

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anita Zenko Sever

**Hepatoprotektivni učinak BPC-a157 na
modelu bilijarne ciroze u štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anita Zenko Sever

**Hepatoprotektivni učinak BPC-a157 na
modelu bilijarne ciroze u štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

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

Voditelji rada: prof.dr.sc.Predrag Sikirić i doc.dr.sc. Marijana Ćorić

Najiskrenije zahvaljujem svojim mentorima prof.dr.sc Predragu Sikiriću i doc.dr. sc. Marijani Ćorić na pomoći, potpori i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem Marku Severu svom suprugu na velikoj moralnoj i stručnoj potpori pri izradi ove disertacije. Zahvaljujem svojim roditeljima na podršci u dosadašnjem školovanju kao i izradi ove disertacije.

POPIS OZNAKA I KRATICA

ALT- alanin –aminotransferaza

AF- alkalna fosfataza

α - SMA –eng. alpha smooth muscle actin

AST- aspartat-aminotransferaza

CCI-4 – tetraklor ugljik

CTGF- eng. connective tissue growth factor, faktor rasta vezivnog tkiva

ET –1 eng. endothelin-1, endotelin-1

FGF – eng. fibroblast growth factor, faktor rasta fibroblasta

FAS- eng. apoptosis stimulating factor, faktor stimulacije apoptoze

GGT- gama- glutamil transferaza

HSC-MFB- eng. hepatic stellate cell- myofibroblast - hepatične stelatne stanice- miofibroblasti

MCP-1- eng. macrophage chemotactic protein-1, kemotaktički protein makrofaga

MMP-2- eng. matrix metalloproteinases, matrix metaloproteinaza

NF- κ B – eng. nuclear factor – κ B, nuklearni faktor κ B

NGF- eng. nerve growth factor, faktor rasta živaca

PDGF - eng. platelet derived growth factor, trombocitni faktor rasta

TGF- β – eng. transforming growth factor- β , transformirajući faktor rasta

TIMP- eng. tissue inhibitor of metalloproteinase, tkivni inhibitor metaloproteinaze

TLR4- eng. Toll-like receptor, Toll like receptor

VEGF – eng. vascular endothelial growth factor, vaskularni endotelni faktor rasta

SADRŽAJ

Stranica

1. UVOD.....	1
1.1. Patofiziologija ciroze jetre	2
1.2. Dosadašnja istraživanja na području liječenja ciroze jetre	5
1.3. Dosadašnja saznanja o pentadekapeptidu BPC157.....	9
2. HIPOTEZA.....	12
3. CILJEVI RADA.....	13
3.1. Opći cilj.....	13
3.2. Specifični ciljevi.....	13
4. MATERIJALI I METODE.....	14
4.1. Kirurški model bilijarne ciroze.....	15
4.2. Lijekovi.....	17
4.3. Promatrani parametri.....	17
4.4. Makroskopska analiza.....	18
4.5. Histološka analiza.....	18
4.6. Biokemijska analiza.....	19
4.7. Statistička analiza.....	20
5. REZULTATI	21
5.1. Makroskopska mjerenja.....	21

5.2. Histološka analiza.....	29
5.3. Biokemijska analiza.....	45
6. RASPRAVA.....	53
7. ZAKLJUČAK.....	58
8. SAŽETAK.....	59
9. SUMMARY.....	61
10. POPIS LITERATURE.....	63
11. ŽIVOTOPIS.....	76

1. UVOD

Ciroza jetre je veliki medicinski problem za kojeg do sada nije pronađeno adekvatno terapijsko rješenje. U svijetu se vrše brojna istraživanja koja na različitim modelima istražuju čimbenike koji su odgovorni za razvoj fibroze jetre do ciroze¹. Modeli ciroze jetre se mogu se podijeliti na kirurški induciranu bilijarnu cirozu ligaturom glavnog žučnog kanala te kemijski induciranu cirozu jetre CCl₄, tioacetamidom, dimetilnitrozaminom, 2-acetilaminofluorenom (2-AAF) i alkoholom²⁻³³. Najviše je istraživanja rađeno na modelima kemijski inducirane ciroze jetre sa tetraklor ugljikom (CCl₄) te kirurški inducirane bilijarne ciroze ligaturom glavnog žučnog kanala, s podjednakom učinkovitošću indukcije ciroze jetre²⁻³³.

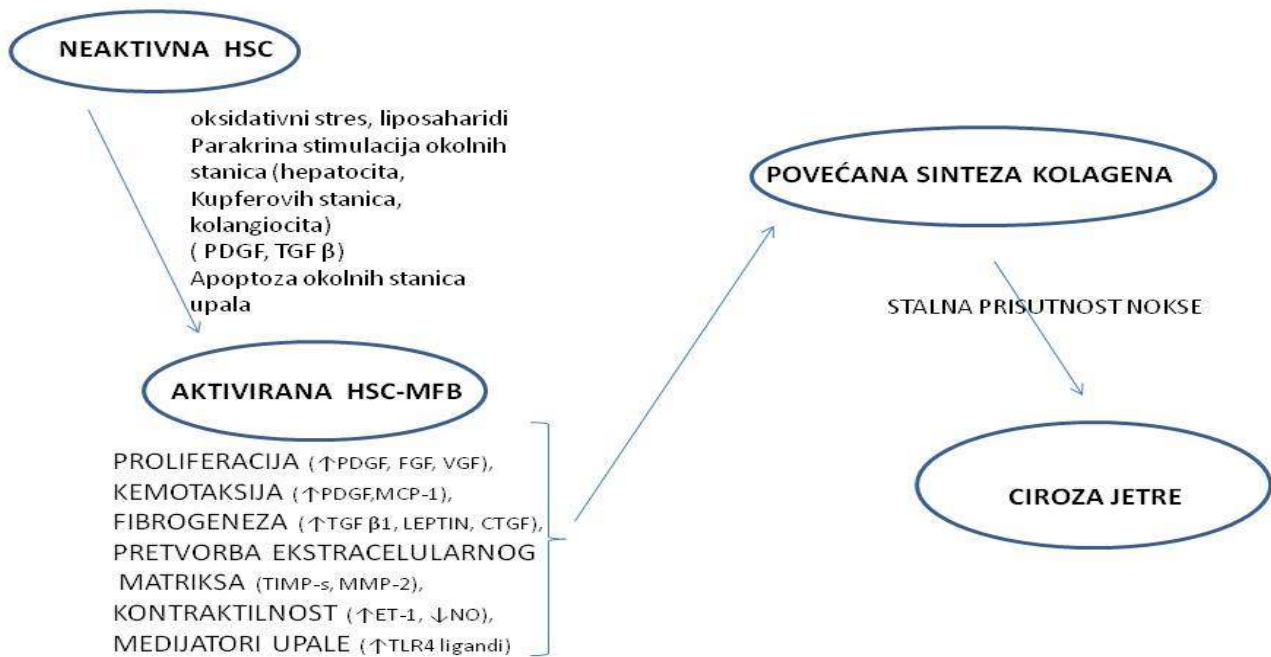
1.1. PATOFIZIOLOGIJA CIROZE JETRE

Nastanak jetrene fibroze je posljedica djelovanja različitih noksi (alkohol, virusne upale, žučna staza te brojni lijekovi)³⁴.

Proces fibroze je u početnim fazama reverzibilan uz uvjet pravovremenog uklanjanja nokse. Daljnjim taloženjem ekstracelularnog matriksa taj proces postaje ireverzibilan s razvojem jetrene ciroze kao terminalnim stadijem¹.

Kao reakcija jetre na noksu te povišenih razina žučnih kiselina i soli, dolazi do oslobađanja slobodnih radikala. Apoptoza stanica dovodi do otpuštanja medijatora upale, TGF β , PTGF-a, lipopolisaharida te aktivacije kaskadnih reakcija koje dovode do upalne reakcije i aktivacije hepatskih stielatnih stanica (Itove stanice ili mioipociti). Hepatske stielatne stanice se nalaze između sinusoida i jetrenih stanica unutar Disseovih prostora te u normalnoj jetri služe za pohranu retinoida (metabolita vitamina A). Djelovanjem određene nokse aktiviraju se i transformiraju u miofibroblaste koji uzrokuju povećanu produkciju PDGF-a, VGF-a, FGF-a, MCP-1-a, TGF- β -a, leptina, TIMP-a, MMP-2-a, ET-1-a, TLR4-a te brojnih drugih medijatora upale. Posljedično dolazi do povećane proliferacije duktalnih kanalića, fibroblasta, pretvorbe ekstracelularnog matriksa u kolagen, kontrakcije tkiva, upalne infiltracije, te snižene razine NO^{1,35-37}. Sve navedeno rezultira povećanom produkcijom kolagena tipa I (70% sinteze kolagena). Ostatak kolagena nastaje aktivacijom portalnih fibroblasta (koji podržavaju sintezu upalnih i fibrogenih medijatora) i fibrocita. Aktivirane hepatske stielatne stanice-miofibroblasti

(HSC-MFB) kontinuirano otpuštaju NF-κB koji odgađa apoptozu te tako indirektno dodatno povećava sintezu kolagena^{1,35-37}. Također otpuštaju inhibitor metaloproteinaze (tkivni inhibitor metaloproteinaze- TIMP) koji blokira matriksmetaloproteinazu (čija je funkcija proteoliza ekstracelularnog matriksa) te na taj način povećavaju ukupnu količinu kolagena^{1,35-37}. Proces fibroze dovodi do zastoja žuči u žučnim kanalčićima, ishemije parenhima i dodatnog otpuštanje upalnih medijatora te oksidativnog stresa. Ovaj začarani krug nokse i posljedične fibroze na koncu rezultira razvojem jetrene ciroze^{1,35-37}.



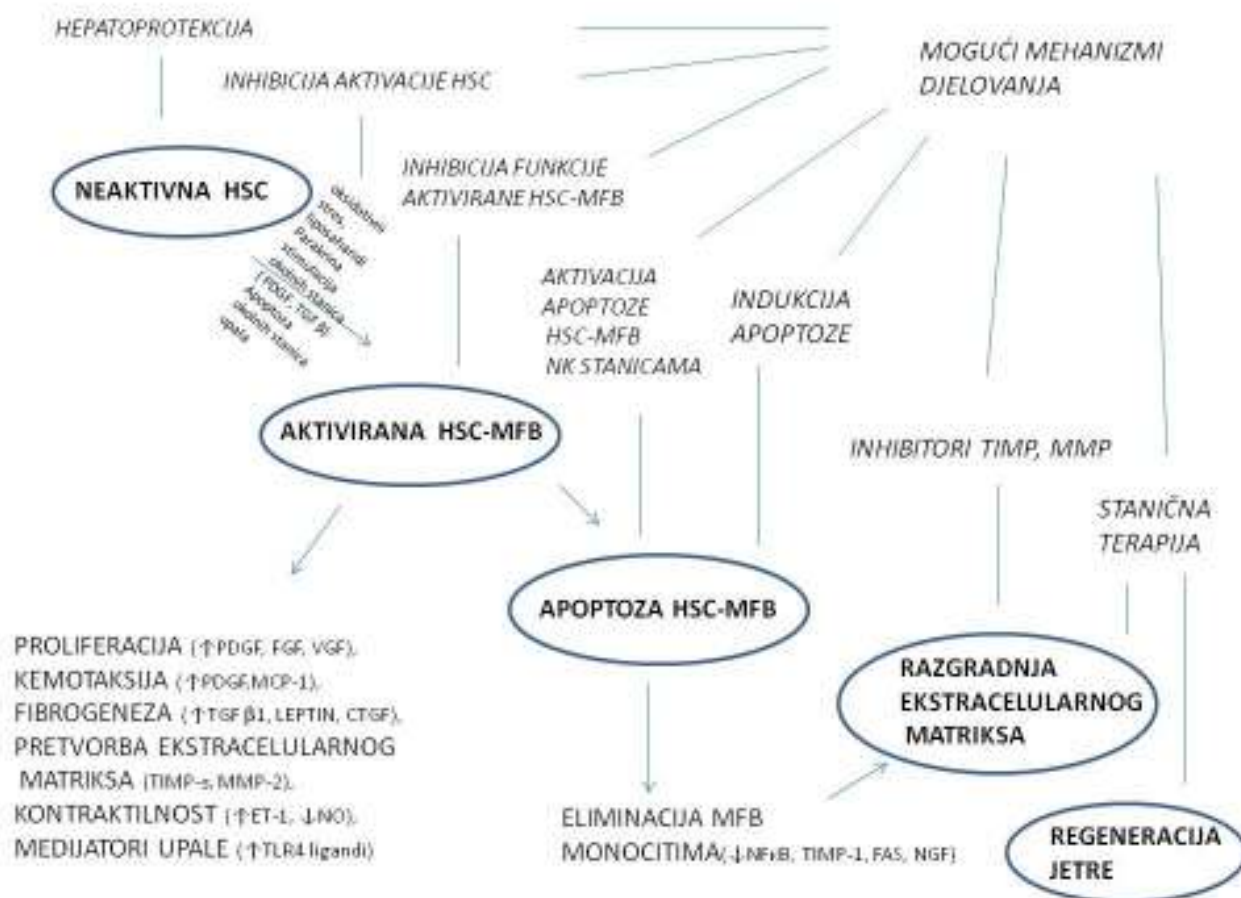
Slika 1. Patofiziologija ciroze jetre ¹

Na Slici 1 prikazana je patofiziologija ciroze jetre. Središnju ulogu u tom procesu imaju neaktivne hepatske stanične stanice (HSC) koje se pod utjecajem nokse, oksidativnog stresa, oštećenja okolnih stanica (posljedične parakrine stimulacije, aktivacije upale i apoptoze) pretvaraju u miofibroblaste (MFB). Aktivirane HSC-MFB stanice potiču ekspresiju i sintezu PDGF-a, FGF-a, VGF-a, MCP-1-a, TGF β -a, leptina, CTGF-a, TIMP-a, MMP-2-a, ET-a, TLR4-a koji dovode do daljnje proliferacije miofibroblasta, migracije upalnih stanica, sinteze kolagena, kontrakcije tkiva i inhibicije apoptoze u jetri. Sve navedeno uz kroničnu prisutnost nokse dovodi do razvoja ciroze jetre kao ireverzibilnog stadija fibroze jetre.

1.2. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA LIJEČENJA JETRENE CIROZE

Brojna su mjesta djelovanja potencijalnih lijekova za sprječavanje progresije fibroze: od zaustavljanja aktivacije HSC (Itovih stanica) preko kaskade upalnog odgovora do produkcije kolagena. Silimarin, cirkumin, resveratrol i vitamin E su u dosadašnjim istraživanjima pokazali hepatoprotektivan učinak u 43% ispitanika, ali ne i učinak na smanjenje jetrene fibroze³⁶. Aplikacija čimbenika rasta hepatocita genskom terapijom ili rekombinantnim proteinom dovodi do regresije jetrene fibroze, ali uz potencijalnu karcinogenost³⁷. Na životinjskim modelima obećavajući su se pokazali i inhibitori kaspaze (npr., VX-166, IDN-6556, GS-945) no bez značajnijeg uspjeha u kliničkim istraživanjima³⁸. Primjena pioglitazona (PPAR ligand) nije imala učinka na modelu kolestatske fibroze, dok je na modelima toksičnih (CCL₄) i metaboličkih lezija usporila proces razvoja fibroze u ranom stadiju bolesti³⁹. Rani tretman atrovastatinom (inhibitor HMG-CoA reduktaze) na modelu ligature glavnog žučnog kanala u štakora inhibira aktivaciju Itovih stanica (HSC) i posljedičnu proizvodnju kolagena, no bez učinka kod već razvijene fibroze⁴⁰. Inhibitori angiotenzin konvertaze i AT1R antagonisti (sartani) na životinjskim modelima usporavaju razvoj fibroze⁴¹. Dugotrajna upotreba AT1R antagonista losartana kod bolesnika s kroničnim hepatitisom C usporava progresiju fibroze, snižava ekspresiju NADPH oksidaze i profibrogenih gena (kolagen tipa 1, MMP-2)⁴². TGF- β ima glavnu ulogu u patogenezi razvoja jetrene fibroze, stoga je primjena TGF- β neutralizirajućih antitijela pokazala antifibrotični učinak u predkliničkim studijama. Također je u kliničkim studijama dokazan povoljan učinak oralno dostupnog piridinskog derivata pirfenidona koji

blokira produkciju TGF- β te tranilasta, koji poništava učinak TGF- β ⁴³. Imatinib (inhibitor nekoliko tirozin kinaza) inhibira proliferaciju HSC (Itovih stanica) i reducira fibrozu na eksperimentalnim modelima, no zbog brojnih nuspojava nije našao kliničku primjenu u liječenju ciroze. Inhibitori protein kinaze druge generacije poput nilotiniba imaju blaže nuspojave te se njihov učinak još istražuje³⁷. Leflunomid (inhibitor sinteze pirimidina) potiče apoptozu HSC⁴⁴. Gliotoxin i sulfasalazin također pokazuju proapoptotički učinak HSC te ubrzavaju povlačenje fibroze na životinjskim modelima⁴⁵⁻⁴⁷. Aktivacija kanaboidnih receptora (CB1, CB2) uzrokuje apoptozu HSC što dovodi do redukcije fibroze kod cirotičnih štakora^{48,49}. Djelomičan antifibrozirajući učinak u jetri postignut je u eksperimentalnim studijama primjenom melatonina, pegiliranog interferona i N-acelicisteina⁵⁰⁻⁵². Alopurinol je na štakorskom modelu bilijarne jetrene lezije također pokazao hepatoprotektivni učinak⁵³. Klinički je dokazana regenerativna sposobnost autologo transplantiranih CD33+ stanica iz koštane srži i CD34+ krvnih stanica te koncentriranih monocita^{54,55}. Također se istražuje učinak alogene transplantacije purificiranih hepatocita kod akutnog jetrenog zatajenja, uznapredovale ciroze i metaboličkih promjena⁵⁶.



