

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Zoran Krstonijević

**Učinci pentadekapeptida BPC 157 na
posttraumatski osteoartritis
koljena u štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Zoran Krstonijević

**Učinci pentadekapeptida BPC 157 na
posttraumatski osteoartritis
koljena u štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Zahvaljujem:

prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, dr. med. na mentorstvu i poticanju na rad i napredak,

doc. dr. sc. Slavici Sović, dr. med. na pomoći pri statističkoj analizi rezultata,

dr. sc. Marku Severu, dr. med. na pomoći pri provođenju istraživanja.

Disertaciju posvećujem sinu Luki i mojoj Tamari, s ljubavlju.

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica

1. UVOD	1
1.1. Svrha rada	1
1.2. Osteoartritis	2
1.2.1. Definicija.....	2
1.2.2. Klasifikacija	2
1.2.3. Rizični čimbenici i mogući uzroci	3
1.2.4. Patogeneza	5
1.2.5. Klinička slika	8
1.2.6. Dijagnostičke pretrage	8
1.2.7. Diferencijalna dijagnoza	9
1.2.8. Liječenje.....	10
1.3. Posttraumatski osteoartritis.....	12
1.3.1. Etiologija i epidemiologija.....	12
1.3.2. Mehanizmi nastanka i sadašnje terapijske mogućnosti	13
1.3.3. Pregled animalnih modela.....	17
1.3.4. Biomarkeri u pretkliničkim istraživanjima	19
1.4. Pentadekapeptid BPC 157	21
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	23
2.1. Hipoteza.....	23
2.2. Ciljevi istraživanja	24
2.2.1. Opći cilj.....	24
2.2.2. Specifični ciljevi	24
3. MATERIJALI I METODE	25
3.1. Dizajn istraživanja	25
3.1.1. Pokusne životinje	25
3.1.2. Operacijski protokol pokusa	25
3.1.3. Djelatna tvar i pokusne skupine	27
3.2. Funkcionalna testiranja.....	29
3.2.1. Analiza hoda	29
3.2.2. Test pritiska ekstenzora.....	30

3.2.3. Test za procjenu kontrakture koljena	31
3.3. Makroskopska procjena	32
3.4. Radiološka obrada (RTG).....	33
3.5. Mikroskopska procjena (histološka obrada).....	34
3.6. Statistička analiza podataka	35
4. REZULTATI.....	36
4.1. Kotretman, 4 tjedna, peroralna primjena	37
4.2. Kotretman, 8 tjedana, peroralna primjena	44
4.3. Kotretman, 4 tjedna, intraartikularna primjena	52
4.4. Kotretman, 8 tjedana, intraartikularna primjena.....	60
4.5. Posttretman, peroralna primjena.....	68
4.6. Posttretman, intraartikularna primjena	75
5. RASPRAVA.....	82
5.1. Eksperimentalni model	82
5.2. Patogenetski mehanizmi	83
5.3. Rezultati provedenog istraživanja	84
5.4. Sadašnje farmakološke terapijske mogućnosti	87
6. ZAKLJUČAK	89
7. SAŽETAK.....	90
8. SUMMARY	92
9. LITERATURA.....	94
ŽIVOTOPIS	112

Popis oznaka i kratica

g - gram (kg - kilogram, mg - miligram, µg - mikrogram, ng - nanogram)

p.o. - per os (peroralno)

i.p. - intraperitonealno

i.a. - intraartikularno

s.c. - subkutano

mm - milimetar

ml - mililitar

ACL - prednja ukrižena sveza (eng. Anterior Cruciate Ligament)

ACR - Američko reumatološko društvo (eng. American College of Rheumatology)

BMI - indeks tjelesne mase (eng. Body Mass Index)

CCL 19 - (eng. C-C motif chemokine ligand 19)

col2a1 - (eng. Collagen type II alpha 1 gene)

COMP - hrskavični oligomerni protein matriksa (eng. Cartilage Oligomeric Matrix Protein)

egr1 - (eng. early growth response 1 gene)

EPT - test pritiska ekstenzora (eng. Extensor Postural Thrust)

GAG - glikozaminoglikan (eng. glycosaminoglycan)

GRO α - (eng. Growth Related Oncogene alpha)

h-EGF - (eng. human Epidermal Growth Factor)

HPLC - visokotlačna tekuća kromatografija (eng. high performance liquid chromatography)

IIP 10 - (eng. Interferon Gamma-Induced Protein 10)

IL 1 - interleukin 1 (eng. interleukin 1)

Lrch1 - (eng. Leucine-rich Repeats and Calponin Homology domain containing 1 gene)

MCL - medijalni kolateralni ligament (eng. Medial Collateral Ligament)

MCP - (eng. Monocyte Chemoattractant Protein)

MFI - test motorne funkcije (eng. Motor Function Index)

MIG - (eng. Monokine Induced by Interferon-Gamma)

MIP 1 β - makrofagni upalni protein 1beta (eng. Macrophage Inflammatory Protein 1beta)

MM - medijalni menisk (eng. Medial Meniscus)

MMP 13 - metaloproteinaza matriksa 13 (eng. Matrix Metalloproteinase 13)

MRL/MpJ - (eng. Murphy Roths Large super-healing mouse strain)

MRI - magnetska rezonanca (eng. Magnetic Resonance Imaging)

naB2 - (eng. nerve growth factor 1-A binding protein-2)

NHANES - (eng. U.S. National Health and Nutrition Examination Survey)

NO - dušikov oksid (eng. nitric oxide)

NSAIL - nesteroidni antiinflamatorni lijekovi

OA - osteoartritis (eng. osteoarthritis)

OARSI - (eng. Osteoarthritis Research Society International)

OSM - onkostatin M (eng. oncostatin M)

PTOA - posttraumatski osteoartritis (eng. post-traumatic osteoarthritis)

RA - reumatoidni artritis (eng. rheumatoid arthritis)

RTG - rentgen (Röntgen)

SAD - Sjedinjene Američke Države (eng. United States of America)

SFI - (eng. Sciatic Functional Index)

TENS - (eng. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation)

TGF α - (eng. transforming growth factor alpha)

TNF α - (eng. tumor necrosis factor alpha)

UZV - ultrazvuk (eng. ultrasonography)

WRI - (eng. Walking Recovery Index)

1. UVOD

1.1. Svrha rada

Osteoartritis (OA) je jedan od najčešćih uzroka kroničnog invaliditeta u odraslih uslijed boli i izmjenjene zglobne funkcije što je posljedica karakterističnih patoloških promjena u zglobnim tkivima i njihovog biopsihosocijalnog konteksta.

Posttraumatski osteoartritis (PTOA) u značajnoj mjeri narušava kvalitetu života i radnu sposobnost bolesnika, te zbog toga predstavlja veliki zdravstveni i socijalno-ekonomski problem, osobito s obzirom da često zahvaća relativno mlađu i radno aktivnu populaciju. Definitivna terapija razvijenog PTOA sastoji se u protetskoj zamjeni zgloba što predstavlja skupi i invazivni postupak koji je opterećen brojnim mogućim komplikacijama, te značajno financijski opterećuje svaki zdravstveni sustav.

Dostupna farmakološka terapija OA usmjerena je na bol, dok ni za jedan terapijski agens nije dokazano da mijenja strukturnu progresiju bolesti. S obzirom da dosadašnja istraživanja nisu ponudila farmakološko rješenje koje bi spriječilo ili usporilo razvoj PTOA, niti omogućilo regresiju već razvijenog PTOA [1], te na brojne pozitivne rezultate istraživanja primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje različitih ozljeda i tkiva [2-12], nametnuta je potreba za ovim istraživanjem.

Očekivani znanstveni doprinos ovog istraživanja trebao bi se očitovati u sprječavanju ili usporavanju razvoja PTOA primjenom pentadekapeptida BPC 157 ili, s druge strane, u regresiji već razvijenog PTOA. Osim toga takve pozitivne učinke na PTOA trebalo bi pokazati i na drugim modelima u daljnjim istraživanjima, što bi u konačnici dovelo i do kliničke primjene pentadekapeptida BPC 157 kod posttraumatskog osteoartritisa, a i drugih osteoartritisa u ljudi.

1.2. Osteoartritis

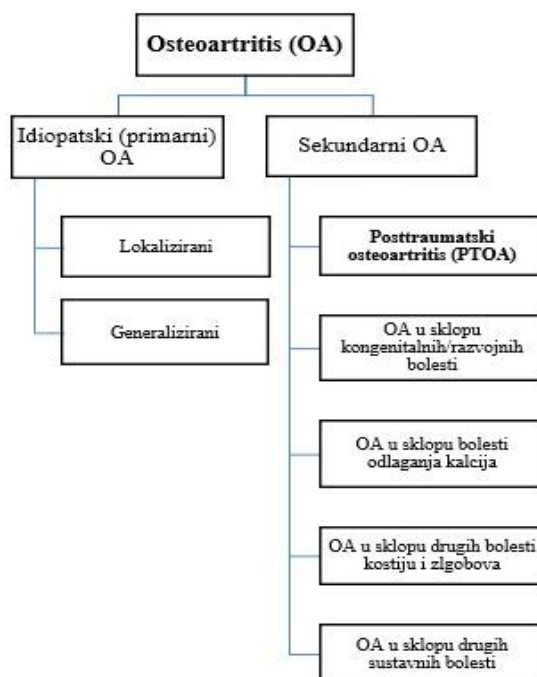
1.2.1. Definicija

Standardizacija definicije osteoartritisa (OA) još uvijek je predmet rasprave pod okriljem Osteoarthritis Research Society International (OARSI) koji je predložio sljedeću definiciju: OA je poremećaj pokretnih zglobova karakteriziran staničnim stresom i degradacijom ekstracelularnog matriksa pokrenut mikroskopskim i makroskopskim ozljedama koje aktiviraju loše prilagodbene odgovore popravka uključujući proinflamatorne puteve prirođenog imuniteta. Poremećaj se isprva manifestira kao molekularni poremećaj (abnormalni metabolizam zglobnog tkiva) kojeg slijedi anatomske i/ili fiziološki poremećaj (karakteriziran degradacijom hrskavice, koštanim remodeliranjem, stvaranjem osteofita, upalom zgloba i gubitkom normalne funkcije zgloba) koji može kulminirati u bolest. [13]

U svakodnevnoj kliničkoj praksi u upotrebi su i druge, jednostavnije i praktičnije definicije OA. Primjerice, Moskowitz i sur. OA definiraju kao najučestaliji oblik bolesti zglobova koji predstavlja vrlo heterogenu skupinu stanja koja rezultiraju istovjetnim histopatološkim i radiološkim promjenama [14].

1.2.2. Klasifikacija

OA se može klasificirati prema zahvaćenim zglobovima, dobi u kojoj počinje, radiografskom izgledu („hipertrofični“ nasuprot „atrofičnom“), pretpostavljenoj etiologiji (npr. „sekundarni posttraumatski“ OA), i stupnju progresije. Više klasifikacijskih sustava je predloženo, svaki sa svojim prednostima i nedostacima. Klasifikacija osteoartritisa Američkog Reumatološkog Društva (ACR) je klasifikacijski sustav u najširoj upotrebi [15], i osteoartritis temeljno dijeli na idiopatski ili primarni (sa potpodjelom na lokalizirani i generalizirani) i na sekundarni (sa potpodjelom na PTOA, OA u kongenitalnim ili razvojnim bolestima, OA u bolestima odlaganja kalcija, OA u drugim poremećajima kostiju i zglobova, te OA u drugim bolestima) (*Slika 1*).



Slika 1. Klasifikacija osteoartritisa prema Američkom reumatološkom društvu*

*preuzeto iz Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, i sur. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. Arthritis Rheum. 1986;29(8):1039-49.

1.2.3. Rizični čimbenici i mogući uzroci

OA je isprva smatran normalnom posljedicom starenja što je dovelo do naziva „degenerativna bolest zgloba“. Međutim, prema današnjem shvaćanju OA nastaje zbog složene interakcije brojnih čimbenika uključujući integritet zgloba, genetiku, lokalnu upalu, mehaničke sile, te stanične i biokemijske procese [16].

Brojni rizični čimbenici i mogući uzroci povezani su sa OA u epidemiološkim studijama:

- dob - starija dob jedan je od najjačih rizičnih čimbenika povezanih sa razvojem OA (prema američkom National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) prevalencija ove bolesti je manja od 0,1 % među ispitanicima između 25 i 34 god., dok je među ispitanicima starijim od 55 god. prevalencija iznad 80 %) [17-20],
- spol - prema brojnim studijama ženski spol povezan je sa povišenim rizikom za razvoj OA [17-22], čak u tolikoj mjeri da će žene sa OA, vjerojatnije od muškaraca, doživjeti brža strukturna oštećenja zgloba i biti podvrgnute protetskoj zamjeni zgloba [23],

- pretilost - vjerojatno najjači čimbenik rizika za razvoj OA na koji se može utjecati u smislu prevencije [17-20, 22], prema jednom istraživanju svaki gubitak na indeksu tjelesne mase (BMI) značajno korelira sa smanjenjem rizika za razvoj simptomatskog OA [19],
- izostanak osteoporoze - veća koštana masa povezana je sa većim rizikom razvoja OA kuka u starijih žena [24-26],
- zanimanje - određena zanimanja koja uključuju neke ponavljajuće pokrete u zglobu ili prolongirani položaj zgloba povezana su sa razvojem OA pojedinih zglobova, npr. klečanje ili penjanje uz stepenice sa OA koljena [27],
- sportske aktivnosti - određeni sportovi povezani su sa povišenim rizikom za razvoj OA pojedinih zglobova, npr. nogomet (koljeno, gležanj, stopalo), gimnastika (rame, lakat, ručni zglob), biciklizam (patelofemoralni zglob), itd. [28],
- ranije ozljede - pospješuju razvoj OA, npr. koljena (studije su pokazale povezanost ligamentarne ili menisecalne ozljede koljena ili kirurške menisectomy i povišenog rizika za razvoj OA [29, 30],
- mišićna slabost - dokazi koji podupiru ulogu mišićne slabosti kao rizičnog čimbenika za razvoj OA jesu nalazi da je slabost mišićne skupine kvadricepsa kojoj prethodi bol u koljenu i mišićna atrofija česta u bolesnika s OA [31], te da je prediktor ozbiljnosti radiografskog i simptomatskog OA koljena [32],
- proprioceptijski deficiti - primjećeni su kod bolesnika s OA koljena i smatra se da su izraz oštećenja mehanoreceptora u zahvaćenom zglobu ili oko njega, a ne podležećeg generaliziranog neurološkog deficita [33],
- genetski čimbenici - široki „screening“ genoma nesrodne ženske populacije Britanki i Kanadanki europskog podrijetla s OA koljena i kontrola pokazao je reproducibilnu povezanost sa markerom unutar gena LRCH1 [34], dok su brojne studije pokazale povezanost mutacija gena COL2A1 na kromosomu 12 koji kodira kolagen tip II sa generaliziranim OA, te ga označile kao potencijalni „osteoartritički gen“ [35-37],
- akromegalija - povezana je sa razvojem sekundarnog OA uslijed učinaka povišenih razina hormona rasta na kost i hrskavicu [38],
- bolest odlaganja kristala kalcija - intraartikularni depoziti kristala koji sadrže kalcij poput kalcij pirofosfat dihidrata (CPPD) i bazičnog kalcij fosfata (BCP) povezani su s oštećenjem hrskavice u bolesnika s OA [39].

1.2.4. Patogeneza

OA je isprva smatran jednostavnim degenerativnim „potrošnim“ procesom (eng. “wear and tear”), te pogrešno nazivan degenerativnom zglobnom bolešću. Međutim, patogeneza OA je puno složenija od „trošenja“, tako da je sufiks „itis“ u nazivu koji je indikativan za upalni proces zapravo točan [40, 41]. Različiti čimbenici igraju važnu ulogu u patogenezi OA, uključujući biomehaničke čimbenike, proupalne medijatore, te proteaze. Razumijevanjem mehanizama koji dovode do destrukcije zglobnog tkiva u OA, te određivanjem ključnih čimbenika involviranih u patološki proces, nastaju novi terapijski ciljevi u svrhu usporavanja ili zaustavljanja progresije OA [42].

Upalni artritis je, standardno, dijelom definiran staničnim upalnim odgovorom predstavljenim povišenim brojem leukocita u zahvaćenim zglobnim tkivima i sinovijalnoj tekućini. Klasični stanični upalni odgovor nije istaknut u OA jer je broj leukocita u sinovijalnoj tekućini obično nizak i rijetko prelazi 1000-2000 stanica po mililitru, što je u suprotnosti s oblicima upalnog artritisa (npr. RA) gdje taj broj uglavnom prelazi 2000 i praćen je jačom infiltracijom sinovije leukocitima, te proliferacijom sinovijalnih fibroblasta i stvaranjem panusa. Iako je sinovijalna upala prisutna i kod OA, upalna komponenta OA je izraženija na molekularnoj razini i karakterizirana je prisutnošću proupalnih medijatora poput citokina i kemokina koji su dio prirodnog imunog odgovora na ozljedu zglobnih tkiva [41]. Proupalni medijatori potiču stvaranje proteolitičkih enzima odgovornih za degradaciju ekstracelularnog matriksa što dovodi do destrukcije zglobnih tkiva. Iako je destrukcija i gubitak zglobne hrskavice glavna sastavnica OA, sva zglobna tkiva su na neki način zahvaćena što ukazuje na to da je OA bolest zgloba kao organa [43]. I mehanički čimbenici imaju ulogu u OA jer prekomjerno ili abnormalno opterećenje zgloba također stimulira stanice zglobnih tkiva na proizvodnju proupalnih faktora i proteaza koji posreduju u destrukciji.

Patološke promjene u OA zahvaćaju sva zglobna tkiva i prisutne su u različitom stupnju kod svih ljudi s OA, što sugerira jedinstveni odgovor zgloba na različite nokse. Redoslijed zahvaćanja pojedinih zglobnih tkiva ovisi o uzročnom čimbeniku i izuzev posttraumatskog OA koji počinje akutnom ozljedom određene zglobne strukture teško je odrediti koje zglobno tkivo je zahvaćeno prvo. Patološke promjene vidljive RTG obradom uključuju gubitak hrskavice koji rezultira suženjem zglobnog prostora i pojavu subhondralne koštane skleroze i cista, te nastanak osteofita, i znak su uznapredovalosti OA. Rane patološke promjene poput

promjena u ekstracelularnom matriksu, sinovitisu, lezija koštane srži i degenerativnih promjena okolnih mekih tkiva, ligamenata i meniska mogu se detektirati MRI obradom [43, 44].

Zglobna tkiva zahvaćena patološkim promjenama u OA su sljedeća:

- zglobna hrskavica - najranije patološke promjene u OA su obično vidljive na površini zglobne hrskavice kao žarišta nepravilnosti u područjima pod najvećim opterećenjem, edem hrskavice posljedično razlabavljenju kolagenske mreže koje dopušta hidrofiličnim proteoglikanima da navlače vodu. Hondrociti su jedini tip stanica prisutan u hrskavici, i normalno su u stanju mirovanja. To su aktivne stanice koje održavaju hrskavicu kroz uobičajene anaboličke i kataboličke procese. S razvojem OA aktivnost tih procesa se značajno ubrzava. Hondrociti proliferiraju uz formiranje grozdova, vjerojatno kao odgovor na gubitak matriksa, dok se barem jedan dio stanica pretvara u hipertrofične hondrocite koji su slični stanicama pronađenim u hipertrofičnim područjima zone rasta, i koje proizvode kolagen tip X i metaloproteinazu matriksa 13 (MMP-13). Kako OA napreduje dolazi do opsežne degradacije i gubitka matriksa radi stalne proizvodnje proteaza potaknute proupalnim citokinima i dijelovima proteina matriksa koji poput povratne sprege potiču hondrocite na daljnju proizvodnju citokina i proteaza. Značajno oštećenje matriksa dovodi do smrti hondrocita, te se pojavljuju područja matriksa lišena stanica. [41, 43],
- kost - zadebljanje subhondralne kosti (subhondralna skleroza) nastaje radi pojačane proizvodnje kolagena koji je neadekvatno mineraliziran. Osteofiti (koštani izdanci) se formiraju na rubovima zgloba, najčešće na hvatištima tetiva ili ligamenata. Kako OA napreduje pojavljuju se koštane ciste, dok erozije kosti nisu tipično vidljive. Lezije koštane srži, vidljive na MRI, najčešće su prisutne u područjima nadležecog gubitka hrskavice gdje su mehanička opterećenja najveća. Patološki, te lezije se sastoje od mikrostrukturnog oštećenja kosti praćenog lokaliziranom nekrozom i fibrozom. [45],
- sinovija - u većini slučajeva simptomatskog OA prisutan je određeni stupanj sinovitisa (sinovijalne upale) i sinovijalne hipertrofije [46, 47], što pridonosi pojavi bolnosti i progresiji OA (uključujući destrukciju hrskavice) kroz proizvodnju proupalnih faktora i proteina [41, 43],
- meka tkiva - OA zahvaća i mekotkivne komponente zgloba poput ligamenata, zglobne kapsule, ili meniska (koljeno), te remeti i njihov ekstracelularni matriks i dovodi do

gubitka stanica. Također, i periartikularni mišići i živci su zahvaćeni OA što rezultira slabošću i bolnošću [48].

Opisane patološke promjene osteoartritičnih zglobova su prisutne, osobito u uznapređovalom stadiju OA, bez obzira na uzročni čimbenik koji inicira razvoj bolesti.

Medijatori upale imaju ulogu u patogenezi OA kao potencijalni pobuđivači destrukcije zglobnog tkiva. Lista proupalnih medijatora pronađenih u sinovijalnoj tekućini i tkivima neprekidno raste. Ranije studije bile su usmjerene na ulogu citokina interleukina 1 (IL-1) inicijalno nazvanog „katabolin“ radi njegove sposobnosti stimulacije katabolične aktivnosti hrskavice koja dovodi do degradacije matriksa. Uloga IL-1 u OA bila je dvojbeno radi toga što su razine pronađene u OA zglobovima bile puno niže od onih potrebnih za degradaciju hrskavice. Drugi citokini su prisutni u OA sinovijalnoj tekućini u znatno višim razinama od IL-1, poput interleukina 6 (IL-6), proteina kemotaksije monocita 1 (MCP-1), interferonom inducirano proteina 10 (IIP-10), te monokina inducirano interferonom (MIG). [49]

Brojni drugi citokini, kao i kemokini, pronađeni su u sinovijalnoj tekućini, ili je zamijećeno da ih proizvode zglobni hondrociti i/ili stanice meniska: IL-7, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, onkostatin M (OSM), s rastom povezan onkogen (GRO)-alfa, kemokin (C-C-motif) ligand 19 (CCL19), makrofagni upalni protein (MIP)-1beta i TGF-alfa [41, 43]. Važna pitanja proizašla su iz široke liste upalnih medijatora pronađenih u OA zglobovima. Stručnjaci su ispitivali što uzrokuje da zglobna tkiva proizvode proupalne medijatore, i koji su najvažniji pobuđivači destrukcije zglobnog tkiva koji bi mogli biti cilj terapijske intervencije. Brojni su dokazi koji povezuju OA sa aktivacijom prirođenog imunskog odgovora pokrenutog oštećenjem tkiva [41, 50]. Medijatori pronađeni u OA zglobu slični su onima pronađenim kod kroničnih rana koje ne cijele. Destrukcija zglobnog tkiva u OA također je posredovana brojnim proteinazama uključujući nekoliko metaloproteinaza matriksa (MMP), cistein proteinaze poput katepsina K, te serin proteinaze [51].

Napredak u razumijevanju mehanizama nastanka i progresije OA omogućuje razvoj ciljanog liječenja usmjerenog na specifične medijatore. Sve dok se ne pronađe agens koji ciljajući na specifični medijator dovodi do usporavanja ili zaustavljanja strukturne progresije OA neće biti jasno koji medijatori su ključni za nastanak i progresiju OA.

1.2.5. Klinička slika

Glavne kliničke manifestacije OA su bolnost i ukočenost zgloba, te funkcionalno ograničenje. Druge kliničke manifestacije u bolesnika s OA uključuju raznolike sekvele poput slabosti mišića i gubitka ravnoteže [52], pojave komorbiditeta poput fibromijalgije [53], depresivne simptomatologije [54], poremećaja spavanja [55], itd.

Simptomi i znakovi koji se mogu uočiti kod bolesnika s OA su sljedeći:

- bol - pogoršava se kretanjama zgloba, dok popušta odmorom,
- osjetljivost (eng. tenderness) - u razini zglobne linije sugerira artikularnu patologiju, dok dalje od zglobne linije sugerira patologiju periartikularnih mekih tkiva,
- ograničena pokretljivost - smanjenje opsega pokreta (aktivnog i pasivnog) uglavnom nastaje zbog rubnih osteofita i zadebljanja zglobne kapsule, međutim ni sinovijalna hiperplazija i efuzija nije zanemariv uzrok,
- koštani edem - odraz je remodeliranja kosti i hrskavice s obje strane zgloba i rubnih osteofita,
- deformacija zgloba - znak je uznapredovalog oštećenja zgloba,
- instabilitet - prvenstveno je odraz mišićne slabosti, ali može biti povezan s pravom nestabilnošću zgloba.

Karakteristične kliničke manifestacije povezane su sa zahvaćanjem određenih zglobova. OA predilekcijski zahvaća koljena, kukove, interfalangealne zglobove, prve karpometakarpalne zglobove, prve tarzometatarzalne zglobove, te apofizealne male zglobove donje vratne i donje lumbalne kralješnice [56].

1.2.6. Dijagnostičke pretrage

Dijagnoza OA je prvenstveno klinička, bazirana na karakterističnim simptomima i znakovima opisanim u prethodnom poglavlju. Za potvrdu kliničke dijagnoze i za potrebe diferencijalne dijagnostike, te procjene stupnja uznapredovalosti OA na raspolaganju je nekoliko slikovnih pretraga:

- radiografija (RTG) - konvencionalna radiografija je najšire korištena slikovna metoda kod OA i omogućuje detekciju karakterističnih obilježja OA poput rubnih osteofita, suženja zglobnog prostora, subhondralne skleroze i subhondralnih cista [57, 58], međutim radiografske promjene kod OA nisu senzitivne, osobito u ranim stadijima bolesti, i često loše koreliraju sa simptomima [59-61],
- magnetska rezonanca (MRI) - za većinu bolesnika sa simptomima OA nije potrebna, međutim može otkriti OA u ranijim stadijima (oštećenja hrskavice i koštane srži), prije nego radiografske promjene postanu vidljive, a također može koristiti kod procjene patologije drugih zglobnih struktura koje se ne vizualiziraju radiografski poput izljeva, sinovije i ligamenata,
- ultrasonografija (UZV) - korisna je za detekciju sinovijalne upale i efuzije, kao i osteofitoze, međutim ne može se koristiti za procjenu dubljih zglobnih struktura i subhondralne kosti.

1.2.7. Diferencijalna dijagnoza

Diferencijalna dijagnoza OA uvelike ovisi o lokalizaciji zahvaćenog zgloba ili zglobova, kao i o prisutnosti ili odsutnosti dodatnih sustavnih simptoma. Nekoliko je alternativnih dijagnoza koje dolaze u razmatranje u određenom kliničkom kontekstu, međutim najčešće ih nije teško razlikovati od OA:

- reumatoidni artritis (RA),
- psorijatični artritis,
- artritis uzrokovan odlaganjem kristala,
- infektivni artritis.

Dijagnoza OA može se postaviti bez korištenja radiografije i/ili laboratorijskih pretraga u prisustvu tipičnih simptoma i znakova u rizičnoj dobnoj skupini. OA perifernog zgloba može sa sigurnošću biti dijagnosticiran samo na kliničkoj osnovi ukoliko je prisutno sljedeće: stalna, sa kretanjama povezana bol u jednom ili više zglobova, dob ≥ 45 godina, te jutarnja ukočenost ≤ 30 minuta. Prisutnost drugih kliničkih karakteristika OA pojačava sigurnost dijagnoze. Ovakav pristup kliničkoj dijagnozi podupire činjenica da radiološki procjenjene strukturne promjene mogu biti prisutne u odsutnosti simptoma i obratno. [59, 60, 62]

1.2.8. Liječenje

Bol u zglobu i poremećaj funkcije glavne su značajke OA. Bolnost povezana sa OA rezultat je višestručnog biopsihosocijalnog procesa u kojem su ne-hrskavične strukture (sinovija, subhondralna kost, periartikularne strukture) uključene i pod utjecajem psihosocijalnih i okolišnih čimbenika. Periferna i centralna senzibilizacija nociceptivnih putova vodi prema trajnoj bolnosti, te time do kroničnih aspekata bolesti. Bolnost povezana sa OA negativno utječe na raspoloženje i spavanje, te radne i rekreativne aktivnosti. [63]

Komponente liječenja OA su brojne, i kreću se u rasponu od pristupa najčešćim s OA povezanim stanjima (poput depresije, poremećaja spavanja, socijalnih problema, itd.) do zglobno-specifičnih intervencija (nefarmakoloških, farmakoloških i kirurških opcija). U konačnici, intervencije su uglavnom usmjerene na smanjenje bolnosti i funkcionalnih ograničenja. Unatoč brojnim pokušajima, liječenje usmjereno na modifikaciju tijeka bolesti za sada se nije pokazalo učinkovitim.

Ciljevi liječenja OA su minimaliziranje boli i optimiziranje funkcije, uz eventualni benefit modificiranja procesa oštećenja zgloba. Primarni cilj kliničara trebali bi biti čimbenici rizika na koje se može utjecati [64]. Iako, za sada, nema farmakološke terapije koja bi modificirala tijek bolesti, dostupne su brojne intervencije usmjerene na bol i funkciju [65]. Također, liječenje bi trebalo biti individualizirano i usmjereno na promjenjive čimbenike koji pridonose bolnosti (poput zglobne inkongruencije, mišićne slabosti, prekomjerne tjelesne težine, itd.).

