanje učinka nakon žrtvovanja		
		2h	3d	7d
CISTEAMIN 40mg/0,5ml/rog maternice	0,9%NaCl 5ml/kg ip	5	5	5
	BPC 157 10 µg/kg ip	5	5	5
	BPC 157 10 ng/kg ip	5	5	5
	12ml/štakor/dan H2O po	5	5	5
	BPC 157 10 µg/kg po	5	5	5
	BPC 157 10 ng/kg po	5	5	5
	L-NAME 5mg/kg ip	5	5	5
	L-arginin 100mg/kg ip	5	5	5
	L-NAME 5mg/kg ip+ L-arginin 100 mg/kg ip	5	5	5

	L-NAME 5mg/kg ip+ BPC 157 10 µg/kg ip	5	5	5
	L-arginin 100mg/kg ip+ BPC 157 10 µg/kg ip	5	5	5
	L-NAME 5mg/kg ip+ L-arginin 100 mg/kg ip + BPC 157 10 µg/kg ip	5	5	5
		0,9%NaCl 5ml/kg ip	5	5
		BPC 157 10 µg/kg ip	5	5
		BPC 157 10 ng/kg ip	5	5
		12ml/štakor /dan H2Opo	5	5
		BPC 157 10 µg/kg po	5	5
		BPC 157 10 ng/kg po	5	5

4.2. Lijekovi

U istraživanju su se koristili pentadekapeptid 157 (GEPPPGKPADDAGLV)(Diagen, Ljubljana, Slovenija) 99% (HPLC) čistoće, otopljen u fiziološkoj otopini NaCl, prema ranije etabliranim protokolima. Pentadekapeptid BPC 157 je aktivni dio proteina BPC 157 primarno izoliranog iz ljudskog želučanog soka, stabilan je otopljen u vodi i u fiziološkoj otopini pri pH 7,0.

Koristili smo esencijalnu amonokiselinu L-arginin koja je prekursor NO-a, te NG-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME), inhibitor sinteze NO i cisteamin. Sve supstance kupljene su kod Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA).

U cijelom eksperimentu za uvođenje životinja u opću anesteziju koristili smo ketamin (Ketamine 0,5-4mg/kg i.p., Ketanest, Parke-Davis GmbH, Berlin, Njemačka) te diazepam (Normabel 0,04-0,2mg/kg i.p., Belupo, Ludbreg, Hrvatska). Kontrolne skupine tretirali smo fiziološkom otopinom (5ml/kg), primijenjenom intraperitonealno te u drugoj skupini peroralno. Postoperacijska analgezija provodila se primjenom ketoprofena 5mg/kg s.c., najmanje jednom dnevno, a prema potrebi i više puta dnevno. Po isteku pojedinog eksperimentalnog perioda životinje su se žrtvovala, prema utvrđenim standardima sukladno odredbama Etičkog kodeksa o laboratorijskim životinjama, Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06), Zakonom o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN37/13) kao i Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13).

4.3. Eksperimentalni protokol

U kratkotrajnoj općoj anesteziji (ketamin 20mg/kg i.p.), uz premedikaciju diazepamom (Apaurin 6mg/kg i.p.), nakon brijanja, pranja i dezinfekcije kože trbuha 10-postotnom otopinom povidon jodida (Betadine; Purdue Frederick, Norwalk, CT, USA), medijalnim uzdužnim rezom oko tri centimetra otvorili smo trbušnu šupljinu. Prikazali smo maternicu te smo cisteamin primjenili u proksimalne dijelove oba roga maternice, u dozi od 400mg/kg, tj. 40mg u volumenu od 0,5ml destilirane vode u svaki od dva roga maternice.

Po zahvatu životinje su grijane, promatrane i prevrtane od strane na stranu dok ne uspostave stabilnu sternalnu rekumbenciju, kada su vraćene u vivarij. Hranu i vodu dobivale su ad libitum. Jednom dnevno životinje su bile analgizirane (ketoprofen, Knavon, Belupo, Hrvatska; 5mg/kg s.c.). Medikacija je uključivala pentadekapeptid BPC 157 10 μ g/kg i 10 ng/kg po danu i to i.p., 1xdan, odnosno u pijućoj vodi, peroralno (12ml/štakor/dan; 0,16 μ g/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg, i.p., 1xdan, L-arginin 100mg/kg, i.p., 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) intraperitonealno, ili samo pijuću vodu (12ml/dan). Primjena BPC 157 je bila neposredno nakon cisteamina ili kod već formiranih lezija nakon dva sata, a L-NAME i L-arginin je davan neposredno nakon cisteamina. Zadnja doza BPC 157 je bila 24 sata prije žrtvovanja. Doze i način primjene su odabrane shodno prethodnim radovima (4).

Životinje su bile žrtvovane nakon dva sata, tri dana i sedam dana po primjeni cisteamina. Učinila se relaparotomija na mjestu ožiljka, otvorila se trbušna šupljina te je prikazana maternica. Nakon toga je maternice u cijelosti odstranjena, a učinak se utvrđivao makroskopski i mikroskopski.

4.4. Makroskopija

Nakon žrtvovanja životinja učinili smo evaluaciju makroskopskih lezija. Procijenjivali smo oštećenje stijenke maternice temeljem intenziteta krvarenja i postotaka površine zahvaćene krvarenjem. Intenzitet krvarenja smo procijenjivali semikvantitativno (0-nema, 1-slabo, 2-srednje i 3-jako), a krvarenjem zahvaćenu površinu smo prikazali kao postotak površine zahvaćene krvarenjem u odnosu na ukupnu površinu maternice oba roga.

4.5. Histološka analiza

Za histološku analizu maternicu smo fiksirali u cijelosti, rastegnuli na stiroporskoj podlozi u 10% neutralnom formalinu. Vrijeme fiksacije je bilo između 24 i 48 sati. Nakon toga smo preuzeli po tri poluserijska poprečna uzorka iz područja makroskopski vidljivog krvarenja, a u slučaju kad nije bilo makroskopski vidljivih promjena, tri poluserijska uzorka u razmacima od 1 cm. Uzorci su standardnim postupcima uklopljeni u parafin, rezani i bojani hemalaon-eozinom.

Histološki se procijenjivalo: a) stupanj nekroze stijenke maternice (0 - nema, 1 - $\leq 1/2$ debljine stijenke maternice, 2 - $\geq 1/2$ debljina stijenke maternice); b) stupanj regeneracije (0 - nema, 1 - fokalno $\leq 1/2$ debljine, 2 - cirkumferencija $\leq 1/2$ debljine, 3 - fokalno $\geq 1/2$ debljine, 4 - cirkumferencija $\geq 1/2$ debljine). Za analizu se koristio program ISSA-VAMSTEC Software Company-Zagreb.

4.6. Statistička analiza

Za statističku analizu koristio se program Statistica 7.0., StatSoft Inc.Tulsa, Oklahoma, USA. Rezultati su testirani na normalnost distribucije Kolmogorov Smirnov testovima, a ovisno o rezultatima distribucije, koristili su se parametrijski testovi ANOVA te post hoc Newman Keuls test ili neparametrijski testovi Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U test. Za usporedbu frekvencija korišten je Fisherov test, a rezultati su prezentirani kao minimum, medijan i maksimum (Min/Med/Maks), tablično i grafički. Statistička značajnost se smatrala kada je $p < 0,05$.

5.0. Rezultati

5.1. Rana primjena terapije

5.1.1. Oštećenje stijenke maternice cisteaminom-makroskopske promjene

Cisteamin izaziva oštećenje stijenke maternice (Slika 2 i 3), a primjena pentadekapeptida BPC 157 potiče i ubrzava regeneraciju sluznice maternice prema svim analiziranim parametrima (Slika 4 i 5). Primjena cisteamina u svaki rog maternice (40mg/0,5ml/rog maternice) uzrokuje teške lezije stijenke maternice.

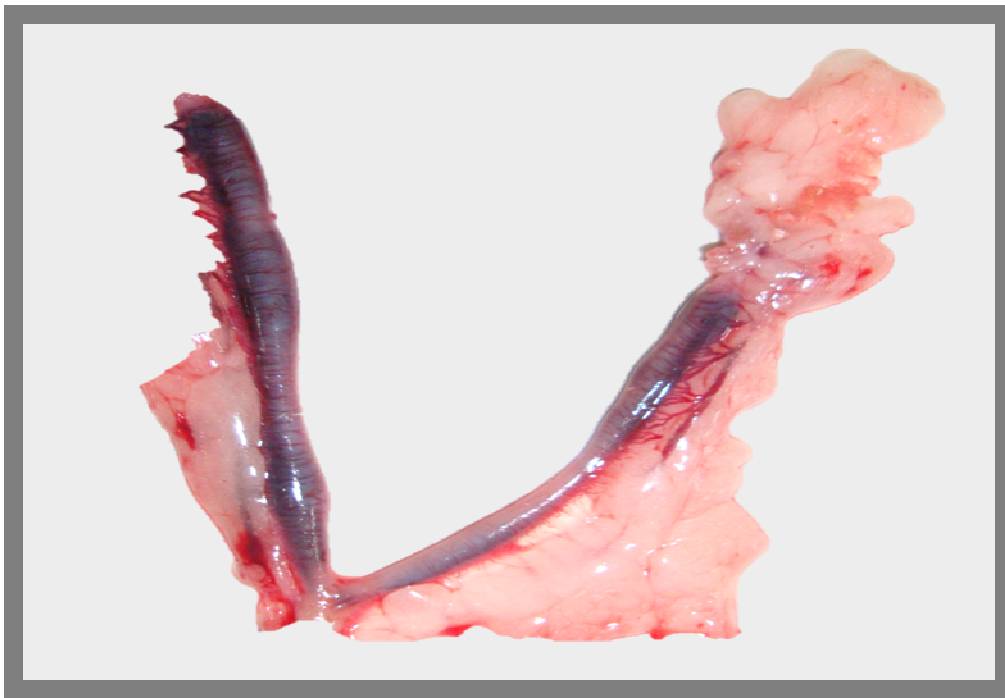
Procijenjivali smo oštećenje stijenke maternice temeljem postotka površine zahvaćene krvarenjem i intenziteta krvarenja. Krvarenjem zahvaćenu površinu smo prikazali kao postotak površine zahvaćene krvarenjem u odnosu na ukupnu površinu maternice oba roga (Slika 7-9), a intenzitet krvarenja (Slika 10-12) smo procijenili semikvantitativno (0-nema, 1-slabo, 2-srednje i 3-jako).

Kod životinja koje su uz cisteamin (40mg/0,5/rog maternice) primale fiziološku otopinu (0,9% NaCl), 5 ml/kg, intraperitonealno ili samo pijuću vodu, krvarenje stijenke maternice je bilo vidljivo 2 sata po primjeni cisteamina uz jaki intenzitet krvarenja. U životinja u kojih je proveden tretman pentadekapeptidom BPC 157, statistički je značajno manja površina zahvaćena krvarenjem, a prikazali smo je kao postotak površine zahvaćene krvarenjem u odnosu na ukupnu površinu maternice oba roga, a intenzitet krvarenja je slabiji u svim ispitivanim vremenskim intervalima i u svim dozama.

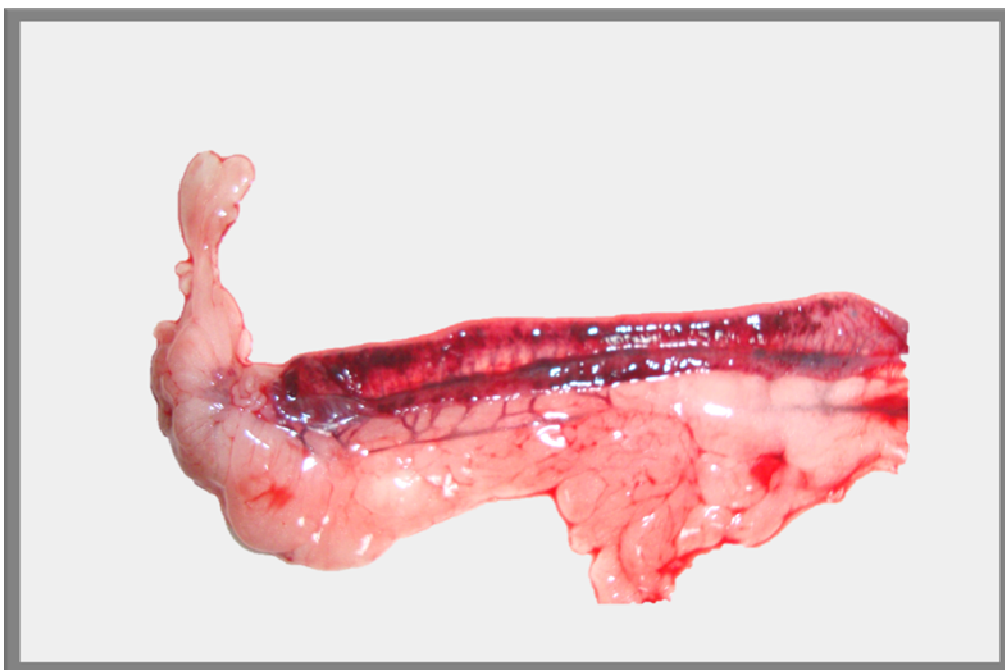
Dodavanjem L-NAME dobili smo lezije koje su odgovarale lezijama kao kod kontrolnih životinja. Međutim, ako L-NAME damo u kombinaciji s BPC 157, pozitivan učinak BPC 157 je i dalje prisutan (Slike 7-12).