Slika 2. Ciljna mjesta djelovanja lijekova ¹

Na Slici 2 prikazani su mehanizmi fibrozne progresije i regresije uz moguća ciljana mjesta djelovanja lijekova. Aktivirane HSC-MFB dovode do proliferacije fibroblasta, sinteze kolagena, kontraktilnosti, migracije upalnih stanica te do razvoja fibroze, u slučaju pravovremenog uklanjanja nokse ili aktivacije apoptoze HSC-MFB dolazi do razgradnje ekstracelularnog matriksa djelovanjem metaloproteinaza i jetrene regeneracije. Moguća mjesta djelovanja: hepatoprotekcija, inhibicija aktivacije HSC, inhibicija funkcije aktivirane HSC- MFB, aktivacija apoptoze NK stanicama, indukcija apoptoze, inhibitori TIMP i MMP i stanična terapija.

Tablica 1. Pregled najistraživanijih tvari u liječenju ciroze jetre te njihov mehanizam djelovanja ^{1,35-39}

ISPITIVANA TVAR	MEHANIZAM DJELOVANJA
Silimarin	protuupalni učinak, hepatoprotekcija
Cirkumin	protuupalni učinak, hepatoprotekcija
Resveratrol	protuupalni učinak, hepatoprotekcija
Vitamin E	protuupalni učinak, hepatoprotekcija
Čimbenik rasta hepatocita	hepatoprotekcija, poticanje proliferacije hepatocita
VX-166	inhibitori kaspaze, hepatoprotekcija
IDN-6556 , GS-945	inhibitori kaspaze, hepatoprotekcija
GS-945	inhibitori kaspaze, hepatoprotekcija
Pioglitazon	PPAR ligand,prevencija aktivacije Itovih stanica
Atrovastatin	inhibitor HMG-CoA reduktaze, prevencija aktivacije Itovih stanica
Sartani (Ibesartan)	Inhibitori angiotenzin konvertaze i AT1R antagonisti , redukcija fibrinogeneze
TGF- β blokirajuća antitijela	blokiranje faktora rasta (TGF - β), redukcija fibrinogeneze
Pirfenidon	blokator sinteze TGF- β , redukcija fibrinogeneze
Imatinib	Inhibitor tirozin kinaza, inhibicija Itovih stanica
Nilotinib	Inhibitori protein kinaze druge generacije , inhibicija Itovih stanica
Leflunomid	inhibitor sinteze pirimidina
Gliotoxin	stimulacija apoptoze Itovih stanica i miofibroblasta
Sulfasalazin	stimulacija apoptoze Itovih stanica i miofibroblasta
Rimonabant	aktivacija kanaboidnih receptora (CB1, CB2), stimulacija apoptoze Itovih stanica i miofibroblasta
Melatonin	protuupalni učinak, inhibicija aktivacije Itovih stanica
Pegilirani interferon Na2b	protuupalni učinak

N-aceticistein	protuupalni učinak, inhibicija aktivacije ltvih stanica
Alopurinol	protuupalni učinak smanjenjem oksidativnog stresa, smanjena aktivacija HSC (\downarrow TGF β), \downarrow inhibicije apoptoze

1.3. DOSADAŠNJA SAZNANJA O PENTADEKAPEPTIDU BPC157

Za pentadekapeptid BPC157 dokazan je antiulkusni učinak u cijelom probavnom sustavu te je smatran medijatorom citoprotekcije. U kliničkim je istraživanjima za upalne bolesti crijeva (PL-10, PLD-116, PL14736 Pliva, Hrvatska) i multiplu sklerozu. To je stabilan peptid, bez toksičnih je učinaka, letalna doza nije dosegnuta, bez nuspojava u testiranjima te je stoga vrlo sigurnog peptidnog profila (npr., druge tvari uzrokuju značajne nuspojave)⁵⁷⁻⁶⁹. Učinak pentadekapeptida BPC157 je povezan s aktivnošću staničnog FAK-paksilin signalnog puta. BPC157 povećava ekspresiju receptora hormona rasta djelovanjem preko Janus kinaze 2. Uočeno je da PDGF-BB i BPC 157 imaju sličnu selektivnost stimulacije granulacijskog tkiva kod cijeljenja rana u db/db miševa. Ipak, BPC157 aktivnije potiče ranu organizaciju kolagena. Također potiče ekspresiju EGR-1 te njegov represorni čimbenik rasta živaca 1-A vežući protein-2 (nab2) u nediferenciranim Caco-2 stanicama brže od PDGF-BB. EGR-1 inducira proizvodnju citokina i čimbenika rasta te ranu tvorbu ekstracelularnog matriksa i kolagena, koji se aktiviraju prilikom jetrene lezije⁷⁰. BPC157 potiče cijeljenje tetive, tetivnomišićnog prijelaza i mišića bez stvaranja ožiljnog tkiva. Pentadekapeptid BPC157 je na modelu akutne jetrene lezije s bilijarnom stazom i ishemijom (ligatura glavnog žučnog kanala i jetrene arterije

unutar 24h) inducirane CCI-4 pokazao hepatoprotektivni učinak⁷¹. Hepatoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC157 je potvrđen i na modelu alkoholne lezije jetre (kod akutne i kronične aplikacije) uz pozitivan učinak na portalnu hipertenziju te kod jetrenih lezija uzrokovanih visokim dozama inzulina⁷²⁻⁷⁴. Uz protulkusni učinak pentadekapeptida BPC157 potvrđen je i hepatoprotektivni učinak na jetrene lezije (od hepatomegalije do opsežne nekroze parenhima) uzrokovane različitim nesteroidnim protuupalnim lijekovima (diklofenak, ibuprofen, paracetamol), pri čemu uz hepatoprotektivni učinak BPC157 ima i pozitivan učinak na prateće lezije cijelog gastrointestinalnog sustava (želudac, dvanaesnik, tanko i debelo crijevo) i mozga (encefalopatija)⁷⁵⁻⁷⁸.

Pentadekapeptid BPC157 modulira aktivnost NO sustava (prilikom blokade NO sustava primjenom LNAME pentadekapeptid BPC157 u potpunosti poništava njen učinak, dok se kod primjene pentadekapeptida BPC157 s L-Argininom, supstratom NO sustava ne postiže potencijacija učinka).⁵⁷⁻⁷⁸.

Tablica 2. Do sada istraživani modeli jetrenih lezija te učinak pentadekapeptida BPC157 ⁷¹⁻⁷⁸

ISTRAŽIVANI MODELI JETRENIH LEZIJA	UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC157
CCI4	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Ibuprofen	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Diklofenak	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Paracetamol	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Visoke doze inzulina	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Kronični alkoholizam	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, prevencija aktivacije Itovih stanica, modulacija NO sustava
Akutna intoksikacija alkoholom	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Ligatura koledokusa i jetrene arterije (24h)	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava
Restraint stress (48h)	antiinflamatorni, hepatoprotektivni učinak, modulacija NO sustava

2. HIPOTEZA

Pentadekapeptid BPC157 djeluje hepatoprotektivno te smanjuje razvoj fibroze na modelu kirurški inducirane bilijarne ciroze u štakora (ligaturom glavnog žučnog kanala).

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ

Opći cilj ovog istraživanja bio je smanjiti fibrozu jetre te očuvati jetrenu funkciju primjenom pentadekapeptida BPC157.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

Specifični cilj ovog istraživanja je očuvanje jetrenog parenhima, biokemijska potvrda uredne jetrene funkcije, reducirana produkcija kolagena u životinja tretiranih pentadekapeptidom BPC157 ovisno o dozi i načinu primjene.

4. MATERIJALI I METODE

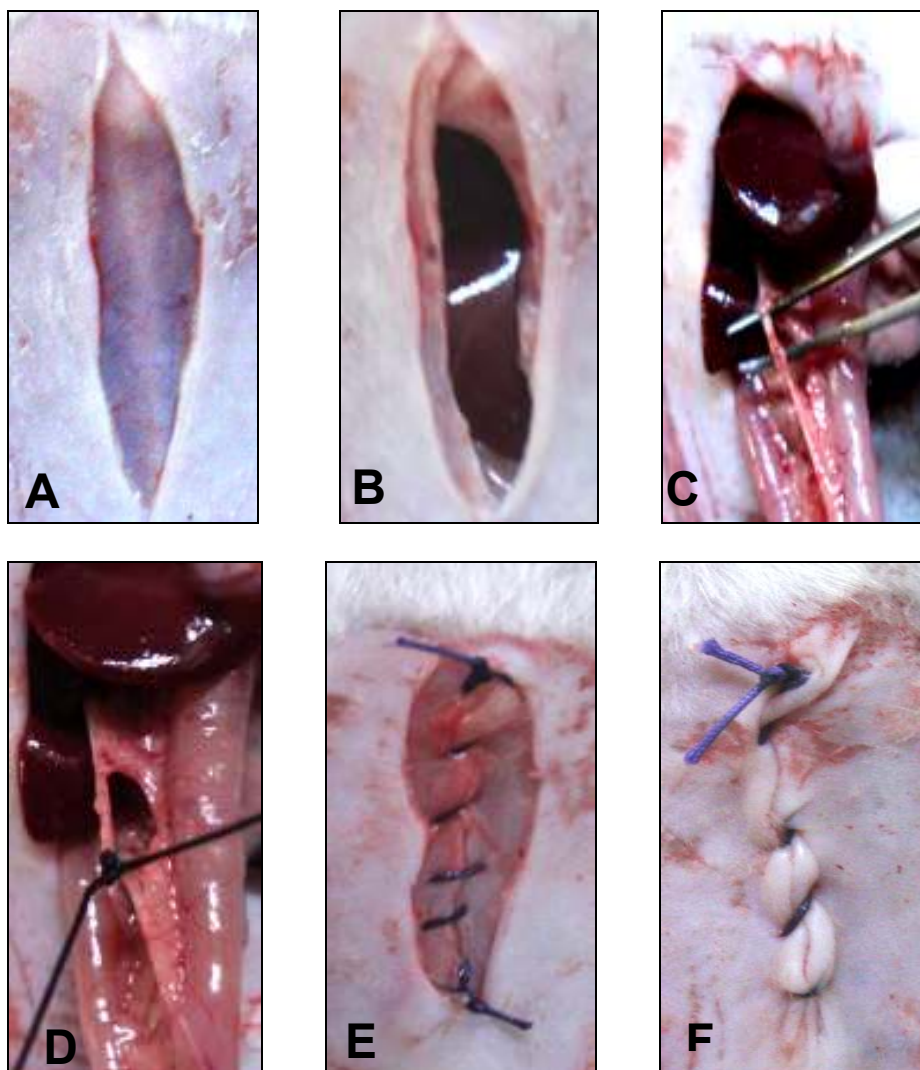
U istraživanju smo primijenili opće prihvaćeni model kirurški inducirane bilijarne ciroze koji je korišten u brojnim studijama²⁻³³. Za istraživanje su korišteni mužjaci Wistar štakora. Prije početka istraživanja sve životinje su bile zdrave, dobrog općeg stanja, jednako uhranjene (mase 180-200g) i kod niti jedne nije primijećena žutica ni akolična stolica. Životinje su držane u normalnim uvjetima, cirkadijani ritam, stalna sobna temperatura, pristup hrani i vodi ad libitum. Sve životinje su hranjene uobičajenom hranom za glodavce. Postupkom randomizacije dodijeljeno je 6 štakora po svakoj pokusnoj skupini kroz vremenske intervale od 2, 4, 6 i 8 tjedana (prema dosad objavljenim istraživanjima). Ukupno su korištene 144 životinje (prikazano u Tablici 3).

Tablica 3. Ispitivane skupine

Skupine	2 tjedna	4 tjedna	6 tjedana	8 tjedana
BPC157 (10 μ g/kg) i.p.	6	6	6	6
BPC157 (10ng/kg) i.p.	6	6	6	6
BPC157 (10 μ g/kg) p.o.	6	6	6	6
BPC157 (10ng/kg) p.o.	6	6	6	6
Kontrola (0,9%NaCl, 5ml/kg) i.p	6	6	6	6
Kontrola (voda za piće 12ml /dan) p.o.	6	6	6	6

4.1. KIRURŠKI MODEL BILIJARNE CIROZE

U općoj anesteziji (Ketamine-HCl 50-60 mg/kg + Xylazine-HCl 5-10 mg/kg i.p.), nakon standardne kirurške pripreme operativnog polja (brijanje kože trbuha, pranje i dezinfekcije operativnog polja povidon jodidom), medijanom laparotomijom (rezom kože i mišića u medijanoj liniji u duljini od 3-4cm), pristupilo se trbušnoj šupljini. Verificirao se u supraduodenalnom dijelu glavni žučni kanal, odvojio od okolne vaskulature (vene porte i jetrene arterije) te je isti isprepariran i ligiran (prema dosadašnjim radovima) . Trbušna stjenka je zašivena po slojevima pojedinačnim šavima (Vicryl 3.0 za mišiće, svila 3.0 za kožu)²⁻³³ . Navedeni postupak prikazan je na Slici 3. Po dovršenom zahvatu životinje su grijane, promatrane i prevrtane sa strane na stranu do uspostave stabilne sternalne rekumbencije i potom su vraćene u vivarij. Hranu i vodu dobivale su ad libitum te analgeziju kao u već objavljenim radovima (buprenorfin 0.5 mg/kg, svakih 12h)⁷⁹.



Slika 3. izvođenje ligature glavnog žučnog kanala.

- A. Rez kože gornje medijane laparotomije
- B. Rez mišića i fascije gornje medijane laparotomije
- C. Verifikacija glavnog žučnog kanala
- D. Ligatura glavnog žučnog kanala
- E. Šavi mišića i fascije laparotomije
- F. Šavi kože.

4.2. LIJEKOVI

Pentadekapeptid BPC 157 (Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija) otopljen u fiziološkoj otopini je korišten u dozama 10µg/kg i 10ng/kg (zbog istraživanja ovisnosti primijenjene doze i učinka) intraperitonealno (i.p skupine) i peroralno u vodi za piće (0.16 µg/ml, ili 0,16ng/ml, 12ml po štakoru ad libitum, p.o. skupine) neposredno nakon učinjenog zahvata i tijekom cijelog istraživanja. Navedeni načini primjene korišteni su zbog istraživanja ovisnosti načina primjene i učinka, kao što je istraživano u dosadašnjim radovima koji su proučavali učinak pentadekapeptida BPC157. Kontrolne životinje primale su ekvivalentnu količinu 0,9% otopine NaCl-a intraperitonealno, odnosno vodu za piće.

4.3. PROMATRANI PARAMETRI

Životinje su svakodnevno promatrane (mjerenje mase (g) i makroskopska promatranja životinja i stolice) i redovito tretirane tijekom cijelog pokusa te prema vremenskim terminima (2, 4, 6 i 8 tjedana) žrtvovane predoziranjem prethodno navedenim anestetikom. Prije samog žrtvovanja anesteziranim životinjama se iz vene kave venepunkcijom uzeo uzorak krvi za biokemijsku analizu. Nakon žrtvovanja izmjerila se masa jetre (sa i bez ispunjenog žučnog kanala) i promatrala se prisutnost/ odsutnost ascitesa. Također su uzeti uzorci tkiva jetre za patohistološku analizu kao u već do sad objavljenim radovima (bojenje hemalaun eozinom, Gomori, Mallory, imunohistokemijski α SMA) ²⁻

33,74,76,77,80-82

4.4. MAKROSKOPSKA ANALIZA

Promatran je izgled, uhranjenost, ponašanje životinja, prisutnost žutice i izgled stolice. Svakodnevno je mjerena masa životinja. Nakon žrtvovanja promatran je izgled jetre (jetra je fotografirana na milimetarskom papiru fotoaparatom (Olympus mju 300 digital)), mjerena je masa jetre (g) pomoću digitalne vage (sa i bez ispunjenog žučnog kanala)²⁻³³.

4.5. HISTOLOŠKA ANALIZA

Neposredno nakon žrtvovanja uzeti su uzorci tkiva jetrenog parenhima, fiksirani u formalinu prema već prije opisanom protokolu fiksacije.^{74,76,77} Nakon fiksacije, uklapanja u parafinske blokove i rezanja uzorci su bojani hemalaun eozinom, po Gomoriu i Malloryu te imunohistokemijski α SMA (određivanje topografske distribucije aktivnih miofibroblasta: lobularna, portalna, porto/septalna sa skorom intenziteta imunoreaktivnih stanica (1-slabo, 2-srednje, 3-jako pozitivne stanice))^{2-33,74,76,77,80-82}. Za morfometrijsku analizu uzoraka koristili smo softverski program ISSA (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska). Uzorci su analizirani pod povećanjem objektiva 10X, 20X ili 40X. Određen je postotak površine kolagena u odnosu na površinu vidnog polja (prosjeak od pet velikih vidnih polja određen „hot-spot“ tehnikom)⁸³. Procijenjena je regeneracijska sposobnost jetre određivanjem proliferacije hepatocita preko broja dvostrukih jezgara (prosjeak od pet velikih vidnih polja)^{74,76,77}. Stupanj jetrene fibroze (0-6) i indeks jetrene aktivnosti (0-18) određeni su prema Ishakovoj klasifikaciji za fibrozu (0- nema

fibroze, 1- fibrozno proširenje pojedinih portalnih prostora, s ili bez kratkih fibroznih septa, 2- fibrozno proširenje većine portalnih prostora, s ili bez kratkih fibroznih septa, 3- fibrozno proširenje većine portalnih prostora s mjestimičnim porto-portalnim (P-P) premoštenjem, 4- fibrozno proširenje portalnih prostora sa značajnim porto-portalnim (P-P) i porto-centralnim (P-C) premoštenjem, 5- značajno premoštenje (P-P i/ili P-C) s pojedinačnim nodulima (inkompletna ciroza), 6- ciroza, vjerojatna ili definitivna) i za nekroinflamatornu aktivnost (piecemeal nekroza: 0-4, konfluentna nekroza: 0-6, fokalna nekroza, apoptoza i fokalna upala: 0-4, portalna upala: 0-4)^{83,84}.