Modaliteti liječenja OA su sljedeći:

- nefarmakološka terapija - osnova je liječenja OA i uvijek treba biti pokušana prva, uz eventualnu primjenu lijekova za smanjenje boli (gdje je neophodno). Nefarmakološka terapija uključuje regulaciju tjelesne težine i vježbanje, edukaciju, udlage i ortoze za pogodne bolesnike, te upotrebu drugih ortopedskih pomagala [66]. Učinkovitost vježbanja na bol i funkciju slična je učinkovitosti nesteroidnih antiinflamatornih lijekova (NSAIL) [67]. Gubitak najmanje 10 % tjelesne težine kombinacijom dijete i vježbanja povezan je sa 50 %-tnim smanjenjem skora boli u bolesnika sa OA koljena i prekomjernom tjelesnom težinom odnosno pretilošću u periodu od 18 mjeseci [68]. Pomagala za hodanje i koljenske ortoze u bolesnika sa zglobnom inkongruencijom i OA koljena imaju učinak na smanjenje boli [65],

- farmakološka terapija - koristi se kod bolesnika sa simptomatskim OA bez adekvatnog odgovora na inicijalne nefarmakološke mjere ili istodobno s njima. Farmakološku terapiju trebalo bi upotrebljavati samo tijekom razdoblja prisustva simptoma obzirom da za nijedan agens nije dokazano da modificira bolest. Glavni lijekovi koji se koriste za farmakološku terapiju OA su topički i peroralni NSAIL, topički kapsaicin, duloksetin, te intraartikularni kortikosteroidi [65]. Kod bolesnika sa zahvaćenim samo jednim ili tek nekoliko zglobova (osobito kod OA koljena ili šake) farmakološku terapiju treba započeti sa topičkim NSAIL obzirom na sličnu efikasnost u usporedbi sa peroralnim NSAIL, a uz bolji sigurnosni profil [69]. Peroralni NSAIL potrebni su kod bolesnika sa neadekvatnim olakšanjem simptoma tijekom upotrebe topičkih NSAIL, kod simptomatskog OA koji zahvaća više zglobova, te kod OA kuka. Ostali navedeni lijekovi koriste se uglavnom kod bolesnika kod kojih je kontraindicirana primjena peroralnih NSAIL, ili kod posebnih skupina bolesnika.
- kirurška terapija - u kirurškom tretmanu OA dominantna je potpuna protetska zamjena zgloba, koja je visoko učinkovita u bolesnika sa uznapredovalim OA koljena i kuka kada se konzervativnim tretmanima ne postigne adekvatno olakšanje boli [70]. Međutim, pregled 14 studija pokazao je da 9-20 % bolesnika koji su podvrgnuti potpunoj protetskoj zamjeni kuka i koljena pati od umjerene do jake dugoročne poslijeoperacijske boli [71]. Prijeoperacijska razina boli, prisutnost komorbiditeta i depresije, te prisutnost konkomitantne boli drugih zglobova povezana je sa povišenim rizikom nepovoljnog bolnog ishoda nakon kirurškog tretmana [72]. Dodatno, bolesnici mogu doživjeti ozbiljne komplikacije i revizijski kirurški tretman, posebno s obzirom na sve nižu dob u kojoj se pristupa kirurškom tretmanu [73]. Artroskopska kirurgija kod OA koljena je bez klinički značajnih benefita nad konzervativnim tretmanom ili placebo kirurškim tretmanom [74]. S druge strane, artroskopija kuka pokazala je određene prednosti u nekim slučajevima [75].
- druge alternativne terapije - druge terapije pokušane su u liječenju OA uključujući akupunkturu, tradicionalnu kinesku medicinu i transkutanu stimulaciju živaca (TENS).

1.3. Posttraumatski osteoartritis

1.3.1. Etiologija i epidemiologija

Posttraumatski osteoartritis (PTOA) je osteoartritis koji se razvija kao posljedica zglobne ozljede i uzrok je doživotne bolnosti i invaliditeta velikog broja ljudi. Akutna zglobna ozljeda i rezidualne posttraumatske abnormalnosti zgloba, prvenstveno instabilitet i inkongruentnost zglobne površine, dovode do progresivnog gubitka zglobne hrskavice, koštanog remodeliranja i promjena u okolnim mekim tkivima, te u konačnici do razvoja PTOA. Današnje terapijske opcije u tretiranju zglobnih ozljeda često su bezuspješne u prevenciji PTOA. [76-79]

PTOA nastaje uslijed sinovijalne degeneracije pokrenute mehaničkim ozljedama zgloba koje dovode do lokaliziranih i „sve-zglobnih“ bioloških odgovora (uz otpuštanje medijatora upale) koji pridonose destruktiji tkiva, kao i mehanizmima „popravka“ [76, 80-84]. Takve ozljede uključuju iščašenja zgloba, puknuće zglobnih ligamenata i kapsule, ozljede meniska, intraartikularne prijelome, te tupe ozljede odnosno kontuzije zglobne površine [76, 80, 85-89]. Znatan udio (otprilike 12 %) ukupne pojavnosti OA kuka, koljena i gležnja posljedica je zglobne ozljede [77, 90].

Kliničke i epidemiološke studije pokazuju da zglobne ozljede značajno povećavaju rizik za pojavu OA [91, 92]. Studija provedena na 1321 ispitaniku (bivši studenti medicine) pokazala je da 13,9 % onih koji su imali ozljedu koljena (meniscealnu, ligamentarnu ili koštanu) tijekom adolescencije ili mlađe odrasle dobi imaju razvijen OA koljena u usporedbi sa 6 % onih koji nisu imali ozljedu koljena [92]. Druge studije pokazuju da unatoč primjeni najboljeg dostupnog tretmana svaki četvrti pacijent nakon prijeloma acetabuluma razvije OA kuka [93, 94], 23-44 % pacijenata razviju OA koljena nakon intraartikularnog prijeloma [95-97], dok OA gležnja razvije više od 50 % pacijenata sa prijelomom koji zahvaća zglobnu površinu distalne tibije [98-100]. Studije s dugoročnim praćenjem pokazuju da pacijenti s ozljedama ligamenata ili meniska koljena imaju deseterostruko viši rizik za razvoj OA od pacijenata bez takvih ozljeda [101].

S obzirom da je učestalost zglobnih prijeloma i drugih zglobnih ozljeda koje zahtijevaju medicinsku intervenciju 8,7 na 100 osoba godišnje [102], broj osoba pod rizikom za razvoj PTOA je znatan, te je pojavnost PTOA zasigurno veća nego što je priznato [92]. Studija

provedena na Sveučilištu Iowa pokazala je da je 1,6 % pacijenata s OA kuka, 9,8 % pacijenata s OA koljena, te 79,5 % pacijenata s OA gležnja u anamnezi imalo jednu ili više zglobnih ozljeda [77, 103]. Ekstrapolacija ovih rezultata sugerira da je ukupan broj pacijenata u SAD-u sa onesposobljavajućim PTOA gotovo šest milijuna i da PTOA generira oko 12 % društvenih troškova OA kao cjeline. Dodatno, za razliku od drugih oblika OA, PTOA često pogađa mlađu odraslu populaciju kod koje protetska zamjena zgloba nije poželjan tretman. Navedena studija [77], pokazala je da su pacijenti sa anamnezom zglobnih ozljeda 10 godina mlađi u vrijeme kliničke prezentacije u odnosu na one bez takvih ozljeda u anamnezi.

Vrijeme proteklo od ozljede do razvoja PTOA varira. Nakon ozbiljnih zglobnih ozljeda (npr. zglobnih prijeloma) PTOA se može razviti u manje od godine dana, dok kod manje ozbiljnih ozljeda (npr. ligamentarnih ili meniscealnih) razvoj PTOA može trajati desetljećima. Uz najbolji mogući tretman značajnih zglobnih ozljeda rizik za razvoj PTOA tijekom života kreće se od oko 20 % pa sve do više od 50 %. Unatoč napretku kirurških metoda zbrinjavanja zglobnih ozljeda rizik razvoja PTOA nije se značajno smanjio. [76, 104]

1.3.2. Mehanizmi nastanka i sadašnje terapijske mogućnosti

Kliničko iskustvo i eksperimentalni rezultati pokazuju da se mehanički uzroci PTOA mogu svrstati u dvije kategorije: akutno strukturalno oštećenje izazvano velikim silama koje se javljaju u trenutku zglobne ozljede, i postupno strukturalno oštećenje i degradacija hrskavice uslijed kroničnih abnormalnih opterećenja ozlijeđenih zglobova. Uz strukturalno oštećenje, većina akutnih zglobnih ozljeda uzrokuje klinički vidljivu zglobnu upalu. Po pitanju zglobnih abnormalnosti odgovornih za postupno i progresivno oštećenje i degradaciju tkiva, dva uobičajena uzroka su nestabilnost zgloba i rezidualna zglobna inkongruencija i uključuju jasno dokumentirane povišene razine kroničnog lokalnog kontaktnog stresa [76, 105-107].

Akutne zglobne ozljede visokog intenziteta koje pokreću degeneraciju zgloba uključuju oštećenje zglobne površine. To oštećenje često uključuje makroskopski strukturalni prekid zglobne hrskavice i subhondralne kosti odnosno intraartikularni prijelom. Nedavne studije artikularnih prijeloma distalne tibije u ljudi pokazale su da je rizik nastanka PTOA nakon akutne ozljede zglobne površine usko povezan s količinom mehaničke energije absorbirane u trenutku nastanka ozljede [108]. Međutim, mnoge akutne zglobne ozljede uzrokuju oštećenje

tkiva, čak i bez vidljivog prekida zglobne površine [76, 109]. U ovim primjerima, akutno oštećenje može biti ograničeno na promjene u sastavu ili mikrostrukturi matriksa, praćene lokaliziranom staničnom smrću [104, 110-112]. Rezultati *in vitro* studija pokazuju da akutne hrskavične ozljede pokreću biološke odgovore koji uzrokuju progresivnu smrt stanica sa širenjem iz mjesta ozljede [76, 113]. Dodatno, stanice koje prežive u oštećenoj hrskavici imaju izražene metaboličke poremećaje koji pojačavaju inicijalne, mehanički uzrokovane strukturalne prekide i dovode do daljnjeg slabljenja hrskavičnog matriksa, kao i njegove tolerancije mehaničkog stresa [76, 81, 113]. Jedan od najvažnijih recentnih napredaka u razumijevanju PTOA bilo je shvaćanje da dok mehanička ozljeda uzrokuje izravno oštećenje tkiva, PTOA nije izravna ili neizbježna posljedica inicijalnog mehaničkog oštećenja. Npr., *in vitro* studija intraartikularnih prijeloma gležnja u ljudi pokazala je da čak i zglobna ozljeda visoke energije „ubije“ relativno malo hondrocita, ali razmjer stanične smrti koji stalno raste kroz 48 sati nakon ozljede sugerira da medijatori otpušteni iz oštećene hrskavice uzrokuju progresivnu smrt stanica [114]. Druge *in vitro* studije pokazale su da inhibicija ili blokiranje medijatora otpuštenih iz oštećene hrskavice dovodi do smanjenja ozljedom uzrokovane smrti hondrocita [76, 81, 83, 84, 113, 115-117]. Prema navedenim studijama progresivne stanične smrti uslijed hrskavične ozljede, rastući broj dokaza pokazuje da zglobni biološki odgovori na mehaničku ozljedu (uključujući otpuštanje upalnih medijatora) imaju ključnu ulogu u početku i progresiji gubitka hrskavice nakon ozljede [76, 81, 113-116, 118-122]. Ovo shvaćanje, u kombinaciji sa *in vitro* identifikacijom posttraumatskih bioloških medijatora progresivne degradacije matriksa i disfunkcije i smrti hondrocita [76, 81, 113, 116, 123], te poboljšanog razumijevanja kako povećanje kontaktnog stresa zglobne površine dovodi do gubitka hrskavice, omogućuje razvoj novih bioloških i mehaničkih intervencija za smanjenje rizika nastanka PTOA [76].

Drugi glavni uzrok PTOA je postupno strukturalno propadanje uzrokovano dugotrajnim (kroničnim) abnormalnim opterećenjima koja uglavnom proizlaze iz posljedica akutne ozljede. Na osnovi kliničkog iskustva kirurzi su pretpostavljali da rezidualna zglobna inkongruencija uslijed intraartikularnog prijeloma i nestabilnost zgloba uslijed ligamentarne, meniscealne ili kapsularne ozljede povećava rizik za razvoj PTOA. Nedavna studija potvrdila je ulogu inkongruencije u nastanku PTOA, i da gubitak zglobne hrskavice prvo nastaje u područjima najjačeg kumulativnog kontaktnog stresa [108]. Iako kliničko iskustvo pokazuje da nestabilnost zgloba uslijed ligamentarne ozljede povećava rizik nastanka PTOA, kvantifikacija mehaničke nestabilnosti zgloba u ljudi i njenog odnosa prema PTOA ostaje

izazov. Istraživanje različitih stupnjeva nestabilnosti koljena u zečeva uslijed parcijalne odnosno kompletne transekcije prednje ukrižene sveze koljena (ACL) pokazalo je izravnu povezanost povišenog stupnja nestabilnosti s razvojem histološki vidljivog oštećenja zglobne hrskavice [107]. Eksperimentalne studije podržavaju kliničku impresiju da nestabilnost zgloba povećava kontaktni stres, kao i stopu kontaktnog stresa tijekom vremena, te time vodi prema PTOA. Također, eksperimentalne studije predložile su ulogu nestabilnosti zgloba uslijed ozljede kao uzroka oštećenja zgloba, međutim nisu izmjerile stupanj nestabilnosti, ili pokazale da li je povišena nestabilnost zgloba povezana s povećanjem oštećenja zgloba tijekom vremena. Da bi razjasnili ovo važno pitanje, Tochigi i sur. razvili su *in vivo* model varijabilne nestabilnosti u kojem je zakočenost zgloba mogla biti mjerena, kako za kompletnu, tako i za stupnjevitu parcijalnu ACL transekciju [107]. Ta je studija pokazala vezu između povišene nestabilnosti zgloba i povećane hrkavične degeneracije, kontinuirano u rasponu povećanja nestabilnosti.

Kod nekih pacijenata s PTOA prisutna je kombinacija inicijalnog oštećenja tkiva uslijed jake akutne ozljede i kronične posttraumatske abnormalnosti zgloba, dok ostali imaju primarno prvi ili drugi uzrok. Npr., pacijenti sa kominutivnim intraartikularnim prijelomima nisu pretrpjeli samo ozljedu zgloba visokog intenziteta, nego u mnogim slučajevima imaju i rezidualnu inkongruenciju zgloba. Nasuprot tome, blaže ligamentarne ili kapsularne ozljede ne moraju uzrokovati klinički vidljivu ozljedu zglobne površine ili upalu zgloba, ali mogu dovesti do PTOA tijekom vremena, vjerojatno uslijed povećane nestabilnosti zgloba. S obzirom da putevi kojima dva glavna mehanička uzroka PTOA (akutna ozljeda i kronično abnormalno opterećenje) dovode do degeneracije zgloba nisu u potpunosti razjašnjeni, i da često nije moguće razdvojiti njihove učinke u studijama ozljeda zglobova u ljudi, teško je razviti metode evaluacije akutne ozljede zgloba koje bi točno predvidjele koji pacijenti će progredirati prema PTOA. Ova nesigurnost otežava pokušaje osmišljavanja boljih rješenja u sprječavanju, ublažavanju, ili prevenciji te progresije. Iako postoji preklapanje između dva glavna mehanička uzroka PTOA, značajna je razlika između PTOA koji primarno nastaje uslijed akutne jake ozljede zgloba, i PTOA koji primarno nastaje uslijed nestabilnosti ili inkongruencije zgloba (kronično). Akutna ozljeda zgloba je jedan izdvojeni događaj koji uzrokuje neposredno strukturalno oštećenje i smrt stanica, te time potiče akutne upalne odgovore i mehanizme popravka. Nasuprot tome, PTOA koji primarno nastaje uslijed rezidualne nestabilnosti ili inkongruencije rezultat je ponavljanih, manjih mehaničkih ozljeda, i ne uključuje značajniju staničnu smrt ili upalne odgovore, nego postupnu degradaciju

stanične metaboličke funkcije i slabljenje održavanja sastava i strukturalnog integriteta matriksa. [124]

Trenutno, liječnici temelje postupke liječenja, s namjerom prevencije PTOA, na kliničkom utisku i stečenom iskustvu. Na raspolaganju je malo temeljnih znanstvenih i bioinženjerskih istraživanja koja bi usmjeravala kliničku praksu. S obzirom da biološki odgovor zglobnih tkiva na ozljedu nije dobro razjašnjen, molekularni i stanični tretmani za minimaliziranje progresivnog oštećenja zgloba trenutno nisu dio zbrinjavanja ozljeda. Ortopedski i trauma kirurzi rutinski poduzimaju ekstenzivne kirurške zahvate u pokušaju ponovne uspostave osovine zgloba i kongruentnosti zglobnih površina nakon intraartikularnih prijeloma [125]. Svrha ovih postupaka anatomske rekonstrukcije je smanjenje rezidualne inkongruencije zgloba, te na taj način smanjenje točaka kontaktnog stresa za koji se pretpostavlja da je odgovoran za razvoj PTOA. Međutim, kirurški pristup, te redukcija i fiksacija frakturirane zglobne površine može dovesti do ozbiljnih komplikacija poput nekroze koštanih fragmenata i mekih tkiva, infekcije, te ozljeda živaca i krvnih žila. U nekim slučajevima komplikacije kirurškog liječenja prijeloma zglobnih površina mogu dovesti do invaliditeta, ili u ekstremnim slučajevima do amputacije ekstremiteta. Kirurške mogućnosti ponovne uspostave stabilnosti zgloba i kongruencije zglobnih površina dramatično su napredovale u zadnjih 25 godina. Međutim, brojne studije kliničkog praćenja pokazale su da 20-50 % pacijenata ipak razvije PTOA nakon sadašnjih kirurških tretmana uobičajenih ozljeda zglobne površine i ligamenata [94, 104, 126], što sugerira da i trenutno najbolja moguća kirurška uspostava stabilnosti i kongruencije zgloba sama po sebi ne prevenira, a možda niti značajno ne smanjuje rizik razvoja PTOA tijekom života za mnoge pacijente. Kirurške mogućnosti liječenja zglobnih ozljeda će i dalje napredovati, ali bolje razumijevanje načina na koji mehaničke ozljede dovode do razvoja PTOA ima potencijal dovesti do novih metoda liječenja zglobnih ozljeda koje kombinirane s kirurškim postupcima mogu smanjiti i prevenirati progresivni gubitak zglobne površine. [124]

Današnje kliničke i eksperimentalne, *in vivo* i *in vitro* studije odnosa između ozljeđujućih mehaničkih sila koje djeluju na sinovijalne zglobove i zglobne površine i gubitka zglobne hrskavice, značajno su pridonijele razumijevanju PTOA. Epidemiološke studije potvrdile su snažnu povezanost između ozljede zgloba i PTOA. Jačina akutnih i ponavljajućih (kroničnih) mehaničkih sila koje uzrokuju PTOA u pacijenata sa prijelomima tibijalnog platoa je jasno definirana. Biološki medijatori destrukcije hrskavice, uključujući medijatore upale, potaknuti mehaničkim silama su identificirani i brojni agensi koji inhibiraju djelovanje tih medijatora

pokazali su potencijalnu korist u smanjenju degradacije zglobne hrskavice. Ova zapažanja sugeriraju da novi kirurški tretmani zglobnih ozljeda koji minimaliziraju posttraumatsku zglobnu inkongruenciju i novi biološki tretmani zglobnih ozljeda koji inhibiraju djelovanje bioloških medijatora hrskavične destrukcije imaju potencijal smanjenja rizika za nastanak PTOA uslijed širokog raspona zglobnih ozljeda. [124]

1.3.3. Pregled animalnih modela

Izbor animalnog modela za istraživanje PTOA je izazovna odluka. Specifičan aspekt razvoja PTOA ili intervencije koja će biti promatrana mora biti uzet u obzir zajedno sa praktičnim pitanjima cijene i tehničke sposobnosti. Korištenje živih životinja za bilo koje znanstveno istraživanje mora udovoljiti smjernicama humanog postupanja sa svakom životinjom u svakoj fazi protokola, i najniža vrsta na filogenetskoj skali koja je podobna za predloženu studiju mora biti izabrana [127]. U dosadašnjim istraživanjima korišteni su raznovrsni animalni modeli. Razmatranje prednosti i nedostataka pojedinih vrsta mora se uzeti u obzir pri izboru animalnog modela. Mali animalni modeli PTOA uključuju miševe, štakore i zamorce. Srednje veliki animalni modeli PTOA uključuju zečeve i mačke. Veliki animalni modeli PTOA uključuju pse, ovce, koze, mini svinje i svinje. Svaka kategorija veličine animalnog modela ima svoje prednosti i nedostatke [128].

Mali animalni model (npr. štakor):

- prednosti - niska cijena, dostupnost genetski modificiranih modela ili prirodnih sojeva uz dosljednu genetsku pozadinu, razvoj PTOA u relativno kratkom vremenu
- nedostaci - mala veličina, ograničene količine tkiva i prikupljenih biouzoraka, potreba za mikroskopom i specijaliziranim instrumentima, mogućnost većih kirurških razlika između pojedinih studija

Srednje veliki animalni model (npr. zec):

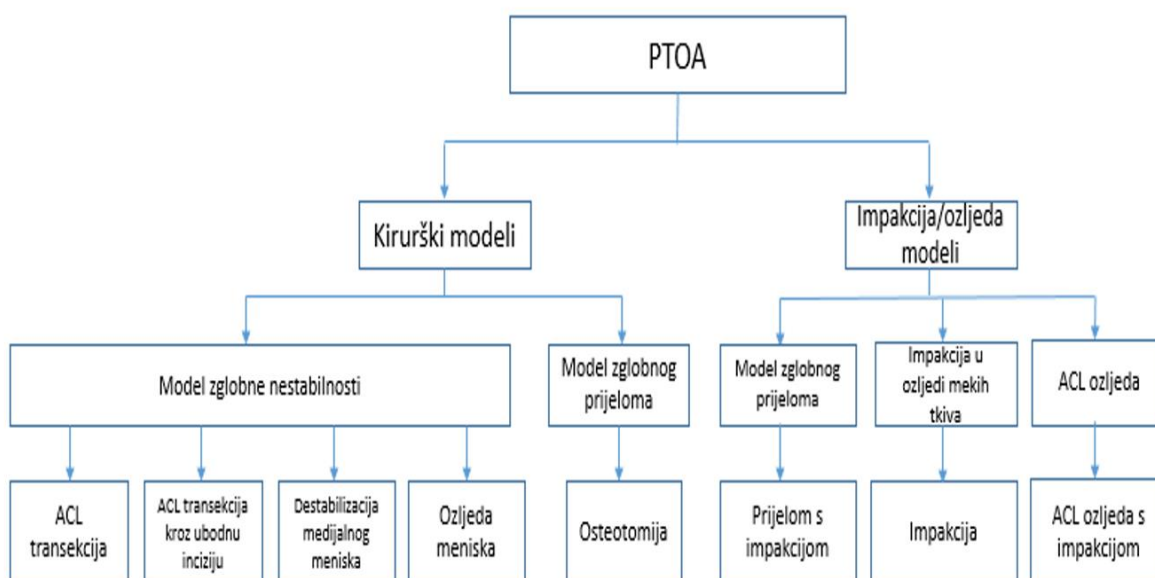
- prednosti - relativno niska cijena, veći zglobovi, brojni izvještaji u literaturi, nastanak lezija sličnih klinički uočenim hrskavičnim defektima

- nedostaci - veći relativni kapacitet cijeljenja u odnosu na ljudske zglobove, koštana zrelost dostignuta sa 10 mjeseci, jedinstveni biomehanizam hoda uz veće opterećenje lateralne strane zgloba, nepogodnost za studije koje uključuju vježbe

Veliki animalni modeli (npr. pas):

- prednosti - moguće longitudinalne studije, veliki zglobovi, brojni izvještaji u literaturi, pogodnost za studije koje uključuju vježbe zbog mogućeg dresiranja
- nedostaci - percepcija javnosti, visoka cijena, ograničena dostupnost reagensa (npr. antitijela), genetska raznolikost između jedinki

Animalni modeli posttraumatskog OA temeljno se dijele na kirurške modele (otvoreni zglob) i impakcija/ozljeda modele (zatvoreni zglob). Kirurški modeli PTOA se dalje dijele na modele zglobne nestabilnosti i na modele zglobnog prijeloma (*Slika 2*).



*Slika 2. Podjela animalnih modela posttraumatskog osteoartritisa**

*preuzeto iz Olson SA, Guilak F, ur. *Post-Traumatic Arthritis: Pathogenesis, Diagnosis and Management*. 1. izd. New York: Springer Science+Business Media; 2015.

Za ovo istraživanje treba napomenuti neke značajke kirurškog modela zglobne nestabilnosti uslijed transekcije ACL-a i destabilizacije medijalnog meniska na malom animalnom modelu: izražene promjene u smislu PTOA u periodu od 4 do 8 tjedana, hrskavične lezije u stražnjem dijelu tibije, subhondralne koštane erozije tibije kroz ploču rasta u periodu od 8 tjedana, povišena celularnost i infiltracija sinovije [128, 129].

1.3.4. Biomarkeri u pretkliničkim istraživanjima

Modeli PTOA (*in vivo* i *in vitro*) korisni su i za definiranje biomarkera ranog OA, i za promatranje odgovora na farmakološku i nefarmakološku (uključujući kiruršku) terapiju.

In vitro opterećenje eksplantata hrskavice može omogućiti koristan uvid u biomarkere generirane ozljedom, te u kojem sustavu testirati efikasnost intervencija kreiranih za prevenciju razvoja PTOA. Prema jednoj studiji, jačina mehaničkog stresa u rasponu od fizioloških do hiperfizioloških vrijednosti proporcionalno povećava otpuštanje hrskavičnog oligomernog proteina matriksa (COMP), glukozaminoglikana (GAG), keratan sulfata i hondroitin sulfata, dok smanjuje sintezu proteina i proteoglikana pri najvišoj razini mehaničkog stresa [130]. Nedavna studija pokazala je da jedan izolirani udar dovodi do štetnih učinaka na viabilnost stanica i otpuštanja GAG i prostaglandina E2 koji su primarno ovisni o stresu [131].

Gotovo svi animalni modeli OA su zapravo modeli PTOA. Zbog toga, pažljivo razmatranje analiza biomarkera i intervencija u ovim modelima može omogućiti značajan uvid u kontrolu i prevenciju PTOA u ljudi.

Nedavna studija na mini svinjama pokazala je da se prilagodba naviše gena koji kodiraju proteine sposobne za degradaciju hrskavičnog ekstracelularnog matriksa pojavljuje u prvih nekoliko dana nakon ACL ozljede, te da se taj odgovor javlja u hondroцитima, stanicama sinovije, ligamentu i ožiljnom tkivu između ozlijeđenih krajeva ligamenta [132]. U istoj studiji je navedeno da se koncentracija fragmenata degradacije kolagena (C2C) u zglobnoj sinovijalnoj tekućini gotovo udvostručuje u prvih pet dana nakon ozljede.

Kod soja miševa MRL/MpJ (tzv. superhealer soj) u usporedbi s drugim sojevima zaštita od PTOA je povezana sa nižim razinama proteina IL-1 alfa i IL-1 beta u sinoviji, serumu i

zglobnim tkivima, višim sustavnim razinama protuupalnih citokina IL-4 i IL-10, sniženom genskom ekspresijom faktora nekroze tumora (TNF) alfa, IL-1 beta, makrofagnih upalnih proteina i kemokina (CCL22) u sinovijalnom tkivu, te reducirane rane i kasne makrofagne sinovijalne infiltracije [133, 134]. Ovi podatci ukazuju na jaku povezanost upale zglobnih tkiva sa razvojem i progresijom PTOA u miševa, te sveukupno prikazuju holistički odgovor zgloba na ozljedu. Rezultati također podupiru hipotezu da akutna zbijanja, nastala u trenutku ozljede, igraju glavnu ulogu u osjetljivosti prema razvoju PTOA dugoročno, te da bi trebala biti neutralizirana radi prevencije PTOA.

Mišji model zglobnog prijeloma podržava ulogu upale i citokina u akutnoj ozljedi zgloba, pokazujući da su akutna zglobna patologija i sinovijalna upala povezane s ozbiljnošću zglobnog prijeloma u koljenu miša. Nadalje, ovaj model je omogućio daljnju podršku hipotezi o ulozi akutnih zbijanja u trenutku ozljede u razvoju PTOA jer je jednokratna primjena male količine (0,9 mg) IL-1Ra intraartikularno značajno smanjila degeneraciju hrskavice i upalu sinovije. Također, intraartikularna primjena pročišćenih mezenhimalnih matičnih stanica u ovom modelu prevenirala je PTOA. S obzirom da su mezenhimalne matične stanice sposobne inhibirati proliferaciju *in vitro* stimuliranih splenocita, autori su pretpostavili da je njihov način djelovanja imunomodulatoran. [135-138]

Intraartikularna primjena IL-1 nakon ozljede zgloba dovela je do bržeg i izrazitijeg artritisa na animalnim modelima [139]. IL-1 se oslobađa kao dio akutnog upalnog odgovora uslijed ozljede tkiva i uzrokuje lokalno povišenje razine proinflammatoryh citokina IL-6, TNF alfa i TGF beta1 [140]. TGF beta1 je profibrozni citokin ključan za normalno cijeljenje rane i za razvoj i progresiju fibroze tkiva [141-143]. Ovi citokini doprinose upali i fibrogenezi tako da stimuliraju miofibroblaste, fibroblaste i ekstracelularne nakupine kolagena i fibronektina [144, 145].

Sveukupno, ovi podatci pokazuju da su upala i biološki faktori ključni u razvoju PTOA nakon ozljede. Razumijevanje ovih neposrednih i ranih molekularnih zbijanja i njihovog vremenskog tijeka trebalo bi dovesti do profiliranja molekularnih biomarkera koji bi mogli služiti za predviđanje razvoja i osjetljivosti na PTOA. Također, stalno rastući broj bioloških agenasa s inhibicijskim učinkom na te biomarkere, npr. na ključni citokin povezan sa OA (IL-1), omogućuje nove puteve prevencije PTOA.

1.4. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419., PL 14736) dio je sekvence proteina BPC izoliranog iz humanog želučanog soka sa 99 % čistoće koja je potvrđena visokotlačnom tekućom kromatografijom (HPLC). Radi se o izrazito stabilnom želučanom peptidu koji se nije razgradio niti nakon 24 sata inkubacije u želučanom soku za razliku od drugih peptida (npr. h-EGF i h-TGF α) koji se razgrađuju već nakon nekoliko minuta [146]. Potpuno je topiv u vodi (pri pH 7.0), te u fiziološkoj otopini. Djeluje bez nosača i učinkovit je u cijeljenju različitih tkiva pri sustavnoj i lokalnoj primjeni, te je smatran medijatorom citoprotekcije. U dosadašnjim istraživanjima primjenjivan je u rasponu doza od ng do μ g, te se pokazao kao vrlo siguran preparat s obzirom da nema toksičnih učinaka, nuspojava u testiranjima, i da letalna doza nije dostignuta. [147, 148]

Razmatranjem mogućih molekularnih mehanizama djelovanja uočeno je da BPC 157 potiče aktivaciju gena egr-1 (early growth response-1), te stimulira ekspresiju egr-1 prema naB2 (nerve growth factor 1-A binding protein-2), što bi uz naB2 antagonist mogao biti mehanizam pozitivne povratne sprege pri cijeljenju različitih tkiva [149-151]. Također je uočeno da egr-1 inducira proizvodnju citokina i čimbenika rasta, te rano stvaranje ekstracelularnog matriksa i kolagena. Dosadašnja istraživanja pokazala su vezu između BPC 157 i važnih obrambenih sustava, poput dopaminskog, serotoninskog i NO sustava [152-154]. BPC 157 modulira aktivnost NO sustava tako da prilikom njegove blokade primjenom L-NAME u potpunosti poništava njen učinak, dok se kod primjene sa L-Argininom (supstrat NO sustava) ne postiže potencijacija učinka [155]. Kao posebnost cijeljenja potpomognutog primjenom BPC 157 spominje se gotovo potpuna funkcionalna i histološka restitucija organa i tkiva [11, 152, 156-158] što nije pokazano u istraživanjima u kojima su korišteni drugi peptidi [159, 160].