Ako smo životinje tretirali s L-argininom, dobili smo protektivni učinak, odnosno površina krvarenja je statistički manja, kao i intenzitet krvarenja (Slike 7-12). Ako L-arginin damo sa BPC 157, lezije su bile jednake kao i kod životinja koje su tretirane samo s BPC 157 (Slike 7-12).

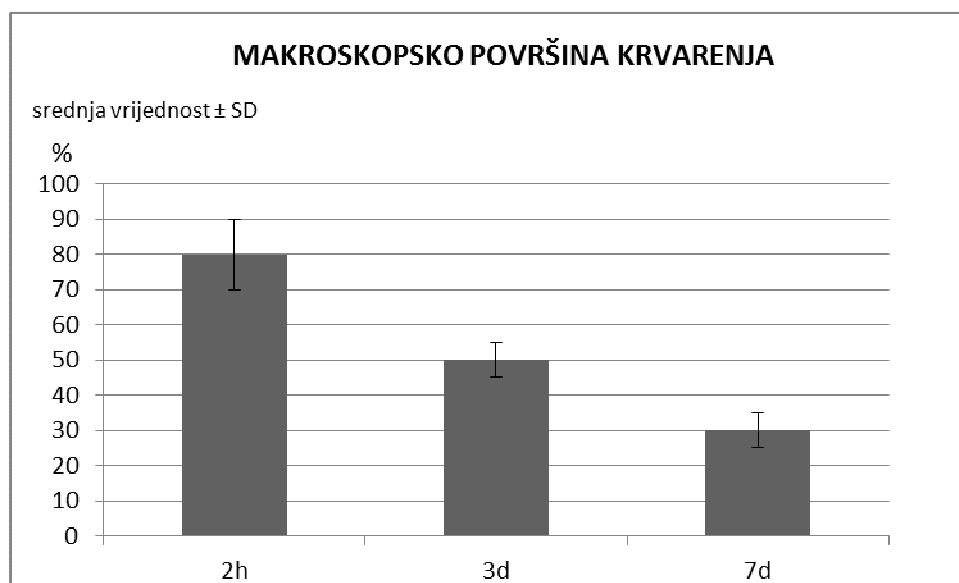
Kombinacijom L-NAME i L-arginina dobili smo lezije kao i kod kontrolnih životinja. Ako smo L-NAME i L-arginin kombinirali s BPC 157, protektivni učinak BPC 157 je bio prisutan.



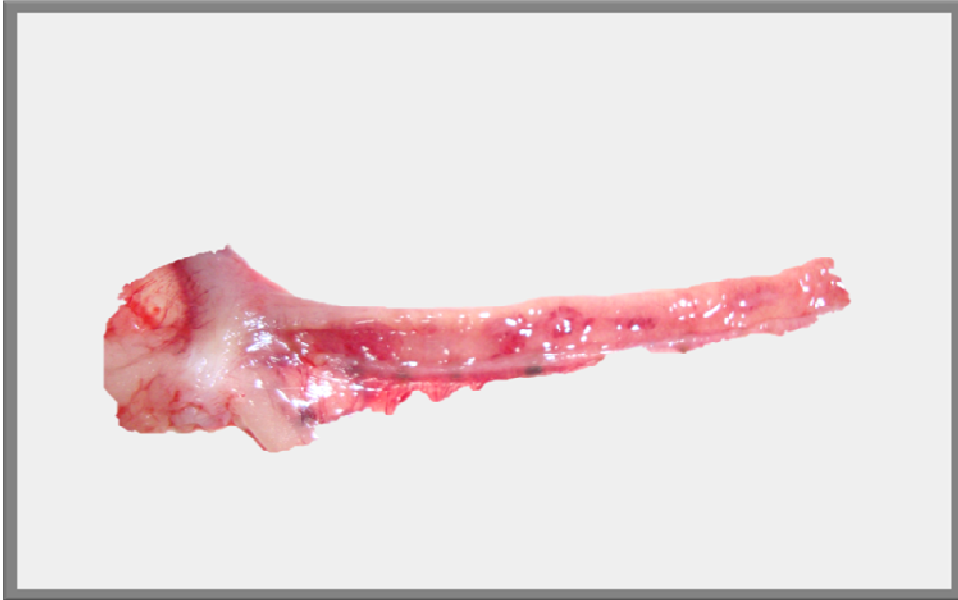
Slika 2. Maternica štakora (oba roga). Makroskopska slika krvarenja maternice u kontrolnih štakora nakon dva sata od primjene cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice).



Slika 3. Maternica štakora (jedan rog). Makroskopska slika krvarenja unutrašnjosti maternice u kontrolnih štakora nakon dva sata od primjene cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice).



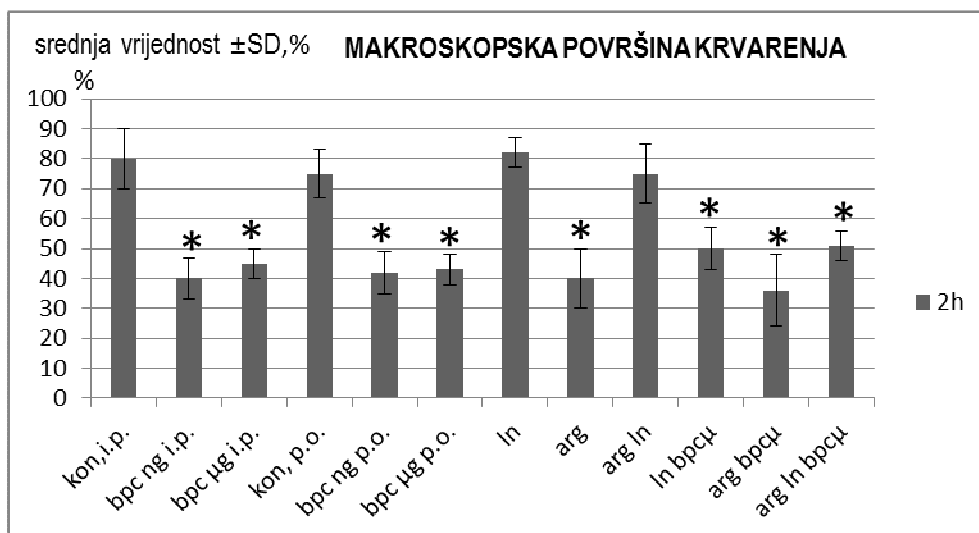
Slika 4. Postotak površine krvarenja stijenke maternice (n=5, srednja vrijednost±SD, %) nakon dva sata, tri dana i sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice) kod kontrolnih životinja. Vidi se signifikantno smanjivanje lezija ($p<0,05$).



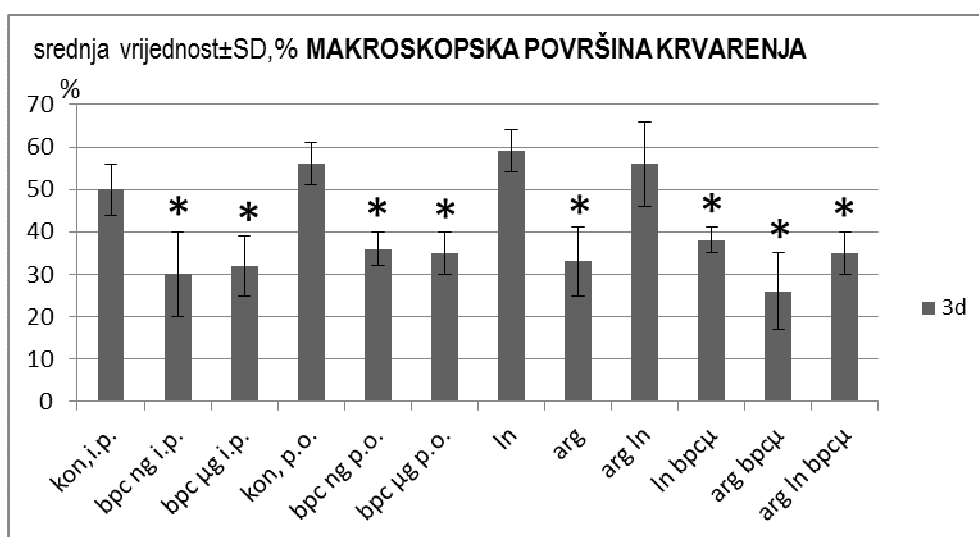
Slika 5. Maternica štakora (unutrašnja strana jednog roga) nakon dva sata od primjene cisteamina u rog maternice (40mg/0,5 ml/rog maternice) i primjene BPC 157 (10 μ g/kg, i.p.). Jasno se pokazuje protektivni učinak BPC 157 na sluznicu maternice.



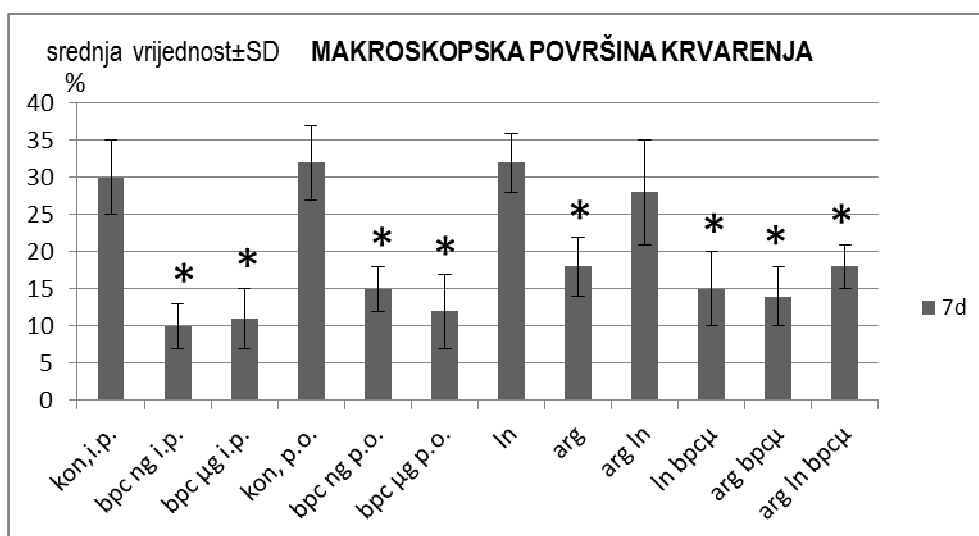
Slika 6. Maternica štakora nakon tri dana od primjene cisteamina u oba roga maternice (40 mg/0,5 ml/rog maternice) i primjene BPC 157 (10 μ g/kg, i.p.). Jasno je vidljiv protektivni učinak BPC 157 na oba roga maternice.