4.6. BIOKEMIJSKA ANALIZA

Iz uzoraka krvi određivane su razine jetrenih enzima (AST, ALT, GGT, alkalne fosfataze), bilirubina i albumina kao pokazatelja jetrene funkcije. Svi testovi su rađeni s Olympus AU2700 uređajem s originalnim reagensima (Olympus Diagnostica, Lismeehan, Ireland)²⁻³³

4.7. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su testirani Kolmogorov-Smirnoff testom za procjenu distribucije podataka. U slučaju normalne distribucije primijenjena je one-way ANOVA test s adekvatnim post hoc testom, dok u slučaju nenormalne distribucije, primijenjen Kruskal-Wallis test s adekvatnim post hoc testom. Za usporedbu frekvencijske razlike među grupama korišten je Chi kvadrat test, odnosno Fischer exact test. Vrijednost $p < 0.05$ smatrala se statistički signifikantnom. Rezultati su prikazani grafički po uzoru na već objavljene radove.^{8,74,76,77}

5. REZULTATI

5.1. MAKROSKOPSKA MJERENJA

Tijekom cijelog istraživanja u svih pentadekapeptid BPC157 životinja primijećen je prirast mase u odnosu na kontrolne skupine. Pentadekapeptid BPC157 životinje su pokretnije, živahnije, bez žutice, smeđe stolice uredne konzistencije, poput zdravih životinja tijekom cijelog eksperimenta, dok su kontrolne životinje bile slabije, trome, ikterične od četvrtog eksperimentalnog tjedna uz porast ascitesa kroz vremenske periode pokusa te su imale akoličnu stolicu. Ascites je bio odsutan u svim skupinama pentadekapeptid BPC157 životinja. Nakon žrtvovanja kod kontrolnih životinja su nađene steatotične, zastoje, a u šestom i osmom tjednu nodularne, cirotične jetre s izrazitom dilatacijom glavnog žučnog kanala, za razliku od pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja kod kojih nisu primijećene nodularne promjene a glavni žučni kanal je manje proširen (Tablica 4, Slika 6, 7).

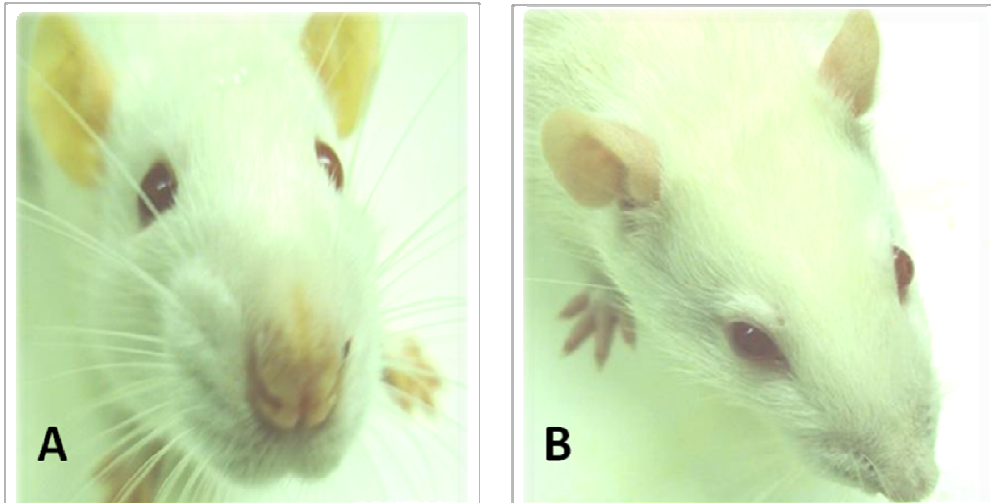
Pronađene su značajno manje mase jetre (s ispunjenim, dilatiranim glavnim žučnim kanalom i mase same jetre) kod pentadekapeptid BPC157 životinja u usporedbi s kontrolnim životinjama ukazujući na manju stazu žuči (Slika 8, 9).

Tablica 4. Makroskopske promjene kod životinja

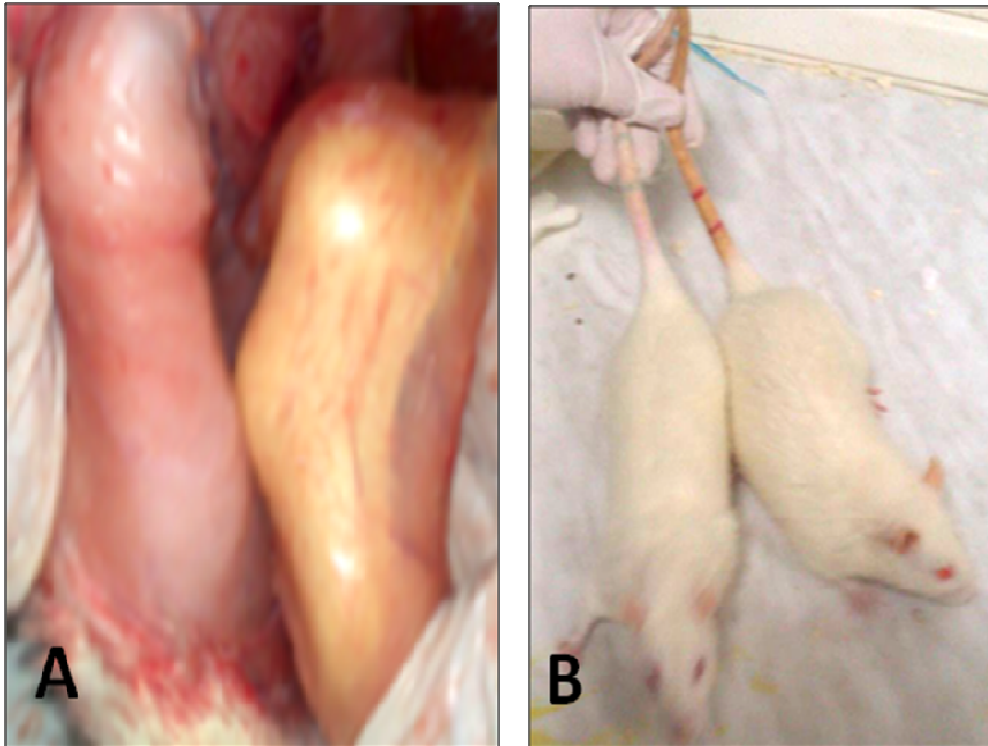
	4 TJEDNA		8 TJEDANA	
	BPC157 μ g	KONTROLA	BPC157 μ g	KONTROLA
PRIRAST MASE	+	+	+	-
ŽUTICA	-	+	-	+
ŽIVAHNOST	+	+	+	-
AKOLIČNA STOLICA	-	+	-	+
ASCITES	-	+	-	+

–Fisher exact probability test +/- vs. kontrola p <0.05

Tablica 4. prikazuje makroskopska promatranja životinja nakon četvrtog i osmog tjedna istraživanja. Kod BPC157 μ g i kontrolnih životinja nakon četvrtog tjedna uočen je prirast mase u odnosu na ranije intervale. Sve BPC157 životinje su se normalno kretale u kavezu , imale su smeđu stolicu te nisu imale ascites, dok su kontrolne životinje bile adinamične, ikterične uz prisutan ascites i akoličnu stolicu. Nakon osmog tjedna kod BPC157 μ g životinja prisutan je prirast mase, dok je u kontrolnih životinja uočena značajna redukcija tjelesne mase. Kod BPC157 μ g životinja je uočena normalna pokretljivost u kavezu,odsustvo žutice te smeđa stolica. Kod kontrolnih životinja nakon osmog tjedna uočen je ascites, žutica, izrazita adinamija te akolična stolica.



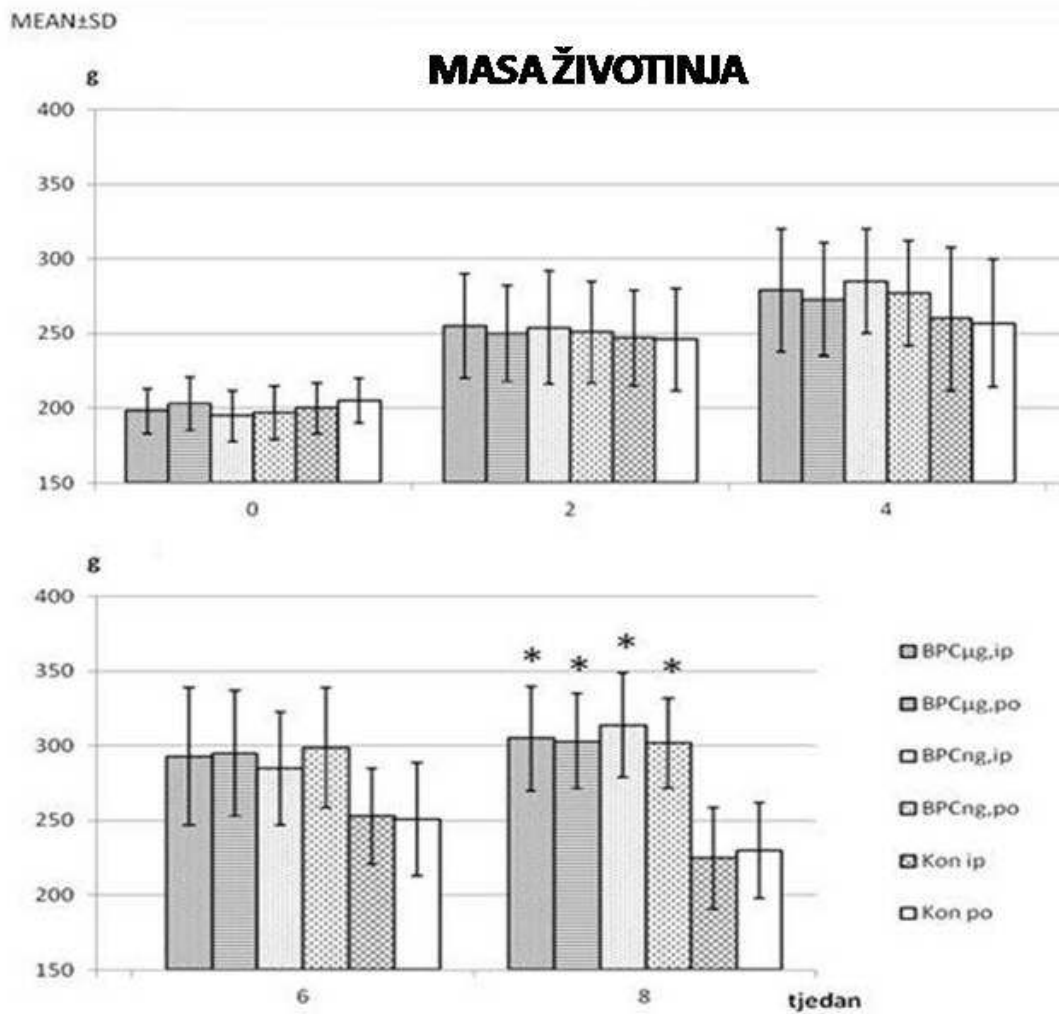
Slika 4. Šesti tjedana istraživanja, pod A: jasno vidljive ikterične uške, njuška i prednje šape kontrolne životinje, pod B: pentadekapeptid BPC157 životinja uredne anikterične kože uški, njuške i prednjih šapa.



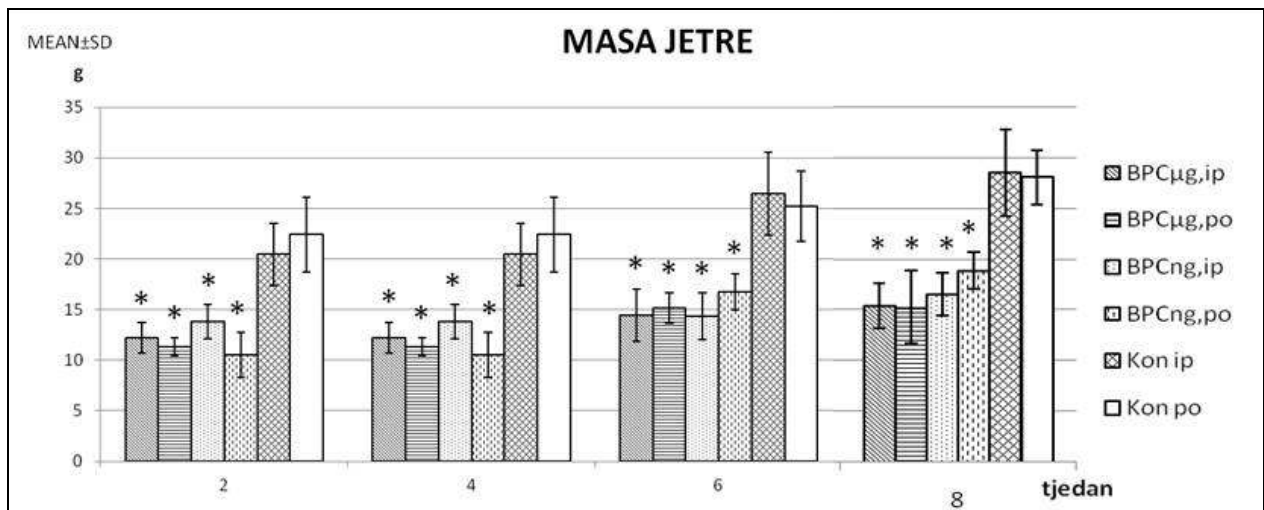
Slika 5. Osmi tjedan istraživanja, pod A : desno, ikterična unutarnja strana kože trbuha kod kontrolne životinje, lijevo, normokolorirana unutarnja strana kože trbuha kod pentadekapeptid BPC157 životinje. Pod B: desno, ikterični rep i uške kod kontrolne životinje, lijevo, normokolorirani rep i uške kod pentadekapeptid BPC157 životinje.



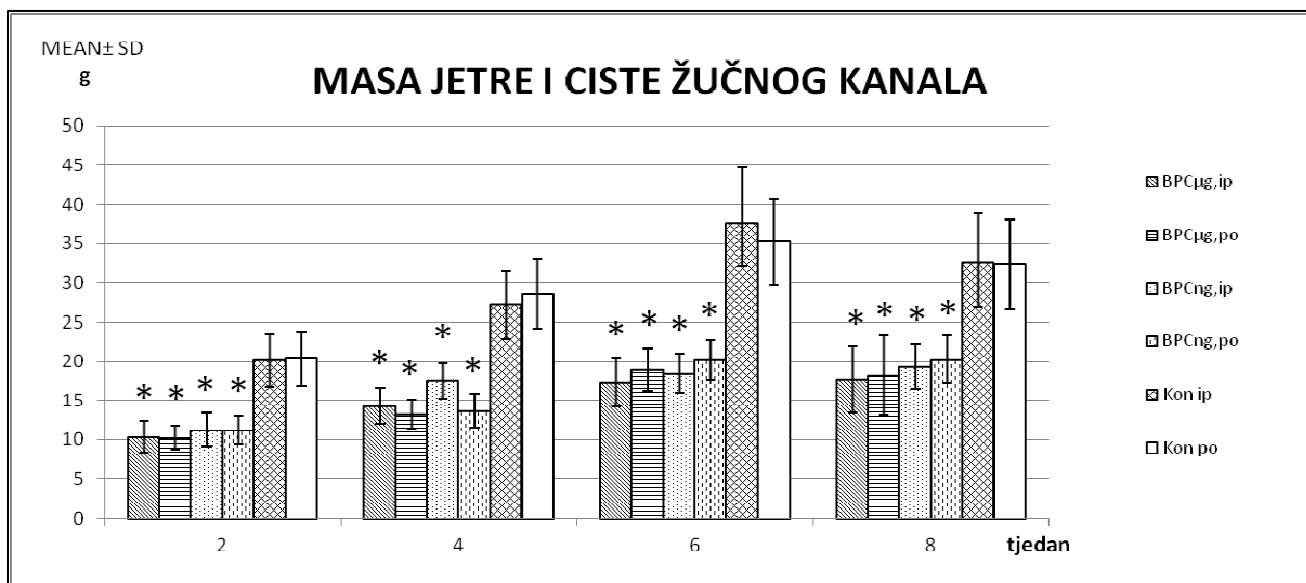
Slika 6. Osmi tjedan istraživanja. Lijevo nodularna, steatotična jetra s većom dilatacijom glavnog žučnog kanala kod kontrolne životinje u odnosu na manju jetru očuvanog parenhima i manje dilatiranog glavnog žučnog kanala u pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja desno.



Slika 7. Masa životinja kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10µg/kg/dan ip. (BPCµg ip.), BPC157 10µg/kg/dan po (0.16µg/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCµg po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10µg/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Postepeni stalan porast mase svih životinja, statistički značajan u osmom tjednu kod pentadekapeptid BPC157 životinja u odnosu na kontrolne životinje. *P <0.05 vs. kontrola.