Inicijalna istraživanja pokazala su dobrobit sustavne i lokalne primjene BPC 157 u cijeljenju duboke kožne opekline, te posljedične stresne želučane lezije [157, 161-167]. Također je važno naglasiti pozitivne učinke lokalne primjene BPC 157 u vidu blokiranja negativnih učinaka sustavne primjene kortikosteroida na cijeljenje kožne opekline [157]. Učinci BPC 157 na strukturu granulacijskog tkiva prilikom cijeljenja rane jasno su pokazani i prvenstveno se pripisuju snažnom angiogenom djelovanju [168]. Također je iznimno važan njegov antiinflamatorni učinak. Naime, uočeno je da primjena BPC 157 smanjuje otpuštanje upalnih

medijatora u serumu i tkivima, te da ne izaziva osifikaciju i metaplaziju okolnih tkiva koja se javlja kod primjene nekih faktora rasta [161].

Daljnja istraživanja pokazala su pozitivne učinke BPC 157 na cijeljenje različitih tkiva. Na modelu segmentalnog koštanog defekta (pseudoartroze) radijusa u kunića primjena BPC 157 dovela je do značajnog ubrzanja premoštenja defekta u usporedbi sa implantacijom koštane srži i autologne kortikalne kosti [12]. Model transekcije Ahilove tetive u štakora pokazao je da sustavna primjena BPC 157 poboljšava cijeljenje presječene tetive [11]. Također je, na štakorskim modelima, pokazano da sustavna primjena BPC 157 poboljšava cijeljenje kirurški odvojenog tetivno-koštanog hvatišta Ahilove tetive [10], kao i potpune transekcije mišića kvadricepsa [9], transekcije medijalnog kolateralnog ligamenta koljena [3], te traumatske ozljede živca [5]. Pokazano je i da primjena BPC 157 potiče i ubrzava cijeljenje intestinalnih anastomoza (npr. ileo-ileo i kolo-kolo) [152, 158, 169], te raznih vrsta fistula (npr. kolokutane i ezofagokutane) [152, 170].

BPC 157 je u fazi kliničkih ispitivanja u istraživanjima za upalne bolesti crijeva (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Hrvatska) i multiplu sklerozu [147, 148, 152, 155, 158, 171].

Za ovo istraživanje važno je istaknuti pokazano smanjenje otpuštanja upalnih medijatora u serumu i tkivima primjenom pentadekapeptida BPC 157 [161], što bi s obzirom na dokazanu važnu ulogu akutnog upalnog odgovora s otpuštanjem proinflammatoryh citokina u razvoju i progresiji PTOA [139-145], moglo razjasniti jedan dio mehanizama nastanka pozitivnih učinaka primjene BPC 157 na PTOA. Drugi dio tih mehanizama mogla bi razjasniti pokazana sposobnost neutralizacije NO sustava primjenom pentadekapeptida BPC 157 [155], s obzirom na dokazanu ulogu NO sustava u indukciji apoptoze *in vitro*, kao i destrukciji hrskavice na štakorskom modelu OA [172]. Također, za razmatranje mehanizama nastanka pozitivnih učinaka primjene pentadekapeptida BPC 157 neizostavno je njegovo snažno angiogeno djelovanje [168].

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Primjena pentadekapeptida BPC 157

- spriječiti će ili usporiti razvoj i progresiju posttraumatskog osteoartritisa
- dovest će do regresije već razvijenog posttraumatskog osteoartritisa

na štakorskom modelu posttraumatskog osteoartritisa koljena.

2.2. Ciljevi istraživanja

2.2.1. Opći cilj

Opći cilj ovog istraživanja je istražiti i analizirati učinke primjene pentadekapeptida BPC 157 na razvoj i progresiju PTOA, te na regresiju već razvijenog PTOA na štakorskom modelu PTOA koljena, i to na razini funkcionalnog ishoda, na razini radiološkog ishoda, te na razini morfološkog ishoda (makroskopskog i mikroskopskog).

2.2.2. Specifični ciljevi

Specifični ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

- istražiti ima li BPC 157 pozitivne učinke na očuvanje funkcijskog integriteta noge izraženog analizom hoda i testom pritiska ekstenzora,
- istražiti ima li BPC 157 pozitivne učinke na razvoj kontraktura koljena,
- istražiti smanjuje li BPC 157 pojavnost radioloških znakova osteoartritisa,
- istražiti smanjuje li BPC 157 pojavnost makroskopskih znakova osteoartritisa,
- istražiti smanjuje li BPC 157 pojavnost histoloških znakova osteoartritisa,
- istražiti postoje li razlike ovisno o načinu primjene (peroralno, intraartikularno),
- istražiti postoje li razlike ovisno o primjenjenoj dozi (10 µg/kg, 10 ng/kg).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Dizajn istraživanja

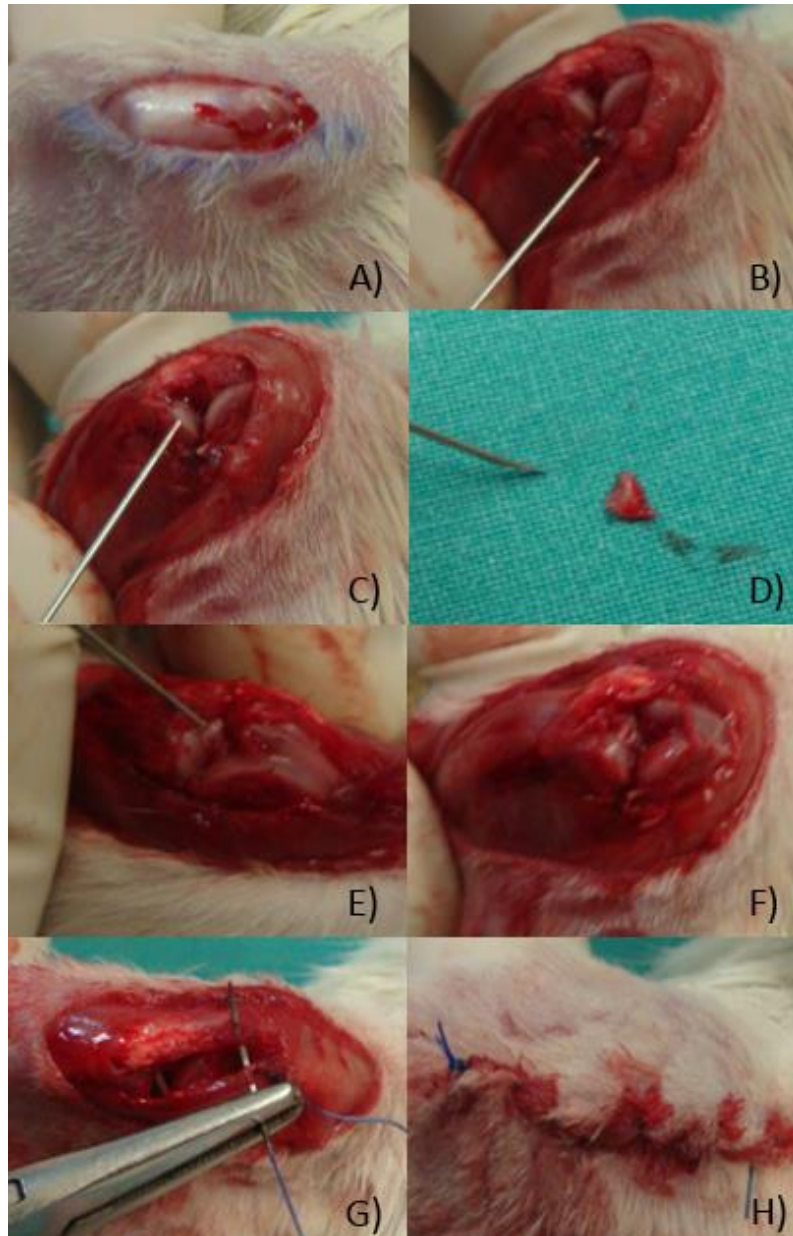
3.1.1. Pokusne životinje

Za ovo istraživanje korištene su ženke Wistar albino štakora prosječne težine 200 g i dobi 8-10 tjedana iz uzgojne stanice Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno pod laboratorijskim uvjetima i pravilima Zavoda, a u skladu s dobrom laboratorijskom praksom. Pokusne životinje su do početka istraživanja boravile u štali, na ujednačenoj sobnoj temperaturi, u uvjetima prirodnih ciklusa svjetla i mraka, uz slobodan pristup paletiranoj hrani i vodi, a njihova aktivnost bila je ad libitum. Životinje su bile smještene u standardnim kavezima. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Operacijski protokol pokusa

Kao model posttraumatskog osteoartritisa korišten je kirurški model osteoartritisa koljena (model zglobne nestabilnosti) kojeg je razvio Henry 2004. godine [173], i kojeg su potom koristili i drugi istraživači u svojim radovima. Opća anestezija provedena je prema preporuci nadležnog etičkog povjerenstva (Ketamine-HCl (Ketantest, Parke-Davis GmbH, Berlin, Njemačka) 50-60 mg/kg i.p. + Xylazine-HCl (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Njemačka) 5-10 mg/kg i.p.). Nakon standardne kirurške pripreme operacijskog polja (brijanje, pranje i dezinfekcija povidon jodidom) medijanom incizijom kože i potkožja, te lateralnim odmicanjem patele pristupilo se na zglobnu kapsulu desnog koljena. Potom je učinjena incizija zglobne kapsule i transekcija medijalnog kolateralnog ligamenta (MCL) u visini zglobne pukotine. Na taj način je otvoren koljenski zglob i prikazan medijalni menisk (MM). Slijedilo je odstranjenje MM-a i prikaz prednjeg križnog ligamenta (ACL). Nakon transekcije ACL-a postignuta je jasna nestabilnost koljenskog zgloba. Na kraju je operacijska incizija

zatvorena u dva sloja, i to zglobna kapsula produžnim Vycril 3.0 šavom, dok je koža šivana produžnim Ethilon 3.0 šavom (Ethicon Inc., Johnson&Johnson, Somerville, SAD) (Slika 3).



Slika 3. Tijek operacijskog zahvata

A) učinjena incizija kože i potkožja, B) učinjena transekcija MCL-a, C) učinjena medijalna menispektomija, D) medijalni menisk (MM), E) prikaz ACL-a, F) učinjena transekcija ACL-a, G) zatvaranje zglobne kapsule, H) zatvorena operacijska incizija (fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan).

Prije, za vrijeme i nakon zahvata životinje su bile grijane, promatrane i prevrtane sa strane na stranu do uspostave stabilne sternalne rekumbencije, te nakon prve primjene pentadekapeptida BPC 157 za tretirane skupine, odnosno fiziološke otopine za kontrolne skupine, vraćene u vivarij, u uvjete identične onima u kojima su boravile i prije pokusa. U istom kavezu mogle su biti smještene samo životinje iz iste pokusne skupine. Sve životinje su dobivale analgeziju, ketoprofen (Ketonal, Lek d.d., Ljubljana, Slovenija) 5 mg/kg s.c. prema potrebi.

3.1.3. Djelatna tvar i pokusne skupine

Kao djelatna tvar korišten je pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija) čistoće 99 %, kako je određeno visokotlačnom kromatografijom (HPLC), otopljen u fiziološkoj otopini (Pliva d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u dozama 10 µg/kg i 10 ng/kg tijekom cijelog trajanja pokusa. Navedene doze pentadekapeptida BPC 157 izabrane su sukladno dosad objavljenim radovima [2-12].

U istraživanju je korišteno ukupno 90 životinja koje su randomizacijom raspoređene u tri serije, 30 životinja po seriji (kotretman, 4 tjedna; kotretman, 8 tjedana; posttretman). Serije su formirane sukladno dosadašnjim radovima u kojima je pokazano da korišteni operacijski model unutar 2-4 tjedna od operacije dovodi do razvoja umjerenog osteoartritisa, a unutar 8 tjedana do razvoja uznapredovalog osteoartritisa [128, 129, 174].

Po učinjenom kirurškom zahvatu pokusne životinje svake pojedine serije su metodom slučajnog odabira raspoređene u šest skupina po pet životinja. Formirane su dvije kontrolne skupine s obzirom na put primjene pentadekapeptida BPC 157 (peroralna i intraartikularna primjena), te četiri tretirane skupine s obzirom na put primjene pentadekapeptida BPC 157 i primjenjenu dozu djelatne tvari (10 µg/kg i 10 ng/kg). Na taj način je metodom slučajnog odabira formirano 18 skupina (svaka sa po pet životinja) (*Tablica 1*).

Tablica 1. Pokusne skupine

	kotretman, 4 tjedna	kotretman, 8 tjedana	posttretman
BPC 157 10 µg/kg p.o.	N=5	N=5	N=5
BPC 157 10 ng/kg p.o.	N=5	N=5	N=5
kontrola (voda za piće) p.o.	N=5	N=5	N=5
BPC 157 10 µg/kg i.a.	N=5	N=5	N=5
BPC 157 10 ng/kg i.a.	N=5	N=5	N=5
kontrola (0,9 % NaCl) i.a.	N=5	N=5	N=5

N = broj životinja po skupini

Peroralna primjena, sukladno dosadašnjim istraživanjima, provedena je pentadekapeptidom BPC 157 otopljenim u vodi za piće, u koncentraciji 0,16 µg/ml za dozu 10 µg/kg odnosno 0,16 ng/ml za dozu 10 ng/kg (12 ml/štakor/dan), svakodnevno do žrtvovanja. Kontrolne životinje, tijekom jednakog vremenskog intervala, dobivale su čistu vodu za piće. [175]

Intraartikularna primjena, sukladno dosadašnjim istraživanjima, provedena je instilacijom 0,1 ml otopine pentadekapeptida BPC 157 u fiziološkoj otopini, u koncentraciji 20 µg/ml za dozu 10 µg/kg odnosno 20 ng/ml za dozu 10 ng/kg, inzulinskom iglom u operirani koljenski zglob nakon operacijskog zahvata, prije buđenja iz anestezije, te potom svaka dva tjedna. Zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja. Kontrolnim životinjama, u jednakim vremenskim intervalima i na isti način, instilirano je 0,1 ml fiziološke otopine intraartikularno. [175]

U posttretmanu primjena je, u navedenim intervalima, počela nakon 4 tjedna od operacijskog zahvata. Žrtvovanje životinja provedeno je u općoj anesteziji, dvostrukom dozom korištenog anestetika, 28. dan (kotretman, 4 tjedna), te 56. dan (kotretman, 8 tjedana i posttretman).

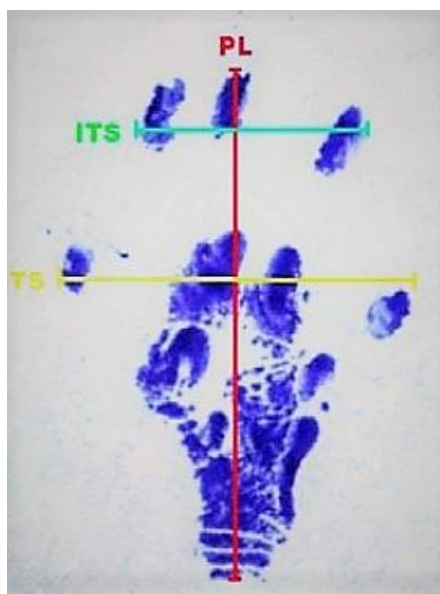
3.2. Funkcionalna testiranja

Tijekom trajanja pokusa funkcionalna testiranja provođena su sukladno ranije objavljenim radovima [3, 4, 6-11], i to 1., 7., 14., 21. i 28. poslijeoperacijski dan za kotretirane serije pokusnih životinja (također 42. i 56. dan za seriju 8 tjedana). Za posttretiranu seriju pokusnih životinja funkcionalna testiranja provođena su 28., 42. i 56. poslijeoperacijski dan. Za funkcionalna testiranja korištena su tri testa: analiza hoda (eng. gait analysis), test pritiska ekstenzora (EPT, Extensor Postural Thrust) i test za procjenu kontrakture koljena.

3.2.1. Analiza hoda

De Medinaceli i sur. 1982. godine [176], opisali su indeks za procjenu funkcionalnog stanja ishijadičnog živca štakora na osnovu parametara mjerenih iz otisaka stopala životinja dobivenih korištenjem drvene staze za hodanje dimenzija 10x100 cm koja je bila pokrivena bijelim papirom i vodila je u tamni odjeljak. Stražnja stopala životinja bila su umočena u metilensko modriilo i pri hodu su ostavljala otiske na bijelom papiru. Iz dobivenih otisaka mjerena su po tri parametra za operiranu (E, eng. experimental) i neoperiranu (N, eng. non-operated) nogu: PL (print-length), TS (toe-spread) i IT (intermediary toe-spread) (*Slika 4*). Indeks je nazvan SFI (Sciatic Functional Index), a složenu formulu za njegovo računanje opisali su Bain i sur. 1989. godine [177].

Za analizu hoda u ovom istraživanju korišten je samo jedan od triju navedenih parametara, i to duljina otiska (PL) mjerena iz videozapisa snimljenog digitalnom kamerom i izražena u mm. Test je izvođen korištenjem prozirne staze za hodanje dimenzija 10x100 cm ispod koje je bila postavljena digitalna kamera (Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan). Štakor je naveden na pravocrtni hod i snimljen je videozapis koji je potom analiziran na računalu uz adekvatnu programsku podršku (VAMSTEC Software Company, Zagreb, Hrvatska). [178]



Slika 4. Parametri iz otiska stopala štakora
(PL - print-length, TS - toe-spread, ITS - intermediary toe-spread)*

**preuzeto iz Silva DN, Silva AC, Aydos RD, Viterbo F, Pontes ER, Odashiro DN, i sur. Nerve growth factor with fibrin glue in end-to-side nerve repair in rats. Acta Cir Bras. 2012;27(4):325-32.*

Rezultat analize hoda prikazan je kao indeks oporavka hoda (WRI, walking recovery index), čija je vrijednost (izražena u mm) dobivena iz formule $WRI = NPL - EPL$. PL neoperirane noge označen je kao NPL, dok je PL operirane noge označen kao EPL. Oporavak hoda je tim bolji što je WRI vrijednost niža. [3]

3.2.2. Test pritiska ekstenzora

Test pritiska ekstenzora (EPT, Extensor Postural Thrust/MFI, Motor Function Index) opisali su Thalhammer i sur. 1995. godine [179], a Koka i Hadlock [180] su dokazali da se može upotrebljavati kao potpuno dostatna metoda za praćenje oporavka motoričke funkcije traumatizirane stražnje noge štakora. Test su izvodila dva ispitivača. Prvi je ispitivač držao torzo životinje cijelom šakom, dok je malim prstom pridržavao neispitivanu nogu. Pritom je životinja bila u uspravnom položaju. Slobodno viseća ispitivana noga bila je postavljena na digitalnu vagu (preciznosti 0,001 g) ravne površine. U trenutku kontakta stopala s ravnom plohom vage štakor se instinktivno odguruje od plohe upotrebljavajući silu ekstenzornih

mišića potkoljenice. U tom trenutku drugi ispitivač očitavao je rezultat toga pritiska kao masu na skali digitalne vage. EPT vrijednost dobivena je korištenjem formule $EPT = (NEPT - EEPT) / NEPT$, i kreće se između 0 i 1. EPT neoperirane noge označen je kao NEPT, dok je EPT operirane noge označen kao EEPT. Deficit motoričke funkcije je to manji što je EPT vrijednost niža.

3.2.3. Test za procjenu kontraktura koljena

Za procjenu kontraktura koljena korišten je test kojeg je opisao Bojanić [181], kako slijedi. Test su izvodila tri ispitivača. Prvi ispitivač držao je životinju straga, lijevom rukom ispod prednjih nogu, pazeći pritom da se životinja ne iskrivljuje, dok je desnom rukom držao rep. Drugi je ispitivač postupno ispružao stražnje noge do maksimalne ekstenzije. U tom trenutku treći je ispitivač označio na neoperiranoj nozi točku do koje doseže maksimalno istegnuta operirana noga svojim palcem. Potom se pomičnom mjerkom mjerilo od označene točke na neoperiranoj nozi do vrha palca te noge. Dobivena vrijednost (mm) izražavala je nedostatak ekstenzije operirane noge odnosno težinu kontraktura koljena (*Slika 5*).



Slika 5. Test za procjenu kontraktura koljena (fotografija je snimljena digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan)

3.3. Makroskopska procjena

Neposredno nakon žrtvovanja životinja pristupalo se makroskopskoj procjeni operiranog koljena. Žrtvovanje nije vršeno isključivo za potrebe makroskopske procjene, već se nakon te procjene pristupalo RTG obradi i pripremi preparata za histološku analizu.

Nakon žrtvovanja kirurški se odstranilo operirano koljeno zajedno sa distalnim dijelom natkoljenice i proksimalnim dijelom potkoljenice eksperimentalne životinje. Potom se, po skidanju kože, potkožnog tkiva i mišićja, koljeno otvorilo i provedena je makroskopska procjena i makroskopsko skoriranje (*Slika 6*).



Slika 6. Makroskopska procjena (fotografija je snimljena digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan)

Za makroskopsku procjenu promatralo se i opisivalo femoralnu i tibijalnu zglobnu površinu, te potom vršilo stupnjevanje koristeći skor 0-2, sukladno dosad objavljenim radovima [174] (*Tablica 2*).

Tablica 2. Stupnjevanje (skoriranje) za makroskopsku procjenu

stupanj 0	glatke i sjajne zglobne površine
stupanj 1	plitke abrazije zglobnih površina i manje nakupine vezivnog tkiva
stupanj 2	duboke abrazije zglobnih površina i opsežne nakupine vezivnog tkiva

3.4. Radiološka obrada (RTG)

Radiološka obrada vršena je, sukladno dosad objavljenim radovima [182], tako da je kirurški odstranjeno koljeno snimljeno RTG-om (Siemens OPTI 150/30/50 HC-100, Siemens AG, München, Njemačka) u dvije projekcije (AP - anteroposteriorna i LL - laterolateralna). RTG snimke analizirane su u suradnji sa radiologom. Stupanj težine promjena izražen je standardiziranom radiološkom klasifikacijom osteoartritisa koljena po Kellgren-Lawrence-u (stupanj 0-4) [183] (Tablica 3).

Tablica 3. Radiološka klasifikacija osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence)

stupanj 0	uredan nalaz
stupanj 1	moguće suženje zglobnog prostora i mogući rubni osteofiti
stupanj 2	jasno suženje zglobnog prostora i jasna prisutnost osteofita
stupanj 3	jasno suženje zglobnog prostora, brojni umjereno veliki osteofiti, nešto skleroze i moguća deformacija koštane konture
stupanj 4	značajno suženje zglobnog prostora, brojni veliki osteofiti, izražena skleroza i jasna deformacija koštane konture

3.5. Mikroskopska procjena (histološka obrada)

Nakon učinjene makroskopske procjene i RTG obrade pristupalo se pripremi preparata za histološku analizu. Priprema preparata vršena je na način da je kirurški odstranjeno koljeno fiksirano u 10 %-tnoj puferiranoj otopini formaldehida, te nakon dekalcinacije Shandon TBD otopinom i dehidracije uklopljeno u parafinski blok. Potom su učinjeni serijski tangencijalni presjeci debljine 4 μm . Uzorci su obojani hemalaun-eozinom. Analizirana je zglobna površina medijalnog platoa tibije, sukladno ranijim istraživanjima [174, 184-186]. Za morfometrijsku analizu korišteni su softverski programi SFORM i ISSA (VAMSTEC Software Company, Zagreb, Hrvatska). Patohistološka analiza učinjena je na mikroskopu tipa Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japan). Uzorke su analizirali iskusni promatrači koji nisu bili upoznati s podrijetlom materijala.

Za određivanje stupnja težine promjena korišten je OARSI (Osteoarthritis Research Society International) sustav temeljen na histološkim karakteristikama progresije osteoartritisa (stupanj 0-6) [187] (*Tablica 4*).

Tablica 4. Histološka klasifikacija stupnja težine osteoartritisa (OARSI sustav)

stupanj 0	uredan nalaz
stupanj 1	pravilna površina, poremećena morfologija hrskavice
stupanj 2	površinske nepravilnosti
stupanj 3	vertikalne fisure (pukotine)
stupanj 4	površinske erozije
stupanj 5	denudacija
stupanj 6	deformacija

3.6. Statistička analiza podataka

Za statističku analizu korišten je računalni program STATISTICA 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Rezultati analize interpretirani su na najmanje 5 %-tnoj razini značajnosti ($\alpha=0,05$).

Obzirom na mali broj pokusnih životinja po skupinama nije provedeno testiranje normalnosti distribucije kvantitativnih obilježja funkcionalnih testiranja (WRI, EPT, kontraktura), kao i radiološkog (Kellgren-Lawrence) i histološkog (OARSI) skoriranja, te su njihove distribucije prikazane kao medijan uz naznačen minimum i maksimum.

Razlike u distribuciji kvantitativnih obilježja po skupinama analizirane su Kruskal-Wallis ANOVA testom. Multiple usporedbe vrijednosti srednjih rangova između parova skupina analizirane su Bonferroni-Dunn testom uz korekciju P vrijednosti prema formuli:

$P = P' \times k \times (k-1)$, gdje je $P' = P$ vrijednost testa, $k =$ broj skupina.

Distribucije kvalitativnih obilježja makroskopskog skoriranja prikazane su po skupinama u tablicama kontingencije. Razlike u njihovoj distribuciji analizirane su korištenjem Freeman-Halton ekstenzije Fisherovog egzaktnog testa.

4. REZULTATI

Rezultati ovog istraživanja pregledno su prikazani tako da je prikaz rezultata podijeljen u šest poglavlja. Poglavlja su formirana tako da svako poglavlje zasebno prikazuje rezultate skupina ovisno o trenutku početka i duljini trajanja primjene pentadekapeptida BPC 157 (kotretman 4 tjedna, kotretman 8 tjedana, posttretman), te ovisno o načinu primjene pentadekapeptida BPC 157 (peroralno, intraartikularno). U svakom poglavlju prikazani su rezultati skupina ovisno o primjenjenoj dozi pentadekapeptida BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg) uz rezultate pripadajuće kontrolne skupine.

Unutar svakog pojedinog poglavlja zasebno su prikazani rezultati s obzirom na promatrane pokazatelje:

- analiza hoda,
- test pritiska ekstenzora,
- test za procjenu kontrakture koljena,
- makroskopska procjena,
- radiološka obrada,
- histološka obrada.

Rezultati svakog pojedinog pokazatelja razmatrani su u tri dijela:

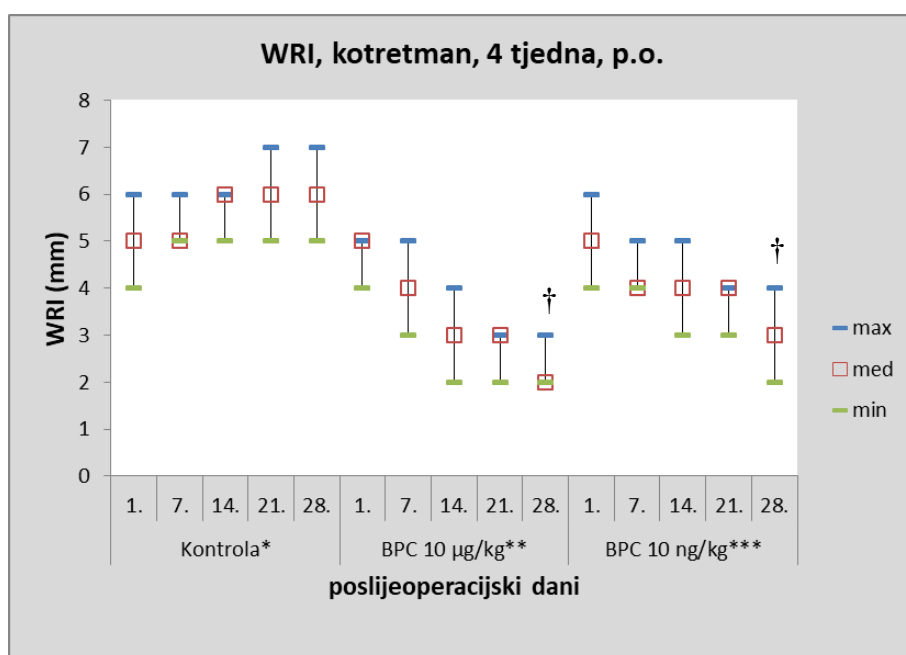
- kratki opis rezultata,
- prikaz rezultata grafikonom ili tablicom,
- statistička analiza rezultata uz naznaku statističke značajnosti.

Radi preglednosti i usklađenosti prikaza rezultata statistička analiza funkcionalnih pokazatelja provedena je samo za rezultate dobivene u zadnjem mjerenju prije žrtvovanja. Rezultati svih ponavljanih mjerenja po poslijeoperacijskim danima su vidljivi na prikazu grafikonom.

4.1. Kotretman, 4 tjedna, peroralna primjena

Analiza hoda

Rezultati analize hoda izraženi kao WRI vrijednost (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 5 do 6 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 5 do 2-3 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 7).



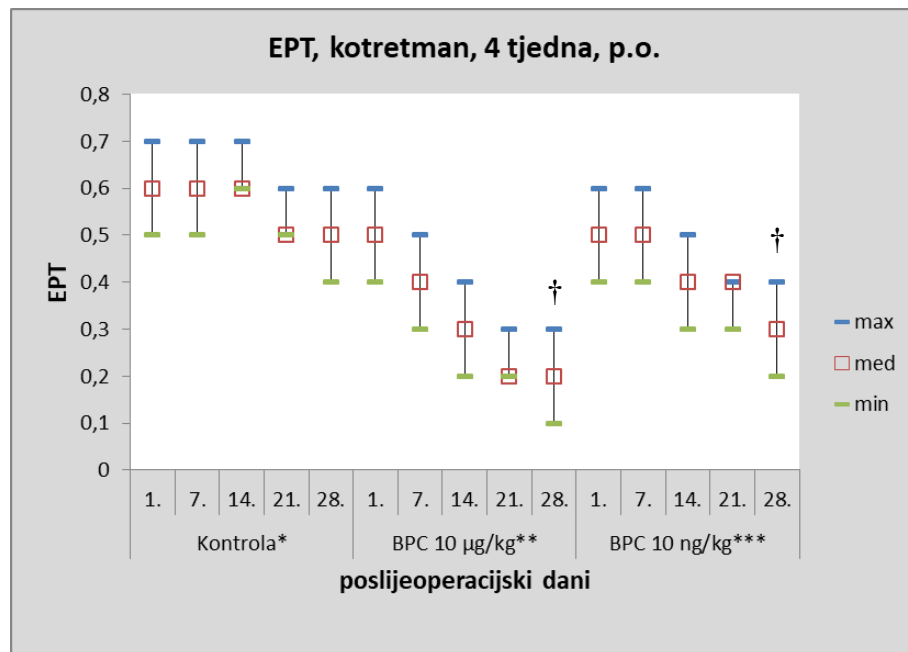
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 7. WRI vrijednosti (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji WRI vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,71$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test pritiska ekstenzora

Rezultati testa pritiska ekstenzora izraženi kao EPT vrijednost pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 0,6 do 0,5 tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 0,5 do 0,2-0,3 tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 8).