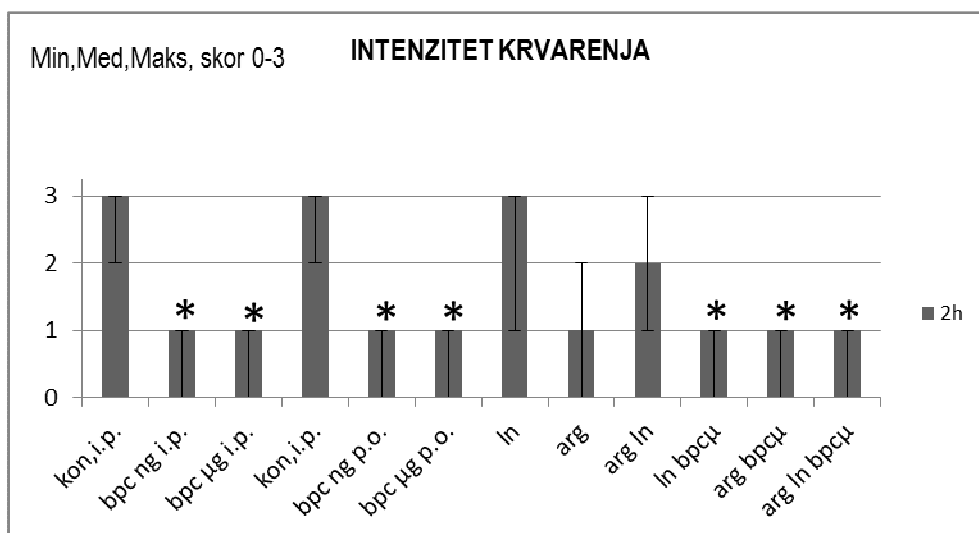
Slika 7. Postotak površine krvarenja stijenke maternice (n=5, srednja vrijednost \pm SD, %) nakon dva sata po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rogmaternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10 μ g/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16 μ g/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



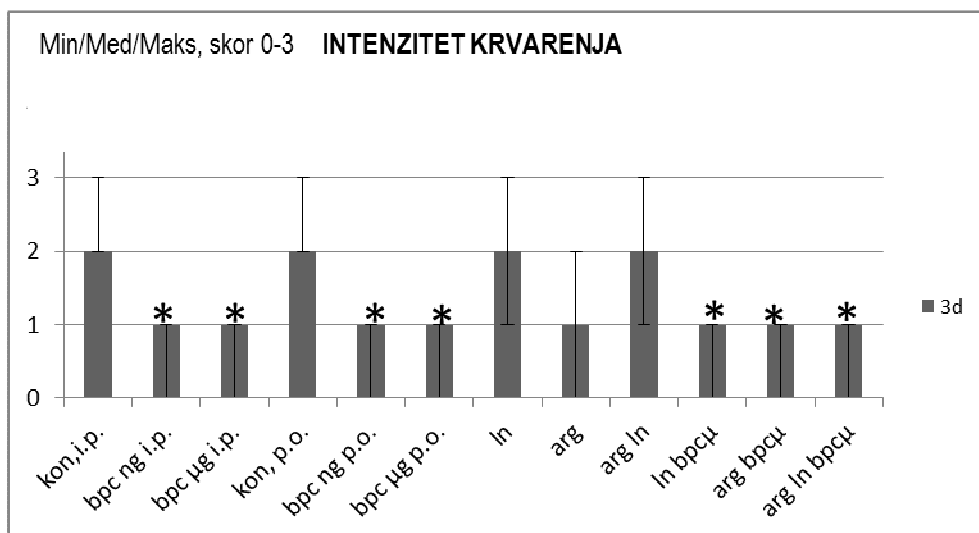
Slika 8. Postotak površine krvarenja stijenke maternice (n=5, srednja vrijednost \pm SD, %) nakon dva sata po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10 μ g/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16 μ g/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



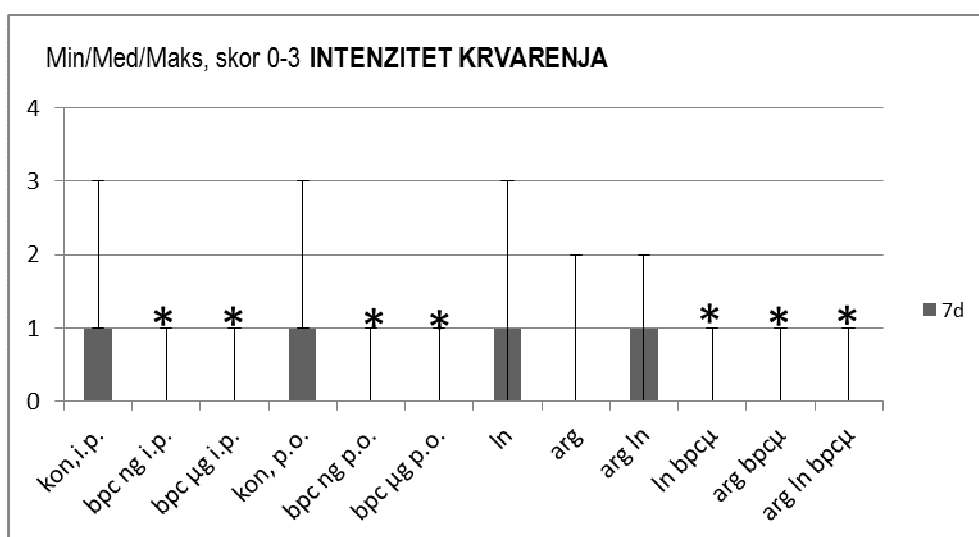
Slika 9. Postotak površine krvarenja stijenke maternice (n=5, srednja vrijednost±SD, %) nakon dva sata po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 10. Intenzitet krvarenja stijenke maternice, skor 0-3, Min/Med/Maks, nakon dva sata po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 11. Intenzitet krvarenja stijenke maternice, skor 0-3, Min/Med/Maks, nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 12. Intenzitet krvarenja stijenke maternice, skor 0-3, Min/Med/Maks, nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

5.1.2. Mikroskopska analiza rezultata

Histološki smo procijenjivali: a) stupanj nekroze stijenke maternice (0 - nema, 1 - $\leq 1/2$ debljine stijenke maternice, 2 - $\geq 1/2$ debljina stijenke maternice); b) stupanj regeneracije (0 - nema, 1 - fokalno $\leq 1/2$ debljine, 2 - cirkumferencija $\leq 1/2$ debljine, 3 - fokalno $\geq 1/2$ debljine, 4 - cirkumferencija $\geq 1/2$ debljine) (Slike 13-21).

Primjena cisteamina u dozi od 40mg/0,5ml/rog maternice stvara nekrozu stijenke maternice (Slike 13, 15, 17, 18, 19). Pojavu nekroze dokazali smo dva sata nakon primjene cisteamina i zahvaćala je više od polovice stijenke maternice.

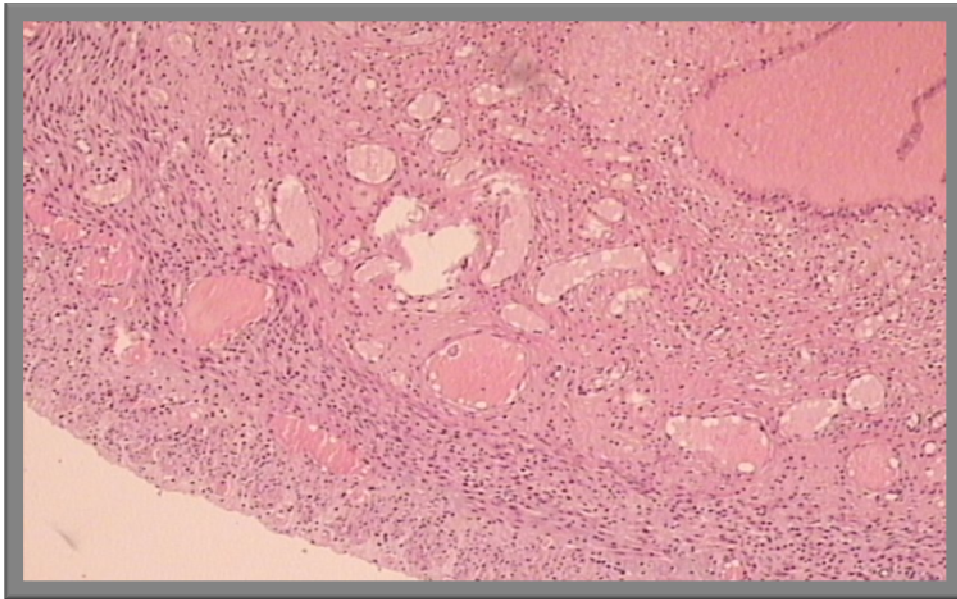
U životinja u kojih je proveden tretman pentadekapeptidom BPC 157, nekroza zahvaća manje od polovice stijenke maternice nakon dva sata (Slike 14, 16, 17, 18, 19). Nakon sedam dana u najduljem ispitivanom vremenskom intervalu nekroza se više ne nalazi.

Dodavanjem L-NAME dobili smo nekrozu u više od polovice stijenke maternice, kao kod kontrolnih životinja. Međutim, ako L-NAME dodamo sa BPC 157, pozitivan učinak istog je i dalje prisutan (Slike 17-19).

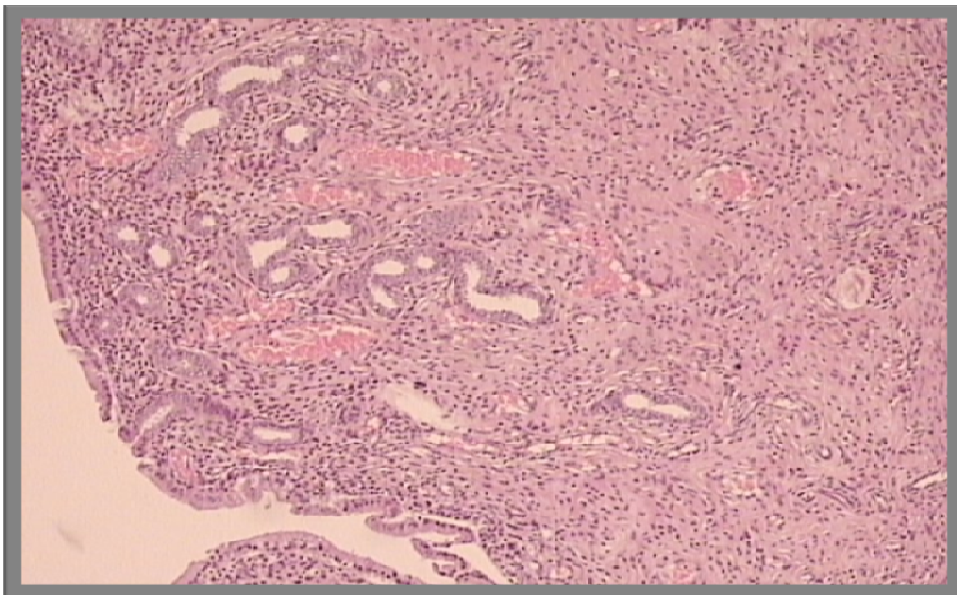
Ako životinje tretiramo L-argininom, dobili smo protektivni učinak, odnosno nekroza je zahvaćala manje od polovice stijenke maternice. Ako L-arginin damo sa BPC 157, učinak je isti kao i kod životinja koje su tretirane samo s BPC 157 (Slike 17-19).

Kombinacijom L-NAME i L-arginina nekroza je bila prisutna u više od polovice stijenke maternice kao kod kontrolnih životinja. Ako smo L-NAME i L-arginin dali sa BPC 157, protektivni učinak istog je bio prisutan (Slike 17-19).

Primjena pentadekapeptida BPC 157 potiče i ubrzava regeneraciju sluznice maternice uzrokovanu cisteaminom (Slike 20 i 21). Regeneracija se nalazi u potpunosti kod tretiranih životinja s BPC 157 u najdužem ispitivanom razdoblju, nakon sedam dana.