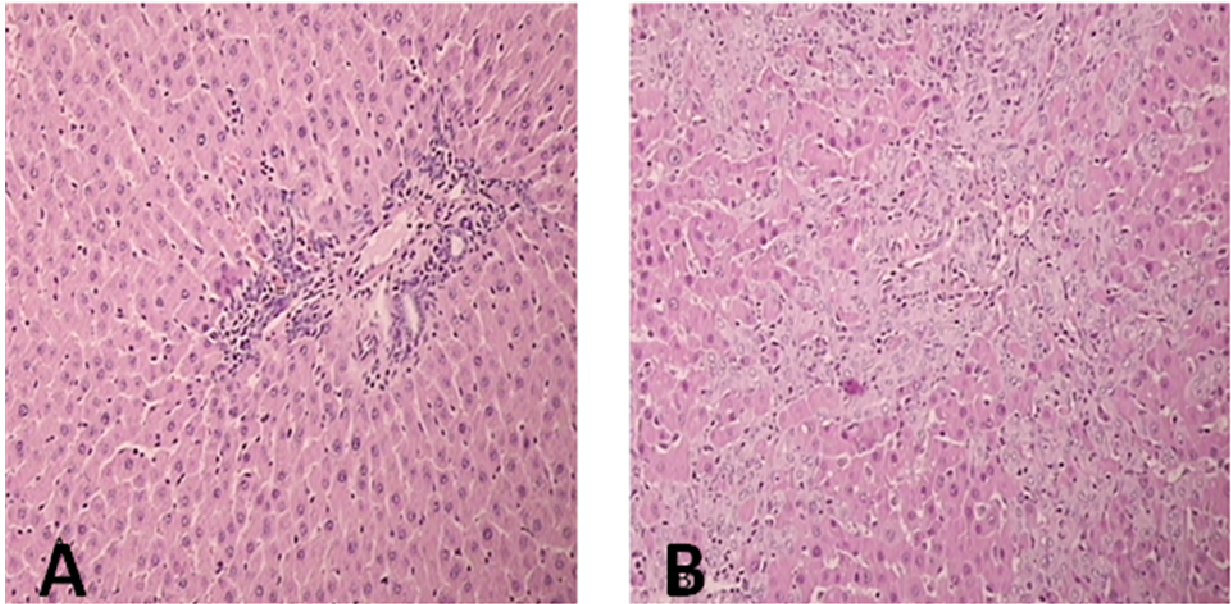
Slika 8. Masa jetre kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno manja masa jetre kod svih pentadeptid BPC157 tretiranih skupina životinja u usporedbi s kontrolnim životinjama tijekom cijelog pokusa. *P < 0.05 vs. kontrola.



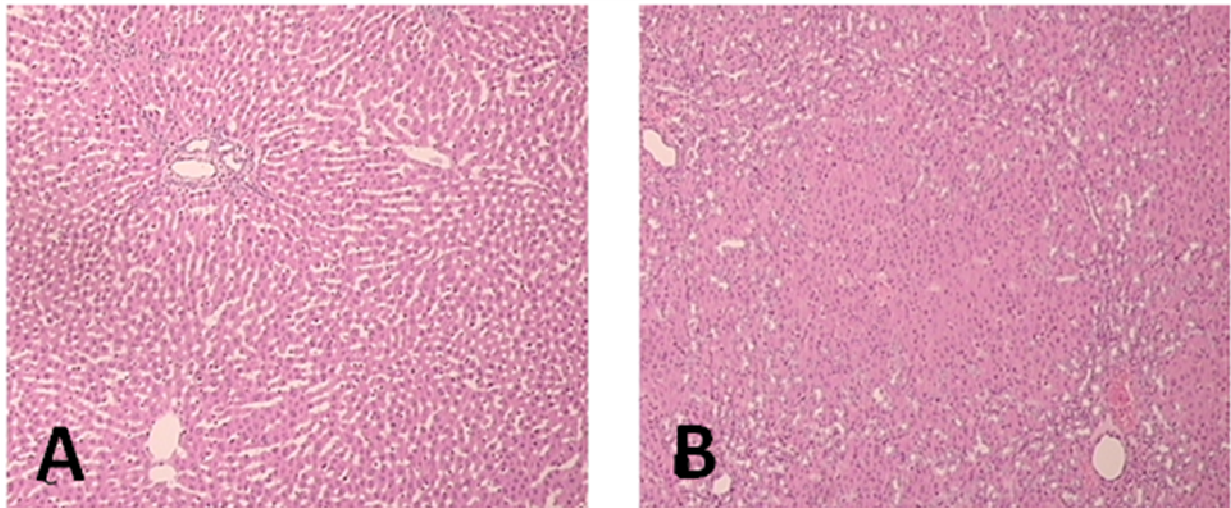
Slika 9. Masa jetre i ciste žučnog kanala kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), pijuća voda (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno manja masa jetre s dilatiranim glavnim žučnim kanalom kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja u odnosu na kontrolne životinje tijekom cijelog pokusa. *P < 0.05 vs. kontrola.

5.2. HISTOLOŠKA ANALIZA

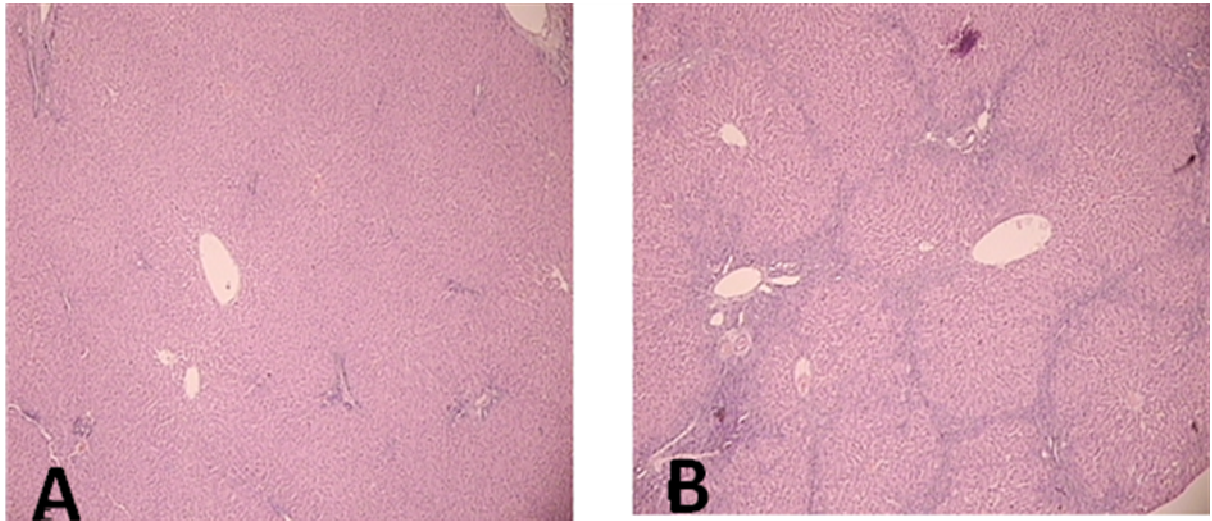
Od drugog tjedna istraživanja kod kontrolnih životinja je uočena blaga proliferacija žučnih kanalića, HSC (Itovih stanica), infiltracija upalnih stanica (portalna i fokalna). Opisane promjene su se pojačavale kod kontrolnih životinja nakon četvrtog tjedna uzrokujući razvoj jetrene ciroze (većina jetrenih režnjića je zamijenjena kolagenom i umnoženim žučnim kanalićima). Kod životinja tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 proces odlaganja kolagena i proliferacije žučnih kanalića je bio značajno manjeg intenziteta (manje fibroznog tkiva po vidnom polju, odsutnost piecemeal i fokalne nekroze, portalna i fokalna upala slabijeg intenziteta) uz očuvanje normalnog jetrenog parenhima. (Slika 10-24).



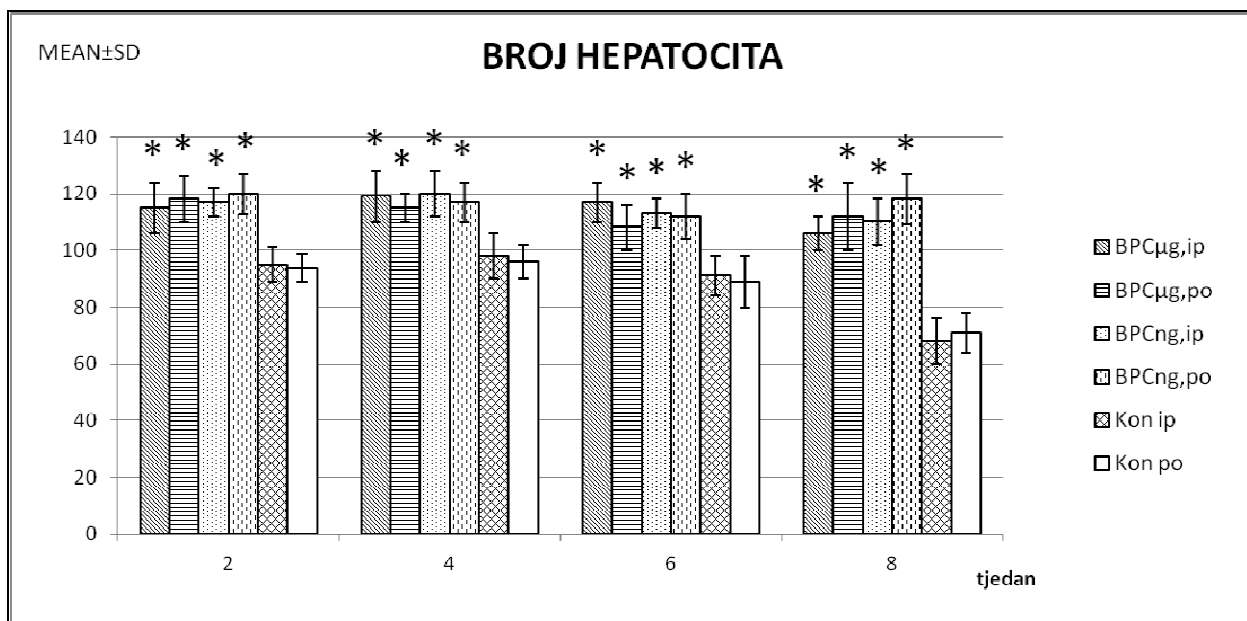
Slika 10. 4 tjedna nakon podvezivanja glavnog žučnog kanala. Pod A: BPC157 skupina, prikazano portalno područje s portalnom venom, ograncima jetrene arterije i žučnim kanalima bez povećane proliferacije, pod B: kontrolna skupina, prikazano značajno povećanje proliferacije žučnih kanala. Slike A i B snimljene su pod vidnim povećanjem 20X, hemalaun i eozin bojenje.



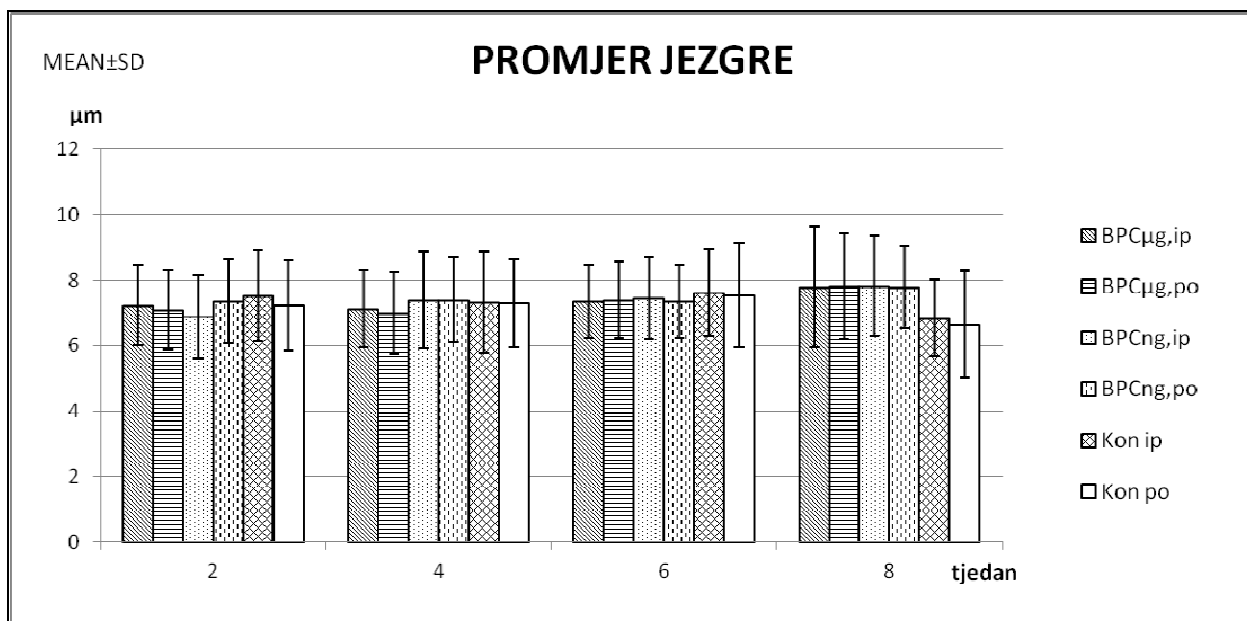
Slika 11. Šest tjedana nakon ligacije glavnog žučnog kanala. Pod A : BPC157 skupina, prikazana je sinusoidalna dilatacija s očuvanim portalnim područjima, pod B: kontrolna skupina, prikazana je poremećena hepatalna lobularna struktura, porto –portalna i porto- centralna. Slike A i B snimljene su pod vidnim povećanjem 10X, hemalaun i eozin bojenje.



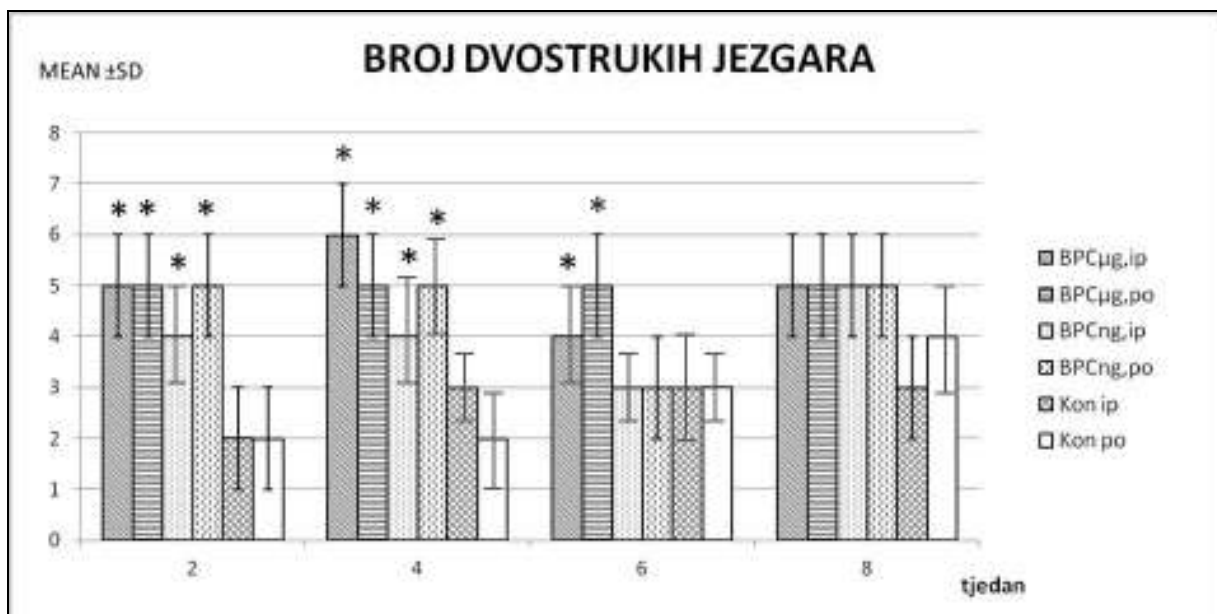
Slika 12. Osam tjedana nakon ligacije glavnog žučnog kanala. Pod A: BPC157 skupina, prikazana su normalna jetrena portalna područja s očuvanim parenhimom, pod B: kontrolna skupina, većina jetrenih lobularnih područja je zamijenjena sa proliferiranim žučnim kanalićima i fibroznim tkivom. Slike A i B snimljene su pod vidnim povećanjem 40X, hemalaun i eozin bojenje.