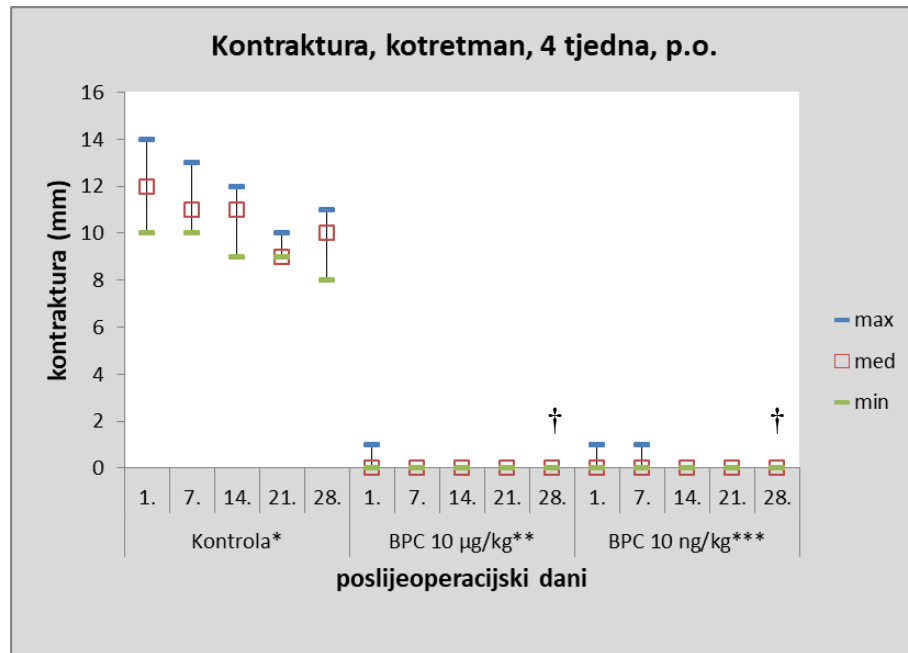
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 8. EPT vrijednosti po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji EPT vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,54$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test za procjenu kontrakture koljena

Rezultati testa za procjenu kontrakture koljena izraženi kao kontraktura (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 12 do 9 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok je medijan tretiranih skupina iznosio 0 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 9).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 9. Kontraktura (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji kontrakture između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=13,36$; $P=0,001$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Makroskopska procjena

Rezultati makroskopske procjene izraženi kao makroskopski skor (0-2) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Nijedna kontrolna životinja nije skorirana skorom 0, dok nijedna tretirana životinja nije skorirana skorom 2 (*Tablica 5, Slika 10*).

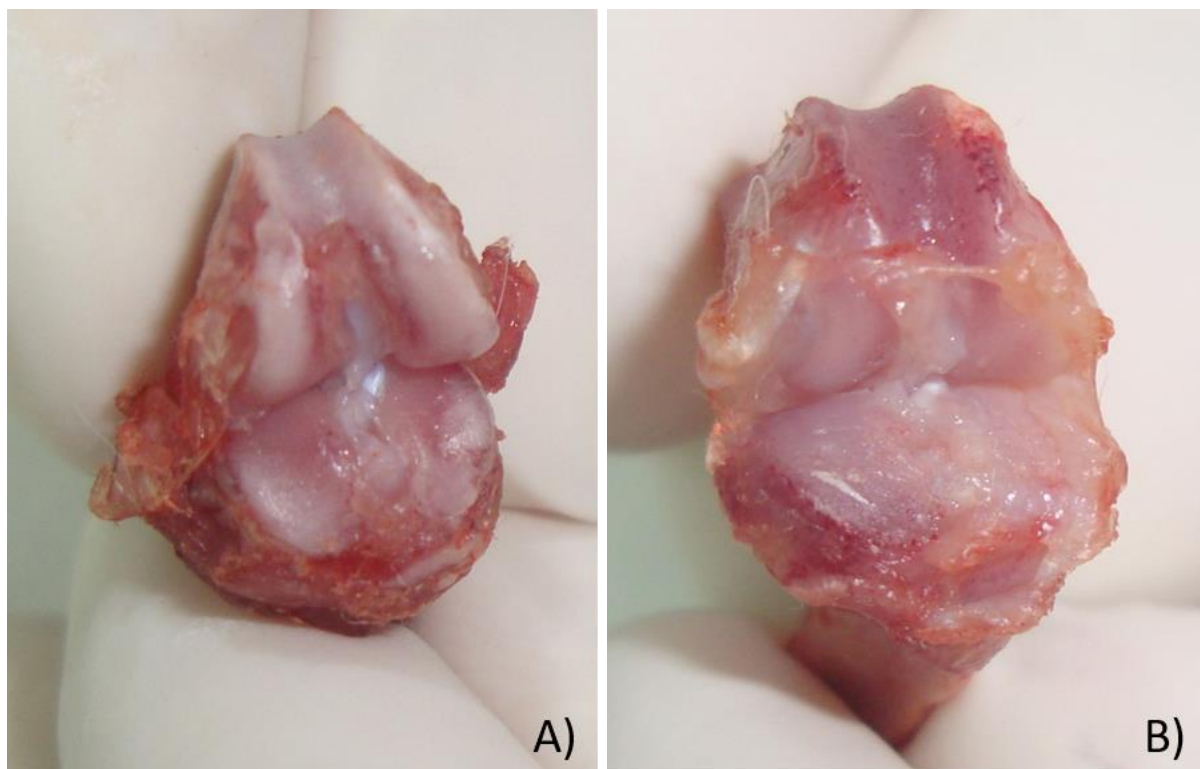
Tablica 5. Makroskopski skor za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao tablica kontingencije.

Makroskopski skor	Kontrola*	BPC 157 10 µg/kg**	BPC 157 10 ng/kg***
stupanj 0	N=0	N=3	N=2
stupanj 1	N=3	N=2	N=3
stupanj 2	N=2	N=0	N=0

* čista voda za piće; ** 0,16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0,16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)

N = broj životinja sa pojedinim skorom

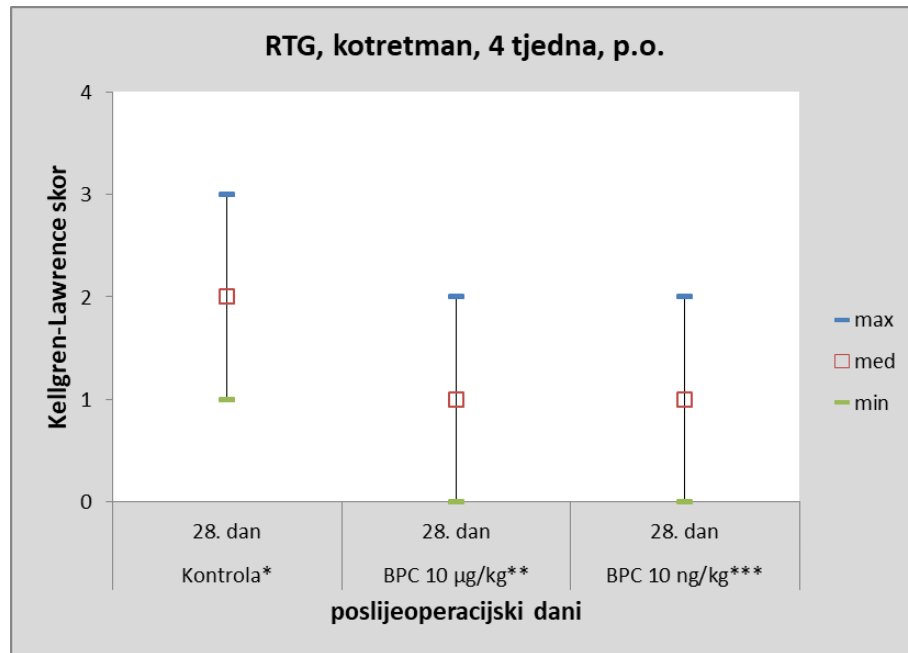
Analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji makroskopskog skora između skupina, Freeman-Halton ekstenzija Fisherovog egzaktnog testa: df=4; P=0,167.



Slika 10. Makroskopski izgled koljena štakora (kotretman, 4 tjedna, peroralna primjena, 10 ng/kg). A) otvoreno koljeno tretirane životinje (vidljive su glatke i sjajne zglobne površine - makroskopski skor 0). B) otvoreno koljeno kontrolne životinje (vidljive su plitke abrazije zglobnih površina i manje nakupine vezivnog tkiva - makroskopski skor 1). Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan.

Radiološka obrada

Rezultati RTG obrade izraženi kao radiološki skor (0-4) prema radiološkoj klasifikaciji osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 2 (uz minimum 1 i maksimum 2), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 1 (uz minimum 0 i maksimum 2) (Slika 11).



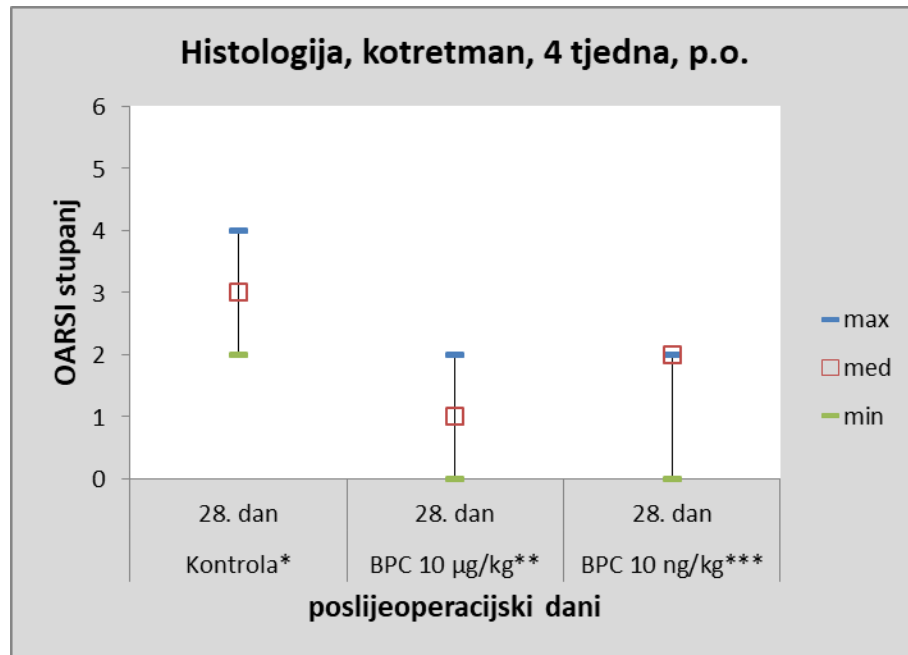
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 11. Kellgren-Lawrence skor za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti radiološkog skora između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=5,15$; $P=0,076$.

Histološka obrada

Rezultati histološke obrade izraženi kao histološki stupanj (0-6) prema OARSI klasifikaciji stupnja težine osteoartritisa pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 3 (uz minimum 2 i maksimum 4), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 1 odnosno 2 (uz minimum 0 i maksimum 2) (Slika 12).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

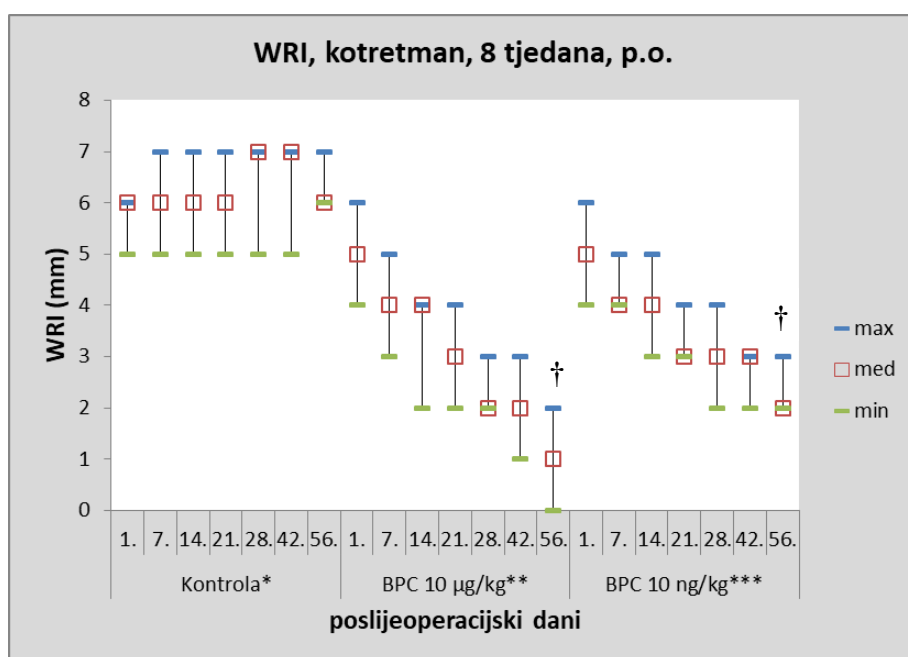
Slika 12. OARSI stupanj za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti OARSI stupnja između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=6,89$; $P=0,032$. Međutim, post-hoc analiza nije pokazala statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina.

4.2. Kotretman, 8 tjedana, peroralna primjena

Analiza hoda

Rezultati analize hoda izraženi kao WRI vrijednost (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 6 do 7 mm tijekom 8 tjedana praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 5 do 1-2 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 13).



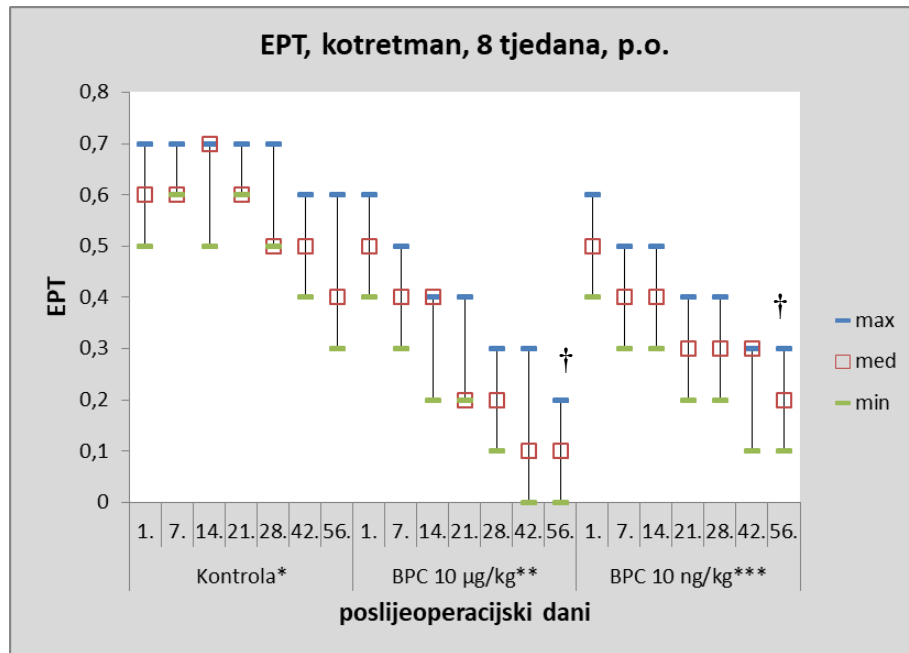
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 13. WRI vrijednosti (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji WRI vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=11,75$; $P=0,003$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test pritiska ekstenzora

Rezultati testa pritiska ekstenzora izraženi kao EPT vrijednost pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 0,7 do 0,4 tijekom 8 tjedana praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 0,5 do 0,1-0,2 tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 14).



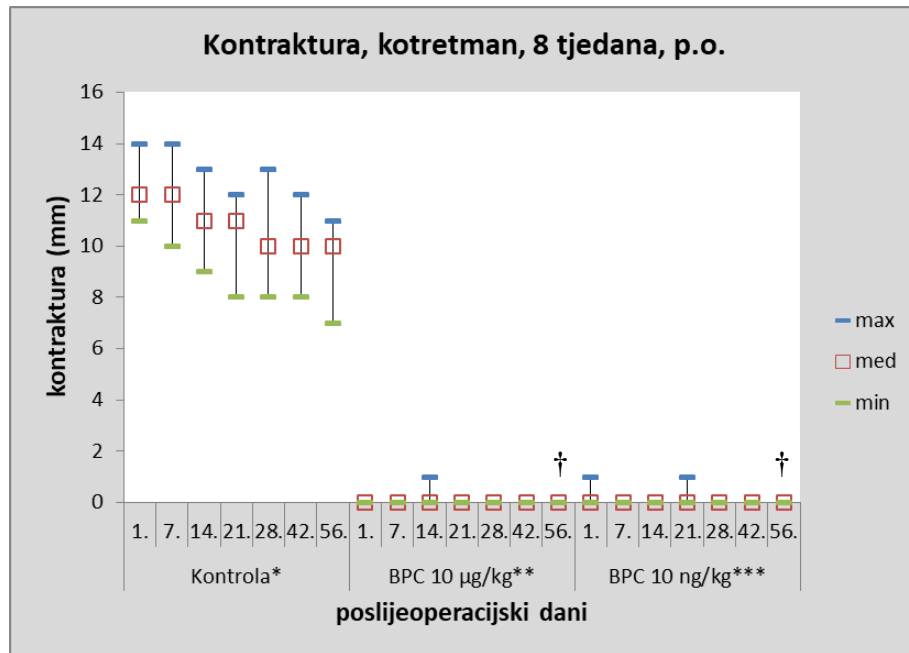
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 14. EPT vrijednosti po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji EPT vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,40$; $P=0,006$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test za procjenu kontrakture koljena

Rezultati testa za procjenu kontrakture koljena izraženi kao kontraktura (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 12 do 10 mm tijekom 8 tjedana praćenja, dok je medijan tretiranih skupina iznosio 0 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 15).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 15. Kontraktura (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji kontrakture između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=13,32$; $P=0,001$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Makroskopska procjena

Rezultati makroskopske procjene izraženi kao makroskopski skor (0-2) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Nijedna kontrolna životinja nije skorirana skorom 0, dok nijedna tretirana životinja nije skorirana skorom 2 (*Tablica 6, Slika 16*).

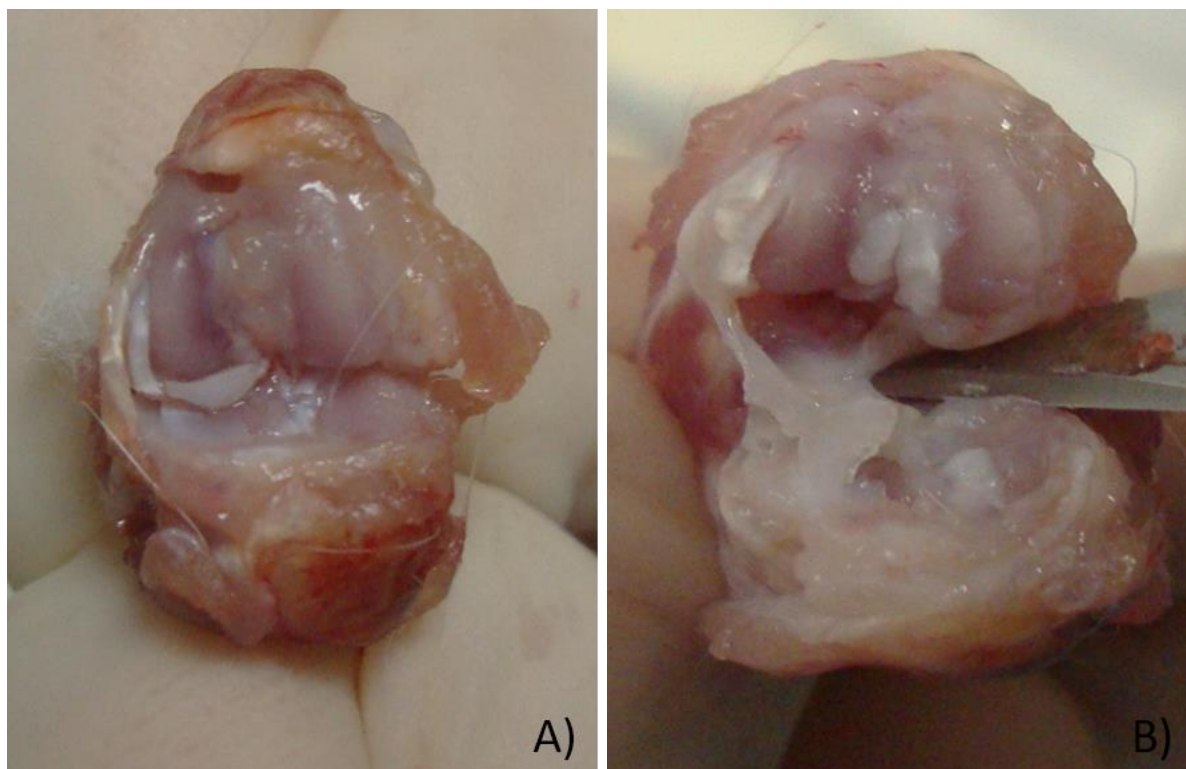
Tablica 6. Makroskopski skor za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao tablica kontingencije. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Makroskopski skor	Kontrola*	BPC 157 10 µg/kg** †	BPC 157 10 ng/kg**** †
stupanj 0	N=0	N=3	N=1
stupanj 1	N=1	N=2	N=4
stupanj 2	N=4	N=0	N=0

* čista voda za piće; ** 0,16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0,16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)

N = broj životinja sa pojedinim skorom; † - P<0,05

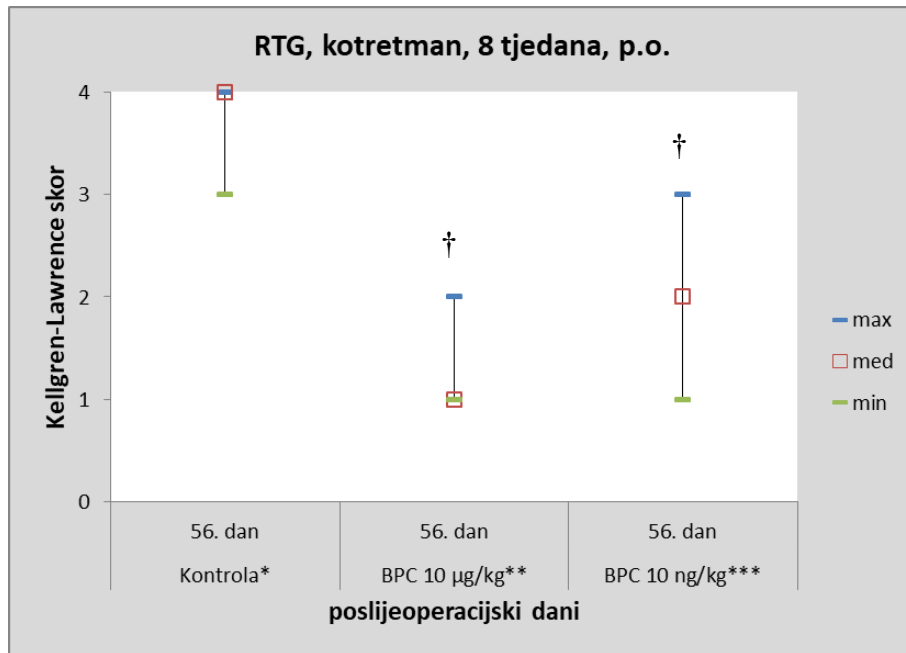
Analiza je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji makroskopskog skora između skupina, Freeman-Halton ekstenzija Fisherovog egzaktnog testa: df=4; P=0,015.



Slika 16. Makroskopski izgled koljena štakora (kotretman, 8 tjedana, peroralna primjena, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A) otvoreno koljeno tretirane životinje (vidljive su glatke i sjajne zglobne površine - makroskopski skor 0). B) otvoreno koljeno kontrolne životinje (vidljive su duboke abrazije zglobnih površina i opsežne nakupine vezivnog tkiva - makroskopski skor 2). Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan.

Radiološka obrada

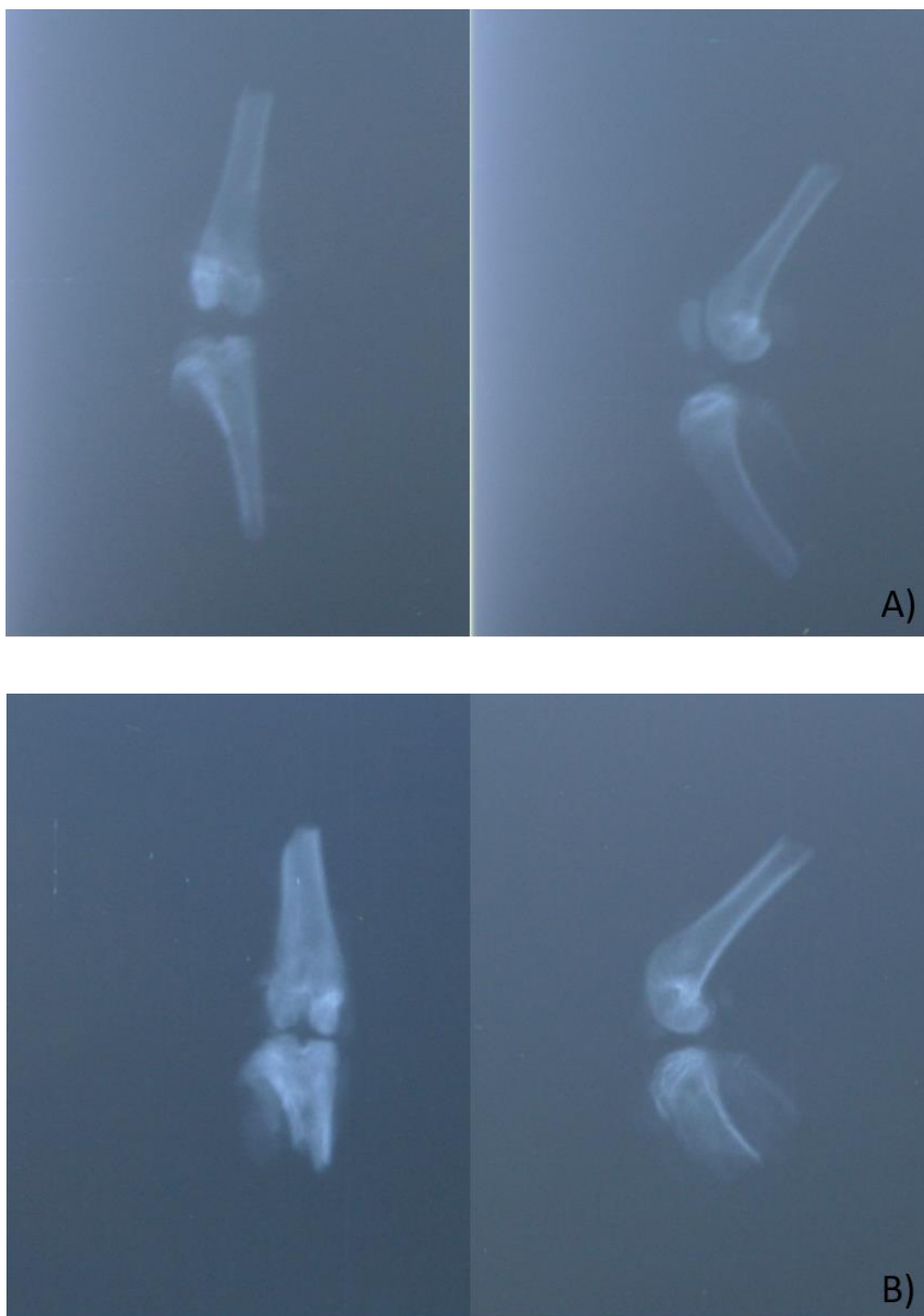
Rezultati RTG obrade izraženi kao radiološki skor (0-4) prema radiološkoj klasifikaciji osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 4 (uz minimum 3), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 1 odnosno 2 (uz minimum 1) (Slika 17 i 18).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 17. Kellgren-Lawrence skor za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

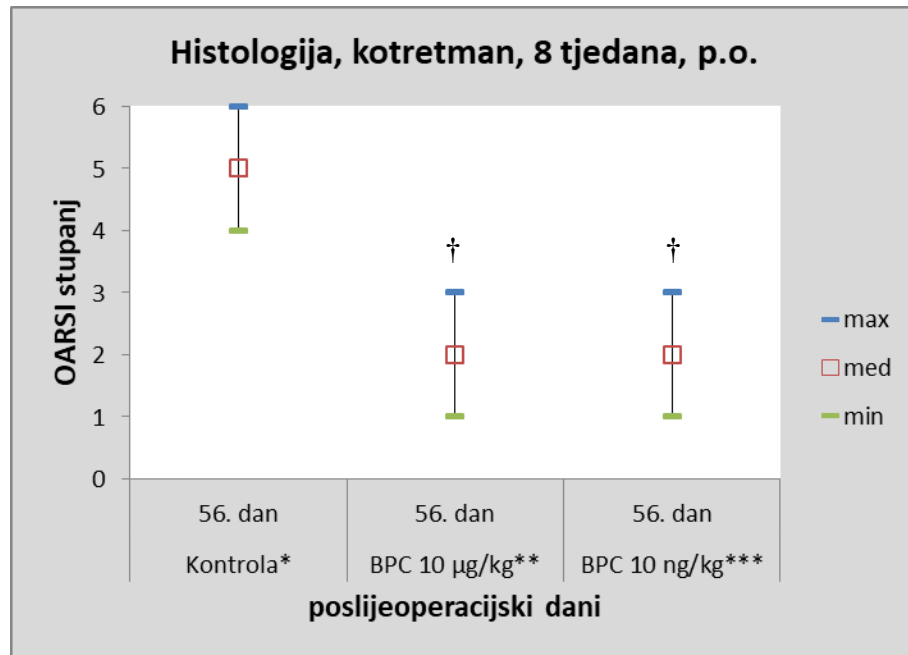
Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti radiološkog skora između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,02$; $P=0,007$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.



Slika 18. Radiološki izgled koljena štakora (kotretman, 8 tjedana, peroralna primjena, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A) RTG snimke koljena tretirane životinje (moguće suženje zglobnog prostora i mogući rubni osteofiti - Kellgren-Lawrence skor 1). B) RTG snimke koljena kontrolne životinje (jasno suženje zglobnog prostora, brojni umjereno veliki osteofiti, nešto skleroze i moguća deformacija koštane konture - Kellgren-Lawrence skor 3). RTG snimke učinjene su na uređaju Siemens OPTI 150/30/50 HC-100, Siemens AG, München, Njemačka.