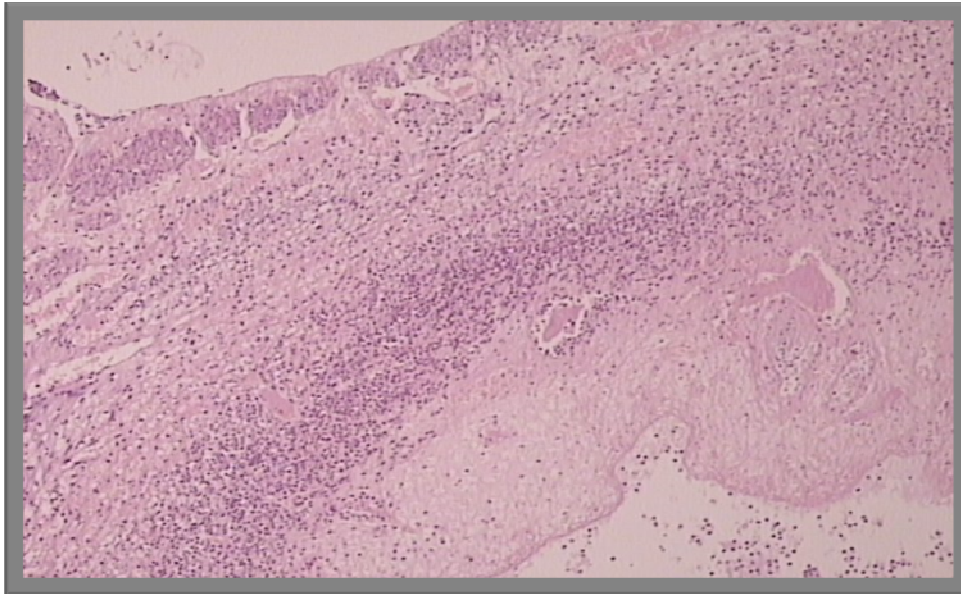


Slika 13. Mikroskopski prikaz lezija maternice induciranih cisteaminom nakon dva sata kod kontrolnih životinja. Poprečni presjek maternice sa žarištima nekroze i krvarenja u stijenci maternice, vide se zastoje krvne žile u svim slojevima stijenke (Olympus BX 50, povećanja 10x).

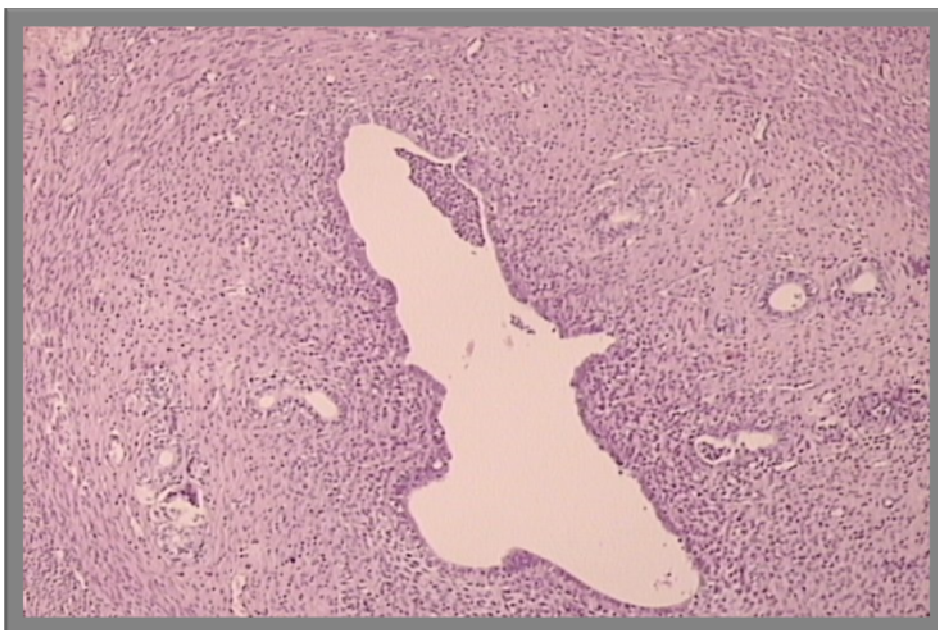


Slika 14. Mikroskopski prikaz protektivnog učinak BPC157 nakon dva sata po primjeni cisteamina. Poprečni presjek maternice s urednim površinskim epitelom endometrija i

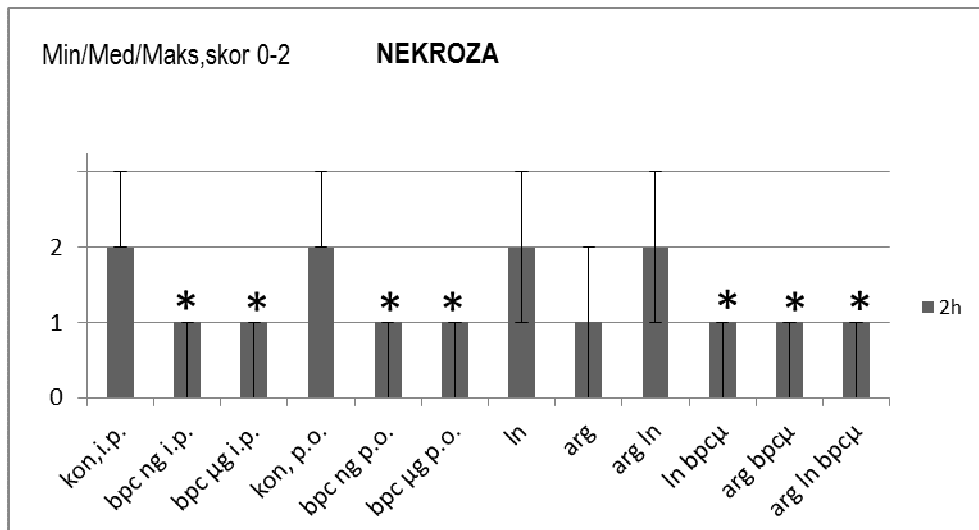
endometralnim žlijezdama, nema nekroze ni krvarenja uz blagi zastoj u krvnim žilama (Olympus BX 50, povećanje 10x).



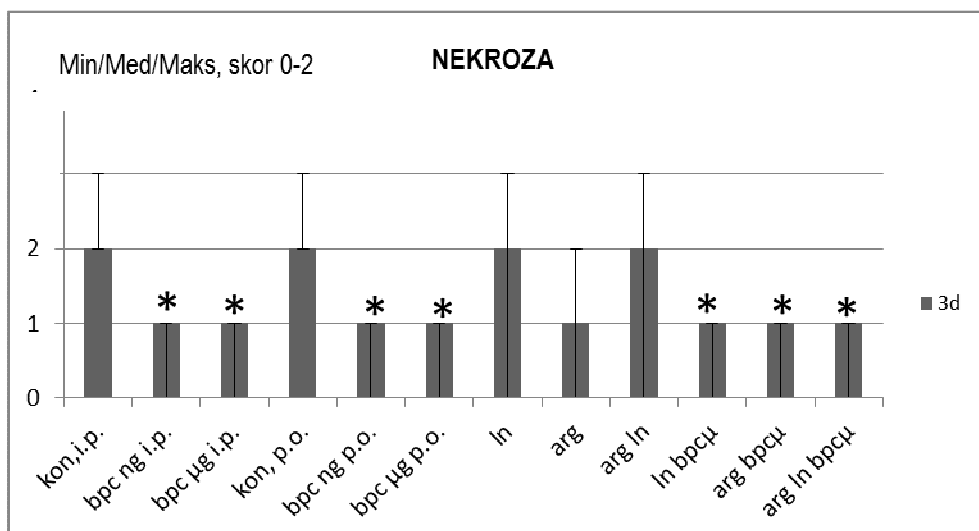
Slika 15. Mikroskopski prikaz lezija maternice induciranih cisteaminom nakon tri dana kod kontrolnih životinja. Poprečni presjek maternice, nekroza i krvarenje zauzimaju nešto više od polovice debljine stijenke, tj. cijeli endometrij uz dio miometrija, a prisutna je i transmuralna upala s mješanim dominantno polimorfonuklearnim upalnim infiltratom (Olympus BX 50, povećanje 20x).



Slika 16. Mikroskopski prikaz protektivnog učinak BPC157 nakon primjene cisteamina nakon tri dana. Poprečni presjek maternice s urednim površinskim epitelom endometrija i urednim endometralnim žlijezdama, nema nekroze ni krvarenja (Olympus BX 50, povećanje 20x)

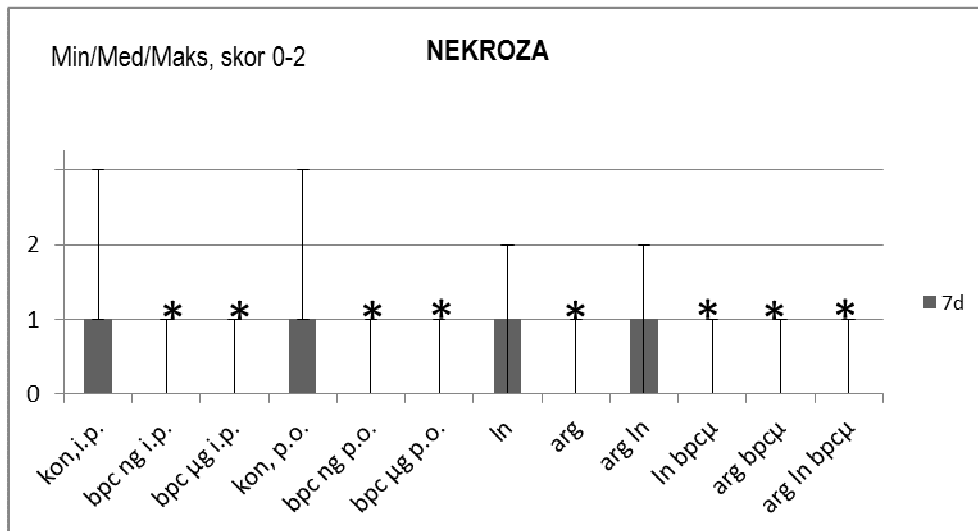


Slika 17. Nekroza stijenke maternice, skor 0-2, Min/Med/Maks, nakon dva sata po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

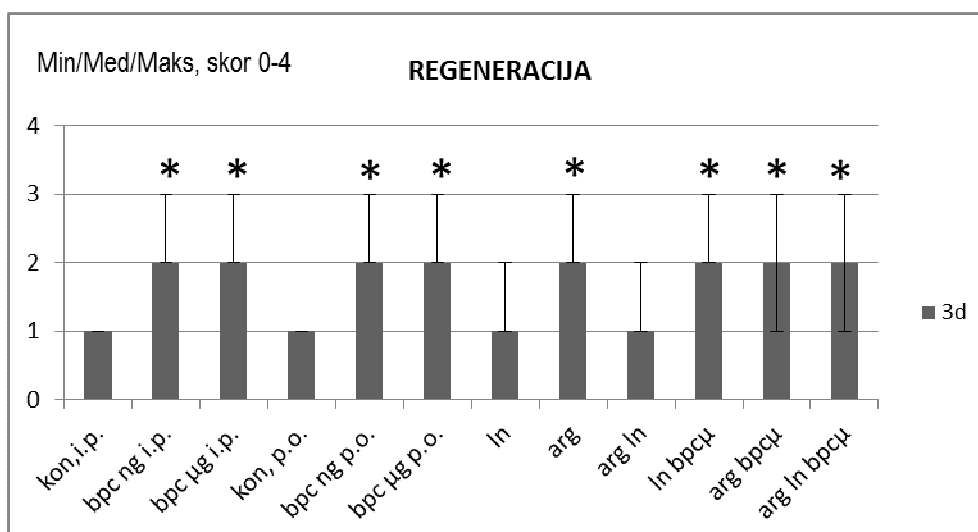


Slika 18. Nekroza stijenke maternice, skor 0-2, Min/Med/Maks, nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan;