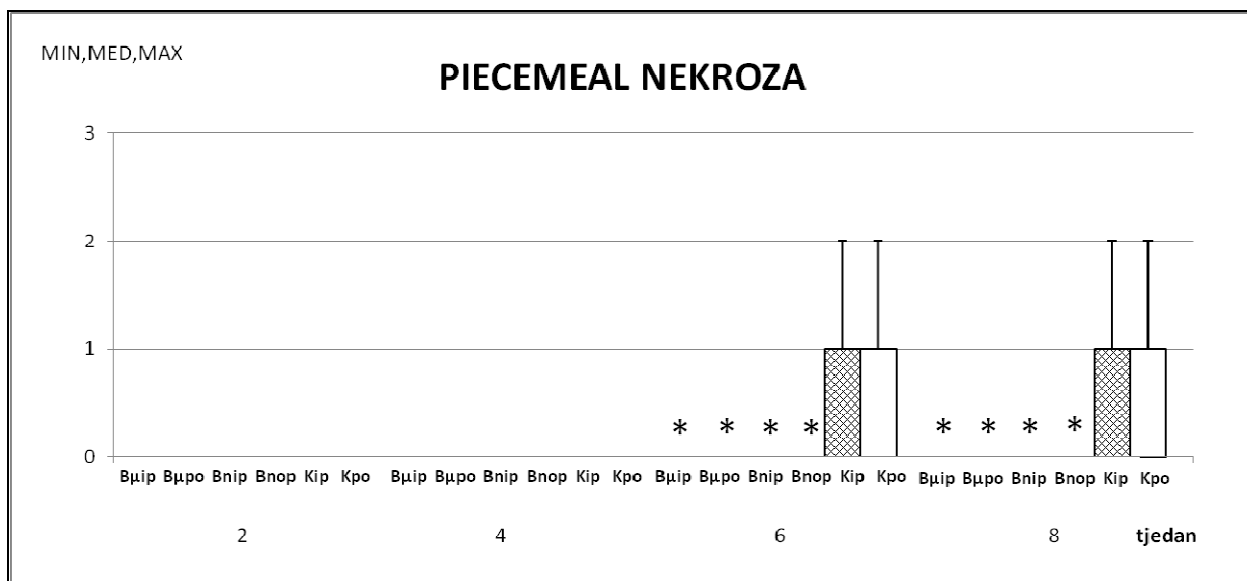
Slika 13. Broj hepatocita nakon ligature glavnog žučnog kanala u štakora kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće(12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po). Značajno veći broj hepatocita kod pentadekapeptid BPC157 životinja u usporedbi s kontrolnim životinjama tijekom cijelog pokusa. *P <0.05 vs. kontrola.



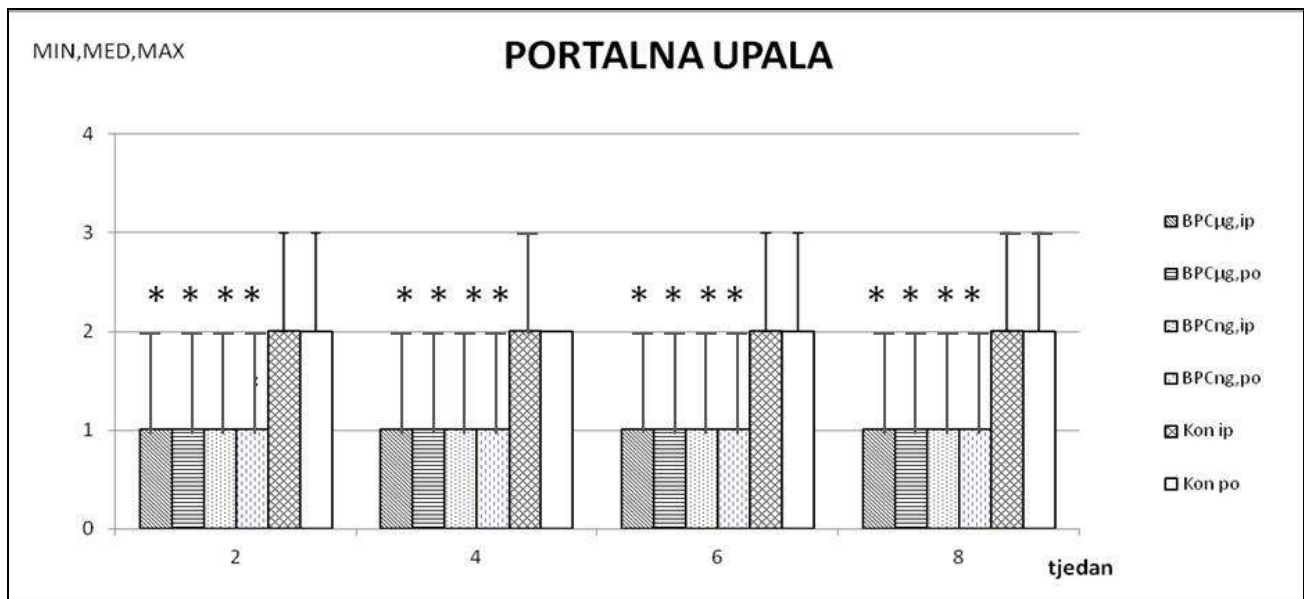
Slika 14. Promjer jezgre hepatocita kroz tjedne. Bez statistički značajne razlike među skupinama. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). *P <0.05 vs. kontrola.



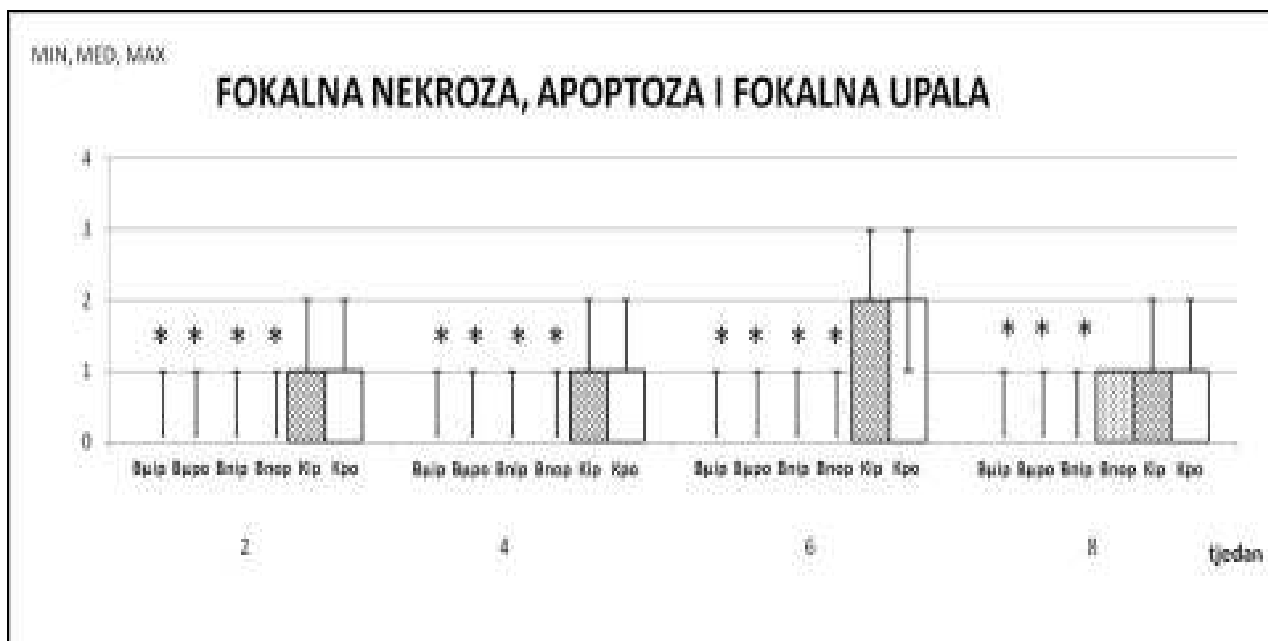
Slika 15. Broj dvostrukih jezgara kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC 157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno veći broj dvostrukih jezgara hepatocita kod pentadekapeptid BPC157 μ g tretiranih životinja tijekom, drugog, četvrtog i šestog tjedna istraživanja te drugog i četvrtog tjedna istraživanja kod životinja tretiranih s pentadekapeptid BPC157 ng u usporebi s kontrolnim životinjama. *P < 0.05 vs. kontrola.



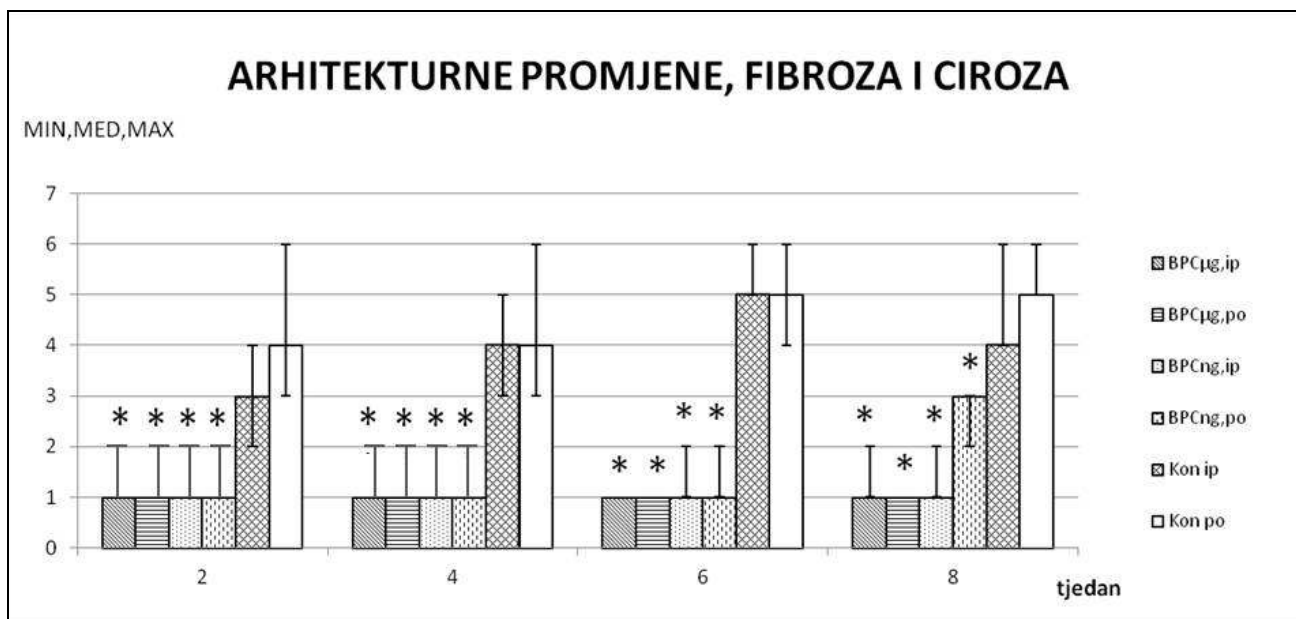
Slika 16. Piecemeal nekroza kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC 157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Skor 0-4 (0-odsutna, 1- slaba, 2 - slaba/umjerena, 3- umjerena, 4-opsežna). Odsutnost piecemeal nekroze u pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja, za razliku od kontrolnih životinja kod kojih je bila odsutna samo u prva 4 tjedna istraživanja. *P <0.05 vs. kontrola.



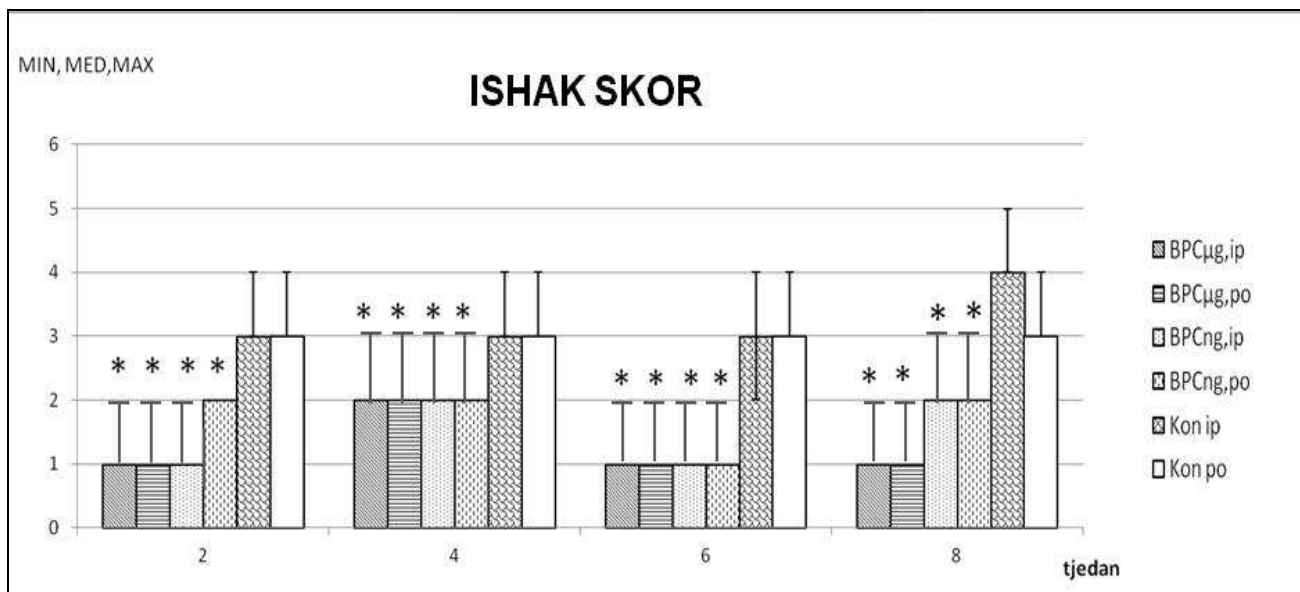
Slika 17. Portalna upala kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Skor 0-4 (0- odsutna, 1- slaba, 2-umjerena, 3- umjerene/značajna, 4- značajna). Kod pentadekapeptid BPC157 životinja tijekom cijelog istraživanja nalazi se slabiji intenzitet portalne upale u usporedbi s kontrolnim životinjama. *P <0.05 vs. kontrola.



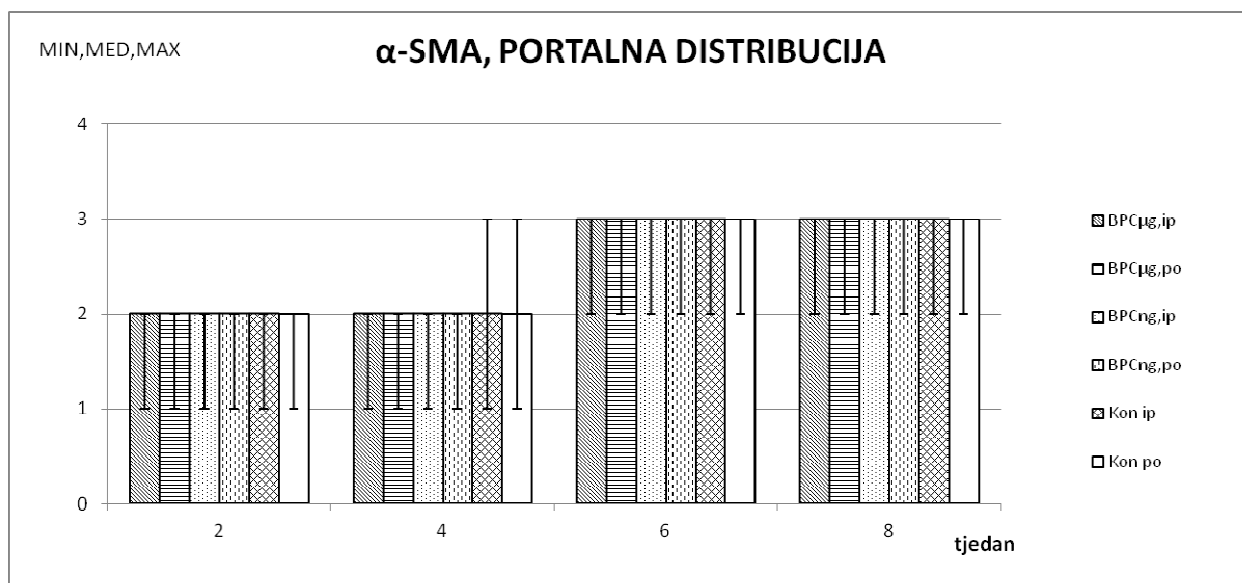
Slika 18. Fokalna nekroza, apoptoza i upala kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Skor 0-4 (0- odsutna, 1- jedno područje ili manje, 2- dva do četiri područja, 3- pet do deset područja, 4- više od deset područja). Odsutnost fokalne litičke nekroze, apoptoze i fokalne upale kod pentadekapeptid BPC157 životinja tijekom prvih 6 tjedana istraživanja te kod BPC157 μ g skupina (ip. i po. skupina) i BPC157 ng, ip skupini životinja u osmom tjednu istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. *P <0.05 vs. kontrola.



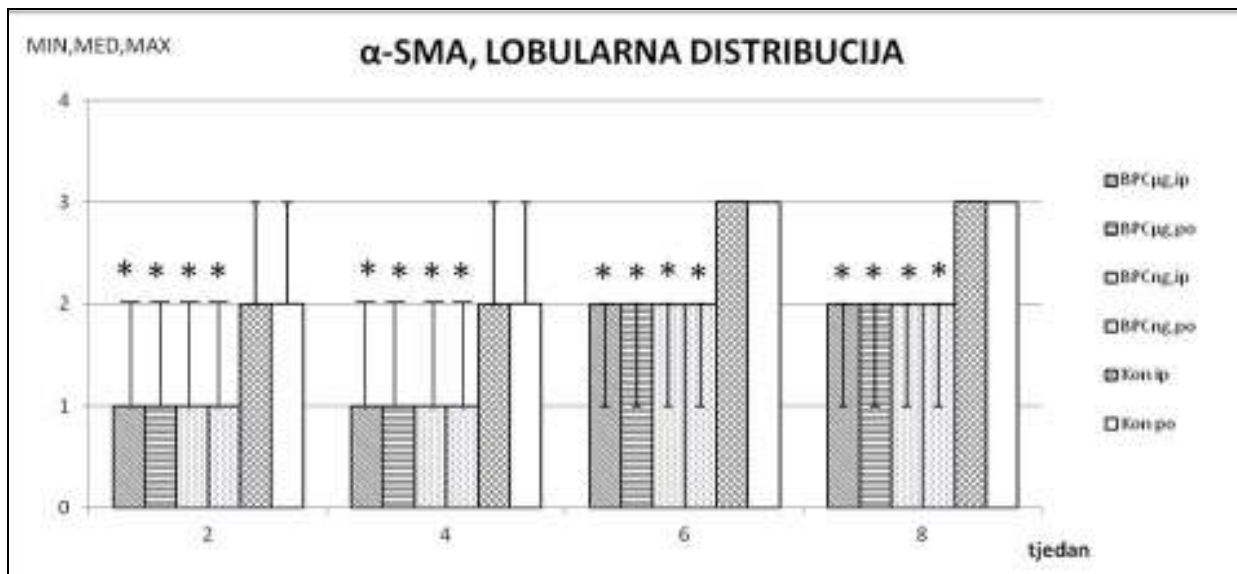
Slika 19. Arhitekturne promjene, fibroza i ciroza kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.) Skor 0-6 (0-odsutnost fibroze, 1-fibrozna ekspanzija ponekih portalnih područja, 2- fibrozna ekspanzija većine portalnih područja, 3- fibrozna ekspanzija većine portalnih područja s povremenim portoportalnim premoštavanjem, 4- fibrozna ekspanzija portalnih područja sa značajnim portoportalnim premoštenjima kao i portocentralnim, 5- značajno premoštavanje (porto-portalni i/ili porto-centralno) s povremenim nodularnim strukturama (djelomična ciroza), 6- ciroza). Značajno manji intenzitet arhitekturnih promjena, fibroze i ciroze u pentadekapeptid BPC 157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u usporedbi s kontrolnim životinjama. *P < 0.05 vs. kontrola.