Histološka obrada

Rezultati histološke obrade izraženi kao histološki stupanj (0-6) prema OARSI klasifikaciji stupnja težine osteoartritisa pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 5 (uz minimum 4 i maksimum 6), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 2 (uz minimum 1 i maksimum 3) (Slika 19).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

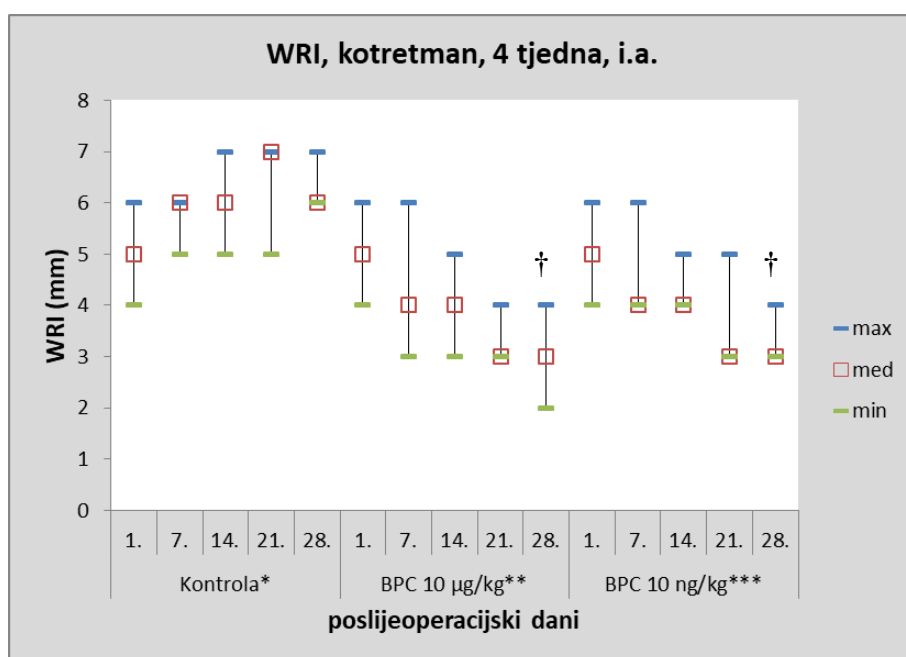
Slika 19. OARSI stupanj za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti OARSI stupnja između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=9,93$; $P=0,007$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

4.3. Kotretman, 4 tjedna, intraartikularna primjena

Analiza hoda

Rezultati analize hoda izraženi kao WRI vrijednost (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 5 do 7 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 5 do 3 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 20).



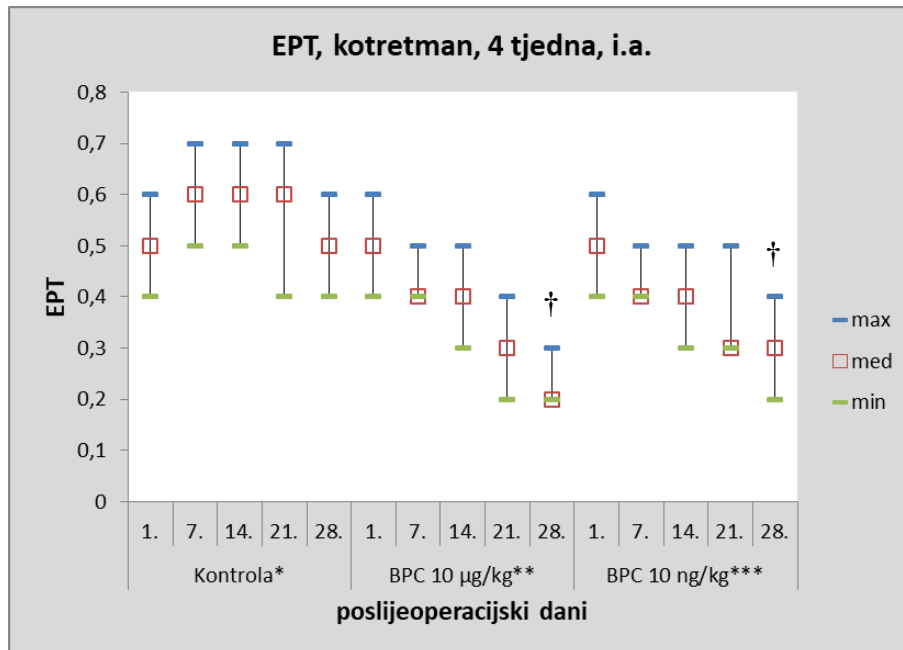
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 20. WRI vrijednosti (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji WRI vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,52$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test pritiska ekstenzora

Rezultati testa pritiska ekstenzora izraženi kao EPT vrijednost pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 0,6 do 0,5 tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 0,5 do 0,2-0,3 tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 21).



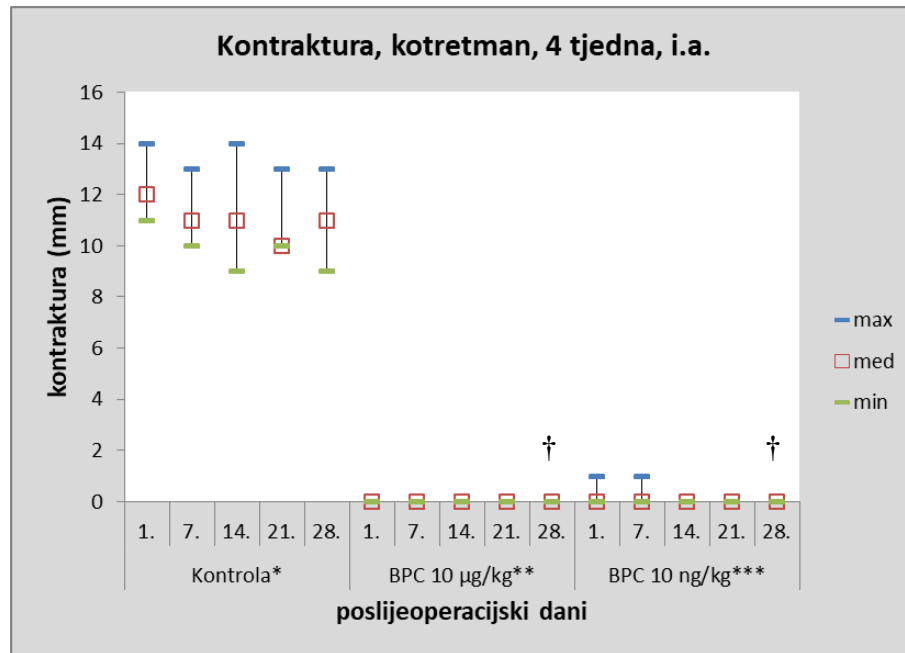
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 21. EPT vrijednosti po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji EPT vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,44$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test za procjenu kontrakture koljena

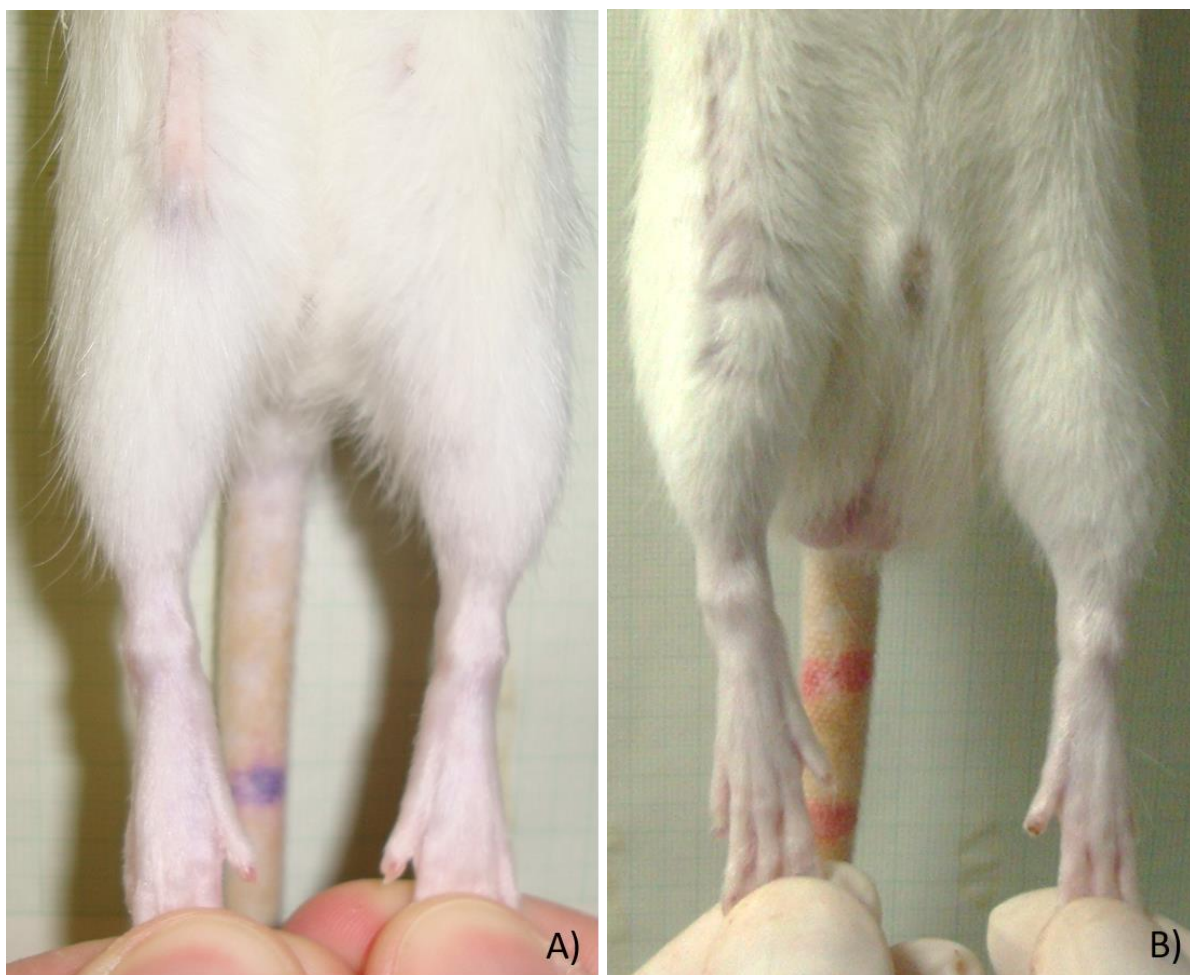
Rezultati testa za procjenu kontrakture koljena izraženi kao kontraktura (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 12 do 10 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok je medijan tretiranih skupina iznosio 0 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 22 i 23).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 22. Kontraktura (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji kontrakture između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=13,29$; $P=0,001$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.



Slika 23. Kontraktura koljena u štakora (kotretman, 4 tjedna, intraartikularna primjena, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A) nema vidljive kontrakture koljena kod tretirane životinje. B) prisutna jasno vidljiva kontraktura koljena kod kontrolne životinje. Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan.

Makroskopska procjena

Rezultati makroskopske procjene izraženi kao makroskopski skor (0-2) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Nijedna kontrolna životinja nije skorirana skorom 0, dok nijedna tretirana životinja nije skorirana skorom 2 (*Tablica 7*).

Tablica 7. Makroskopski skor za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0,9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao tablica kontingencije.

Makroskopski skor	Kontrola*	BPC 157 10 µg/kg**	BPC 157 10 ng/kg***
stupanj 0	N=0	N=2	N=1
stupanj 1	N=2	N=3	N=4
stupanj 2	N=3	N=0	N=0

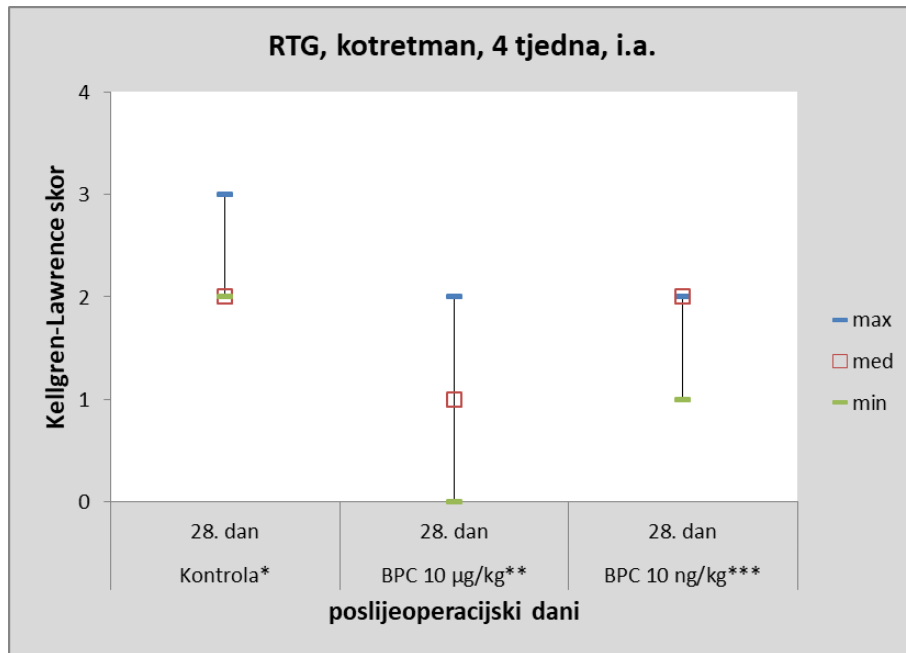
* čista voda za piće; ** 0,16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0,16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)

N = broj životinja sa pojedinim skorom

Analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji makroskopskog skora između skupina, Freeman-Halton ekstenzija Fisherovog egzaktnog testa: $df=4$; $P=0,126$.

Radiološka obrada

Rezultati RTG obrade izraženi kao radiološki skor (0-4) prema radiološkoj klasifikaciji osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 2 (uz maksimum 3), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 1 odnosno 2 (uz maksimum 2) (Slika 24).



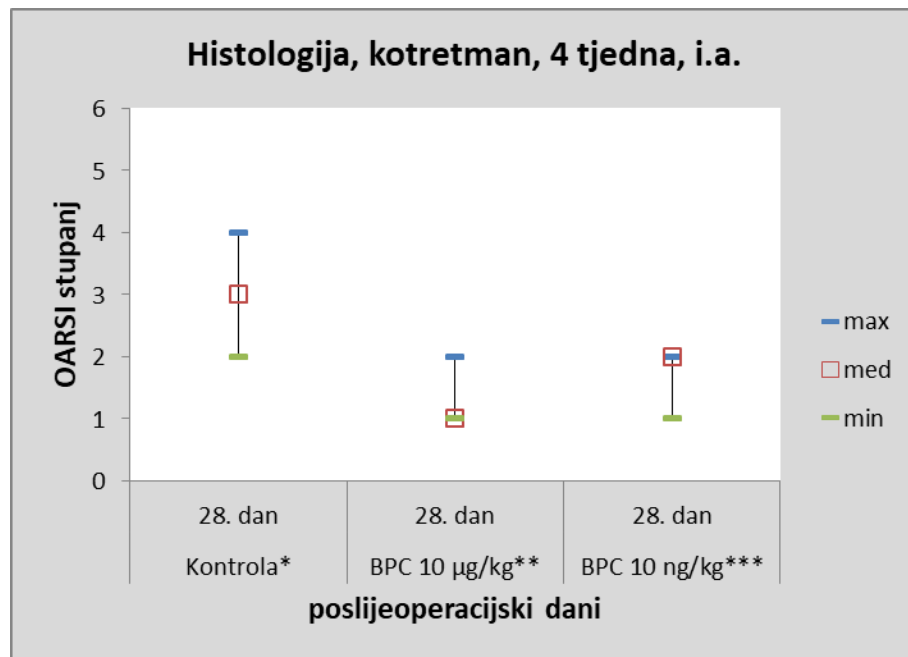
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 24. Kellgren-Lawrence skor za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti radiološkog skora između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=5,97$; $P=0,051$.

Histološka obrada

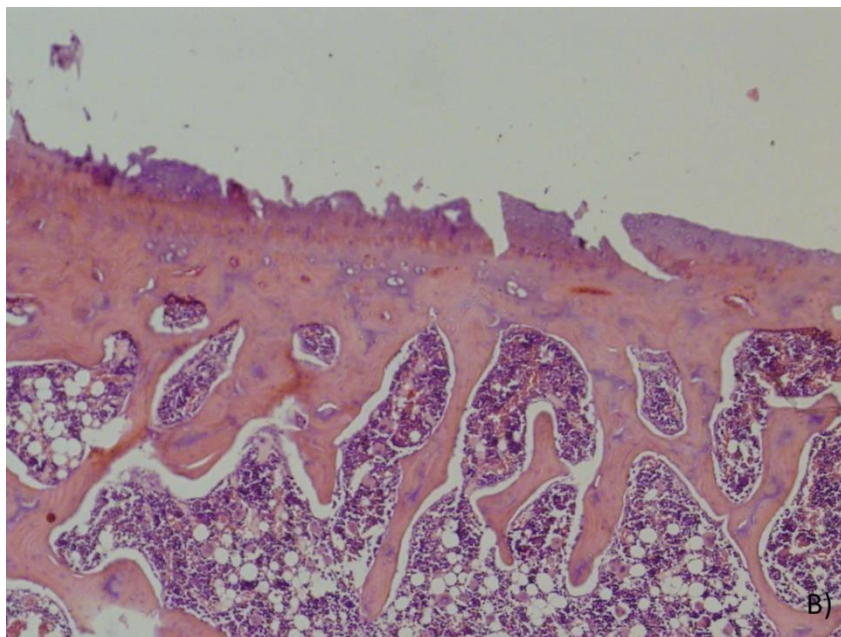
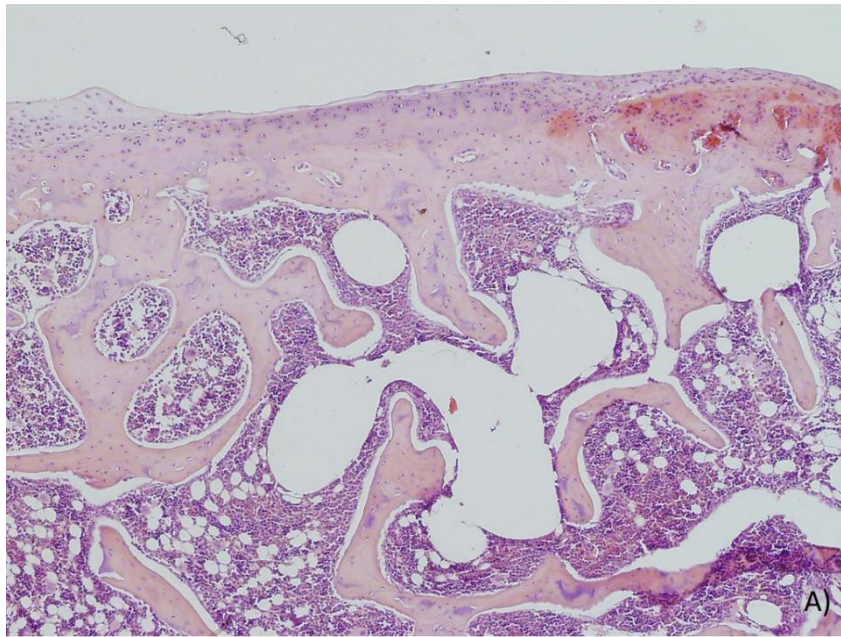
Rezultati histološke obrade izraženi kao histološki stupanj (0-6) prema OARSI klasifikaciji stupnja težine osteoartritisa pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 3 (uz minimum 2 i maksimum 4), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 1 odnosno 2 (uz minimum 1 i maksimum 2) (Slika 25 i 26).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 25. OARSI stupanj za kotretiranu seriju životinja (4 tjedna, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti OARSI stupnja između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=7,17$; $P=0,028$. Međutim, post-hoc analiza nije pokazala statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina.

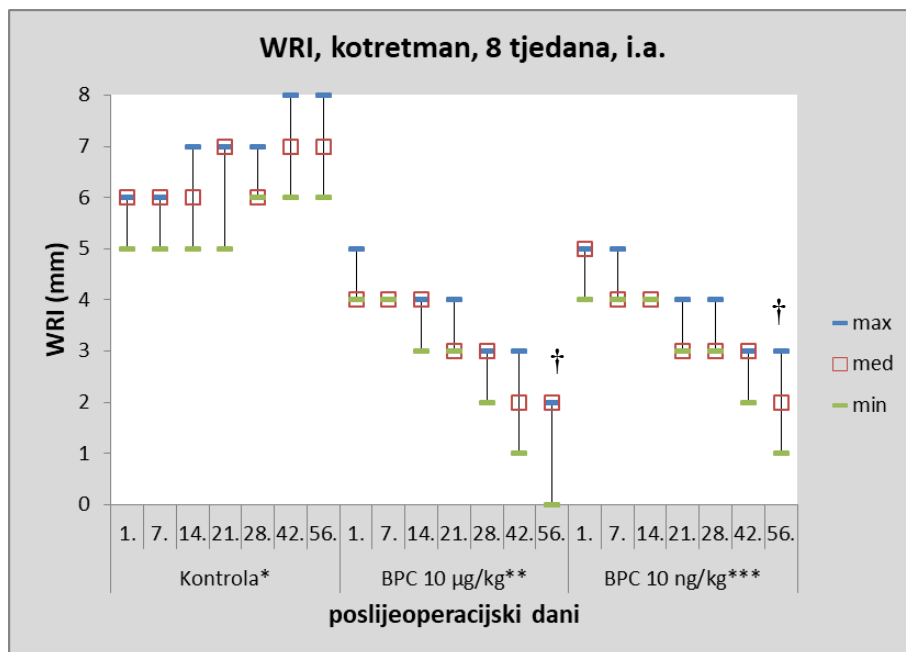


Slika 26. Histološki izgled zglobne površine medijalnog kondila tibije štakora (kotretman, 4 tjedna, intraartikularna primjena, 10 µg/kg). A) histološki uzorak tretirane životinje pokazuje intaktnu zglobnu površinu, no prisutan je edem hrskavice i gubitak orijentacije hondrocita, te blaga proliferacija hondrocita u površinskom sloju hrskavice, promjene zahvaćaju do 30 % površine (stupanj 1, stadij 3 - ukupan OARSI skor 3). B) histološki uzorak kontrolne životinje pokazuje gubitak kontinuiteta zglobne površine s vertikalnim fisurama koje se u dubljim slojevima granaju i zahvaćaju površinski, srednji i početno duboki sloj hrskavice, uz prisutan gubitak i proliferaciju hondrocita, kao i naglašeni gubitak orijentacije, promjene zahvaćaju više od 50 % površine (stupanj 3, stadij 4 - ukupan OARSI skor 12). HE (10x). Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Olympus DP71, Olympus Corporation, Tokio, Japan.

4.4. Kotretman, 8 tjedana, intraartikularna primjena

Analiza hoda

Rezultati analize hoda izraženi kao WRI vrijednost (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 6 do 7 mm tijekom 8 tjedana praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 4-5 do 2 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 27).



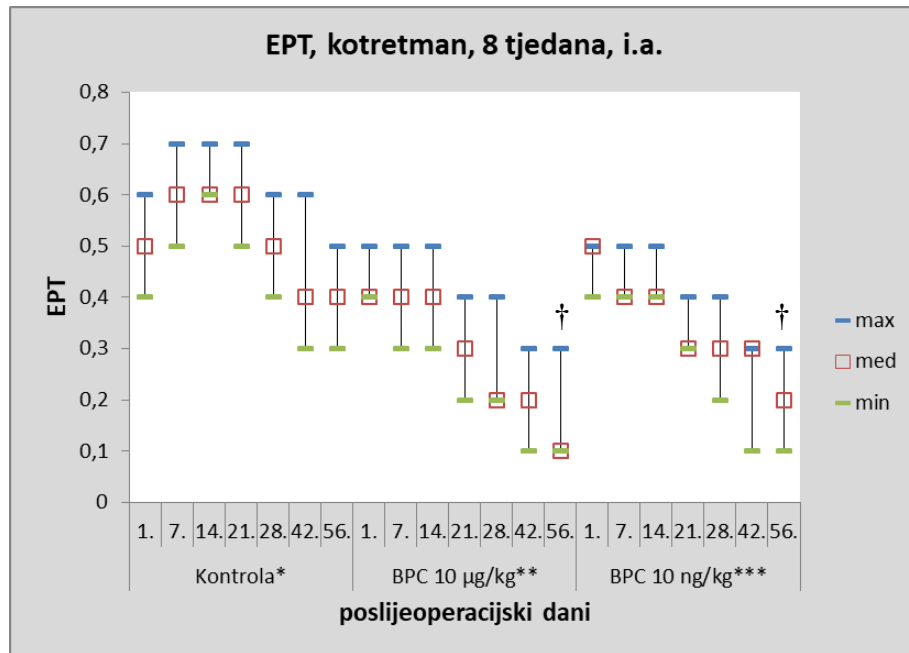
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 27. WRI vrijednosti (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji WRI vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,55$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test pritiska ekstenzora

Rezultati testa pritiska ekstenzora izraženi kao EPT vrijednost pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 0,6 do 0,4 tijekom 8 tjedana praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 0,5 do 0,1-0,2 tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 28).



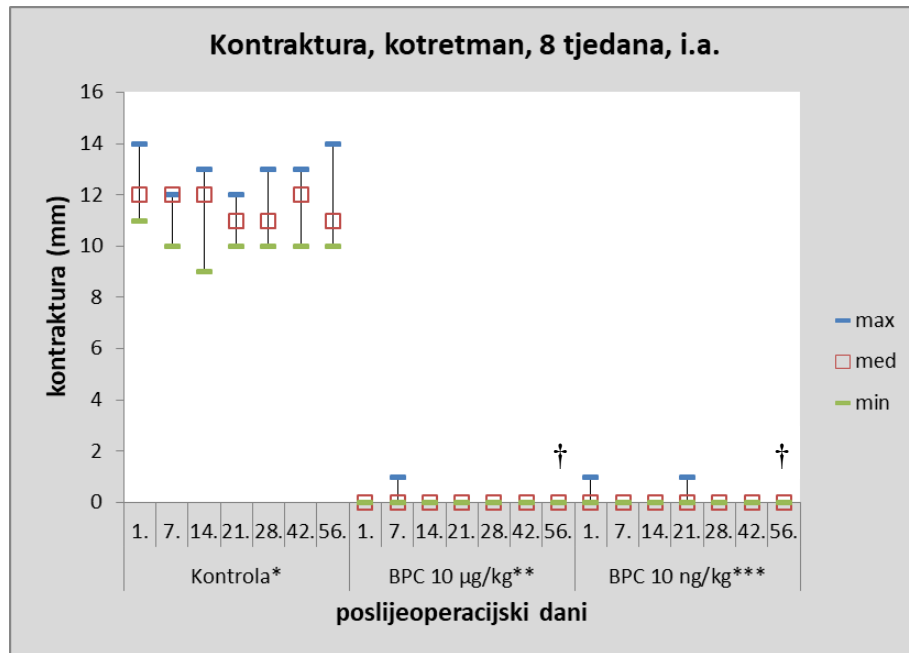
* 0,9 % NaCl (0,1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0,1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0,1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 28. EPT vrijednosti po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0,9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji EPT vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=8,39$; $P=0,015$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test za procjenu kontrakture koljena

Rezultati testa za procjenu kontrakture koljena izraženi kao kontraktura (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 12 do 11 mm tijekom 8 tjedana praćenja, dok je medijan tretiranih skupina iznosio 0 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 29).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 29. Kontraktura (mm) po poslijeoperacijskim danima za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji kontrakture između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=13,32$; $P=0,001$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Makroskopska procjena

Rezultati makroskopske procjene izraženi kao makroskopski skor (0-2) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Nijedna kontrolna životinja nije skorirana skorom 0, dok nijedna tretirana životinja nije skorirana skorom 2 (*Tablica 8, Slika 30*).

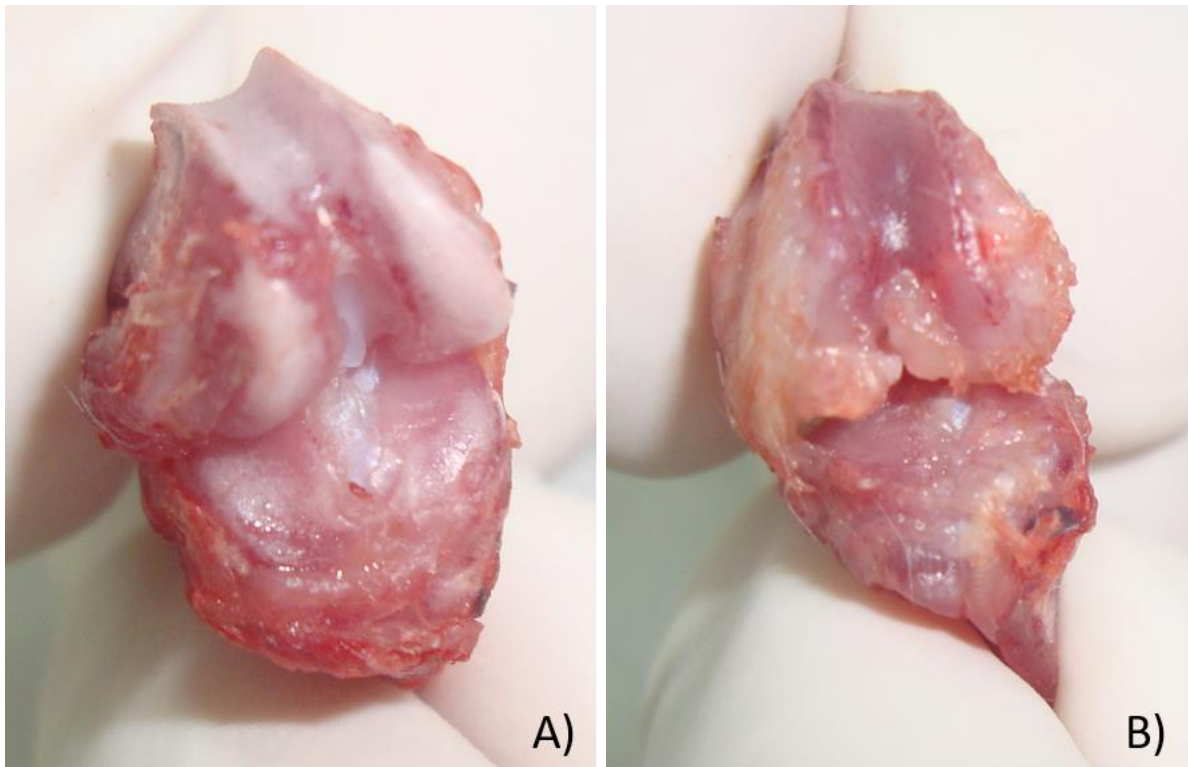
Tablica 8. Makroskopski skor za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0,9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao tablica kontingencije. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Makroskopski skor	Kontrola*	BPC 157 10 µg/kg** †	BPC 157 10 ng/kg*** †
stupanj 0	N=0	N=1	N=0
stupanj 1	N=0	N=4	N=5
stupanj 2	N=5	N=0	N=0

* čista voda za piće; ** 0,16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0,16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)

N = broj životinja sa pojedinim skorom; † - P<0,05

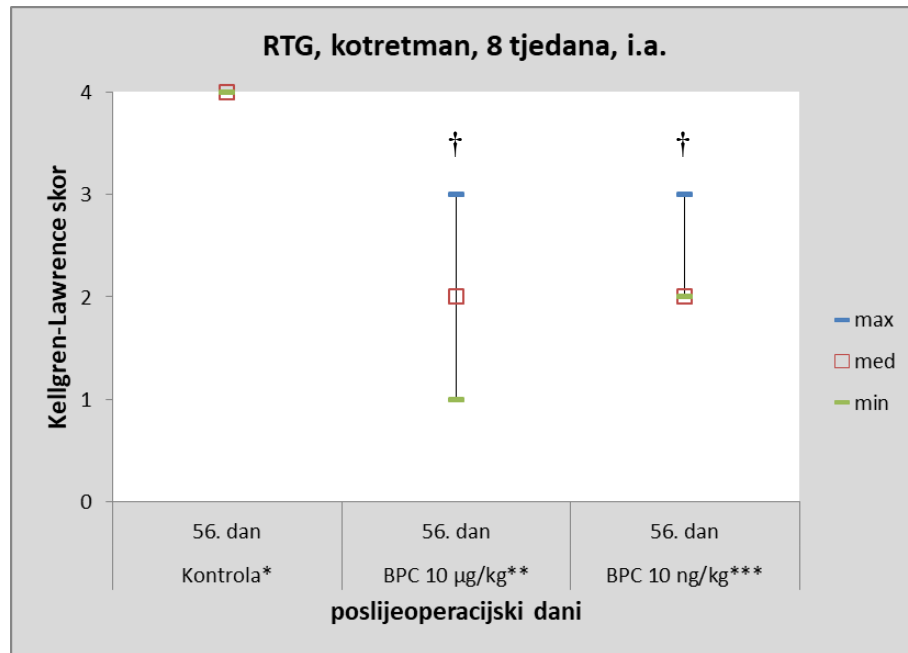
Analiza je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji makroskopskog skora između skupina, Freeman-Halton ekstenzija Fisherovog egzaktnog testa: df=4; P=0,001.