0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

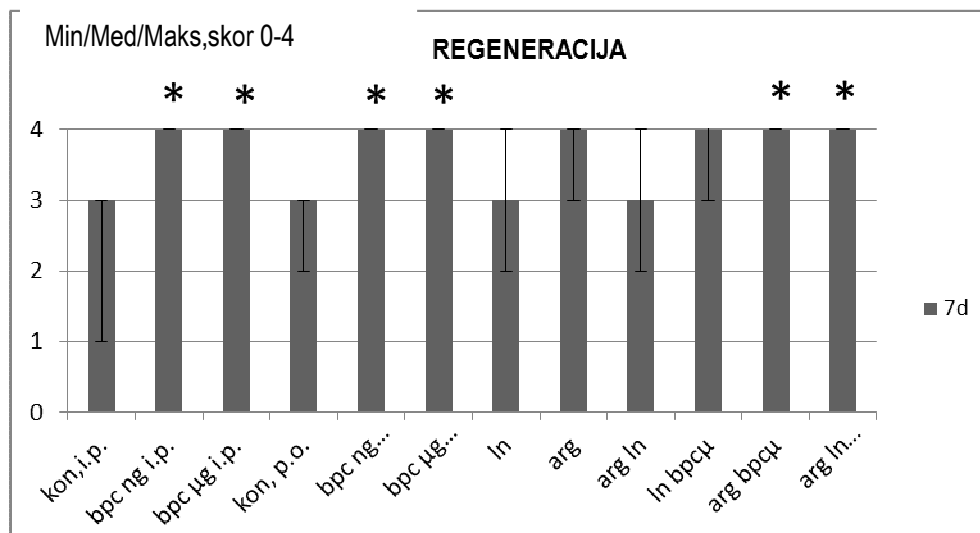


Slika 19. Nekroza stijenke maternice, skor 0-2, Min/Med/Maks, nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 20. Regeneracija sluznice maternice, skor 0-4, Min/Med/Maks, nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan,

primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



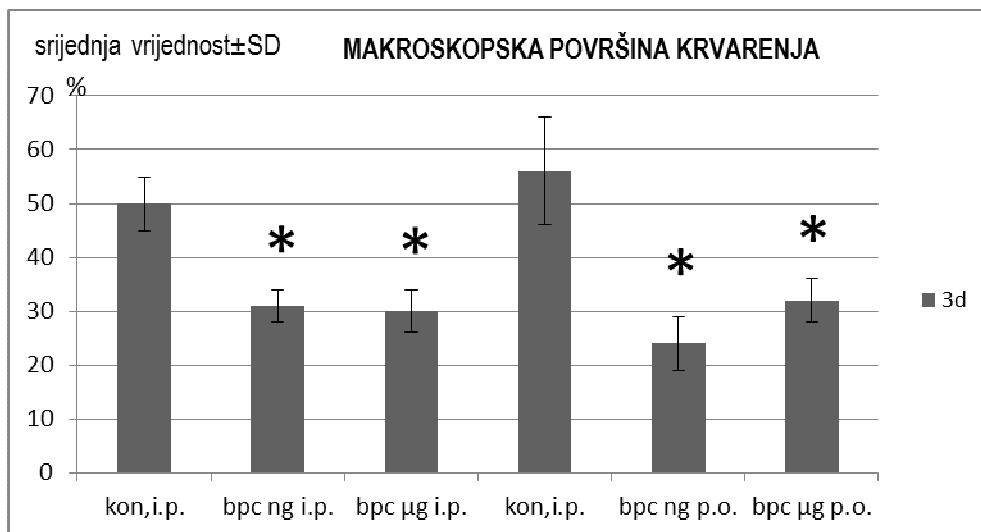
Slika 21. Regeneracija stijenke maternice, skor 0-4, Min/Med/Maks, nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice). Neposredno nakon cisteamina daje se BPC 157, 10µg/kg ili 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p. ili u pijućoj vodi, peroralno, 12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p. 1xdan, L-arginin 100mg/kg i.p. 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p. 1xdan) ili samo pijuću vodu (12ml/štakor/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

5.2. Kasna primjena terapije

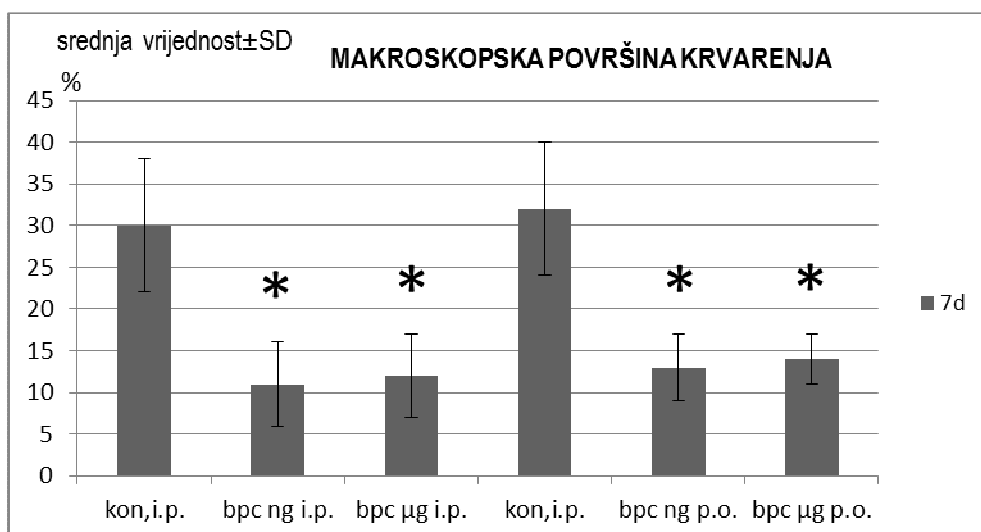
5.2.1. Makroskopska i mikroskopska analiza rezultata

Primjena BPC 157 dva sata nakon primjene cisteamina pokazuje učinkovitost tretmana BPC 157, jer je postotak veličine površine zahvaćene krvarenjem i intenzitet krvarenja statistički značajno manji nego kod kontrolnih životinja (Slike 22-25). Primjena cisteamina u dozi od 40mg/0,5 ml/rog maternice stvara nekrozu stijenke maternice (Slike 26 i 27). Nekroza nakon tri dana zahvaća više od polovice stijenke maternice. Međutim, nakon sedam dana počinje regeneracija sluznice maternice. U životinja u kojih je proveden tretman pentadekapeptidom BPC 157, nekroza zahvaća manje od polovice stijenke maternice i pokazuju tendenciju smanjivanja, sve do potpunog izostanka u najduljem ispitivanom vremenskom intervalu. Primjena pentadekapeptida BPC 157 potiče i ubrzava regeneraciju sluznice maternice nakon lezija uzrokovanih cisteaminom, prema svim analiziranim parametrima (Slike 28 i 29).

Regeneracija stijenke događa se postupno i u potpunosti se nalazi kod tretiranih životinja s BPC 157 u najdužem ispitivanom razdoblju, nakon sedam dana. Kod kontrolnih životinja regeneracija se događa sporije i nakon sedam dana zahvaća fokalno više od pola debljine stijenke maternice.

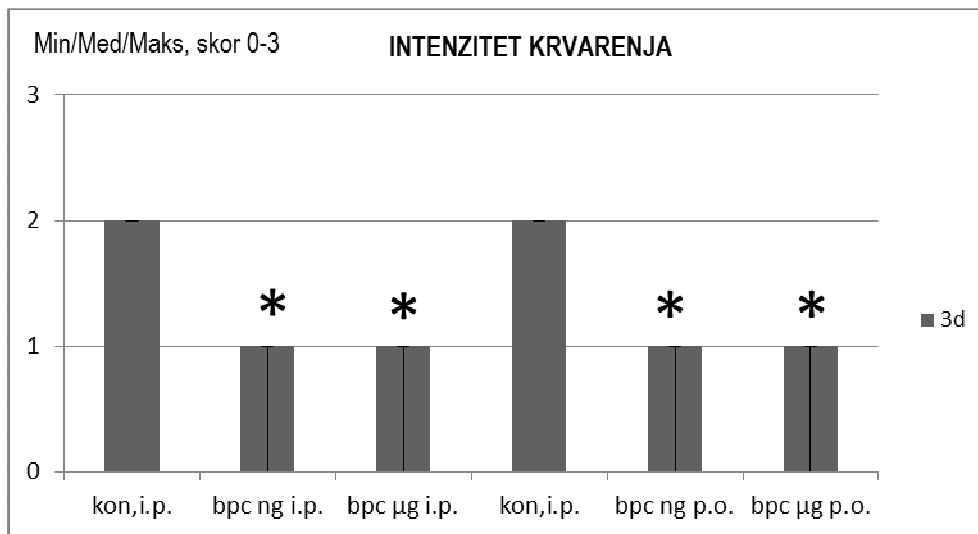


Slika 22. Postotak površine krvarenja stijenke maternice (n=5,srednja vrijednost±SD, %) nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

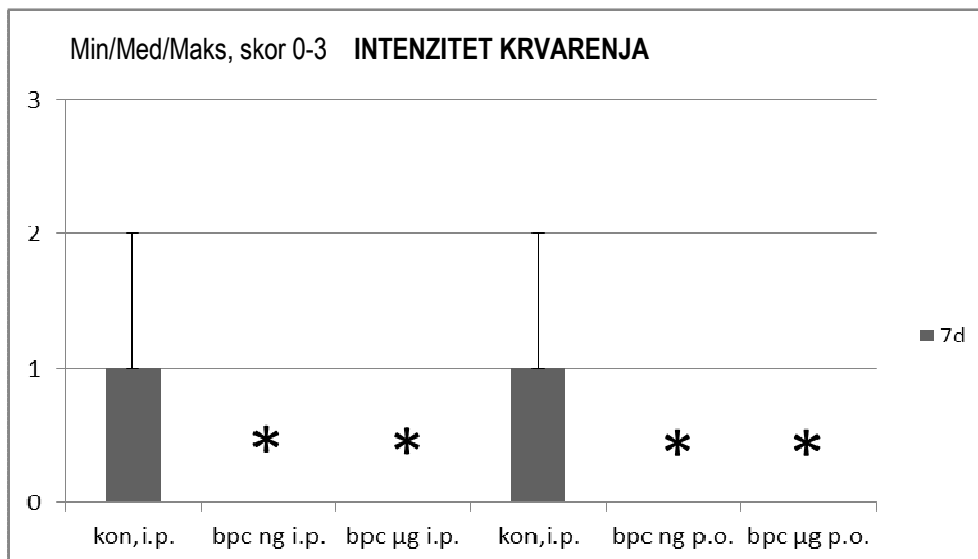


Slika 23. Postotak površine krvarenja stijenke maternice (n=5,srednja vrijednost±SD, %) nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje

su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan)
 *P<0,05, najmanje prema kontroli.

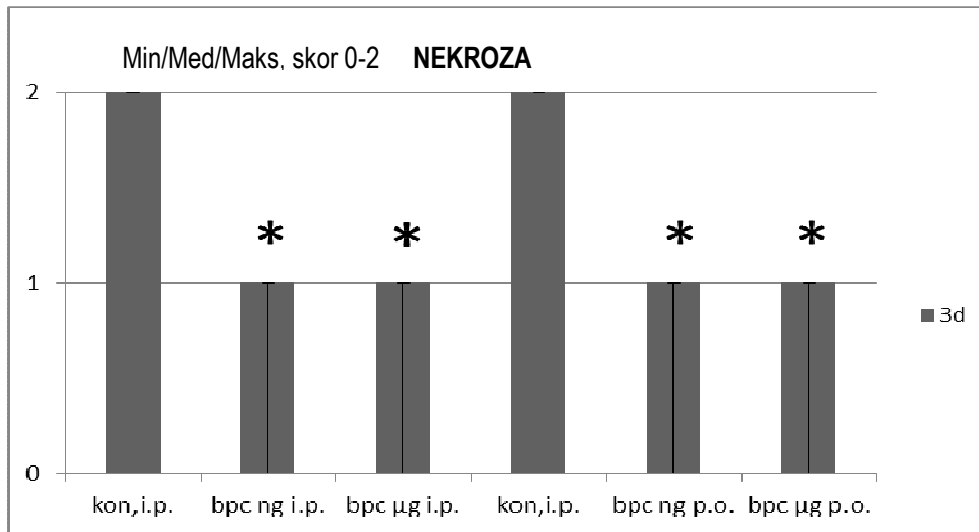


Slika 24. Intenzitet krvarenja stijenke maternice, skor 0-3, Min/Med/Maks, nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