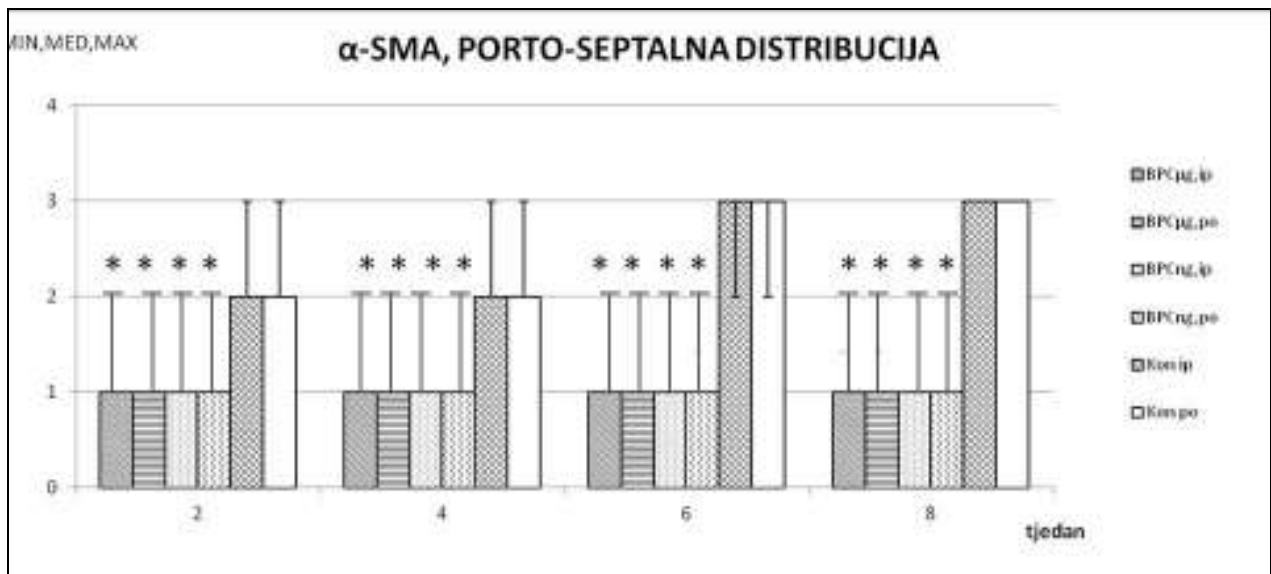
Slika 20. Ishak skor kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno manji ukupan Ishak skor (0-18) kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u usporedbi s kontrolnim životinjama. *P < 0.05 vs. kontrola.



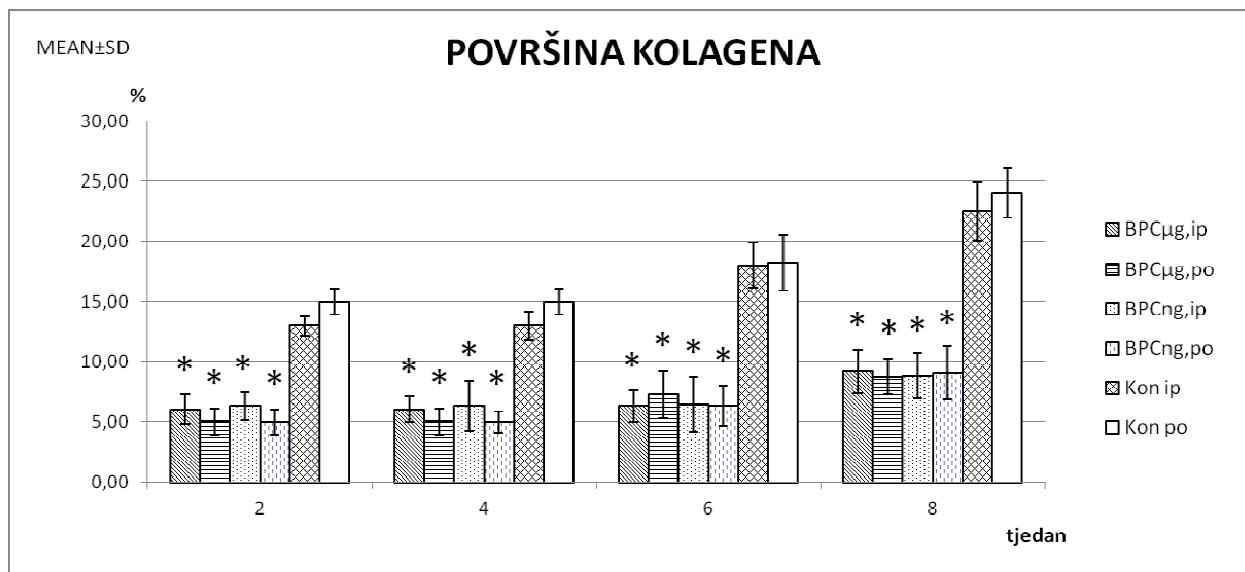
Slika 21. α - SMA, portala distribucija kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Bez značajne razlike u intenzitetu (1-3) u portalnoj distribuciji (α -SMA bojenje). *P <0.05 vs. kontrola.



Slika 22. α - SMA, lobularna distribucija kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.) Značajno manji intenzitet (1-3) u lobularnoj distribuciji (α -SMA bojenje) kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u usporedbi s kontrolnim životinjama. *P <0.05 vs. kontrola.



Slika 23. α - SMA, porto-septalna distribucija kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.) Značajno manji intenzitet (1-3) u porto-septanoj distribuciji (α -SMA bojenje) kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u usporebi s kontrolnim životinjama. *P <0.05 vs. kontrola.

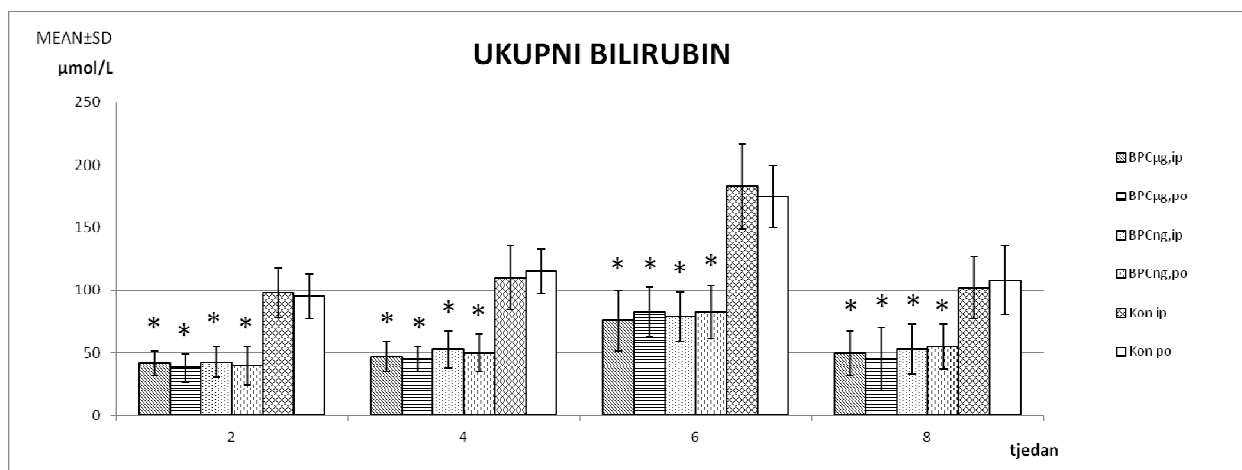


Slika 24. Površina kolagena kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno manja površina kolagena po vidnom polju kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u usporedbi s kontrolnim životinjama. *P < 0.05 vs. kontrola.

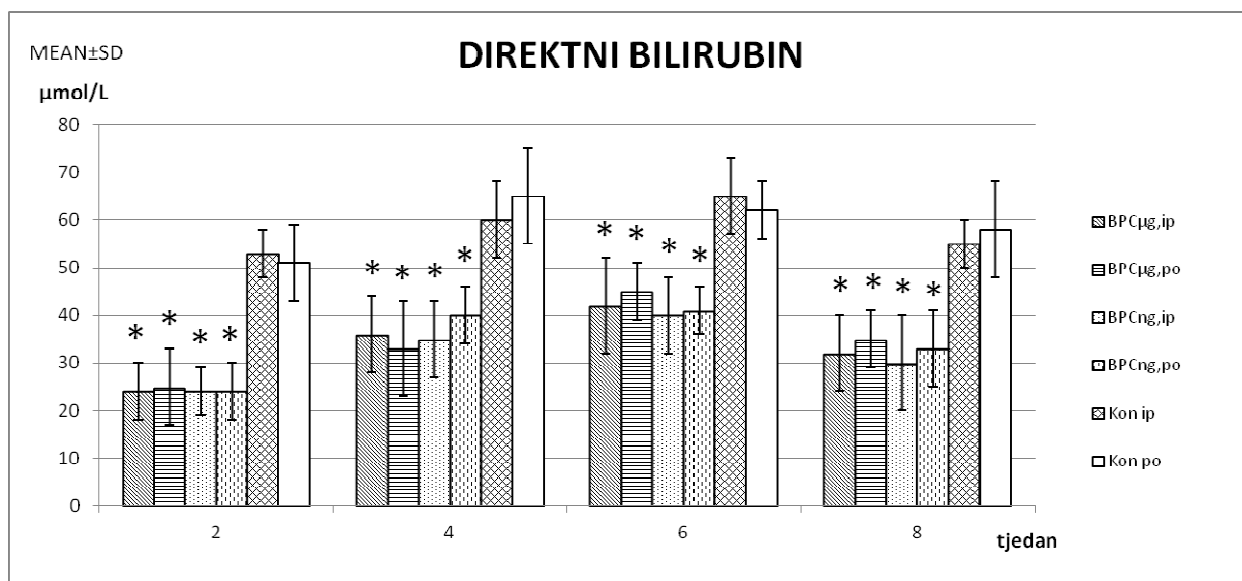
5.3. BIOKEMIJSKA ANALIZA

Tijekom cijelog istraživanja kod svih pentadekapeptid BPC157 životinja nađene su značajno niže serumske vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina u usporedbi s kontrolnim životinjama, posljedično kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja nije primijećena žutica (prisutna kod kontrolnih životinja od četvrtog tjedna istraživanja). (Slika 25, 26)

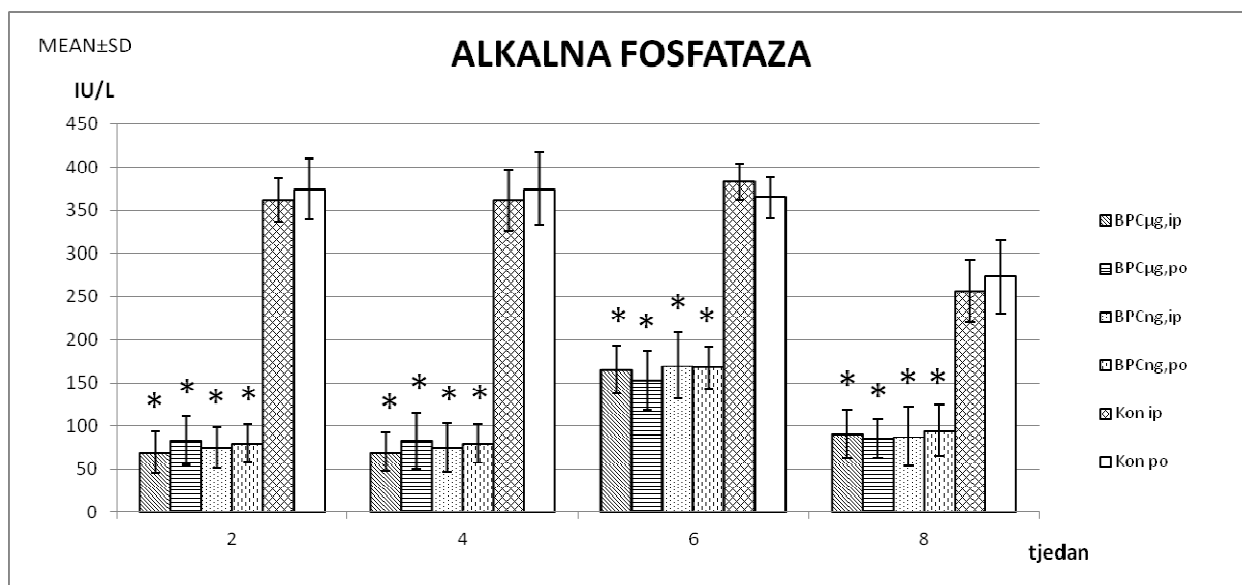
Kao posljedica staze žuči te otpuštanja slobodnih radikala, žučnih soli dolazi do oštećenja funkcije hepatocita kod kontrolnih životinja i posljedičnog rasta jetrenih enzima. Serumske razine jetrenih enzima (alkalne fosfataze, AST, ALT, GGT) su bile značano niže u pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja u usporedbi s kontrolnim životinjama pokazujući manje funkcionalno jetreno oštećenje i hepatoprotekciju u pentadekapeptid BPC 157 životinja. (Slika 27-30)



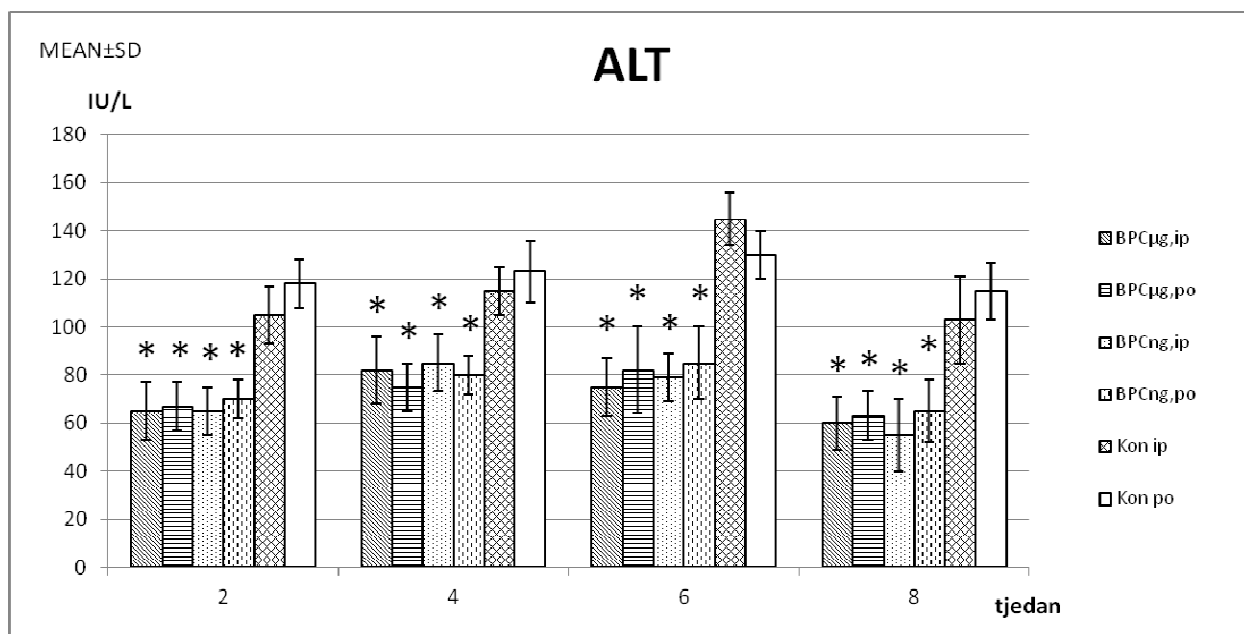
Slika 25. Ukupni bilirubin kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC 157 10μg/kg/dan ip. (BPCμg ip.), BPC157 10μg/kg/dan po (0.16μg/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCμg po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10μg/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno niže vrijednosti ukupnog serumskog bilirubina kod pentadekapeptid BPC157 životinja tijekom cijelog istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. *P < 0.05 vs. kontrola.