Slika 30. Makroskopski izgled koljena štakora (kotretman, 8 tjedana, intraartikularna primjena, 10 ng/kg). A) otvoreno koljeno tretirane životinje (vidljive su plitke abrazije zglobnih površina i manje nakupine vezivnog tkiva - makroskopski skor 1). B) otvoreno koljeno kontrolne životinje (vidljive su duboke abrazije zglobnih površina i opsežne nakupine vezivnog tkiva - makroskopski skor 2). Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan.

Radiološka obrada

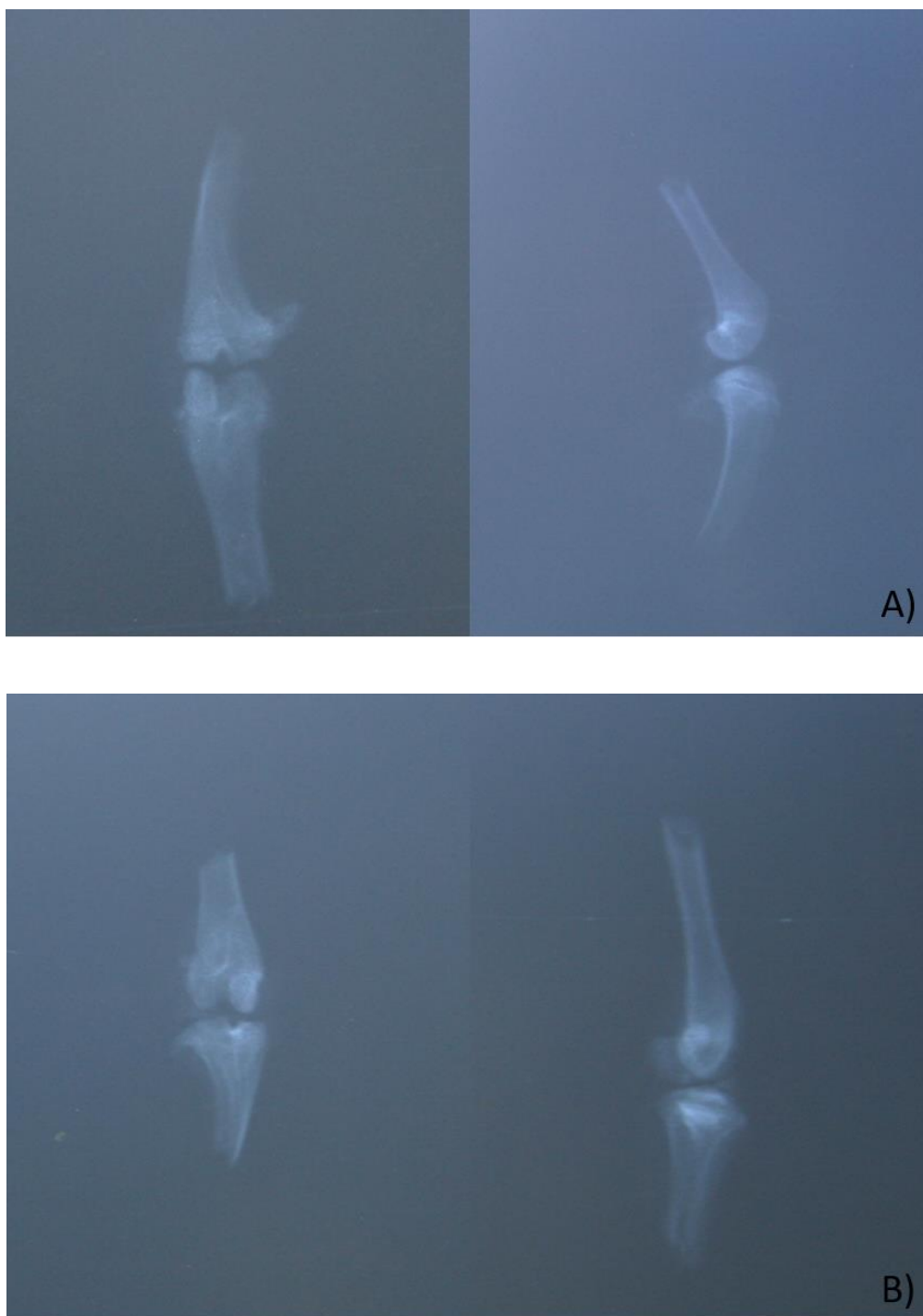
Rezultati RTG obrade izraženi kao radiološki skor (0-4) prema radiološkoj klasifikaciji osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 4 (uz minimum 4), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 2 (uz minimum 1 odnosno 2) (Slika 31 i 32).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 31. Kellgren-Lawrence skor za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

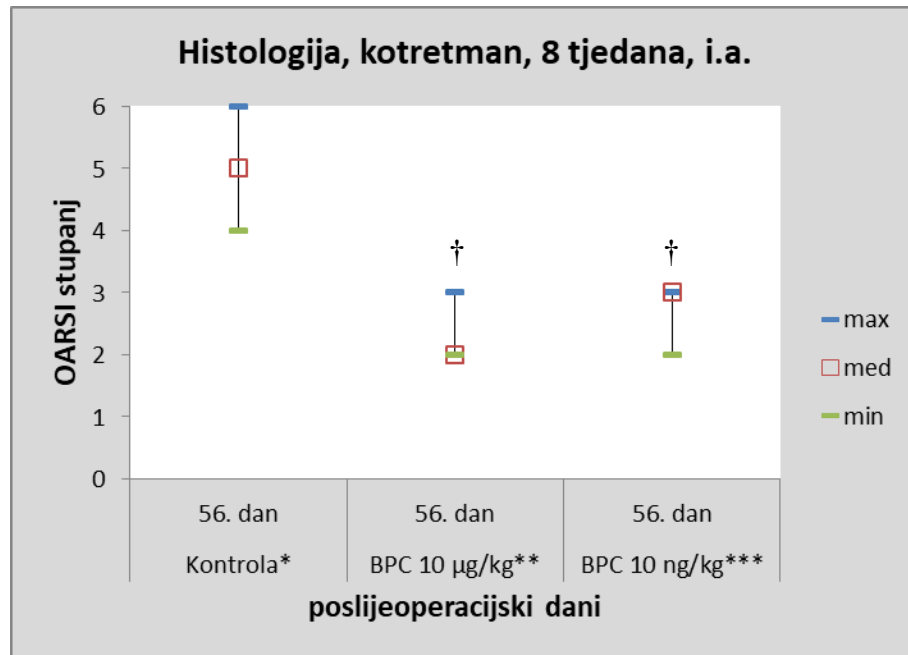
Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti radiološkog skora između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,85$; $P=0,004$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.



Slika 32. Radiološki izgled koljena štakora (kotretman, 8 tjedana, intraartikularna primjena, 10 ng/kg). A) RTG snimke koljena tretirane životinje (jasno suženje zglobnog prostora i jasna prisutnost osteofita - Kellgren-Lawrence skor 2). B) RTG snimke koljena kontrolne životinje (značajno suženje zglobnog prostora, brojni veliki osteofiti, izražena skleroza i jasna deformacija koštane konture - Kellgren-Lawrence skor 4). RTG snimke učinjene su na uređaju Siemens OPTI 150/30/50 HC-100, Siemens AG, München, Njemačka.

Histološka obrada

Rezultati histološke obrade izraženi kao histološki stupanj (0-6) prema OARSI klasifikaciji stupnja težine osteoartritisa pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 5 (uz minimum 4 i maksimum 6), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 2 odnosno 3 (uz minimum 2 i maksimum 3) (Slika 33).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

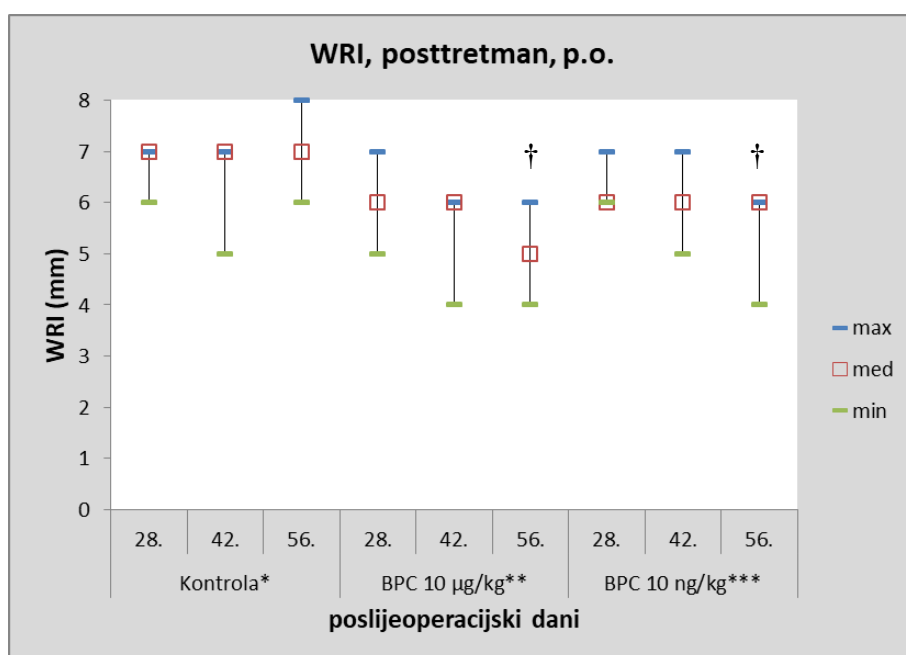
Slika 33. OARSI stupanj za kotretiranu seriju životinja (8 tjedana, intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija odmah nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti OARSI stupnja između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,31$; $P=0,006$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

4.5. Posttretman, peroralna primjena

Analiza hoda

Rezultati analize hoda izraženi kao WRI vrijednost (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 7 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 6 do 5 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 34).



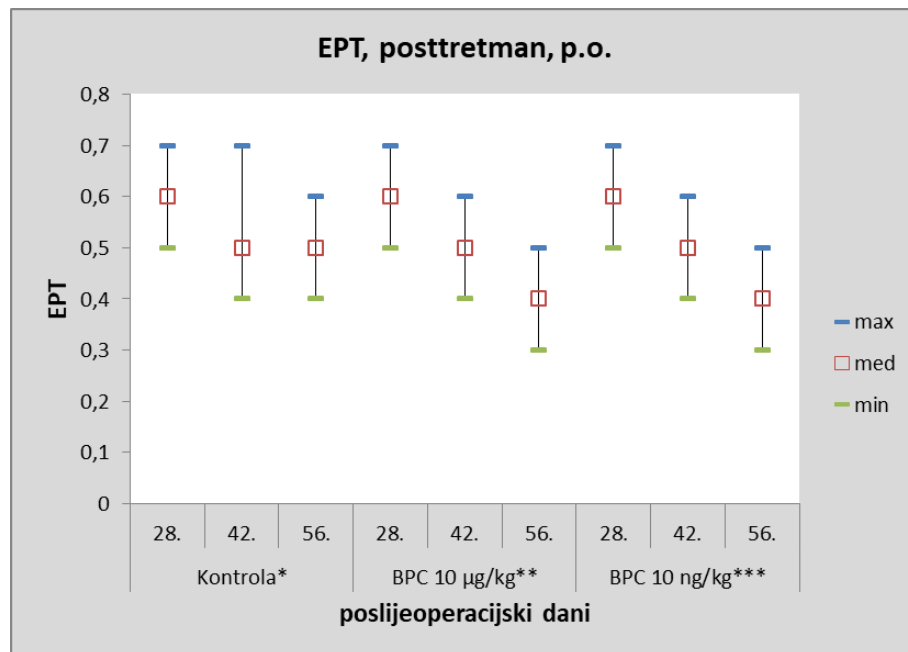
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 34. WRI vrijednosti (mm) po poslijeoperacijskim danima za posttretiranu seriju životinja (peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, početak primjene nakon 4 tjedna, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji WRI vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=7,77$; $P=0,020$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test pritiska ekstenzora

Rezultati testa pritiska ekstenzora izraženi kao EPT vrijednost pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 0,6 do 0,5 tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 0,6 do 0,4 tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 35).



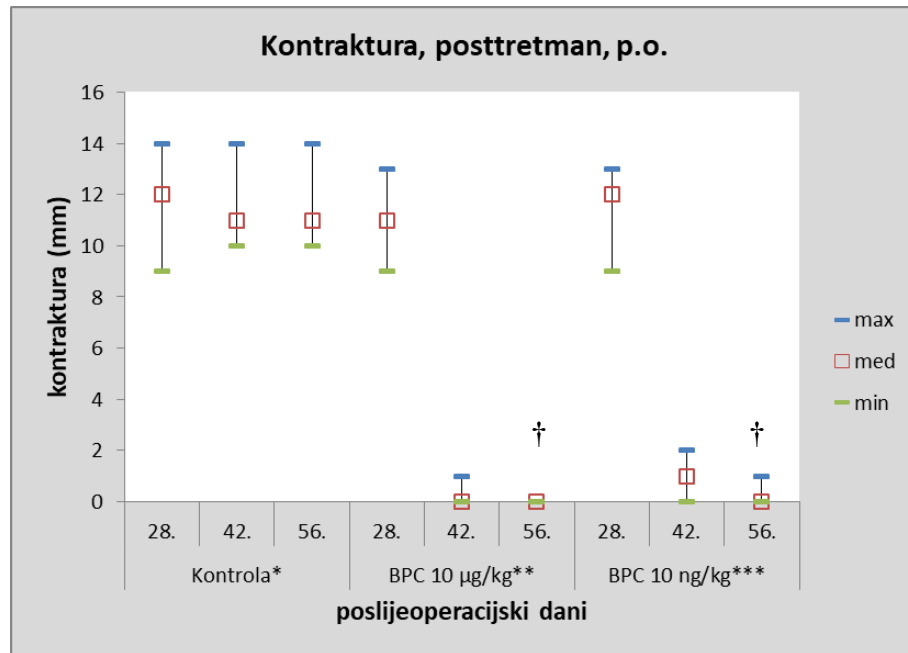
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 35. EPT vrijednosti po poslijeoperacijskim danima za posttretiranu seriju životinja (peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, početak primjene nakon 4 tjedna, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji EPT vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=3,50$; $P=0,174$.

Test za procjenu kontrakture koljena

Rezultati testa za procjenu kontrakture koljena izraženi kao kontraktura (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 12 do 11 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 12 do 0 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 36).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 36. Kontraktura (mm) po poslijeoperacijskim danima za posttretiranu seriju životinja (peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, početak primjene nakon 4 tjedna, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji kontrakture između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=12,12$; $P=0,002$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Makroskopska procjena

Rezultati makroskopske procjene izraženi kao makroskopski skor (0-2) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Većina kontrolnih životinja skorirana je skorom 2, dok je većina tretiranih životinja skorirana skorom 1 (Tablica 9, Slika 37).

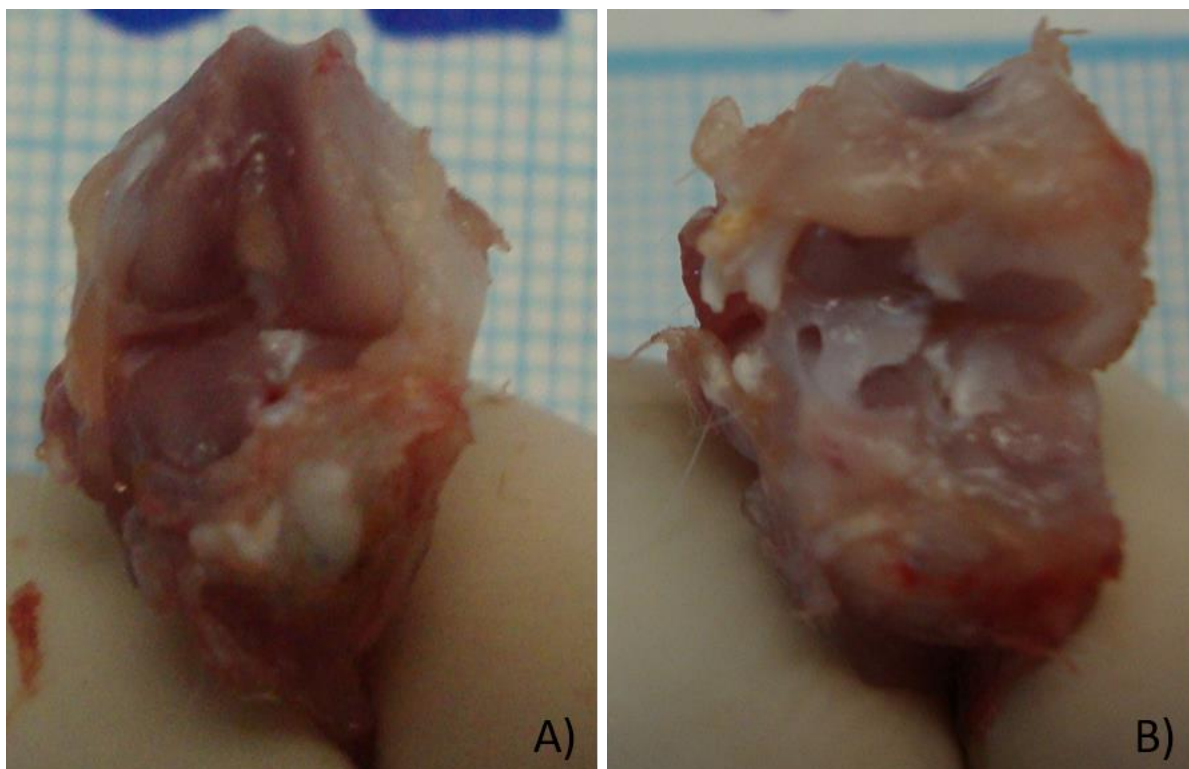
Tablica 9. Makroskopski skor za posttretiranu seriju životinja (peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, početak primjene nakon 4 tjedna, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao tablica kontingencije.

Makroskopski skor	Kontrola*	BPC 157 10 µg/kg**	BPC 157 10 ng/kg****
stupanj 0	N=0	N=0	N=0
stupanj 1	N=1	N=4	N=3
stupanj 2	N=4	N=1	N=2

* čista voda za piće; ** 0,16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0,16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)

N = broj životinja sa pojedinim skorom

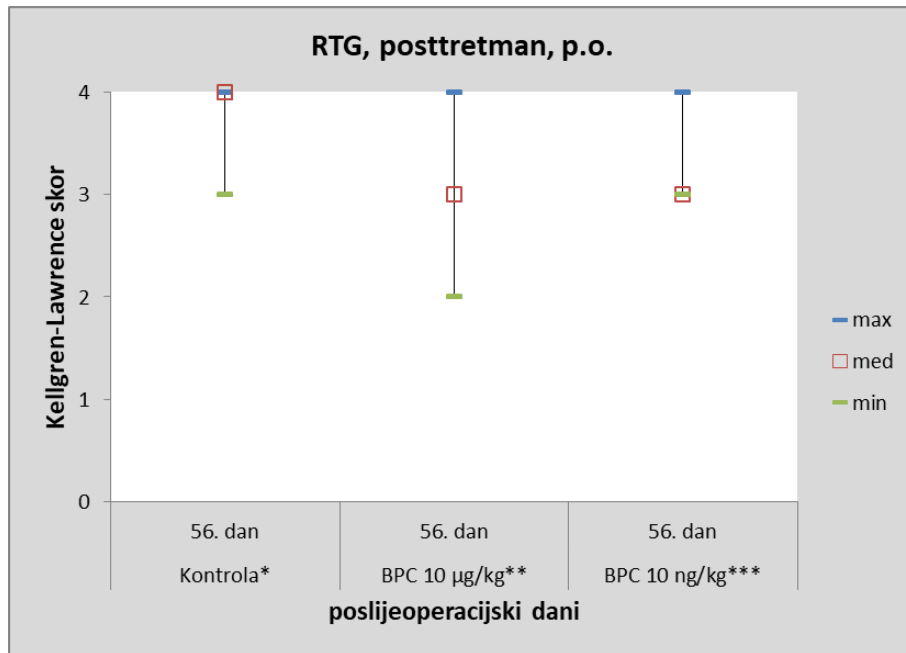
Analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji makroskopskog skora između skupina, Freeman-Halton ekstenzija Fisherovog egzaktnog testa: df=4; P=0,301.



Slika 37. Makroskopski izgled koljena štakora (posttretman, peroralna primjena, 10 μ g/kg). A) otvoreno koljeno tretirane životinje (vidljive su plitke abrazije zglobnih površina i manje nakupine vezivnog tkiva - makroskopski skor 1). B) otvoreno koljeno kontrolne životinje (vidljive su duboke abrazije zglobnih površina i opsežne nakupine vezivnog tkiva - makroskopski skor 2). Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan.

Radiološka obrada

Rezultati RTG obrade izraženi kao radiološki skor (0-4) prema radiološkoj klasifikaciji osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 4 (uz minimum 3), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 3 (uz minimum 2 odnosno 3) (Slika 38).



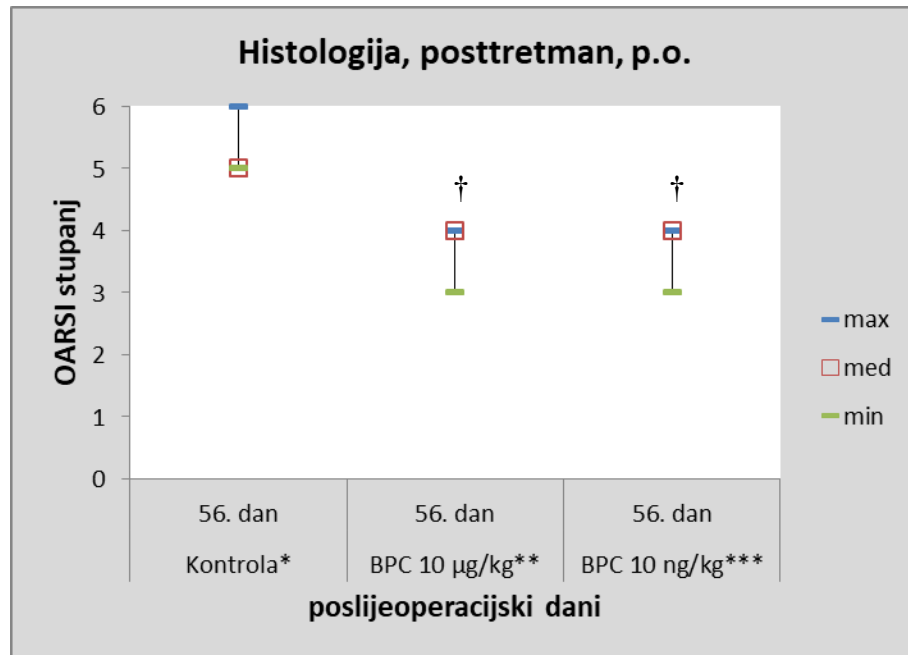
* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 38. Kellgren-Lawrence skor za posttretiranu seriju životinja (peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, početak primjene nakon 4 tjedna, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti radiološkog skora između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=3,93$; $P=0,141$.

Histološka obrada

Rezultati histološke obrade izraženi kao histološki stupanj (0-6) prema OARSI klasifikaciji stupnja težine osteoartritisa pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 5 (uz minimum 5 i maksimum 6), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 4 (uz minimum 3 i maksimum 4) (Slika 39).



* čista voda za piće; ** 0.16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0.16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

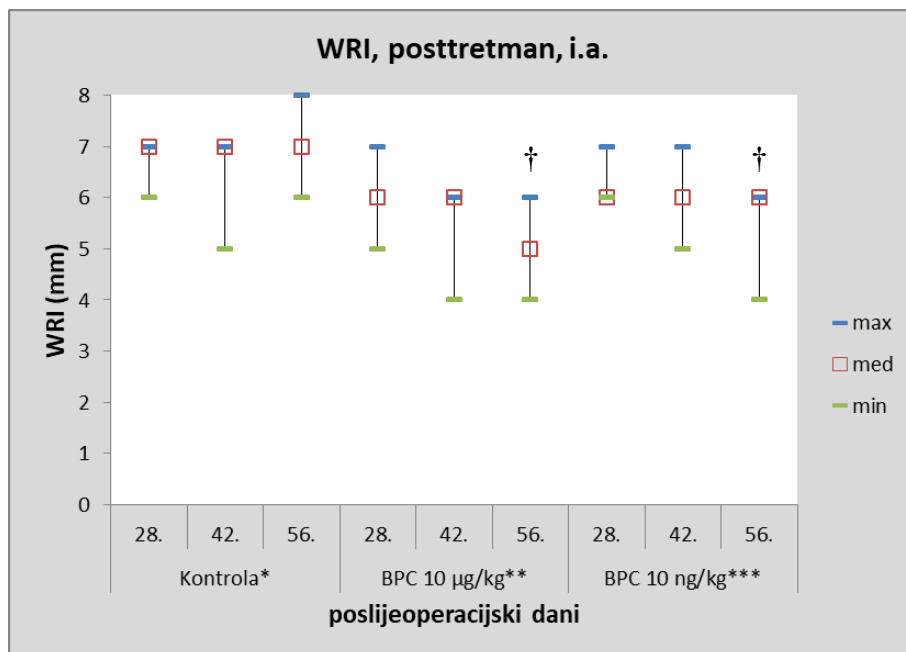
Slika 39. OARSI stupanj za posttretiranu seriju životinja (peroralna primjena, BPC 157 otopljen u vodi za piće, početak primjene nakon 4 tjedna, svakodnevno do žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti OARSI stupnja između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,86$; $P=0,004$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

4.6. Posttretman, intraartikularna primjena

Analiza hoda

Rezultati analize hoda izraženi kao WRI vrijednost (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 7 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 6 do 5 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 40).



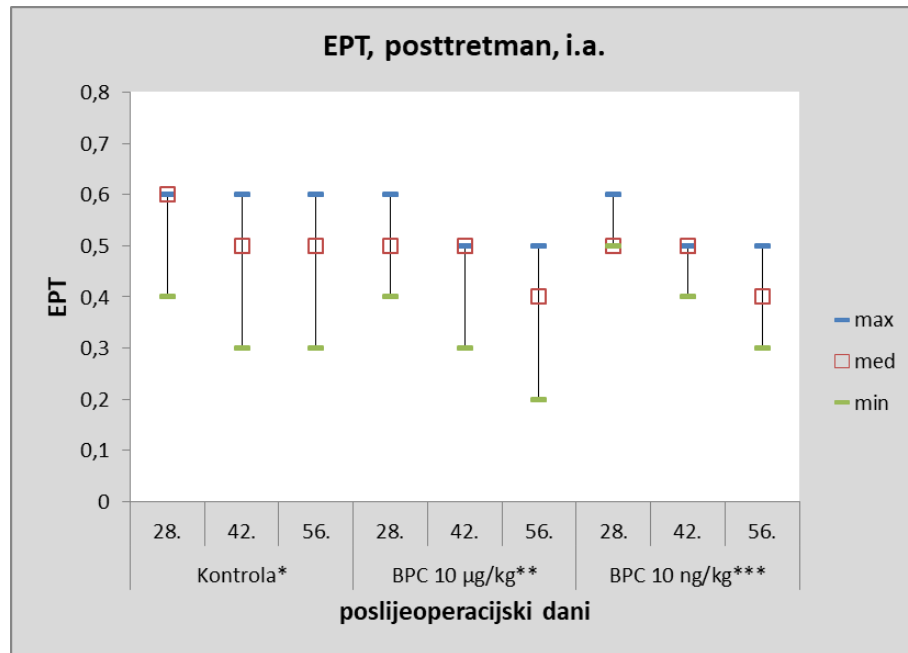
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 40. WRI vrijednosti (mm) po poslijeoperacijskim danima za posttretiranu seriju životinja (intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija nakon 4 tjedna, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji WRI vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=11,63$; $P=0,003$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

Test pritiska ekstenzora

Rezultati testa pritiska ekstenzora izraženi kao EPT vrijednost pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 0,6 do 0,5 tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 0,5 do 0,4 tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 41).