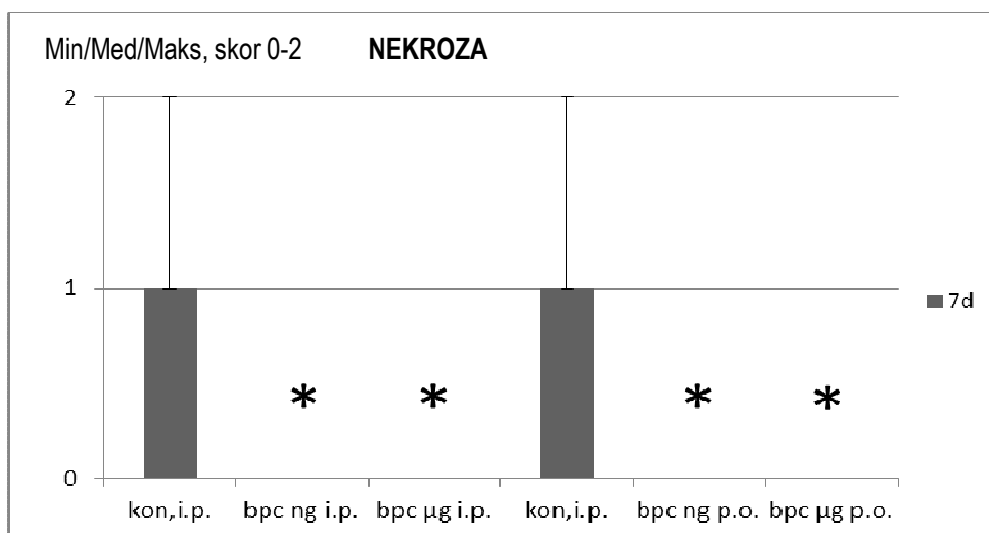


Slika 25. Intenzitet krvarenja stijenke maternice, skor 0-3, Min/Med/Maks, nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki

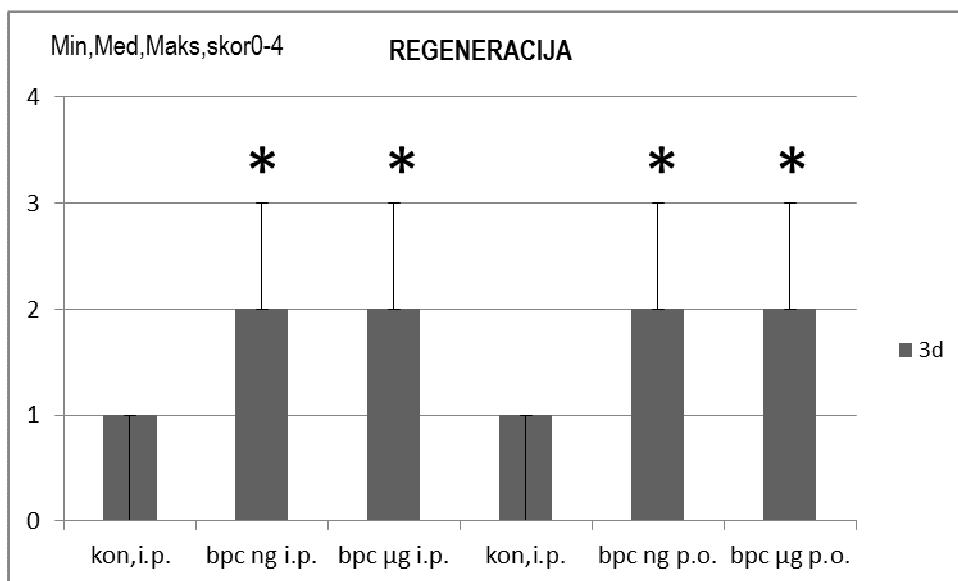
volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



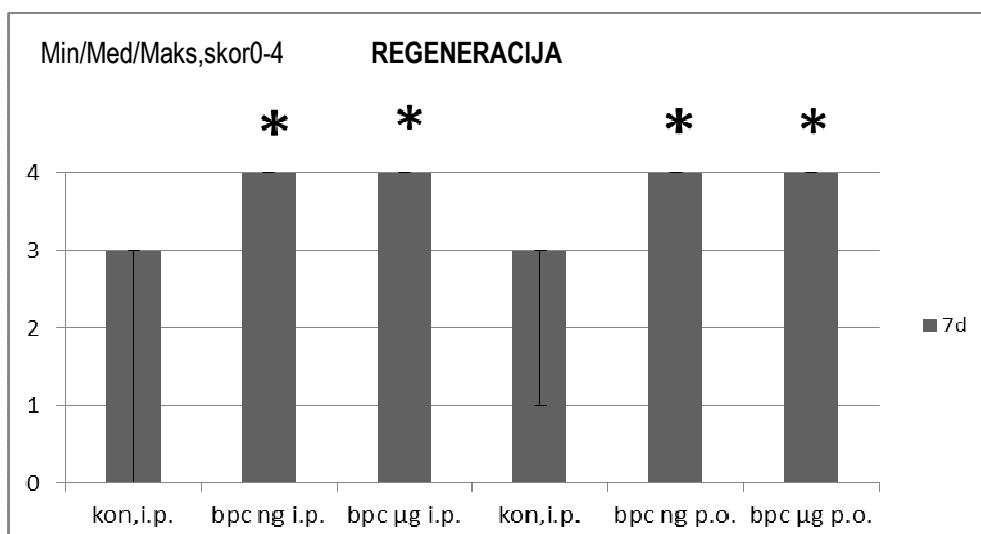
Slika 26. Nekroza stijenke maternice, skor 0-2, Min/Med/Maks, nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 27. Nekroza stijenke maternice, skor 0-2, Min/Med/Maks, nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 28. Regeneracija sluznice maternice, skor 0-4, Min/Med/Maks, nakon tri dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.



Slika 29. Regeneracija sluznice maternice, skor 0-4, Min/Med/Maks, nakon sedam dana po primjeni cisteamina (40mg/0,5ml/rog maternice), dva sata nakon cisteamina životinje su primile pentadekapeptid BPC 157 10µg/kg, 10ng/kg (1x/5ml/kg/dan i.p.), ili u pijućoj vodi, p.o. (12ml/štakor/dan; 0,16µg/ml ili 0,16ng/ml), a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) i.p., ili samo pijuću vodu (12ml/dan) *P<0,05, najmanje prema kontroli.

6.0. Rasprava

Spriječavanje nastanka unutarmaternih priraslica nakon oštećenja sluznice maternice i danas predstavlja izazov kako u kliničkom, tako i eksperimentalnom aspektu. Oko 90 % unutarmaternih priraslica nastaje kao posljedica oštećenja sluznice maternice nakon kiretaža zbog komplikacija u trudnoći kao što su zadržani ili nekompletni pobačaj (14), zaostalo tkivo posteljice (15) i postporođajna krvarenje (16). Oštećenja sluznice maternice i izvan trudnoće također mogu dovesti do pojave priraslica. Na prvom mjestu su dijagnostičke kiretaže (17), zatim histeroskopske operacije mioma, polipa i septuma maternice (18). Infekcija također može biti uzrok unutarmaternih priraslica iako su stavovi istraživača različiti. Neki autori smatraju infekciju glavnim razlogom nastanka unutarmaternih priraslica i to posebice kronične i subakutne upale maternice (19-21), dok drugi smatraju da ista ne igra značajnu ulogu u stvaranju priraslica (22). Pretpostavlja se da upalni proces zajedno s oštećenjem sluznice maternice dovodi do stvaranja priraslica (23, 24).

Prijašnje studije koje su upotrebljavale cisteamin kao sredstvo za izazivanje oštećenja sluznice duodenuma i kolona (1-3) dokazale su štetan učinak uz upalni proces. Budući da ne postoji cisteaminski model za oštećenje sluznice maternice, mi smo odlučili ispitati utjecaj cisteamina na sluznicu maternice.

Rezultati istraživanja nedvojbeno su pokazali da cisteamin uzrokuje oštećenje stijenke maternice koje se makroskopski prezentira kao krvarenje. Primjenom različitih protokola medikacije, koji su se razlikovali po vrsti medikamenta, dozi i vremenu apliciranja, makroskopski se utvrđivao opseg oštećenja sluznice maternice, odnosno njezin intenzitet. Kod kontrolnih životinja već nakon dva sata po primjeni cisteamina zamjećuju se makroskopski vidljive promjene u vidu krvarenja, a u životinja u kojih je proveden tretman pentadekapeptidom BPC 157, površina zahvaćena krvarenjem u odnosu na ukupnu površinu oba roga maternice je statistički manja, a intenzitet krvarenja slabiji u svim ispitivanim vremenskim intervalima i u svim dozama (Slike 7-12).

Cisteamin apliciran u robove maternice stvara nekrozu koja nakon dva sata zahvaća više od polovice stijenke maternice. U životinja u kojih je proveden tretman pentadekapeptidom BPC 157, nekroza zahvaća manje od polovice stijenke maternice i pokazuju tendenciju smanjivanja, sve do potpunog nestanka u najduljem ispitivanom vremenskom intervalu (Slike 17-19).

U životinja koje su primile pentadekapeptid BPC 157 uočena je statistički značajna regeneracija sluznice maternice u odnosu na kontrolne životinje (Slike 20-21).

Pentadekapeptid BPC 157 se pokazao učinkovit i u nanogramskoj i mikrogramskoj dozi i kod intraperitonealnog i peroralnog načina primjene.

Cilj nam je bio dokazati da cisteamin oštećuje sluznicu maternice, a BPC 157 smanjuje dokazana oštećenja, ali unutarmaternične priraslice nismo dokazali ni u najduljem vremenskom intervalu od sedam dana. Usprkos tome što cisteamin dovodi do krvarenja i nekroze sluznice maternice gotovo u cijelosti, regeneracija sluznice događa se nakon sedam dana promatranog razdoblja.

Sljedeći cilj našeg istraživanja bio je ispitati učinak primjene blokade NO-sintetaze primjenom L-NAME te učinak primjene substrata za NO-sintetazu, L-arginina te pokazati međudjelovanje L-NAME i/ili L-arginina s pentadekapeptidom BPC 157.

Rezultati su pokazali da dodavanjem L-NAME lezije ostaju iste kao i kod kontrolnih životinja. Međutim, kada smo L-NAME dali sa BPC 157, pozitivan učinak istog bio je i dalje prisutan.

Ako životinje tretiramo L-argininom, dobili smo protektivni učinak, odnosno površina, intenzitet krvarenja i nekroza bili su smanjeni. Ako smo L-arginin dali sa BPC 157, lezije su bile jednake kao i kod životinja koje su tretirane samo s BPC 157.

Kombinacijom L-NAME i L-arginina dobili smo lezije kao i kod kontrolnih životinja. Ako smo L-NAME i L-arginin dali prije BPC 157, protektivni učinak istog bio je i dalje prisutan.

Iz svega gore navedenog zaključujemo da cisteamin izaziva teška oštećenja tkiva i time dovodi do maksimalne insuficijencije NO-sustava te insuficijentne NOS. Slijedom toga, L-NAME ne može imati svoj primarni učinak (lezije ostaju kao kod kontrole) i ne može dodatnom inhibicijom još smanjiti već maksimalnu inhibiciju (insuficijenciju) NO-sustava i blokadu NOS-a. S druge strane, L-arginin, koji je substrat NOS-a i prekursor NO-a, dakle, doprinosi poboljšanju prethodno negativnog učinka te pokazuje primarno pozitivni učinak (koji je rezultat popravljene situacije s NO te potaknutom sintezom preko NOS-a) (Slike 7-9). Da je tome tako, svjedoči učinak L-NAME kod životinja koje su primile i L-arginin te se primarni učinak L-arginina gubi i lezije su ponovno teške kao kod kontrole (Slike 7-9). Takav

se učinak smatra dokazom specifične uključenosti NO-sustava te da je učinak cisteamina specifični fenomen povezan s inhibicijom NOS-a, te jednako protektivni s reaktivacijom NO-sustava. Dakle, to pokazuje da je L-NAME aktivna, odnosno aktivna je blokada NOS-a, onda kada postoji ono što se može blokirati - to je djelatna sinteza NO-a preko aktivne NOS (što ponovo postoji kada se cisteaminskim štakorima doda L-arginin).

BPC 157 primijenjen samostalno pokazuje manje lezije u odnosu na kontrolu, a taj pozitivni učinak zadržan je i kada se primijeni s L-NAME, L-argininom i u kombinaciji (grupe životinja: 1. BPC 157; 2. BPC 157+L-NAME; 3. BPC157+L-arginin, 4. BPC 157+L-NAME+L-arginin). Osim toga, BPC 157 uklanja učinak L-NAME (BPC 157+L-NAME)(BPC 157+L-NAME+L-arginin) jer su lezije manje nego kod kontrolnih životinja što znači da reaktivira NO-sustav u potpunosti te da je njegov učinak jači nego učinak L-arginina u odnosu na L-NAME (inhibicija NOS-a uzrokovana primjenom L-NAME) (Slike 7-12). U kombinaciji BPC 157 + L-arginin jednaki je učinak na lezije kao i kod samog BPC 157, znači ostaje primarni učinak BPC 157, jer nema kompeticije s L-argininom. Dakle, cisteaminske lezije na uterusu pokazuju fenomen specifične inhibicije NO-sustava, a učinak BPC 157 posredovan je čini se reaktivacijom NO-sustava.