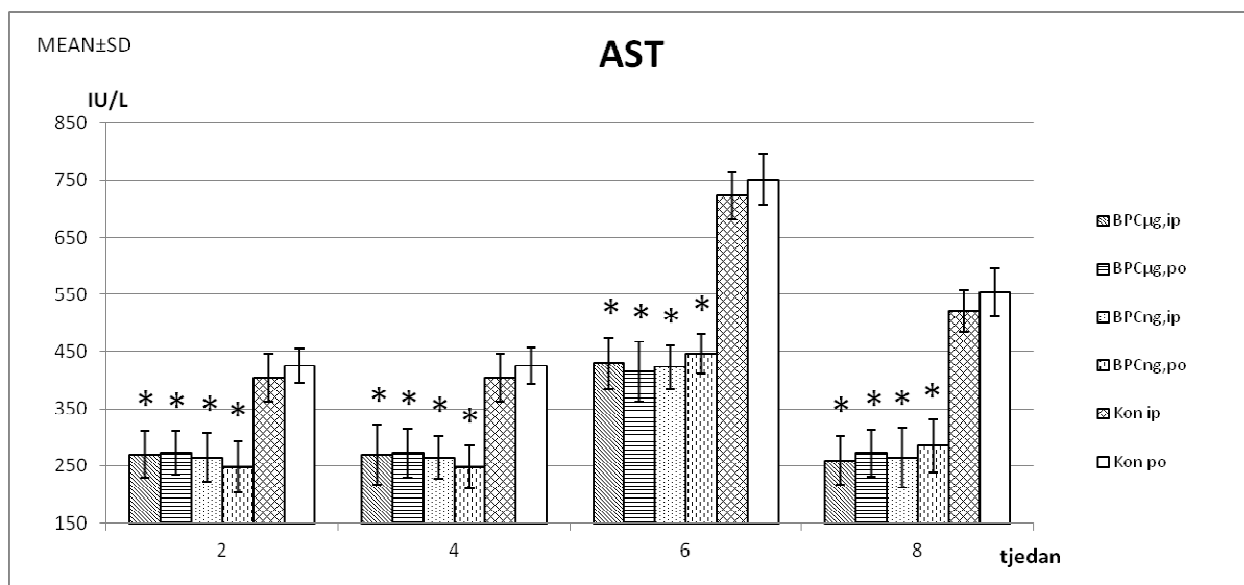
Slika 26. Direktni bilirubin kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno niže serumske vrijednosti direktnog bilirubina kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. *P < 0.05 vs. kontrola.



Slika 27. Alkalna fosfataza kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno niže serumske vrijednosti alkalne fosfataze kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u usporedbi s kontrolnim životinjama. *P < 0.05 vs. kontrola.

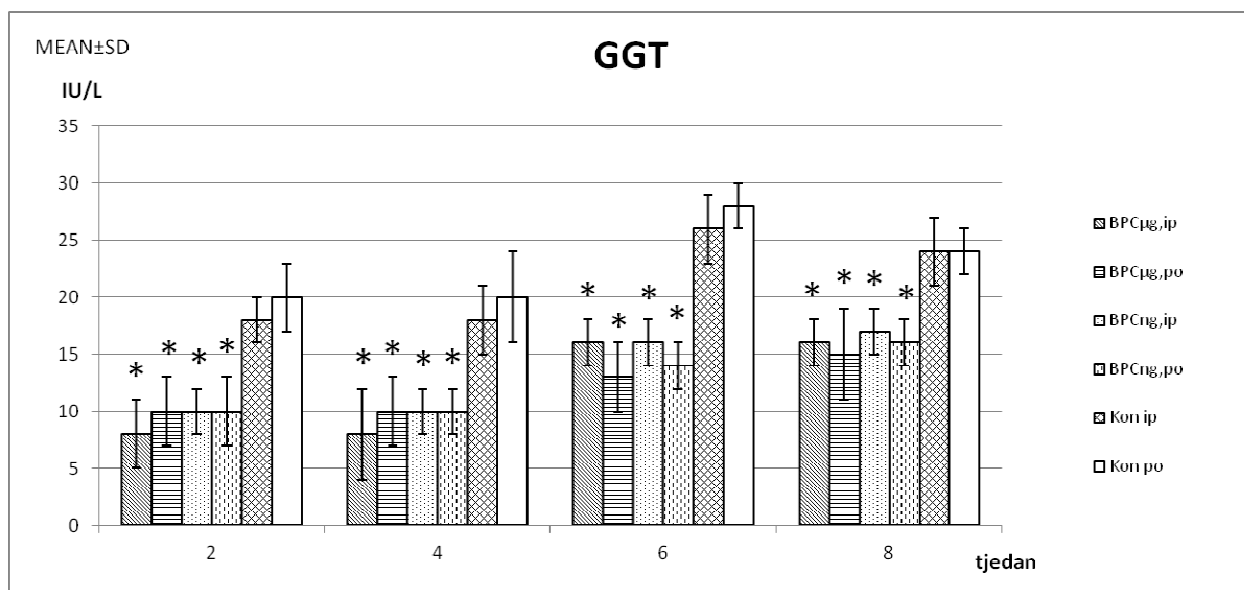


Slika 28. ALT kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno niže serumske vrijednosti ALT-a kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. *P <0.05 vs. kontrola.



Slika 29. AST kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.) *P < 0.05 vs. kontrola.

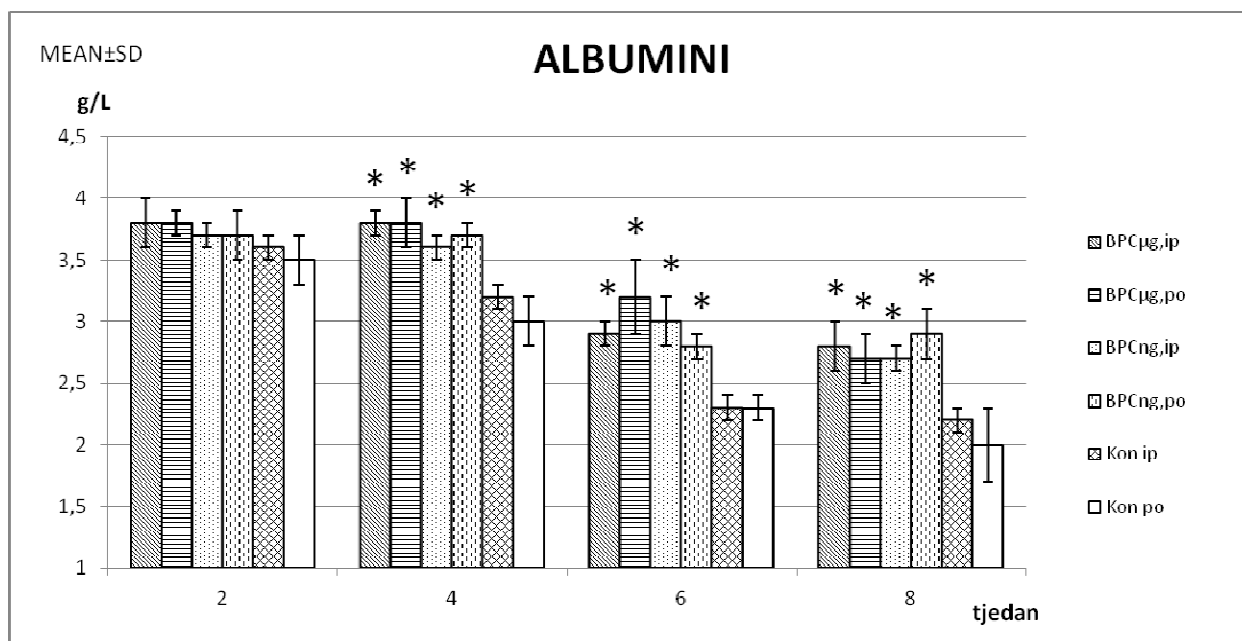
Značajno niže serumske vrijednosti AST-a kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. p vrijednost < 0.05 je smatrana statistički značajnom.



Slika 30. GGT kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.).

Značajno niže serumske vrijednosti GGT-a kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja tijekom cijelog istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. *P <0.05 vs. kontrola.

Serumske razine albumina su bile značajno više u pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja, slične s razinama u zdravih životinja potvrđujući bolju sintetsku funkciju jetre što pridonosi manjem razvoju ascitesa. (Slika 31.)



Slika 31. Albumini kroz tjedne. 0.9%NaCl (5ml/kg/dan ip.) (Kon. ip.), voda za piće (12 ml/štakor/dan) (Kon. po.), BPC157 10 μ g/kg/dan ip. (BPC μ g ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po (0.16 μ g/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPC μ g po), BPC157 10ng/kg/dan ip. (BPCng ip.), BPC157 10 μ g/kg/dan po. (0.16ng/ml, 12 ml/štakor/dan) (BPCng po.). Značajno više serumske vrijednosti albumina kod pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja od četvrtog tjedna istraživanja u odnosu na kontrolne životinje. *P < 0.05 vs. kontrola.

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju promatrali smo učinak pentadekapeptida BPC157 na razvoj jetrene fibroze na štakorskom modelu ligature glavnog žučnog kanala. Potvrđen je hepatoprotektivan i protuupalni učinak pentadekapeptida BPC157. Rezultati istraživanja ukazuju na moguću inhibiciju aktivacije hepatskih staničnih stanica pentadekapeptidom BPC157.

Ciroza jetre je terminalni stadij procesa fibroze jetre te je rezultat utjecaja različitih nepovoljnih uzroka³⁴. U ranim fazama taj proces je reverzibilan pod uvjetom pravovremenog uklanjanja uzroka jetrene nekroze. Proces fibroze postaje nepovratan s daljnjom izloženošću jetrenoj nekrozi što posljedično rezultira odlaganjem izvanstaničnog matriksa te razvojem jetrene ciroze.

Ozljeda jetre određenim nekrosama rezultira povećanom razinom žučnih kiselina i soli, otpuštanjem slobodnih radikala te aktivacijom niza kaskadnih reakcija od upalne reakcije, duktalne proliferacije do apoptoze hepatocita i transformacije HSC u miofibroblaste s povećanom proizvodnjom kolagena tipa I (70%). Ostatak kolagena nastaje aktivacijom portalnih fibroblasta i fibrocita^{1,35}

Najčešće istraživane tvari s potencijalnim učinkom na cirozu jetre s obzirom na mjesto učinka mogu se podijeliti na protuupalne i hepatoprotektivne tvari, inhibitore aktivacije hepatskih staničnih stanica, inhibitore aktivnosti hepatskih staničnih stanica-miofibroblasta, induktore apoptoze hepatskih staničnih stanica-miofibroblasta, inhibitore metaloproteinaze i TIMP receptora te stanična terapija.⁴¹

Pentadekapeptid BPC157 je peptid izvorno izoliran iz ljudskog želučanog soka, ima antiulkusni učinak u cijelom probavnom sustavu što je prikazano na

mnogim različitim modelima. BPC157 je u kliničkim ispitivanjima za upalnu bolest crijeva i multiplu sklerozu. Ovaj peptid je bez toksičnih učinaka, smrtonosna doza nije postignuta, nema nuspojava i zato je vrlo sigurnog peptidnog profila⁵⁷⁻⁶⁹. Poboljšava cijeljenje različitih tkiva (mišića (poprečnoprugastog i glatkog), živaca, sluznice, kosti, tetiva) te cijeljenje složenih rana poput fistula (ezofagokutane, gastrokutane, kolokutane, duodenokolične, rektovaginalne)^{85,86}. BPC157 u prisutnosti nokse in vivo potiče angiogenezu (potiče ekspresiju VEGF, CD34 i FVIII pozitivnih vaskularnih elemenata) ali bez izravnog poticanja angiogeneze u in vitro uvjetima^{85,86}.

Uočeno je da PDGF-BB i BPC157 imaju sličnu selektivnost na stimulaciju granulacijskog tkiva u zacjeljivanju rana kod db / db miševa, međutim, BPC157 aktivnije potiče ranu organizaciju kolagena. On također potiče ekspresiju EGR-1 i njenog represora NIAB2 u Caco-2 stanicama brže od PDGF-BB. EGR-1 inducira produkciju citokina i faktora rasta te rano nastajanje izvanstaničnog matriksa, također modulira aktivnost FAK-paksilina i JAK-2 signalnog puta koji su bitni u procesima fibrogeneze i fibrolize. Smanjuje prekomjerno otpuštanje endotelina (koji potiče kontrakciju ltvih stanica) te modulira aktivnost NO sustava s posljedičnom boljom prokrvljenošću tkiva, većom tolerancijom na noksu i smanjenim razvojem ožiljnog tkiva⁷⁰.

BP157 je na modelu akutnih jetrenih lezija izazvanih CCl₄ (u roku od 24 sata) pokazao hepatoprotektivni učinak⁷¹.

Hepatoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC157 je potvrđen na modelima alkoholnih jetrenih lezija (djeluje kao antagonist alkohola, umanjuje želučana i jetrena oštećenja, bilo nakon akutnog ili kroničnog unosa, suprotstavlja se akutnoj intoksikaciji i posljedicama apstinencije kod kroničnog

alkoholnog abuzusa), s pozitivnim učinkom na portalnu hipertenziju te kod jetrenih lezija uzrokovanih visokim dozama inzulina ⁷²⁻⁷⁴.

Također je uočen pozitivan učinak pentadekapeptida BPC 157 na portalnu hipertenziju, snižavanjem portalnog tlaka već 3 minute nakon aplikacije peptida, redistribucijom portalnog krvotoka te otvaranjem prirodnih portokavalnih komunikacija uz održanu bolju prokrvljenost tkiva jetre.

Kod štakora s ligaturom glavnog žučnog kanala tretiranih s pentadekapeptidom BPC157 uočili smo manju dilataciju žučnog kanala bez vidljivih nodularnih promjena jetre, bez uočene steatoze dok ju u kontrolnoj skupini nađena steatotična, zastojna, nodularna, fibrozna čvrsta jetra s većim promjerom žučnog kanala. Za napomenuti je da pentadekapeptid BPC157 životinje nisu bile ikterične te kod njih nije uočen razvoj ascitesa, koji je redovito bio prisutan kod kontrolnih životinja. Također sve tretirane životinje su imale normokoloriranu stolicu za razliku od akolične stolice u kontrolnih životinja što ukazuje na indirektni, drugi put izlučivanja žuči iz tijela i zahtjeva daljnja istraživanja. Prirast mase uočen kod tretiranih životinja ukazuje na bolju sintetsku i metaboličku funkciju jetre što također rezultira većom pokretljivošću i aktivnošću tretiranih životinja.

Serumske vrijednosti bilirubina (ukupnog i direktnog) bile su značajno niže u pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja što govori za prilog hepatoprotekciji na razini hepatocita te unatoč stazi te povišenoj razini žučnih soli, očuvanoj metaboličkoj funkciji jetre. Kod pentadekapeptid BPC157 životinja uočena je histološki i manja portalna i periportalna upala što potvrđuje od prije i na drugim modelima i organskim sustavima uočeni protuupalni učinak te govori u prilog generaliziranom protuupalnom učinku. Alfa SMA bojenjem koje je

indirektni pokazatelj aktivnih miofibroblasta uočena je značajno manja aktivnost miofibroblasta u lobularnim i portoseptalnim prostorima što govori za manju sintezu kolagena te manji razvoj jetrene ciroze.

Vrijednosti jetrenih enzima (AST, ALT, GGT) također su bile niže u pentadekapeptid BPC157 tretiranih životinja sa značajno višim razinama serumskog albumina.

Protuupalni te citoprotektivni učinak pentadekapeptid BPC157 na stanice žučnih kanalića je također potvrđen s obzirom na značajno niže serumske vrijednosti alkalne fosfataze.

Vrijednosti navedenih enzima potvrđuju bolju funkciju jetre, manje jetreno oštećenje u usporedbi s kontrolnim životinjama.

Histološki kod kontrolnih životinja pronađena je razvijena ciroza jetre sa značajno većim postotkom površine parenhima zahvaćenim kolagenom, veća i intenzivnija područja upale u usporedbi s pentadekapeptid BPC157 životinjama kod kojih je jetreni parenhim bio usporediv sa zdravim jetrenim parenhimom.

Kod životinja tretiranih pentadekapeptid BPC157 uočili smo značajno veći broj hepatocita te veći broj hepatocita s dvostrukim jezgrama u odnosu na kontrolne životinje kod kojih se ukupni broj hepatocita te broj hepatocita s dvostrukim jezgrama konstantno snižavao, iz čega proizlazi očuvana mitotska aktivnost hepatocita kod BPC157 životinja te samim time i veća regenerativna sposobnost jetre. Pentadekapeptid BPC157 svojim učinkom preko Egr-1 gena i njegovog represora NIAB2 vjerojatno regulira aktivnost HSC stanica te na taj način značajno smanjuje proces nastanka ožiljnog tkiva te posljedičnog razvoja fibroze jetre.⁷⁶

Nadalje pentadekapeptid BPC157 modulira aktivnost NO sustava, potiče sintezu NO-a što posljedično dovodi do bolje vaskularizacije i oksigenacije tkiva što također potiče regeneraciju generalno, pa tako i same jetre.⁸⁷

Sve zajedno ukazuje na hepatoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC157 u stanju kolestaze te sprečavanju razvoja ciroze jetre.

7. ZAKLJUČAK

Poništavanje procesa fibroze jetre predstavlja paradigmu za proces cijeljenja, ne samo u jetri nego i u drugim tkivima dok primjena pentadekapeptida BPC157 redovito poboljšava proces cijeljenja uz smanjenu neželjenu fibrozu. Shodno tome, izgleda da se pentadekapeptid BPC157 suprotstavlja razvoju ciroze jetre citoprotektivnim odnosno hepatoprotektivnim učinkom, protuupalnim učinkom, posljedičnom inhibicijom aktivacije hepatičnih stelatnih stanica te modulacijom aktivnosti NO sustava (bolja vaskularizacija i oksigenacija tkiva). Kad uzmemo u obzir dobiveni učinak pentadekapeptida BPC157 (jednako uspješan i kod peroralne primjene i kod parenteralne primjene u mikrogramske i nanogramske dozama) na mehanizme nastanka kolagena te pozitivan hepatoprotektivni učinak čak i u uvjetima dugotrajne kolestaze (kao što je ligatura glavnog žučnog kanala) te učinkovitost poništavanja razvoja fibroze jetre smatramo da pentadekapeptid BPC157 predstavlja moguće farmakološko rješenje problema ciroze jetre.