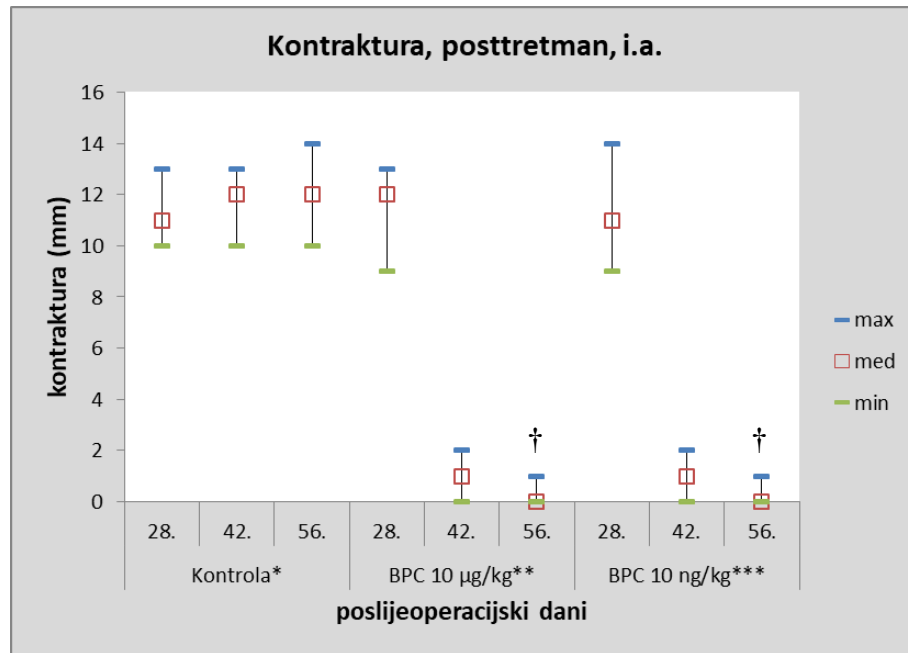
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 41. EPT vrijednosti po poslijeoperacijskim danima za posttretiranu seriju životinja (intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija nakon 4 tjedna, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji EPT vrijednosti između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=2,04$; $P=0,360$.

Test za procjenu kontrakture koljena

Rezultati testa za procjenu kontrakture koljena izraženi kao kontraktura (mm) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine kretao se od 11 do 12 mm tijekom 4 tjedna praćenja, dok se medijan tretiranih skupina kretao od 12 do 0 mm tijekom istog vremenskog razdoblja (Slika 42 i 43).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 42. Kontraktura (mm) po poslijeoperacijskim danima za posttretiranu seriju životinja (intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija nakon 4 tjedna, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji kontrakture između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,64$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.



Slika 43. Kontraktura koljena u štakora (posttretman, intraartikularna primjena, 10 ng/kg). A) nema vidljive kontrakture koljena kod tretirane životinje. B) prisutna jasno vidljiva kontraktura koljena kod kontrolne životinje. Fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Canon Digital Ixus 130, Canon, Tokio, Japan.

Makroskopska procjena

Rezultati makroskopske procjene izraženi kao makroskopski skor (0-2) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Sve kontrolne životinje skorirane su skorom 2, dok je nekoliko tretiranih životinja skorirano skorom 1 (*Tablica 10*).

Tablica 10. Makroskopski skor za posttretiranu seriju životinja (intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0,9 % NaCl, prva aplikacija 4 tjedna nakon operacijskog zahvata, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao tablica kontingencije.

Makroskopski skor	Kontrola*	BPC 157 10 µg/kg**	BPC 157 10 ng/kg***
stupanj 0	N=0	N=0	N=0
stupanj 1	N=0	N=2	N=1
stupanj 2	N=5	N=3	N=4

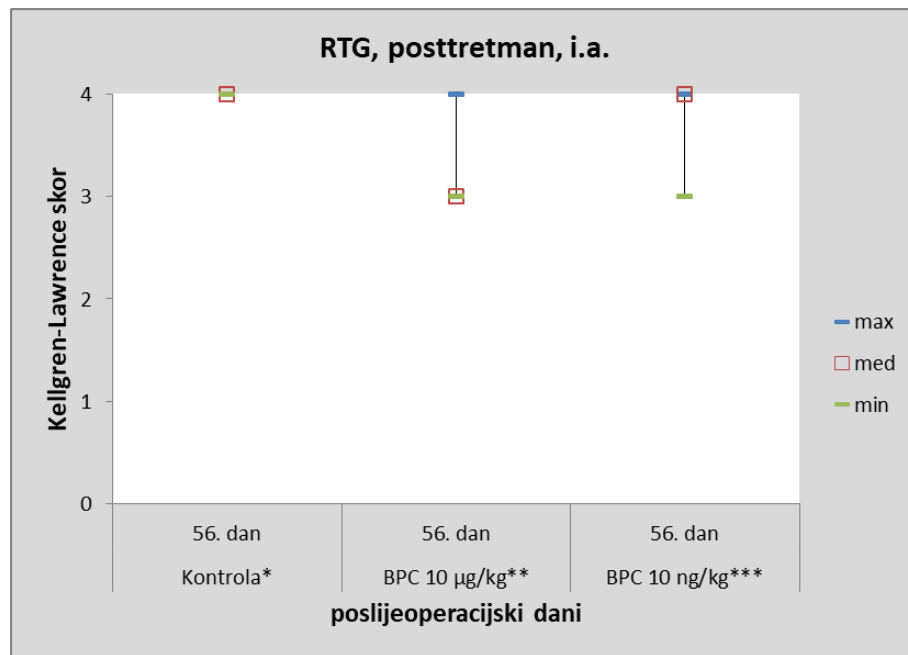
* čista voda za piće; ** 0,16 µg/ml (12 ml/štakor/dan); *** 0,16 ng/ml (12 ml/štakor/dan)

N = broj životinja sa pojedinim skorom

Analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji makroskopskog skora između skupina, Freeman-Halton ekstenzija Fisherovog egzaktnog testa: df=4; P=0,615.

Radiološka obrada

Rezultati RTG obrade izraženi kao radiološki skor (0-4) prema radiološkoj klasifikaciji osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence) pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 4 (uz minimum 4), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 3 odnosno 4 (uz minimum 3) (Slika 44).



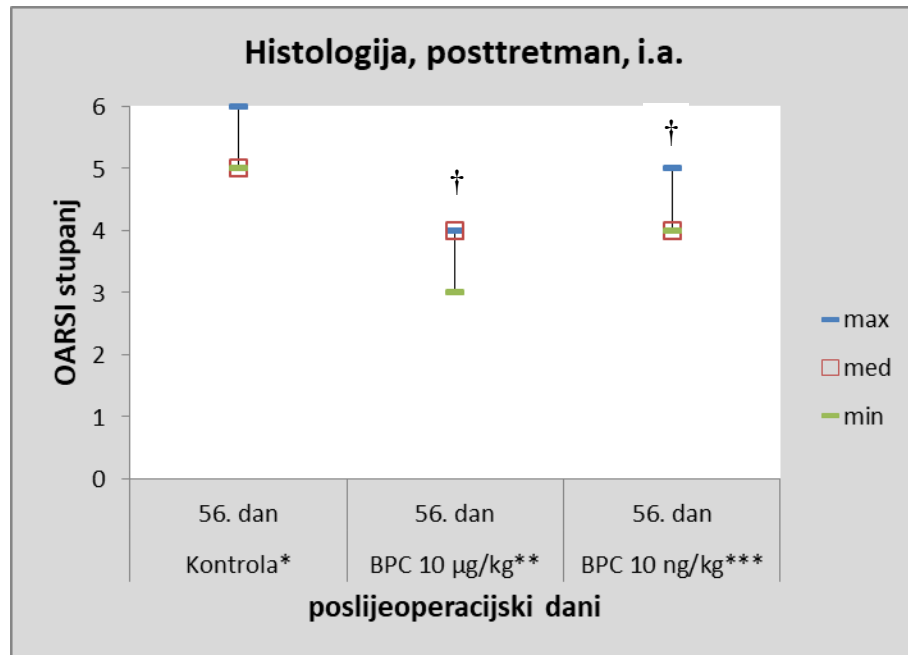
* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum

Slika 44. Kellgren-Lawrence skor za posttretiranu seriju životinja (intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija nakon 4 tjedna, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum.

Analiza srednjih rangova nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti radiološkog skora između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=3,92$; $P=0,141$.

Histološka obrada

Rezultati histološke obrade izraženi kao histološki stupanj (0-6) prema OARSI klasifikaciji stupnja težine osteoartritisa pokazali su razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Medijan kontrolne skupine iznosio je 5 (uz minimum 5 i maksimum 6), dok je medijan tretiranih skupina iznosio 4 (uz minimum 3 i maksimum 5) (Slika 45).



* 0.9 % NaCl (0.1 ml/aplikacija); ** 20 µg/ml (0.1 ml/aplikacija); *** 20 ng/ml (0.1 ml/aplikacija)
med - medijan; max - maksimum; min - minimum; † - P<0,05

Slika 45. OARSI stupanj za posttretiranu seriju životinja (intraartikularna primjena u dvotjednim intervalima, BPC 157 otopljen u 0.9 % NaCl, prva aplikacija nakon 4 tjedna, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Rezultati su prikazani kao medijan uz naznačen maksimum i minimum. Statistički značajne razlike označene su simbolom †.

Analiza srednjih rangova je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji vrijednosti OARSI stupnja između skupina, Kruskal-Wallis ANOVA test: $H(2, N=15)=10,64$; $P=0,005$. Post-hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i tretiranih skupina. Između tretiranih skupina statistički značajna razlika nije pokazana.

5. RASPRAVA

Prije rasprave o samim rezultatima ovog istraživanja i o tome potvrđuju li dobiveni rezultati postavljenu hipotezu potreban je osvrt na korišteni eksperimentalni model, te na potencijalne mehanizme pozitivnog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 u patogenetskom „klupku“ razvoja posttraumatskog osteoartritisa (PTOA), dok je nakon rasprave o rezultatima potreban osvrt na sadašnje farmakološke terapijske mogućnosti.

5.1. Eksperimentalni model

Kako je već ranije navedeno, u ovom istraživanju kao eksperimentalni model PTOA korišten je kirurški model osteoartritisa koljena [173]. Radi se o modelu zglobne nestabilnosti koja je izazvana kombiniranom, ligamentarnom (presijecanje MCL-a i ACL-a) i meniscealnom (destabilizacija i odstranjenje medijalnog meniska) ozljedom koljena. Dosadašnja istraživanja pokazala su da korišteni operacijski model unutar 2-4 tjedna od operacije dovodi do razvoja umjerenog osteoartritisa, a unutar 8 tjedana do razvoja uznapredovalog osteoartritisa [128, 129, 174]. Također je potrebno istaknuti da korišteni operacijski model dovodi do značajne zglobne nestabilnosti, a dokazana je izravna povezanost povišenog stupnja nestabilnosti s razvojem histološki vidljivog oštećenja zglobne hrskavice [107]. Brojna istraživanja pokazala su povezanost ligamentarnih i meniscealnih ozljeda koljena sa razvojem PTOA u ljudskoj populaciji. Ruptura ACL-a je česta ozljeda sa incidencijom od 35 na 100 tisuća stanovnika godišnje na svjetskoj razini [188] i jasno je povezana sa ozljedama meniska i lezijama hrskavice, te povišenim rizikom za ranu pojavu PTOA s prevalencijom koja varira od 10 do 90 % [29, 87, 189]. Incidencija udruženih ozljeda medijalnog meniska sa rupturom ACL-a varira od 25 do 45 % [190-192]. Meta analiza 33 studije sa dugoročnim praćenjem pokazala je da rekonstrukcija ACL-a ne smanjuje rizik za ranu pojavu PTOA nakon rupture ACL-a [193]. Pokazana je neovisna povezanost oštećenja medijalnog meniska sa gubitkom hrskavice medijalnog dijela tibijalne i femoralne zglobne površine [194]. Meniscektomija smanjuje kontaktnu površinu i posljedično tome 2-3 puta povećava razinu stresa [195]. Potpuna meniscektomija uzrokuje osteoartritičke promjene koljena, dok je rizik za razvoj OA visok čak i nakon parcijalne meniscektomije [196]. Bostonska studija OA koljena pokazala je

neovisnu povezanost oštećenja i ekstruzije meniska sa pogoršanjem morfološkog skora hrskavice [197]. Prikazana istraživanja, kao i brojna druga, nesumnjivo potvrđuju reprezentativnost odabranog eksperimentalnog modela.

5.2. Patogenetski mehanizmi

Patogenetska zbivanja u razvoju posttraumatskog osteoartritisa mogu se podijeliti u tri faze [198]. Neposredna faza, povezana sa trenutkom mehaničke ozljede, mjeri se u sekundama i obilježena je staničnom nekrozom, rupturom kolagena, gubitkom glikozaminoglikana i stvaranjem hemartrosa. Akutna posttraumatska faza sa izraženom upalnom komponentom traje otprilike dva mjeseca i obilježena je apoptozom, leukocitnom infiltracijom, otpuštanjem brojnih upalnih medijatora, degradacijom ekstracelularnog matriksa, gubitkom hijalurona i lubricina, te artrofibrozom. Kronična faza koja traje godinama obilježena je remodeliranjem zglobnih tkiva i upalom. Za ovo istraživanje posebno je zanimljiva akutna posttraumatska faza, s obzirom na neka već pokazana djelovanja pentadekapeptida BPC 157. Stanična smrt hrskavičnih stanica (hondrocita) identificirana je kao važan mehanizam u razvoju OA [199] i javlja se u dvije faze nakon mehaničke ozljede: neposredna faza obilježena staničnom nekrozom na inicijalno ozlijeđenom području koju slijedi faza širenja stanične smrti uslijed mehanizama apoptoze na okolna inicijalno neozlijeđena područja [200-204]. Apoptoza je vidljiva nakon mehaničke ozljede i na animalnim modelima i kod zglobnih ozljeda u ljudi uslijed aktivacije kaspaza, enzima koji reguliraju i izvršavaju apoptozu [205]. Također je dokazana uloga citokina IL-1, IL-6 i TNF- α kao glavnih medijatora akutnog posttraumatskog upalnog odgovora u razvoju i progresiji PTOA [139-145]. Navedeno progresivno povećanje broja apoptotičnih stanica izvan inicijalno ozlijeđenog područja i otpuštanje proinflammatoryh citokina u drugoj, akutnoj posttraumatskoj fazi patogeneze PTOA, nudi „prozor“ za terapijsku intervenciju primjenom pentadekapeptida BPC 157. Naime, dosadašnja istraživanja ponudila su važne činjenice o ulozi NO sustava u razvoju i progresiji OA. Pokazano je da NO proizveden u hondrocitima pod utjecajem proinflammatoryh citokina (poput interleukina-1 β) ima važnu ulogu kao medijator dediferencijacije i apoptoze hondrocita zglobne hrskavice [206]. Neka istraživanja *in vitro* su pokazala da određeni agensi, npr. cilostazol (selektivni inhibitor fosfodiesteraze tipa III), štite hondrocite štakora od NO inducirane apoptoze i na taj način preveniraju destrukciju hrskavice u štakorskom modelu osteoartritisa [172]. Dosadašnja

istraživanja pokazala su da primjena pentadekapeptida BPC 157 smanjuje otpuštanje upalnih medijatora u serumu i tkivima [161], te da pentadekapeptid BPC 157 posjeduje sposobnost neutralizacije NO sustava [155]. Navedena istraživanja u svjetlu iznesenih činjenica o ulozi upalnih medijatora i NO sustava u razvoju i progresiji PTOA, uz dokazano snažno angiogeno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 [168], nesumnjivo ukazuju na potencijalno značajne terapijske benefite primjene pentadekapeptida BPC 157 u akutnoj posttraumatskoj fazi patogenetskih zbivanja u razvoju PTOA. Uloga upale i u kroničnoj fazi patogenetskih zbivanja u razvoju PTOA ukazuje na to da i tada možemo očekivati određene terapijske benefite primjene pentadekapeptida BPC 157.

5.3. Rezultati provedenog istraživanja

Funkcionalni pokazatelji u svim kontrolnim skupinama životinja jasno ukazuju na značajan gubitak funkcije operirane noge neposredno nakon operacijskog zahvata. Analizom hoda nije pokazan spontani oporavak funkcije tijekom 4 tjedna odnosno 8 tjedana praćenja (WRI je sličnih vrijednosti s tendencijom pogoršanja protekom vremena), dok sila pritiska i kontraktura operirane noge pokazuju blagi spontani oporavak funkcije koja na kraju praćenja ipak značajno zaostaje za neoperiranom nogom (EPT vrijednost i kontraktura u blažem su poboljšanju protekom vremena). Nasuprot kontrolnim skupinama, sve kotretirane skupine životinja, neovisno o načinu primjene (peroralno ili intraartikularno) ili primjenjenoj dozi pentadekapeptida BPC 157 (mikrogramska ili nanogramska), pokazuju znatno brži i potpuniji funkcijski oporavak. WRI i EPT vrijednosti pokazuju kontinuirano poboljšavanje protekom vremena, uz tendenciju približavanja normalnim vrijednostima na kraju praćenja. Stekli smo dojam da su vrijednosti kod peroralne primjene na kraju 4 tjedna odnosno 8 tjedana praćenja diskretno bolje u odnosu na vrijednosti kod intraartikularne primjene. Kontraktura praktički potpuno nestaje odmah po primjeni pentadekapeptida BPC 157, bez obzira na način primjene ili primjenjenu dozu, i ne pojavljuje se tijekom cijelog vremena praćenja. Kod postretiranih skupina životinja, neovisno o primjenjenoj dozi i načinu primjene, WRI i EPT vrijednosti pokazuju tendenciju poboljšanja u odnosu na kontrolne skupine protekom vremena, međutim na kraju praćenja odstupanje od normalnih vrijednosti u odnosu na kotretirane skupine je veće. Ponovno smo stekli dojam diskretno boljih vrijednosti kod peroralne primjene u odnosu na intraartikularnu primjenu. Međutim, kontraktura opet praktički potpuno nestaje odmah po

primjeni pentadekapeptida BPC 157 i ne pojavljuje se tijekom cijelog vremena praćenja. Rezultati statističke analize podataka daju nedvosmislenu potvrdu navedenim razmatranjima. Kod kotretiranih skupina svi funkcionalni pokazatelji statistički se značajno razlikuju od kontrolnih skupina, neovisno o načinu primjene i primjenjenoj dozi pentadekapeptida BPC 157. Kod posttretiranih skupina WRI vrijednosti i kontraktura se statistički značajno razlikuju od kontrolnih skupina, dok se EPT vrijednosti statistički značajno ne razlikuju, neovisno o načinu primjene i primjenjenoj dozi pentadekapeptida BPC 157.

Morfološki (makroskopski i mikroskopski), te radiološki pokazatelji u svim kontrolnim skupinama životinja pokazuju jasno izražene znakove umjerenog PTOA nakon 4 tjedna praćenja (makroskopski skor 1, histološki stupanj 3, radiološki skor 2), dok nakon 8 tjedana praćenja u svim kontrolnim skupinama pokazuju izražene znakove teškog, uznapredovalog PTOA (makroskopski skor 2, histološki stupanj 5, radiološki skor 4). Nasuprot kontrolnim skupinama sve kotretirane skupine životinja, neovisno o načinu primjene (peroralno ili intraartikularno) ili primjenjenoj dozi pentadekapeptida BPC 157 (mikrogramska ili nanogramska), pokazuju značajno bolje rezultate. Radiološki skor nakon 4 tjedna praćenja pokazuje niže vrijednosti u odnosu na kontrolne skupine (prosječno 1), dok nakon 8 tjedana praćenja pokazuje značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolne skupine (prosječno 1-2). Stekli smo dojam diskretno nižih vrijednosti radiološkog skora kod peroralne primjene u odnosu na vrijednosti kod intraartikularne primjene. Posttretirane skupine pokazuju nešto manje, no ipak prisutne razlike (prosječno 3) u vrijednosti radiološkog skora u odnosu na kontrolne skupine. Ponovno smo stekli dojam diskretno boljih vrijednosti kod peroralne primjene u odnosu na intraartikularnu primjenu, no bez razlika s obzirom na primjenjenu dozu. Makroskopski skor kod kotretiranih skupina životinja nakon 4 tjedna praćenja pokazuje niže vrijednosti u odnosu na kontrolne skupine, dok su nakon 8 tjedana praćenja te razlike znatno veće, bez razlika s obzirom na dozu i način primjene pentadekapeptida BPC 157. Kod posttretiranih skupina razlike u odnosu na kontrolne skupine su znatno manje, no ipak prisutne. Ponovno smo stekli dojam diskretno boljih rezultata kod peroralne primjene u odnosu na intraartikularnu primjenu, opet bez razlika s obzirom na primjenjenu dozu. Histološki stupanj kod kotretiranih skupina nakon 4 tjedna praćenja pokazuje niže vrijednosti (prosječno 1-2), dok su nakon 8 tjedana praćenja te razlike u odnosu na kontrolne skupine još bolje vidljive (prosječno 2). Gledajući histološki stupanj nema razlika između skupina s obzirom na dozu i način primjene pentadekapeptida BPC 157. Razlike u vrijednosti histološkog stupnja kod posttretiranih skupina u odnosu na kontrolne skupine manje su

izražene, no ipak prisutne bez obzira na primjenjenu dozu i način primjene pentadekapeptida BPC 157. Rezultati statističke analize podataka nedvosmisleno potvrđuju navedena razmatranja. Kod kotretiranih skupina u odnosu na kontrolne skupine pokazana je statistički značajna razlika u radiološkom i makroskopskom skor u za sve skupine praćene 8 tjedana, neovisno o primjenjenoj dozi i načinu primjene pentadekapeptida BPC 157, dok je za sve skupine praćene 4 tjedna pokazana statistički granično značajna razlika. Za sve kotretirane skupine, neovisno o načinu primjene, primjenjenoj dozi i vremenu praćenja pokazana je statistički značajna razlika u histološkom stupnju. Kod posttretiranih skupina nije pokazana statistički značajna razlika u makroskopskom i radiološkom skor u, za razliku od histološkog stupnja gdje je pokazana statistički značajna razlika bez obzira na način primjene i primjenjenu dozu pentadekapeptida BPC 157.

Rezultati provedenog istraživanja jasno su potvrdili prvi dio postavljene hipoteze i pokazali da pentadekapeptid BPC 157 primjenjen u mikrogramskoj ili nanogramskoj dozi ima značajne pozitivne učinke na sprječavanje razvoja i progresije PTOA na štakorskom modelu PTOA koljena, i to na razini funkcionalnog, te radiološkog i morfološkog (makroskopskog i histološkog) ishoda. Detaljnijom analizom rezultata primjetili smo diskretno izraženiji učinak peroralne primjene pentadekapeptida BPC 157 u odnosu na intraartikularnu primjenu kod svih tretiranih skupina, što se može objasniti dodatnom traumom koljena štakora tijekom intraartikularne aplikacije, ili prevelikim vremenskim intervalima (dva tjedna) između pojedinih aplikacija. Nepostojanje razlike s obzirom na primjenjenu dozu u skladu je sa brojnim ranijim istraživanjima učinaka pentadekapeptida BPC 157. Nešto manje razlike između tretiranih i kontrolnih skupina nakon 4 tjedna praćenja mogu se objasniti time da u navedenom vremenskom periodu dolazi do razvoja tek umjerenog osteoartritisisa kod kontrolnih skupina, dok su kod skupina praćenih 8 tjedana sve razlike puno izraženije jer u navedenom vremenskom periodu dolazi do razvoja teškog, uznapredovalog osteoartritisisa kod kontrolnih skupina. Uočeni paradoksní nestanak kontrakture koljena odmah po primjeni pentadekapeptida BPC 157, neovisno o primjenjenoj dozi, načinu primjene ili trenutku početka primjene, također je sukladan brojnim dosadašnjim istraživanjima. Rezultati radiološkog i makroskopskog skoriranja kod kotretiranih skupina koji su granično statistički značajni mogu se objasniti malim brojem životinja u pojedinoj skupini, kao i relativno uskim rasponom mogućih radioloških i makroskopskih skorova (što je osobito izraženo kod makroskopskog skoriranja). Dobiveni rezultati praćenja posttretiranih skupina potvrdili su i drugi dio postavljene hipoteze, odnosno potvrdili su regresiju već razvijenog PTOA

primjenom pentadekapeptida BPC 157 na razini funkcionalnog ishoda, s obzirom na to da su rezultati funkcionalnih testiranja na kraju praćenja posttretiranih skupina bolji u odnosu na rezultate kontrolnih skupina nakon 4 tjedna praćenja. Svi rezultati na kraju praćenja posttretiranih skupina su značajno bolji u odnosu na rezultate kontrolnih skupina nakon 8 tjedana praćenja, što dodatno potvrđuje i prvi dio postavljene hipoteze, da primjena pentadekapeptida BPC 157 značajno pozitivno utječe na sprječavanje razvoja i progresije PTOA. Navedeno je jasno vidljivo na razini funkcionalnog ishoda gdje su rezultati tretiranih skupina statistički značajno bolji u odnosu na rezultate kontrolnih skupina, te na razini histološkog ishoda gdje je razlika također statistički značajna, dok se statistički granično značajni rezultati na razini radiološkog i makroskopskog ishoda mogu tumačiti malim brojem životinja u pojedinoj skupini i relativno uskim rasponom mogućih radioloških, i osobito makroskopskih skorova, kako je ranije spomenuto.

Navedena razmatranja rezultata provedenog istraživanja nameću jasnu potrebu za daljnjim istraživanjima na istom eksperimentalnom modelu na barem dvije osnove. Prva osnova je naš stečeni dojam diskretno boljih rezultata kod peroralne primjene u odnosu na intraartikularnu primjenu, što nameće potrebu za istraživanjem učinaka pentadekapeptida BPC 157 kod intraartikularne primjene u kraćim vremenskim intervalima između pojedinih aplikacija (npr. jednom tjedno). Druga osnova za daljnja istraživanja je traženje morfološke i radiološke potvrde regresije već razvijenog PTOA, što nameće potrebu za istraživanjem učinaka pentadekapeptida BPC 157 kroz dulji vremenski period praćenja posttretiranih skupina (npr. 12 ili 16 tjedana).

5.4. Sadašnje farmakološke terapijske mogućnosti

Trenutno ne postoji farmakološki agens za terapiju osteoartritisa koji mijenja tijek bolesti. Sama činjenica da 50 % bolesnika sa traumatskom ozljedom zgloba razvije PTOA, i da PTOA čini 12 % svih slučajeva osteoartritisa nameće potrebu za pronalaskom takvog agensa, koji bi djelujući u akutnoj posttraumatskoj upalnoj fazi, prevenirao ili odgodio razvoj OA. Idealna farmakološka terapija trebala bi inhibirati posttraumatske upalne odgovore, prevenirati smrt stanica, te prevenirati degradaciju i stimulirati produkciju novog hrskavičnog ekstracelularnog matriksa (inicijalno ometati rana katabolička i upalna zbivanja, a potom poticati anabolička zbivanja). Cilj terapije trebala bi biti i trenutna, i dugoročna korist, što bi podrazumijevalo

početak terapije odmah nakon ozljede. Povoljan način primjene u ranoj fazi nakon ozljede je intraartikularna injekcija koja omogućuje visoku koncentraciju agensa na mjestu ozljede uz nisku sustavnu izloženost što smanjuje rizik od sustavnih nuspojava. Brojni farmakološki agensi kao što su inhibitori kaspaza [207, 208], inhibitori citokina [209], faktori rasta [210, 211], inhibitori enzima degradacije ekstracelularnog matriksa [212], i mnogi drugi, istaknuti su i istraživani kao potencijalna terapija OA. Međutim, nijedan istraživani agens do sada nije etiketiran kao agens koji mijenja tijek bolesti. [198]

Pentadekapeptid BPC 157 sa svojim dobro poznatim svojstvima izostanka toksičnih učinaka, nuspojava u testiranjima, i činjenicom da letalna doza nije dostignuta [147, 148] zasigurno je pogodan, kako za intraartikularnu, tako i za sustavnu primjenu. U svjetlu činjenice o akutnoj posttraumatskoj upalnoj fazi razvoja OA kao idealnom terapijskom „prozoru“ za primjenu potencijalnog agensa, te dokazanog protuupalnog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 [161] i njegove sposobnosti gotovo potpune funkcionalne i histološke restitucije organa i tkiva [11, 152, 156-158], jasan je potencijal pentadekapeptida BPC 157 za inhibiciju ranih kataboličkih i upalnih zbivanja, te za poticanje anaboličkih zbivanja, što su tražena svojstva farmakološke terapije OA. Sve navedeno snažno ukazuje na potencijal pentadekapeptida BPC 157 da postane farmakološki agens za terapiju OA koji mijenja tijek bolesti. Pokazana učinkovitost u mikrogramskoj i nanogramskoj dozi jasan je pokazatelj iznimnog endogenog učinka primjene pentadekapeptida BPC 157, i osnova za daljnja istraživanja u još nižim dozama.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju prvi dio postavljene hipoteze i pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 ima značajan učinak na sprječavanje razvoja i progresije PTOA na kirurškom modelu PTOA koljena u štakora. Dobiveni rezultati također potvrđuju i drugi dio postavljene hipoteze i pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157 dovodi do regresije već razvijenog PTOA na kirurškom modelu PTOA koljena u štakora.

Analizom tih rezultata može se zaključiti slijedeće:

- pokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 u smislu očuvanje funkcionalnog integriteta noge (analiza hoda i test pritiska ekstenzora),
- pokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 u smislu sprječavanja nastanka kontrakture koljena (test za procjenu kontrakture koljena),
- pokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 u smislu smanjenja pojavnosti radioloških znakova osteoartritisa koljena (Kellgren-Lawrence skor),
- pokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 u smislu smanjenja pojavnosti makroskopskih znakova osteoartritisa koljena (makroskopski skor),
- pokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 u smislu smanjenja pojavnosti histoloških znakova osteoartritisa koljena (OARSI stupanj),
- pokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 kod peroralne i intraartikularne primjene, te u dozi 10 µg/kg i 10 ng/kg,
- pokazana je statistička značajnost za sve navedene učinke,
- potrebno je provesti daljnja istraživanja o učincima primjene pentadekapeptida BPC 157 na istom eksperimentalnom modelu, te potom i na drugim animalnim modelima u cilju utvrđivanja primjenjivosti rezultata na prevenciju i liječenje PTOA u ljudi.

7. SAŽETAK

Uvod. Osteoartritis (OA) je najčešća bolest zglobova i jedan od najvažnijih uzroka bolnosti, onesposobljenja i ekonomskih gubitaka u svim populacijama. Znatan udio (12 %) ukupne pojavnosti OA posljedica je globalnih ozljeda. Uz najbolju trenutno moguću skrb značajnih globalnih ozljeda, rizik za razvoj posttraumatskog OA (PTOA) kreće se od oko 20 % do više od 50 %. S obzirom da trenutno ne postoji farmakološki agens za terapiju osteoartritisa koji mijenja tijek bolesti, te na brojne pozitivne učinke pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje različitih ozljeda i tkiva, nametnuta je potreba za ovim istraživanjem.