Imajući na umu sve do sada poznate pozitivne efekte pentadekapeptida BPC 157 i njegovu povezanost s NO-sustavom (5, 85) te specifičnu osobinu ovog agensa da antagonizira negativan učinak blokade aktivnosti NO-sustava s L-NAME, što je ujedno pokazano i u cisteaminskom modelu oštećenja stijenke maternice, može se zaključiti da je protektivni učinak peptida BPC 157 u navedenom modelu analogan ranije opaženom protektivnom učinku peptida BPC 157 u prijašnjim radovima (4). Dokazano je da se BPC 157 upliće u učinke NO na cjelovitost sluznice želuca, kao i održanje krvnog tlaka na specifičan način, uglavnom sinergistički s L-argininom i antagonistički s L-NAME (4). Naime, želučane lezije eksperimentalno izazvane 96-postotnim etanolom su umanjene primjenom BPC 157 i L-arginina, ali primjena L-NAME nije poništila učinak BPC 157 kao što je poništila učinak L-arginina. Navedeno ukazuje na to da BPC 157 interferira s učinkom NO-sustava na jače ili drugačije izražen način od samog NO (4). Korisni učinci BPC 157 i međusobnu povezanost s NO-sustavom (primjenom L-arginin/L-NAME, samostalno ili zajedno) potvrđeni su i u dugim radovima. Ovaj peptid je također povećavao produkciju NO u kardiovaskularnom sustavu u uvjetima doksorubicinske kardiotoksičnosti i posljedične srčane insuficijencije (79). Navedeni porast produkcije dušičnog oksida se indirektno manifestirao kroz smanjenje

vrijednosti endotelina 1 kao parametra funkcije endotela, čime je ujedno i potvrđen protektivan učinak peptida BPC 157 na endotelne stanice (80). Interakcija ovog agensa i NO-sustava u kontekstu disfunkcije endotela je također pokazana i u modelima L-NAME inducirane arterijske hipertenzije i L-argininom inducirane arterijske hipotenzije gdje je primjena peptide BPC 157 u oba modela dovodila do uspostave normalnih vrijednosti arterijskog tlaka (4). U kontekstu insuficijencije procesa cijeljenja u različitim tkivima koji je također odraz insuficijencije i dualnosti NO-sustava (dušični monoksid inhibira funkciju trombocita i proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica kao važnih događaja u mehanizmu cijeljenja), također je pokazan pozitivan homeostatski učinak pentadekapeptida BPC 157 na primjeru cijeljenja više različitih tkiva (mišić, tetiva, ligament, živac, kost, krvne žile, crijevne fistule) (5, 86, 87).

Odnos BPC 157 i NO-sustava pokazan je i kod aritmija (81), kod poremećaja nakon hipokalemije (82) i hiperkalijemije (83) i konačno u kompleksnoj nemogućnosti cijeljenja, dokazanoj s cijeljenjem fistula, kolokutane (5) i ezofagokutane (84).

S obzirom na sve navedeno, pentadekapeptid BPC 157 pokazuje značajan protektivni učinak u odnosu na maternicu te posjeduje terapijski potencijal u ovom eksperimentalnom modelu. Osim toga, primjena L-NAME ne pogoršava cisteaminske lezije sluznice maternice, dok primjena L-arginina djeluje protektivno. Navedeni protektivni učinak na maternicu se ostvaruje primjenom pentadekapeptida BPC 157, koji se ne može antagonizirati djelovanjem L-NAME, ali istovremeno nije zabilježen niti eventualni pozitivan sinergizam s istodobnom primjenom L-arginina i BPC 157. Rezultati ove studije ukazuju da pentadekapeptid BPC 157 pokazuje konzistentan protektivan učinak u cisteaminom induciranih lezija maternice kod štakora, te da su učinci posredovani NO-sustavom.

7.0. Zaključci

1. Lokalno primijenjen u svaki rog uterusa, cisteamin izaziva oštećenje stijenke maternice uz intenzivno krvarenje već dva sata nakon primjene, a te lezije, međutim, regrediraju kroz sedam dana.
2. BPC 157 primijenjen parenteralno i peroralno i u mikrogramskim i nanogramskim dozama, inhibira nastajanje lezija (primijenjen neposredno nakon cisteamina) i ubrzava cijeljenje već postojećih (primijenjen nakon dva sata kada su lezije najteže).
3. Primjena L-arginina kao NOS-substrata dovodi do poboljšanja koje se, kako je navedeno, uklanja istodobno primjenom L-NAME (lezije kao kod kontrolnih životinja). Primjena cisteamina i nastala oštećenja tkiva izazivaju posljedično ispad NO-sistema i maksimalnu inhibiciju NOS-a, jer L-NAME sama ne povećava nastale lezije, no inhibira poboljšanje do kojeg dovodi primjena L-arginina do razine kontrolnih lezija.
4. BPC 157 pokazuje pozitivan učinak u interakciji s NO-sustavom (grupe životinja: 1. BPC 157; 2. BPC 157+L-NAME; 3. BPC157+L-arginin, 4. BPC 157+L-NAME+L-arginin). Osim toga, BPC 157 uklanja učinak L-NAME (BPC 157+L-NAME)(BPC 157+L-NAME+L-arginin), jer su lezije manje nego kod kontrolnih životinja, što znači da reaktivira NO-sustav. Njegov učinak je jači od učinka L-arginina u odnosu na L-NAME (inhibicija NOS-a uzrokovana primjenom L-NAME). Time je ukazano na povezanost učinka ispitivanog peptida BPC 157 u uvjetima modulacije aktivnosti NO-sustava.
5. S obzirom na sve navedeno, čini se kako pentedekapeptid BPC 157 pokazuje značajan protektivan učinak u odnosu na maternicu te da posjeduje terapijski potencijal u ovom eksperimentalnom modelu.

Sažetak:

Cisteamin ima ulcerogeni učinak na sluznicu duodenuma i kolona, a nije poznat učinak na sluznicu maternice. Isto tako nije poznato da li je potencijalni učinak cisteamina na maternicu posredovan preko djelovanja na NO-sustav. Pentadekapeptid BPC 157 inhibira lezije i duodenuma i kolona te stoga pretpostavljamao da ima koristan učinak i na sluznicu maternice. Isto tako, pentadekapeptid BPC 157 antagonizira učinak inhibicije NO-sustava (primjena blokatora NOS-a, L-NAME) i hiperstimulacije NO-sustava (primjena substrata NOS-a, L-arginin) te ima značajni učinak na NO-sustav na modelima različitih lezija. Stoga je cilj ovoga rada pokazati da cisteamin oštećuje stijenku maternice i da BPC 157 inhibira nastajanje lezija i ubrzava cijeljenje već postojećih. Cisteamin se primjenio u 250 Wistar Albino štakora, u proksimalne dijelove rogova maternice (40mg/0,5 ml/rog maternice) te se učinak utvrđivao makroskopski i mikroskopski, nakon dva sata, tri dana i sedam dana po primjeni cisteamina. Medikacija je uključivala pentadekapeptid BPC 157 10 μ g/kg, 10ng/kg po danu, i to: (i) intraperitonealno, 1xdan, odnosno (ii) u pijućoj vodi, peroralno (12ml/štakor/dan; 0,16 μ g/ml ili 0,16ng/ml); L-NAME 5mg/kg i.p., 1xdan, L-arginin 100mg/kg 1xdan, primijenjenih samostalno i/ili u kombinacijama, a kontrolne životinje su primale jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) intraperitonealno ili samo pijuću vodu (12ml/dan). Primjena je bila neposredno nakon cisteamina ili kod već formiranih lezija nakon dva sata.

Rezultati ovog istraživanja su ukazali na to da cisteamin izaziva oštećenje stijenka maternice, a BPC 157 primijenjen parenteralno i peroralno i u mikrogramskim i nanogramskim dozama, inhibira nastajanje lezija i ubrzava cijeljenje već postojećih. Uočena je i povezanost učinka ispitivanog peptida BPC 157 u uvjetima modulacije aktivnosti NO-sustava, blokadom s L-NAMA i prekursorom NO, L-argininom, što govori da je regeneracija sluznice maternice povezana sa sustavom dušičnog oksida. Zaključno se može reći da je pentadekapeptid BPC 157 pokazao značajan protektivni učinak u odnosu na maternicu te da posjeduje terapijski potencijal u ovom eksperimentalnom modelu.

Ključne riječi: cisteamin, sluznica maternice, BPC 157, NO-sustav

Abstract:

Cysteamine induces damages of endometrium and pentadecapeptide BPC 157 counteracts those lesions as well as interacts with NO-system. Cysteamine was applied directly in each of the uterus horns (40mg/0.5ml/uterus horn), in the total dose of the 400 mg/kg. Effect was evaluated by macroscopic and microscopic examination after 2h, 3days and 7 days. Medication was given after cysteamine, either immediately or 2h later, including pentadecapeptide BPC 157 10µg/kg or 10ng/kg per day, intraperitoneally (5ml/kg), or per-orally (12ml/rat/day, 0.16ug/ml, 0.16ng/ml), L-NAME (5mg/kg/day intraperitoneally), L-arginine (100mg/kg/day intraperitoneally), given alone and/or in combinations, while controls received saline (5ml/kg) intraperitoneally or drinking water (12ml/rat/day).

We demonstrated a strong damaging effect of cysteamine on the endometrium. BPC 157 given intraperitoneally or per-orally prevented lesions development and counteracted already extensive lesions. We proved interaction between the tested pentadecapeptide BPC 157 in conditions of modulation of the NO-synthetase inhibitor L-NAME or NO-synthetase substrate L-arginine. These suggest NO-system related regeneration of the endometrium and beneficial effect of BPC 157 connected with NO-system. In conclusion, significant protective effect to the uterus of pentadecapeptide BPC 157 may have a particular therapeutical potential.

Key words: cysteamine, endometrium, BPC 157, NO-system

Literatura:

1. Sikirić P, Mikus D, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, et al. Pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, bromocriptine, and atropine effect in cysteamine lesions in totally gastrectomized rats: a model for cytoprotective studies. *Dig Dis Sci* 1997;42:1029-37.
2. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, et al. The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 1994;54:PL63-8.
3. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G, Perovic D, Staresinic M, Anic T, et al. Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. *J Physiol Paris* 2001;95:283-8.
4. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1997;332:23-33.
5. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci* 2008;108:7-17.
6. Ilić-Forko J, Babić D. Korpus uterusa (tijelo maternice). U: Jukić S i sur. *Patologija ženskog spolnog sustava*. 3. izd. Zagreb: AGM, 1999 str. 107-30.
7. Fritsch H. Ein Fall von volligen Schwund der Gebärmutterhöhle nach Auskratzung. *Zentralbl Gynaekol* 1894;18:1337-42.
8. Asherman JG. Amenorrhoea traumatica (atretica). *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1948;55:23-30.
9. Asherman JG. Traumatic intrauterine adhesions. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1950;57:892-896.

10. Asherman JG. Traumatic intrauterine adhesions and their effects on fertility. *Int J Fertil* 1957;2:49–54.
11. Yu D, Med M, Wong YM, Cheong Y, Xia E, Li TC. Asherman syndrome-one century later. *Fertil Steril* 2008;89:759-79.
12. Wamsteker K, De Block S. Diagnostic hysteroscopy: technique and documentation. In: Sutton C, Diamond M, eds. *Endoscopic surgery for gynecologists*. London: WB Saunders, 1998:511–24.
13. Nasr AL, Al-Inany HG, Thabet SM, Aboulghar M. A clinicohysteroscopic scoring system of intrauterine adhesions. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50:178–81
14. Friedler S, Margalioth EJ, Kafka I, Yaffe H. Incidence of post-abortion intra-uterine adhesions evaluated by hysteroscopy. *Hum Reprod* 1993;8:442-444
15. Westendorp IC, Ankum WM, Mol BW, Vonk J. Prevalence of Ashermans syndrome after secondary removal of placental remnants or a repeat curettage for incomplete abortion. *Hum Reprod* 1998;13:3347-50.
16. Roman H, Sentilhes L, Cingotti M, Verspyck E, Marpeau L. Uterine devascularization and subsequent major intrauterine synechiae and ovarian failure. *Fertil Steril* 2005;83:755-7
17. Schenker JG, Margalioth EJ. Intrauterine adhesions: an updated appraisal. *Fertil Steril* 1982;37:593–610.
18. Taskin O, Sadik S, Onoglu A, Gokdeniz R, Erturan E, Burak F, Wheeler JM. Role of endometrial suppression on the frequency of intrauterine adhesions after resectoscopic surgery. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2000;7:351-4.
19. Taylor PJ, Cumming DC, Hill PJ. Significance of intrauterine adhesions detected hysteroscopically in eumenorrhic infertile women and role of antecedent curettage in their formation. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:239-42.
20. Rabau E, David A. Intrauterine adhesions: etiology, prevention, and treatment. *Obstet gynecol* 1963;22:626-9.
21. Czernobilsky B. Endometritis and infertility. *Fertil Steril* 1978;30:119-30.