8. SAŽETAK

Dugotrajna bilijarna staza uzrokuje oštećenje jetre koje rezultira cirozom s mogućim smrtnim ishodom. Unatoč brojnim ranijim studijama problem liječenja ciroze jetre još nije adekvatno riješen. Za pentadekapeptid BPC157 je već pokazan hepatoprotektivni učinak na oštećenjima jetre uzrokovanim alkoholom, visokim dozama inzulina i nesteroidnim upalnim lijekovima. U ovoj studiji ispitali smo učinak pentadekapeptida BPC157 na poznatom kirurški induciranom modelu bilijarne ciroze uzrokovane ligacijom zajedničkog žučovoda koja uzrokuje cirozu jetre u štakora.

Za eksperiment su korišteni mužjaci Wistar štakora mase 180-200g. Postupkom randomizacije životinje su podijeljene u peptidom tretirane i kontrolne skupine. Nakon podvezivanja glavnog žučnog kanala, životinje su primale pentadekapeptid BPC157 svakodnevno, u dozi od 10 ug / kg i 10 ng / kg intraperitonealno ili oralno. Kontrolna grupa dobila je ekvivalentan volumen 0.9% NaCl-a. Nakon vremenskih intervala od 2, 4, 6 i 8 tjedana, životinje su žrtvovane. Uzeti su uzorci krvi za mjerenje jetrenih enzima (ALT, AST, GGT, AP), bilirubina i razine serumskog albumina kao indikatora funkcije jetre.

Izmjerena je tjelesna težina životinja, težine jetri sa i bez proširenog glavnog žučnog kanala. Uzeti su uzorci jetrenog parenhima, fiksirani, obrađeni te potom bojani hemalaun eozinom, po Gomoriju, Malloriju te imunohistokemijski α SMA. Histološki je određen stupanj fibroze (0-6) i nekroinflamatorni skor (0-18) po Ishak klasifikaciji. Izmjeren je postotak površine kolagena. Proliferativna sposobnost hepatocita određena je prema prosječnom broju dvostrukih jezgara po vidnom polju.

Pentadekapeptid BPC157 tretirane životinje nisu imale žuticu, imale su manju težinu jetre, tjelesnu težinu sličnu zdravim životinjama. Histološki manje površine zahvaćene kolagenom uz bolje očuvani jetreni parenhim (BPC157 životinje) za razliku od kontrolnih životinja kod kojih je nađena razvijena jetrena ciroza. Biokemijski nalazi pokazali su niže vrijednosti bilirubina, jetrenih enzima i više vrijednosti albumina u usporedbi s kontrolnim životinjama što pokazuje bolju očuvanost i funkcionalnu aktivnost jetre.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da bi pentadekapeptid BPC157 mogao biti potencijalno farmakološko rješenje kod problema jetrene ciroze.

Ključne riječi: podvezivanje glavnom žučnog kanala, bilijarna ciroza, pentadekapeptid BPC157

9. SUMMARY

Hepatoprotective effect of BPC 157 on model of biliary cirrhosis in rats

Anita Zenko Sever (2016)

We examined hepatoprotective effect of pentadecapeptide BPC157 on rat model of cirrhosis caused by common bile duct ligation.

The animals received pentadecapeptide BPC157 daily (10µg/kg and 10 ng/kg (ip/po)) during 2, 4, 6 and 8 weeks. The control group received the equivalent volume of 0.9% NaCl. Blood samples were taken for liver enzymes measurement, bilirubin and albumin serum levels.

We measured the body weight, liver weight with and without main bile duct. Histopathological analysis was performed on hematoxylin-eosin, Gomori's, Mallory stain and α SMA. The fibrosis degree and liver necroinflammatory activity were determined by Ishak classification. Hepatic fibrosis extent was assessed as collagen area percentage within microscopic field. Hepatocyte proliferative ability was determined according to the average number of double nuclei in five HPF.

BPC157 animals had no jaundice, smaller liver weight, smaller bile stasis within bile duct, body weight similar to healthy animals. Histologically smaller collagen area and better preserved parenchyma was found in BPC157 animals vs. liver cirrhosis in control animals. Biochemical results shown lower bilirubin, liver enzymes and albumin values in BPC157 rats compared to control showing better preservation of liver activity.

We can conclude that BPC157 could be pharmacological solution for liver cirrhosis.

Key words: common bile duct ligation, biliary cirrhosis, pentadecapeptide BPC157

10. POPIS LITERATURE

1. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 2007 Mar; 117(3):539-48.
2. Marques TG, Chaib E, da Fonseca JH, i sur. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras.* 2012 Aug; 27(8):589-94.
3. Antoine M, Tag CG, Wirz W, i sur. Upregulation of pleiotrophin expression in rat hepatic stellate cells by PDGF and hypoxia: implications for its role in experimental biliary liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 2; 337(4):1153-64.
4. Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, i sur. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Oct; 20(10):1538-44.
5. Aziz TA, Aziz MA, Fouad HH, i sur. Interferon-alpha gene therapy prevents aflatoxin and carbon tetrachloride promoted hepatic carcinogenesis in rats. *Int J Mol Med.* 2005 Jan; 15(1):21-6.
6. Priester S, Wise C, Glaser SS. Involvement of cholangiocyte proliferation in biliary fibrosis. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2010 Jun 15; 1(2):30-7.
7. Shen H, Fan J, Burczynski F, Minuk GY, Cattini P, Gong Y. Increased Smad1 expression and transcriptional activity enhances trans-

- differentiation of hepatic stellate cells. *J Cell Physiol.* 2007 Sep; 212(3):764-70.
8. Gobejishvili L, Barve S, Breitkopf-Heinlein K, i sur. Rolipram attenuates bile duct ligation-induced liver injury in rats: a potential pathogenic role of PDE4. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013 Oct;347(1):80-90.
 9. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000 Jan 28; 275(4):2247-50.
 10. Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol.* 2008; 43(6):419-28.
 11. Matsuhashi T, Otaka M, Odashima M, i sur. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates thioacetamide-induced liver injury in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Jan; 20(1):135-40.
 12. Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, Roth RA. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury. *Toxicol Sci.* 2007 Nov; 100(1):267-80.
 13. Windmeier C, Gressner AM. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. *Gen Pharmacol.* 1997 Aug; 29(2):181-96.
 14. Song M, Zhou Z, Chen T, Zhang J, McClain CJ. Copper deficiency exacerbates bile duct ligation induced liver injury and fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Oct; 339(1):298-306.

15. Lessa JF, Rangel LS, Costa NJ Jr, Castro e Silva O, Cruz CA, Sousa JB. Effects of albumin administration in serum liver enzymes of rats in the presence of extrahepatic biliary obstruction, *Acta Cir Bras.* 2011; 26 Suppl 2:70-3.
16. Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, Marroni C, Zettler C, Marroni N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2008 Apr-Jun; 45(2):156-62.
17. Tarcin O, Basaranoglu M, Tahan V, i sur. Time course of collagen peak in bile duct-ligated Rats. *BMC Gastroenterol.* 2011 Apr 28;11:45
18. Wang YX, Yuan J, Chu ES, i sur. T1rho MR imaging is sensitive to evaluate liver fibrosis: an experimental study in a rat biliary duct ligation model. *Radiology.* 2011 Jun; 259(3):712-9.
19. Bosoi CR, Parent-Robitaille C, Anderson K, Tremblay M, Rose CF. AST-120 (spherical carbon adsorbent) lowers ammonia levels and attenuates brain edema in bile duct-ligated rats. *Hepatology.* 2011 Jun; 53(6):1995-2002.
20. Ozturk H, Terzi A, Ozturk H, Kukner A. Effect of sirolimus on renal injury induced by bile duct ligation in rats.; *Acta Cir Bras.* 2010 Oct; 25(5):401-6.
21. Ackerman Z, Karmeli F, Pizov G, Ben-Dov I, Pappo O. Renal effects of gentamicin in chronic bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci.* 2006 Feb; 51(2):406-15.
22. Tahan G, Akin H, Aydogan F, i sur. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats. *Can J Surg.* 2010 Oct; 53(5):313-8.

23. Lemos QT, Andrade ZA. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Aug; 105(5):611-4.
24. Panakanti R, Pratap A, Yang N, Jackson JS, Mahato RI. Triplex Forming Oligonucleotides against Type α 1(I) Collagen attenuates Liver Fibrosis induced by Bile Duct ligation. *Biochem Pharmacol*. 2010 Dec 1; 80(11):1718-26.
25. Paschos KA, Charsou C, Constantinidis TC, i sur. Corticotropin-releasing hormone receptors mediate opposing effects in cholestasis-induced liver cell apoptosis. *Endocrinology*. 2010 Apr; 151(4):1704-12.
26. Dirlik M, Canbaz H, Düşmez Apa D, i sur. The monitoring of progress in apoptosis of liver cells in bile duct-ligated rats. *Turk J Gastroenterol*. 2009 Dec;20(4):247-56.
27. Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H. An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2003 Jul; 139(6):1085-94.
28. Wang N, Feng Y, Cheung F, i sur. A comparative study on the hepatoprotective action of bear bile and *Coptidis Rhizoma* aqueous extract on experimental liver fibrosis in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Nov 29; 12:239.
29. Dong ZX, Su L, Brymora J, i sur. Resistin mediates the hepatic stellate cell phenotype. *World J Gastroenterol*. 2013 Jul 28;19(28):4475-85.

30. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol.* 1984 Jun; 65(3):305-11.
31. Paiva Neto MC, Almeida RE, Xavier MM, i sur. Influence of glutamine on morphological and functional changes of liver in the presence of extrahepatic biliary obstruction in rats. *Acta Cir Bras.* 2010 Aug; 25(4):375-80.
32. Iwaisako K, Haimerl M, Paik YH, i sur. Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 22;109(21):E1369-76.
33. He H, Mennone A, Boyer JL, Cai SY. Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology.* 2011 Feb; 53(2):548-57.
34. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):209-18.
35. Takami T, Terai S, Sakaida I. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Current state and future prospects for our liver regeneration therapy using autologous bone marrow cells for decompensated liver cirrhosis patients. *J Pharmacol Sci.* 2011;115(3):274-8.
36. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, i sur. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholicsteatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010 May 6;362(18):1675-85.

37. Fallowfield JA. Therapeutic targets in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 May;300(5):G709-15
38. Witek RP, Stone WC, Karaca FG, i sur. Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009 Nov;50(5):1421-30.
39. Leclercq IA, Sempoux C, Stärkel P, Horsmans Y. Limited therapeutic efficacy of pioglitazone on progression of hepatic fibrosis in rats. *Gut*. 2006 Jul;55(7):1020-9.
40. Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, i sur. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2010 Oct;53(4):702-12.
41. Yang L, Bataller R, Dulyx J, i sur. Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice. *J Hepatol*. 2005 Aug;43(2):317-23.
42. Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, i sur. Effects of losartan on hepatic expression of nonphagocytic NADPH oxidase and fibrogenic genes in patients with chronic hepatitis C. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Oct;297(4):G726-34.
43. Armendáriz-Borunda J, Islas-Carbajal MC, Meza-García E, i sur. A pilot study in patients with established advanced liver fibrosis using pirfenidone. *Gut*. 2006 Nov;55(11):1663-5.
44. Tang X, Yang J, Li J. Accelerative effect of leflunomide on recovery from hepatic fibrosis involves TRAIL-mediated hepatic stellate cell apoptosis. *Life Sci*. 2009 Apr 10;84(15-16):552-7.

45. Douglass A, Wallace K, Parr R, i sur. Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *J Hepatol.* 2008 Jul;49(1):88-98.
46. Oakley F, Meso M, Iredale JP, i sur. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2005 Jan;128(1):108-20.
47. Oakley F, Teoh V, Ching-ASue G, i sur. Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2009 Jun;136(7):2334-2344.
48. Muñoz-Luque J, Ros J, Fernández-Varo G, i sur. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Feb;324(2):475-83.
49. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, i sur. Lotersztajn S. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):671-6.
50. Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, i sur. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res.* 2004 Sep; 37(2):78-84.
51. Tasci I, Mas MR, Vural SA, i sur. Rat liver fibrosis regresses better with pegylated interferon alpha2b and ursodeoxycholic acid treatments than spontaneous recovery. *Liver Int.* 2006 Mar;26(2):261-8.

52. Tahan G, Tarcin O, Tahan V, i sur. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Dec;52(12):3348-54.
53. Aldaba-Muruato LR, Moreno MG, Hernández-Mercado E, Shibayama M, Muriel P. Secondary biliary cirrhosis in the rat is prevented by decreasing NF- κ B nuclear translocation and TGF- β expression using allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012 Nov;90(11):1469-78.
54. Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, i sur. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells.* 2005 Apr;23(4):463-70.
55. Gordon MY, Levicar N, Pai M, i sur. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells.* 2006 Jul;24(7):1822-30.
56. Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Yagi H, Yarmush ML. Stem cells for liver repopulation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009 Dec;14(6):667-73.
57. I. Zoricic, P. Sikiric, S. Seiwert, i sur. 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 1997.*, 1997, pp 249-258.
58. Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci.* 2009 Oct;54(10):2070-83.

59. Klicek R, Sever M, Radic B, i sur. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci.* 2008 Sep;108(1):7-17.
60. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today.* 2008;38(8):716-25.
61. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, i sur. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig Dis Sci.* 2009 Jan;54(1):46-56.
62. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today.* 2007;37(9):768-77.
63. Sikiric P. The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). *Inflammopharmacology.* 1999;7(1):1-14.
64. Sikiric P, Seiwert S, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology.* 2006 Dec;14(5-6):214-21.

65. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res.* 2006 May;24(5):1109-17.
66. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G, i sur. Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):283-8.
67. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):261-70.
68. Sikiric P, Separovic J, Anic T, i sur. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H₂-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris.* 1999 Dec;93(6):479-85.
69. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, i sur. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris.* 1997 May-Oct;91(3-5):173-8.
70. Tkalcević VI, Cuzić S, Brajsa K, i sur, 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 Sep 10;570(1-3):212-21.
71. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, i sur. Hepatoprotective effect of BPC 157, a 15-amino acid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl₄ administration. *A*

comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci.* 1993;53(18):PL291-6.

72. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice., *Eur J Pharmacol.* 2004 Sep 24;499(3):285-90.
73. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G, i sur. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine., *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):315-24.
74. Ilic S, Brcic I, Mester M, i sur. Over-dose insulin and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Attenuated gastric ulcers, seizures, brain lesions, hepatomegaly, fatty liver, breakdown of liver glycogen, profound hypoglycemia and calcification in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60 Suppl 7:107-14.
75. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, i sur. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol.* 2010 Apr;61(2):241-50.
76. Ilic S, Drmic D, Franjic S, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci.* 2011 Mar 14;88(11-12):535-42.

77. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, i sur. Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats.; *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep 30;667(1-3):322-9.
78. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Pharm Des.* 2013;19(1):76-83
79. Jablonski P, Howden BO. Oral buprenorphine and aspirin analgesia in rats undergoing liver transplantation. *Lab Anim.* 2002 Apr;36(2):134-43.
80. Canbakan B, Akin H, Tahan G, i sur. The effects of pegylated interferon alpha 2b on bile-duct ligation induced liver fibrosis in rats., *Ann Hepatol.* 2009 Jul-Sep;8(3):234-40.
81. Chou MH, Huang YH, Lin TM, i sur. Selective activation of Toll-like receptor 7 in activated hepatic stellate cells may modulate their profibrogenic phenotype., *Biochem J.* 2012 Oct 1;447(1):25-34.
82. Sato Y, Murase K, Kato J, i sur. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone., *Nat Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):431-42.
83. Varenika V, Fu Y, Maher JJ, i sur. Hepatic fibrosis: evaluation with semiquantitative contrast-enhanced CT, *Radiology.* 2013 Jan;266(1):151
84. Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach, *Mod Pathol.* 2007 Feb;20 Suppl 1:S3-14.
85. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract., *Curr Pharm Des.* 2011;17(16):1612-32

86. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, i sur. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157., *Curr Med Chem.* 2012;19(1):126-32
87. Cesarec V, Becejac T, Misic M, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy., *Eur J Pharmacol.* 2013 Feb 15;701(1-3):203-12

11. ŽIVOTOPIS

Anita Zenko Sever

Rođena sam 24. rujna 1985. godine u Zagrebu.

Nakon završene osnovne škole Dragutina Domjanića u Adamovcu, upisala sam opću gimnaziju u Sesvetama.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2004. godine, a završila 2010. godine.

Akadske godine 2008./2009., dobila sam Dekanovu nagradu za najbolji znanstveni rad studenta na temu „Hepatoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC157 na modelu akutne intoksikacije paracetamolom u štakora“.

Pripravnički staž sam odradila 2011. godine na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo.

Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2012. godine a završila 2015. godine.

Od 2012. godine radim u KBC Zagreb na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju.

Aktivno sam sudjelovala na domaćim i međunarodnim kongresima, prvi autor na 10 kongresnih sažetaka te koautor na 38 kongresnih sažetaka.

Koautor sam na 3 rada objavljena u CC časopisima.

Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društvo za patologiju i sudsku medicinu. Udana sam i majka jednog djeteta.