22. Polishuk WZ, Anteby SO, Weinstein D. Puerperal endometritis and intrauterine adhesions. *Int Surg* 1975;60:418-20.
23. Smid A, Borsos A, Takacs I. Aetiology of Asherman's syndrome. *Zentralbl Gynakol* 1980;102:380-5.
24. Shaffer W. Role of uterine adhesions in the cause of multiple pregnancy losses. *Clin Obstet Gynecol* 1986;29:912-24.
25. Polishuk WZ, Sadovsky E. A syndrome of recurrent intrauterine adhesions. *Am J Obstet Gynecol* 1975;123:151-8.
26. Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions. *J Minim Invasive Gynecol* 2010;17:555–569.
27. Wamsteker K. Intrauterine adhesions (synechiae). In: Brosens I, Wamsteker K, eds. *Diagnostic imaging and endoscopy in gynecology: a practical guide*. London: WB Saunders 1997:171–84.
28. Fayeza JA, Mutie G, Schneider PJ. The diagnostic value of hysterosalpingography and hysteroscopy in infertility investigation. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:558–60.
29. Soares SR, Barbosa dos Reis MM, Camargos AF. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertil Steril* 2000;73:406–11.
30. Salle B, Gaucherand P, de Saint Hilaire P, Rudigoz RC. Transvaginal sonohysterographic evaluation of intrauterine adhesions. *J Clin Ultrasound* 1999;11:131–134.
31. Sugimoto O. Diagnostic and therapeutic hysteroscopy for traumatic intrauterine adhesions. *Am J Obstet Gynecol* 1978;11:539–547.
32. Duffy S, Reid PC, Sharp F. In-vivo studies of uterine electrosurgery. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:579–82.
33. Roge P, Cravello L, D'Ercole C, Brousse M, Boubli L, Blanc B. Intrauterine adhesions and fertility: results of hysteroscopic treatment. *Gynaecol Endosc* 1997;6:225–8.

34. Zikopoulos KA, Kolibianakis EM, Platteau P, de Munck L, Tournaye H, Devroey P, Camus M: Live delivery rates in subfertile women with Asherman's syndrome after hysteroscopic adhesiolysis using the resectoscope or the Versapoint system. *Reprod Biomed Online* 2004;8:720–725.
35. Roy KK, Baruah J, Sharma JB, Kumar S, Kachawa G, Singh N: Reproductive outcome following hysteroscopic adhesiolysis in patients with infertility due to Asherman's syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281:355–361.
36. Yu D, Li TC, Xia E, Huang X, Liu Y, Peng X: Factors affecting reproductive outcome of hysteroscopic adhesiolysis for Asherman's syndrome. *Fertil Steril* 2008;89:715–722.
37. Capella-Allouc S, Morsad F, Rongieres-Bertrand C, Taylor S, Fernandez H. Hysteroscopic treatment of severe Asherman's syndrome and subsequent fertility. *Hum Reprod* 1999;14:1230–1233.
38. Valle RF, Sciarra JJ: Intrauterine adhesions: hysteroscopic diagnosis classification, treatment, and reproductive outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1459–1470.
39. Pabuccu R, Atay V, Orhon E, Urman B, Ergun A: Hysteroscopic treatment of intrauterine adhesions is safe and effective in the restoration of normal menstruation and fertility. *Fertil Steril* 1997;68:1141–1143.
40. Shokeir TA, Fawzy M, Tatongy M: The nature of intrauterine adhesions following reproductive hysteroscopic surgery as determined by early and late follow-up hysteroscopy: clinical implications. *Arch Gynecol Obstet* 2008;277:423–427.
41. Polishuk WZ, Kohane S: Intrauterine adhesions: diagnosis and therapy. *Obstet Gynecol Digest* 1966;8:41.
42. March CM: Management of Asherman syndrome. *Reprod Biomed Online* 2011;23:63–76.
43. Pellicano M, Bramante S, Cirillo D, Palomba S, Bifulco G, Zullo F, Nappi C: Effectiveness of autocrosslinked hyaluronic acid gel after laparoscopic myomectomy in infertile patients: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2003;80:441–444.
44. Guida M, Acunzo G, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Piccoli R, Pellicano M, Cerrota G, Cirillo D, Nappi C: Effectiveness of auto-crosslinked hyaluronic acid gel in the prevention of

intrauterine adhesions after hysteroscopic surgery: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod* 2004;19:1461–1464.

45. Metwally M, Watson A, Lilford R, Vandekerckhove P: Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 19, CD001298.

46. Reijnen MM, Falk P, van Goor H, Holmdahl L: The antiadhesive agent sodium hyaluronate increases the proliferation rate of human peritoneal mesothelial cells. *Fertil Steril* 2000;74:146–151.

47. March CM: Management of Asherman syndrome. *Reprod Biomed Online* 2011;23:63–76.

48. Sher G, Fisch JD: Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel method to improve uterine artery blood flow and endometrial development in patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2000;15:806–809.

49. Takasaki A, Tamura H, Miwa I, Taketani T, Shimamura K, Sugino N: Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertil Steril* 2010; 93:1851–1858.

50. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today* 2007;37:768-77.

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

52. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, Klicek R, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL-14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology* 2006;14:214-21.

53. 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;24:1109-17.

54. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Balen I, Aralica G, Gjurasin M, et al. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. *J Physiol Paris* 2001;95:261-70.
55. Sikiric P, Separovic J, Anic T, Buljat G, Mikus D, Seiwerth S, et al. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H2-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris* 1999;93:479-85.
56. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic et al. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris* 1997;91:173-8.
57. Sikirić P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, et al. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris* 1993;87:313-27.
58. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B, Brajsa K, Bubenik M, Stipanovic S, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers *Gut* 2003; 51:309.
59. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M, Oreskovic K, Peterson J, Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL 14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005;128:584.
60. 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;29:323-34.
61. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001;27:817-27.
62. Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci* 2011;88:535-42.

63. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris* 2001;95:295-301.
64. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54:2070-83.
65. Zoricic I, Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, et al. Pentadecapeptide BPC 157 beneficially influences the healing of colon-colon anastomosis in rats. *Cell injury and protection in the gastrointestinal tract. From basic sciences to Clinical perspectives* 1996. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London 1996.
66. Tkalcević VI, Cuzić S, Brajsa K, Mildner B, Bokulić A, Situm K, Perović D, Glojnarić I, Parnham MJ. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol* 2007;570:212-21.
67. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Coric M, Brcic L, et al. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol* 2010;61:241-50.
68. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1996;41:1518-26.
69. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV international union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1999;49:137-42.
70. Vallance P, Collier J. Fortnightly review biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ* 1994;309:453-7.
71. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith L, Golden M, Benjamin N et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med* 1995;1:546-51.

72. Cannon RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44:1809–19.
73. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthesis in mammals. *Biochem J* 1994;298:249–58.
74. Ariggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343:1199–206.
75. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Res* 2003;60:49–57.
76. Ganz P, Vita JA. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, multipotent molecule. *Circulation* 2003;108:2049–53.
77. Bansal RK, Goldsmith PC, He Y, Zaloudek CJ, Ecker JL, Riemer RK. A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. *J Clin Invest* 1997;99:2502–8.
78. Cameron I.T, Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Hum Rep* 1998;4:565-569
79. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwert S, Rogic D, Kusec V, et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci* 2004;95:19-26
80. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwert S, et al. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris* 1997;91:139-49.
81. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, et al. Inhibition of methyl digoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009;156:83-9
82. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I, Horvat I, Udovicic M, Uzun S, et al. Mortal furosemide-hypokalemia-disturbances in rats NO-system related. Shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 more than with L-arginine. *J Clin Exp Cardiol* 2012;3:201.

83. Barisic M, Balenovic D, Klicek R, Nikitovic B, Drmic D, Udovicic M, et al. Mortal hyperkalemia disturbance in rats is NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. *Reg Pept* 2012
84. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujić D, Drmic D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur J Pharmacol* 2012. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.055.
85. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romić Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, i sur. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med Sci Monit* 2006; 12:36-45.
86. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J Orthop Res.* 2006; 24:982-9.
87. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, Jukic I, Radic B, Pevec D, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today.* 2008; 38: 716-25.

Životopis autora s popisom literature

Osobni podaci :

Ime i prezime: Tatjana Pavelić Turudić

Datum rođenja: 02.05.1965.

Mjesto rođenja: Virovitica, Hrvatska

Školovanje

2010. godine-subspecijalist humane reprodukcije

1999. godine-specijalist ginekologije i opstetricije

1990. godine-diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilista u Zagrebu

1984. godine završila srednju školu u Virovitici

Radno iskustvo

Od 2006. Zavod za ginekologiju i humanu reprodukciju, KB «Sveti Duh»

Od 2003.-2006. god. Poliklinika Sunce

Od 1999.-2003. Klinika za dječje bolesti Zagreb

Od 1995.-1999. Opća bolnica Virovitica

Od 1990.-1995. Medicinski centar Virovitica

Popis radova:

1. Kurjak A, Mišković B, Stanojević M, Amiel Tison C, Ahmed B, Azumendi G, Vasilj O, Andonotopo W, Turudić T, Salihagić Kadić A. New scoring system for fetal neurobehavior assessed by three and four dimensional sonograph. *Jurnal of Perinatal medicine* 2008;36:73-81
2. Habek D, Turudić T. Retroperitoneal hematoma-a rare complication after cervical conization because of cervicoisthmic arteriovenous malformation. *Central european Jurnal of Medicine* 2011;6:710-12

3. Habek D, Ujević B, Turudić T, Bauman R, Horvat G, Marton I. Laparoskopski asistirana neovaginoplastika po Davydovu. *Gynecologia et perinatologi* 2011;20:35-39
4. Zaputović S, Stanojević M, Honemayer U, Turudić T, Kurjak A. Surgically correctable fetal anomalies: ultrasound diagnosis and management. *Jurnal of ultrasound in obst and gynecology* 2012;6:237-256
5. Klicek R, Kolenc D, Suran J, Drmic D, Brcic L, Aralica G, Sever M, Holjevac J, Radic B, Turudic T, Kokot A, Patrlj L, Rucman R, Seiwerth S, Sikiric P. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:597-612.
6. Vucemilo T, Skoko M, Sarcević B, Puljiz M, Alvir I, Turudić TP, Mihaljević I. The level of serum pro-matrix metalloproteinase-2 as a prognostic factor in patients with invasive ductal breast cancer. *Coll Antropol* 2014;38:135-40.

Popis sažetaka:

1. Prikaz novorođenčeta sa spontanom intestinalnom perforacijom. Turudić T, Bekavac I, Erceg Ivkošić I, Stanojević M, XXVI.Perinatalni dan „Ante Dražančić“, Zagreb, Hrvatska, 23-25 Studeni 2012.
2. Modified natural IVF cycle in infertile patients over 40-waist of time and money. Turudić T, Bauman R. 10 Congress of the European Socyety of Gynecology, Brussels,18-21 Sept, 2013.
3. Emergency contraception among adolescent girls. Hiršl-Hećej V, Šikanić-Dugić N, Turudić T, The 7th Congress of the European Society of Contraception, Genova, Italy, April, 2002.
4. Spolno ponašanje i cervikalne neoplazije u adolescentica. Šikanić-Dugić N, Turudić T, Hiršl-Hećej V, Kani D, Treći hrvatski kongres ginekologa i opstetričara, Plitvice, 16-19 Svibanj, 2001.