Materijali i metode. Istraživanje je provedeno na kirurškom modelu PTOA koljena u štakora (ženke Wistar albino štakora prosječne težine 200g i dobi 8-10 tjedana držane u standardnim uvjetima) nakon transekcije MCL-a, medijalne menisektomije i transekcije ACL-a desnog koljena. Pentadekapeptid BPC 157 primjenjen je u dozi 10 µg/kg ili 10 ng/kg, otopljen u vodi za piće, peroralno (0,16 µg/ml ili 0,16 ng/ml, 12 ml/štakor/dan, svakodnevno do žrtvovanja), te otopljen u fiziološkoj otopini, intraartikularno (20 µg/ml ili 20 ng/ml, 0,1 ml/aplikacija, dvotjedni intervali, prva aplikacija neposredno nakon operacije, zadnja aplikacija dva tjedna prije žrtvovanja). Kontrolne skupine dobivale su čistu vodu za piće ili 0,1 ml fiziološke otopine intraartikularno. S obzirom na način primjene i primjenjenu dozu BPC 157 životinje su nakon operacije raspoređene u 12 tretiranih i 6 kontrolnih skupina (svaka sa po 5 životinja) metodom slučajnog odabira (kotretman 4 tjedna, kotretman 8 tjedana, posttretman 8 tjedana - tretiranje je počelo nakon 4 tjedna). Tijekom trajanja pokusa funkcionalna testiranja (analiza hoda, test pritiska ekstenzora, test za procjenu kontrakture koljena) vršena su 1., 7., 14., 21., 28., 42. i 56. poslijeoperacijski dan. Žrtvovanje je provedeno 28. dan za kotretman 4 tjedna i 56. dan za kotretman 8 tjedana i posttretman. Neposredno nakon žrtvovanja provedena je RTG obrada i makroskopska procjena, te priprema preparata za histološku obradu.

Rezultati. Funkcionalni pokazatelji u svim kontrolnim skupinama jasno su ukazali na značajan gubitak funkcije operirane noge neposredno nakon operacijskog zahvata. Nasuprot kontrolnim skupinama sve kotretirane skupine pokazale su znatno brži i potpuniji funkcijski oporavak. Kod posttretiranih skupina vidljivo je poboljšanje funkcije u odnosu na kontrolne skupine protekom vremena, međutim konačne vrijednosti značajno zaostaju za normalnim vrijednostima. Makroskopski i histološki, te radiološki pokazatelji u kontrolnim skupinama pokazali su jasno izražene znakove umjerenog PTOA nakon 4 tjedna praćenja, dok su nakon 8

tjedana pokazali izražene znakove teškog, uznapredovalog PTOA. Nasuprot kontrolnim skupinama sve kotretirane skupine pokazale su značajno bolje rezultate. Kod posttretiranih skupina razlike u odnosu na kontrolne skupine bile su znatno manje. Vidljiva je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 kod peroralne i intraartikularne primjene, te u dozi 10 µg/kg i 10 ng/kg. Statističkom obradom rezultati su potvrđeni kao statistički značajni ($P < 0,05$).

Zaključak. Primjena pentadekapeptida BPC 157 ima značajan učinak na sprječavanje razvoja i progresije PTOA, te na regresiju već razvijenog PTOA na kirurškom modelu PTOA koljena u štakora, neovisno o načinu primjene i primjenjenoj dozi.

8. SUMMARY

Introduction. Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease and among the most important causes of pain, disability and economic loss in all populations. A substantial fraction (12 %) of the overall burden of disease of OA arises secondary to joint trauma. With the best current care of significant joint injuries, the risk of post-traumatic OA (PTOA) ranges from about 20 % to more than 50 %. Considering that disease-modifying OA therapies are presently not available, and numerous positive effects of pentadecapeptide BPC 157 on healing of different injuries and tissues, the need for this investigation is imposed.

Materials and methods. Research was conducted on surgical model of knee PTOA in the rat (female Wistar albino rats weighing an average of 200 g and aged 8-10 weeks, kept in standard conditions) after MCL transection, medial meniscectomy and ACL transection of the right knee. Pentadecapeptide BPC 157 was administered in doses of 10 µg/kg or 10 ng/kg, dissolved in drinking water, perorally (0,16 µg/ml or 0,16 ng/ml, 12 ml/rat/day, daily till sacrifice), and dissolved in saline solution, intraarticularly (20 µg/ml or 20 ng/ml, 0,1 ml/application, two weeks interval, first application immediately after surgery, last application two weeks before sacrifice). Control groups received pure drinking water or 0,1 ml of saline solution intraarticularly. Considering route of administration and administered dose, after surgery animals were distributed in 12 treated and 6 control groups (each group with 5 animals), randomly (cotreatment 4 weeks, cotreatment 8 weeks, post-treatment 8 weeks - treatment started after 4 weeks). Throughout whole duration of experiment, functional measurements (gait analysis, extensor postural thrust, assessment test for knee contracture) were conducted on day 1, 7, 14, 28, 42 and 56 after surgery. Sacrifice was conducted on day 28 for cotreatment 4 weeks, and on day 56 for cotreatment 8 weeks and post-treatment. Immediately after sacrifice radiological interpretation and macroscopical assessment were conducted, as well as preparing of samples for histological interpretation.

Results. Functional indicators in all control groups clearly indicated significant loss of function of operated leg immediately after surgery. As opposed to control groups, all cotreated groups showed substantially faster and more complete functional recovery. In post-treated groups contrary to control groups improvement of function was visible throughout time, however definitive values differed significantly from normal values. Macroscopical and histological, as well as radiological indicators in control groups showed clearly expressed

signs of moderate PTOA after 4 weeks, and clearly expressed signs of heavily, advanced PTOA after 8 weeks. As opposed to control groups, all cotreated groups showed substantially better results. In post-treated groups in comparison with control groups differences were significantly lower. Effectiveness of pentadecapeptide BPC 157 is clearly visible at peroral and intraarticular administration, and at doses of 10 µg/kg and 10 ng/kg. Statistical analysis showed results statistically significant ($P < 0,05$).

Conclusion. Pentadecapeptide BPC 157 administration have substantial effect on prevention of development and progression of PTOA, and on regression of already developed PTOA on surgical model of knee PTOA in the rat, independently of administration route and administered dose.

Effects of pentadecapeptide BPC 157 on post-traumatic knee osteoarthritis in the rat

Zoran Krstonijević

2018.

9. LITERATURA

1. Sofat N, Beith I, Anilkumar PG, Mitchell P. Recent clinical evidence for the treatment of osteoarthritis: what we have learned. *Rev Recent Clin Trials*. 2011;6(2):114-26.
2. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Pang JH. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. *J Appl Physiol*. 2011;110(3):774-80.
3. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L, Radic B, Vukoja I, Seiwert S, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res*. 2010;28(9):1155-61.
4. Pevec D, Novinscak T, Brcic L, Sipos K, Jukic I, Staresinic M, i sur. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit*. 2010;16(3):81-88.
5. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, i sur. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept*. 2010;160(1-3):33-41.
6. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwert S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(Suppl 7):191-6.
7. Krivic A, Majerovic M, Jelic I, Seiwert S, Sikiric P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. *Inflamm Res*. 2008;57(5):205-10.
8. 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(8):716-25.
9. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S, i sur. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res*. 2006;24(5):1109-17.
10. Krivic A, Anic T, Seiwert S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J Orthop Res*. 2006;24(5):982-9.

11. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L, Jadrijevic S, Suknaic S, Perovic D, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthop Res.* 2003;21(6):976-83.
12. Sebecic B, Nikolic V, Sikiric P, Seiwerth S, Sosa T, Patrlj L, i sur. Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC-157, on the healing of segmental bone defect in rabbits: a comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone.* 1999;24(3):195-202.
13. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(8):1233-41.
14. Moskowitz RW, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, Hochberg MC. *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management.* 4. izd. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
15. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, i sur. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29(8):1039-49.
16. Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis. *Lancet.* 1997;350(9076):503-8.
17. Jordan JM, Luta G, Renner JB, Linder GF, Dragomir A, Hochberg MC, i sur. Self-reported functional status in osteoarthritis of the knee in a rural southern community: the role of sociodemographic factors, obesity, and knee pain. *Arthritis Care Res.* 1996;9(4):273-8.
18. Heliövaara M, Mäkelä M, Impivaara O, Knekt P, Aromaa A, Sievers K. Association of overweight, trauma and workload with coxarthrosis. A health survey of 7,217 persons. *Acta Orthop Scand.* 1993;64(5):513-8.
19. Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1992;116(7):535-9.
20. Hartz AJ, Fischer ME, Bril G, Kelber S, Rupley D Jr, Oken B, i sur. The association of obesity with joint pain and osteoarthritis in the HANES data. *J Chronic Dis.* 1986;39(4):311-9.
21. Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. Osteo-arthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis.* 1966;25(1):1-24.

22. Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Hauck WW. Sex differences in osteoarthritis of the knee. The role of obesity. *Am J Epidemiol* 1988;127(5):1019-30.
23. Maillefert JF, Gueguen A, Monreal M, Nguyen M, Berdah L, Lequesne M, i sur. Sex differences in hip osteoarthritis: results of a longitudinal study in 508 patients. *Ann Rheum Dis* 2003;62(10):931-4.
24. Lindsay R. Estrogen deficiency. U: Riggs BL, Melton LJ, ur. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis, and Management*. 2. izd. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1995. Str. 133-137.
25. Cooper C, Cook PL, Osmond C, Fisher L, Cawley MI. Osteoarthritis of the hip and osteoporosis of the proximal femur. *Ann Rheum Dis*. 1991;50(8):540-2.
26. Nevitt MC, Lane NE, Scott JC, Hochberg MC, Pressman AR, Genant HK, i sur. Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum*. 1995;38(7):907-16.
27. Cooper C, McAlindon T, Coggon D, Egger P, Dieppe P. Occupational activity and osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis*. 1994;53(2):90-3.
28. Panush RS. Does exercise cause arthritis? Long-term consequences of exercise on the musculoskeletal system. *Rheum Dis Clin North Am*. 1990;16(4):827-36.
29. von Porat A, Roos EM, Roos H. High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes. *Ann Rheum Dis*. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(3):269-73.
30. Neyret P, Donell ST, Dejour H. Osteoarthritis of the knee following meniscectomy. *Br J Rheumatol*. 1994;33(3):267-8.
31. Fisher NM, Kame VD Jr, Rouse L, Pendergast DR. Quantitative evaluation of a home exercise program on muscle and functional capacity of patients with osteoarthritis. *Am J Phys Med Rehabil*. 1994;73(6):413-20.
32. Slemenda C, Brandt KD, Heilman DK, Mazzuca S, Braunstein EM, Katz BP, i sur. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med*. 1997;127(2):97-104.
33. Sharma L, Pai YC. Impaired proprioception and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1997;9(3):253-8.
34. Spector TD, Reneland RH, Mah S, Valdes AM, Hart DJ, Kammerer S, i sur. Association between a variation in LRCH1 and knee osteoarthritis: a genome-wide single-nucleotide polymorphism association study using DNA pooling. *Arthritis Rheum*. 2006;54(2):524-32.

35. Knowlton RG, Katzenstein PL, Moskowitz RW, Weaver EJ, Malemud CJ, Pathria MN, i sur. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *N Engl J Med.* 1990;322(8):526-30.
36. Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, Prockop DJ. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6565-8.
37. Vikkula M, Palotie A, Ritvaniemi P, Ott J, Ala-Kokko L, Sievers U, i sur. Early-onset osteoarthritis linked to the type II procollagen gene. Detailed clinical phenotype and further analyses of the gene. *Arthritis Rheum.* 1993;36(3):401-9.
38. Matteucci BM. Metabolic and endocrine disease and arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1995;7(4):356-8.
39. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53(3):523-37.
40. Lane NE, Brandt K, Hawker G, Peeva E, Schreyer E, Tsuji W, i sur. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(5):478-82.
41. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):35-44.
42. Yu SP, Hunter DJ. Emerging drugs for the treatment of knee osteoarthritis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2015;20(3):361-78.
43. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-707.
44. Sharma L, Chmiel JS, Almagor O, Dunlop D, Guermazi A, Bathon JM, i sur. Significance of preradiographic magnetic resonance imaging lesions in persons at increased risk of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(7):1811-9.
45. Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, Gmitro AF, Krupinski EA, Schwartz SA, i sur. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal Radiol.* 2008;37(5):423-31.

46. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, i sur. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3492-501.
47. Baker K, Grainger A, Niu J, Clancy M, Guermazi A, Crema M, i sur. Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(10):1779-83.
48. Roos EM, Herzog W, Block JA, Bennell KL. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):57-63.
49. Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, i sur. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):R7.
50. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. The growing array of innate inflammatory ignition switches in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(7):2055-8.
51. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(1):133-45.
52. Hurley MV, Scott DL, Rees J, Newham DJ. Sensorimotor changes and functional performance in patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(11):641-8.
53. Edwards RR, Bingham CO 3rd, Bathon J, Haythornthwaite JA. Catastrophizing and pain in arthritis, fibromyalgia, and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2006;55(2):325-32.
54. Sale JE, Gignac M, Hawker G. The relationship between disease symptoms, life events, coping and treatment, and depression among older adults with osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2008;35(2):335-42.
55. Abad VC, Sarinas PS, Guilleminault C. Sleep and rheumatologic disorders. *Sleep Med Rev.* 2008;12(3):211-28.
56. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis.* 1989;48(4):271.
57. Hayashi D, Roemer FW, Guermazi A. Imaging for osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016;59(3):161-9.
58. Roemer FW, Eckstein F, Hayashi D, Guermazi A. The role of imaging in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(1):31-60.

59. Bedson J, Croft PR. The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9:116.
60. Kim C, Nevitt MC, Niu J, Clancy MM, Lane NE, Link TM, i sur. Association of hip pain with radiographic evidence of hip osteoarthritis: diagnostic test study. *BMJ.* 2015;351:h5983.
61. Hannan MT, Felson DT, Pincus T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 2000 Jun;27(6):1513-7.
62. Osteoarthritis: national clinical guideline for care and management in adults. In: *Conditions.* NCCfC (Ed), Royal College of Physicians, London 2008.
63. Neogi T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(9):1145-53.
64. Hunter DJ. Focusing osteoarthritis management on modifiable risk factors and future therapeutic prospects. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2009;1(1):35-47.
65. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, i sur. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(3):363-88.
66. Bennell KL, Hunter DJ, Hinman RS. Management of osteoarthritis of the knee. *BMJ.* 2012;345:e4934.
67. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, i sur. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(4):476-99.
68. Messier SP, Mihalko SL, Legault C, Miller GD, Nicklas BJ, DeVita P, i sur. Effects of intensive diet and exercise on knee joint loads, inflammation, and clinical outcomes among overweight and obese adults with knee osteoarthritis: the IDEA randomized clinical trial. *JAMA.* 2013;310(12):1263-73.
69. Derry S, Moore RA, Rabbie R. Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;(9):CD007400.
70. Skou ST, Roos EM, Laursen MB, Rathleff MS, Arendt-Nielsen L, Simonsen O, i sur. A Randomized, Controlled Trial of Total Knee Replacement. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1597-606.

71. Beswick AD, Wylde V, Gooberman-Hill R, WhaBlom A, Dieppe P. What proportion of patients report long-term pain after total hip or knee replacement for osteoarthritis? A systematic review of prospective studies in unselected patients. *BMJ Open*. 2012;2(1):e000435.
72. Hawker GA, Badley EM, Borkhoff CM, Croxford R, Davis AM, Dunn S, i sur. Which patients are most likely to benefit from total joint arthroplasty? *Arthritis Rheum*. 2013;65(5):1243-52.
73. Weinstein AM, Rome BN, Reichmann WM, Collins JE, Burbine SA, Thornhill TS, i sur. Estimating the burden of total knee replacement in the United States. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(5):385-92.
74. Thorlund JB, Juhl CB, Roos EM, Lohmander LS. Arthroscopic surgery for degenerative knee: systematic review and meta-analysis of benefits and harms. *BMJ*. 2015;350:h2747.
75. Kemp JL, MacDonald D, Collins NJ, Hatton AL, Crossley KM. Hip arthroscopy in the setting of hip osteoarthritis: systematic review of outcomes and progression to hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(3):1055-73.
76. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, i sur. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res*. 2011;29(6):802-9.
77. Brown TD, Johnston JC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma*. 2006;20:739-44.
78. Buckwalter JA, Anderson DD, Brown TD, Tochigi Y, Martin JA. The roles of mechanical stresses in the pathogenesis of osteoarthritis: implications for treatment of joint injuries. *Cartilage*. 2013;4:286-94.
79. McKinley TO, Borrelli Jr J, D'Lima DD, Furman BD, Giannoudis PV. Basic science of intra-articular fractures and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Trauma*. 2010;24(9):567-70.
80. Buckwalter JA, Brown TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;423:7-16.
81. Ding L, Heying E, Nicholson N, Stroud NJ, Homandberg GA, Buckwalter JA, i sur. Mechanical impact induces cartilage degradation via mitogen activated protein kinases. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(11):1509-17.

82. Elsaid KA, Fleming BC, Oksendahl HL, Machan JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, i sur. Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1707–15.
83. Sauter E, Buckwalter JA, McKinley TO, Martin JA. Cytoskeletal dissolution blocks oxidant release and cell death in injured cartilage. *J Orthop Res.* 2012;30(4):593–8.
84. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, i sur. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3626–37.
85. Badlani JT, Borrero C, Golla S, Harner CD, Irrgang JJ. The effects of meniscus injury on the development of knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative. *Am J Sports Med.* 2013;41(6):1238–44.
86. Friel NA, Chu CR. The role of ACL injury in the development of posttraumatic knee osteoarthritis. *Clin Sports Med.* 2013;32(1):1–12.
87. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* 2004;50(10):3145–52.
88. Valderrabano V, Hintermann B, Horisberger M, Fung TS. Ligamentous posttraumatic ankle osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2006;34(4):612–20.
89. Dare D, Rodeo S. Mechanisms of post-traumatic osteoarthritis after ACL injury. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16(10):448.
90. Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(427 Suppl):S6–15.
91. Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Cho SA, Hauck WW. The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. *Am J Epidemiol.* 1989;130(2):278–88.
92. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med.* 2000;133(5):321–8.
93. Bhandari M, Matta J, Ferguson T, Matthys G. Predictors of clinical and radiological outcome in patients with fractures of the acetabulum and concomitant posterior dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88(12):1618–24.
94. Saterbak AM, Marsh JL, Nepola JV, Brandser EA, Turbett T. Clinical failure after posterior wall acetabular fractures: the influence of initial fracture patterns. *J Orthop Trauma.* 2000;14(4):230–7.

95. Honkonen SE. Degenerative arthritis after tibial plateau fractures. *J Orthop Trauma*. 1995;9(4):273–7.
96. Volpin G, Dowd GS, Stein H, Bentley G. Degenerative arthritis after intra-articular fractures of the knee. Long-term results. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72(4):634–8.
97. Weigel DP, Marsh JL. High-energy fractures of the tibial plateau. Knee function after longer follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(9):1541–51.
98. Bonar SK, Marsh JL. Unilateral external fixation for severe pilon fractures. *Foot Ankle*. 1993;14(2):57–64.
99. Kellam JF, Waddell JP. Fractures of the distal tibial metaphysis with intra-articular extension—the distal tibial explosion fracture. *J Trauma*. 1979;19:593–601.
100. Marsh JL, Weigel DP, Dirschl DR. Tibial plafond fractures. How do these ankles function over time? *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A(2):287–95.
101. Gillquist J, Messner K. Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis. *Sports Med*. 1999;27(3):143–56.
102. Praemer AP, Furner S, Rice DP. *Musculoskeletal conditions in the United States*. Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999.
103. Saltzman CL, Salamon ML, Blanchard GM, Huff T, Hayes A, Buckwalter JA, i sur. Epidemiology of ankle arthritis: report of a consecutive series of 639 patients from a tertiary orthopaedic center. *Iowa Orthop J*. 2005;25:44–6.
104. Marsh JL, McKinley T, Dirschl D, Pick A, Haft G, Anderson DD, i sur. The sequential recovery of health status after tibial plafond fractures. *J Orthop Trauma*. 2010;24(8):499–504.
105. McKinley TO, Tochigi Y, Rudert MJ, Brown TD. The effect of incongruity and instability on contact stress directional gradients in human cadaveric ankles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(11):1363–9.
106. McKinley TO, Tochigi Y, Rudert MJ, Brown TD. Instability-associated changes in contact stress and contact stress rates near a step-off incongruity. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(2):375–83.
107. Tochigi Y, Vaseenon T, Heiner AD, Fredericks DC, Martin JA, Rudert MJ, i sur. Instability dependency of osteoarthritis development in a rabbit model of graded anterior cruciate ligament transection. *J Bone Joint Surg Am*. 2011;93(7):640–7.
108. Anderson DD, Van Hofwegen C, Marsh JL, Brown TD. Is elevated contact stress predictive of post-traumatic osteoarthritis for imprecisely reduced tibial plafond fractures? *J Orthop Res*. 2011;29(1):33–9.

109. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;402:21–37.
110. Borrelli Jr J. Chondrocyte apoptosis and posttraumatic arthrosis. *J Orthop Trauma.* 2006;20(10):726–31.
111. Borrelli Jr J, Torzilli PA, Grigiene R, Helfet DL. Effect of impact load on articular cartilage: development of an intra-articular fracture model. *J Orthop Trauma.* 1997;11(5):319–26.
112. D’Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, Colwell Jr CW. Prevention of chondrocyte apoptosis. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A(Suppl 2(Pt 1)):25–6.
113. Martin JA, McCabe D, Walter M, Buckwalter JA, McKinley TO. N-acetylcysteine inhibits post-impact chondrocyte death in osteochondral explants. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(8):1890–7.
114. Tochigi Y, Buckwalter JA, Martin JA, Hillis SL, Zhang P, Vaseenon T, i sur. Distribution and progression of chondrocyte damage in a whole-organ model of human ankle intra-articular fracture. *J Bone Joint Surg Am.* 2011;93(6):533–9.
115. Beecher BR, Martin JA, Pedersen DR, Heiner AD, Buckwalter JA. Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death. *Iowa Orthop J.* 2007;27:1–8.
116. Goodwin W, McCabe D, Sauter E, Reese E, Walter M, Buckwalter JA, i sur. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res.* 2010;28(8):1057–63.
117. Ramakrishnan P, Hecht BA, Pedersen DR, Lavery MR, Maynard J, Buckwalter JA, i sur. Oxidant conditioning protects cartilage from mechanically induced damage. *J Orthop Res.* 2010;28(7):914–20.
118. Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R229.
119. Furman BD, Olson SA, Guilak F. The development of posttraumatic arthritis after articular fracture. *J Orthop Trauma.* 2006;20(10):719–25.
120. Hurtig M, Chubinskaya S, Dickey J, Rueger D. BMP-7 protects against progression of cartilage degeneration after impact injury. *J Orthop Res.* 2009;27(5):602–11.
121. Joos H, Hogrefe C, Rieger L, Durselen L, Ignatius A, Brenner RE. Single impact trauma in human early-stage osteoarthritic cartilage: implication of prostaglandin D2 but no additive effect of IL-1beta on cell survival. *Int J Mol Med.* 2011;28(2):271–7.
122. Natoli RM, Athanasiou KA. Traumatic loading of articular cartilage: mechanical and biological responses and post-injury treatment. *Biorheology.* 2009;46(6):451–85.

123. Martin JA, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage. *Biorheology*. 2006;43(3–4):517–21.
124. Olson SA, Guilak F, ur. *Post-Traumatic Arthritis: Pathogenesis, Diagnosis and Management*. 1. izd. New York: Springer Science+Business Media; 2015.
125. Marsh JL, Buckwalter J, Gelberman R, Dirschl D, Olson S, Brown T, i sur. Articular fractures: does an anatomic reduction really change the result? *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(7):1259–71.
126. Olson SA, Marsh JL. Posttraumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;423:2.
127. National Research Council (US) Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press (US); 2011.
128. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1:363–76.
129. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:1061–9.
130. Piscoya JL, Fermor B, Kraus VB, Stabler TV, Guilak F. The influence of mechanical compression on the induction of osteoarthritis-related biomarkers in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(12):1092–9.
131. Waters NP, Stoker AM, Carson WL, Pfeiffer FM, Cook JL. Biomarkers affected by impact velocity and maximum strain of cartilage during injury. *J Biomech*. 2014;47(12):3185–95.
132. Haslauer CM, Elsaid KA, Fleming BC, Proffen BL, Johnson VM, Murray MM. Loss of extracellular matrix from articular cartilage is mediated by the synovium and ligament after anterior cruciate ligament injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(12):1950–7.
133. Ward BD, Furman BD, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F, Olson SA. Absence of posttraumatic arthritis following intraarticular fracture in the MRL/MpJ mouse. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):744–53.
134. Lewis Jr JS, Furman BD, Zeitler E, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F, et al. Genetic and cellular evidence of decreased inflammation associated with reduced incidence of posttraumatic arthritis in MRL/MpJ mice. *Arthritis Rheum*. 2013;65(3):660–70.

135. Lewis JS, Hembree WC, Furman BD, Tippets L, Cattel D, Huebner JL, et al. Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(7):864–73.
136. Furman B, Mangiapani D, Zeitler E, Bailey K, Horne P, Huebner J, et al. Targeting pro-inflammatory cytokines following joint injury: Acute intra-articular inhibition of IL-1 following knee injury prevents posttraumatic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:R134.
137. Kimmerling KA, Furman BD, Mangiapani DS, Moverman MA, Sinclair SM, Huebner JL, Chilkoti A, Kraus VB, Setton LA, Guilak F, Olson SA. Sustained intra-articular delivery of IL-1RA from a thermally responsive elastin-like polypeptide as a therapy for post-traumatic arthritis. *Eur Cell Mater*. 2015;29:124–39; discussion 139–40.
138. Diekman BO, Wu CL, Louer CR, Furman BD, Huebner JL, Kraus VB, et al. Intra-articular delivery of purified mesenchymal stem cells from C57BL/6 or MRL/MpJ superhealer mice prevents posttraumatic arthritis. *Cell Transplant*. 2013;22(8):1395–408.
139. Stimpson SA, Dalldorf FG, Otterness IG, Schwab JH. Exacerbation of arthritis by IL-1 in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. *J Immunol*. 1988;140(9):2964–9.
140. Cameron ML, Fu FH, Paessler HH, Schneider M, Evans CH. Synovial fluid cytokine concentrations as possible prognostic indicators in the ACL-deficient knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1994;2(1):38–44.
141. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816–27.
142. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):255–73.
143. Gharaee-Kermani M, Phan SH. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. *Curr Pharm Des*. 2001;7(11):1083–103.
144. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005;13(1):7–12.
145. Lewthwaite J, Blake S, Thompson RC, Hardingham TE, Henderson B. Antifibrotic action of interleukin-1 receptor antagonist in lapine monoarticular arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1995;54(7):591–6.
146. Veljaca M, Chan K, Guglietta A. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-157 in human gastric juice. *Gastroenterology* 1995;108:761.

147. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des.* 2011;17(16):1612-32.
148. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Des.* 2010;16(10):1224-34.
149. Tkalcevic V, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situm K, i sur. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol.* 2007;570:212-21.
150. Sandor Z, Vincze A, Jadus MR, Dohoczky C, Erceg D, Szabo S. The protective effect of newly isolated peptide PL-10 in the iodoacetamide colitis model in rats. *Gastroenterology.* 1997;112:A400.
151. Khomenko T, Szabo S, Deng XM, Sandor Z, Gombos Z, Yoshida M. Cell proliferation, transcription factor egr-1 and growth factors in experimental ulcerative colitis after treatment with PL 14736: In vitro and in vivo studies. *Gastroenterology.* 2003;124:A493.
152. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, 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;108:7-17.
153. Korchounov A, Meyer MF, Krasnianski M. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *J Neural Transm.* 2010;117:1359-69.
154. Sotoyama H, Zheng Y, Iwakura Y, Mizuno M, Aizawa M, Shcherbakova K. i sur. Pallidal hyperdopaminergic innervation underlying D2 receptor-dependent behavioral deficits in the schizophrenia animal model established by EGF. *PLoS One.* 2011;6:e25831.
155. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Des.* 2014;20(7):1126-35.
156. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Med Chem.* 2012;19:126-32.

157. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, i sur. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. *Burns*. 2003;29:323-34.
158. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. Stable gastric pentadecapeptid 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.
159. Rickert M, Wang H, Wieloch P, Lorenz H, Steck, E, Sabo D, i sur. Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon. *Connect Tissue Res*. 2005;46:175-83.
160. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, i sur. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest*. 1997;100:321-30.
161. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, i sur. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris* 1997;91:173-8.
162. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, i sur. Pentadecapeptid BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001;27:817-27.
163. Bilic M, Bumber Z, Blagaic AB, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P. The stable gastric pentadecapeptide BPC, given locally, improves CO2 laser healing in mice. *Burns* 2005;31:310-5.
164. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, i sur. The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor agonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 1994;54:PL63-8.
165. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, i sur. Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1996;41:1518-26.
166. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, i sur. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Digest Dis Sci* 1996;41:1604-14.

167. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris* 1997;91:113-22.
168. Sikiric P, Separovic J, Anic T, Buljat G, Mikus D, Seiwerth S, 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;93:479-85.
169. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci.* 2009;54(10):2070-83.
170. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujić D, Drmic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur J Pharmacol.* 2013;701:203-12.
171. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M, i sur. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des.* 2014;20(7):1121-5.
172. Lee SW, Song YS, Shin SH, Kim KT, Park YC, Park BS, i sur. Cilostazol protects rat chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis in vitro and prevents cartilage destruction in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(3):790-800.
173. Henry JL. Molecular events of chronic pain: from neuron to whole animal in an animal model of osteoarthritis. *Novartis Found Symp.* 2004;260:139-45.
174. Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, i sur. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):R13. Erratum in: *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):407.
175. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(1):63-70.
176. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77(3):634-43.
177. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83:129–138.

178. Starčević, N. Utjecaj BPC 157 na cijeljenje frakture, ektopičnu kost i heterotopnu osifikaciju u štakora [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2017.
179. Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershadsky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic-nerve block with lidocaine. *Anesthesiology*. 1995;82:1013-25.
180. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol*. 2001;168:192-5.
181. Bojanić, I. Učinak primjene pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje medijalnog kolateralnog ligamenta u štakora [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2007.
182. Cibere J, Zhang H, Thorne A, Wong H, Singer J, Kopec JA, i sur. Association of clinical findings with pre-radiographic and radiographic knee osteoarthritis in a population-based study. *Arthritis Care Res*. 2010;62(12):1691-8.
183. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2000;16(4):494-502.
184. Jay GD, Fleming BC, Watkins BA, McHugh KA, Anderson SC, Zhang LX, i sur. Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2382-91.
185. Weng LH, Wang CJ, Ko JY, Sun YC, Wang FS. Control of Dkk-1 ameliorates chondrocyte apoptosis, cartilage destruction, and subchondral bone deterioration in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum*. 2010;62(5):1393-402.
186. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, i sur. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(1):13-29.
187. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(3):24-34.
188. Gianotti SM, Marshall SW, Hume PA, Bunt L. Incidence of anterior cruciate ligament injury and other knee ligament injuries: a national population-based study. *J Sci Med Sport*. 2009;12:622-7.
189. Nebelung W, Wuschech H. Thirty-five years of follow-up of anterior cruciate ligament-deficient knees in high-level athletes. *Arthroscopy*. 2005;21:696-702.

190. Indelicato PA, Bittar ES. A perspective of lesions associated with ACL insufficiency of the knee. A review of 100 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;198:77–80.
191. Irvine GB, Glasgow MM. The natural history of the meniscus in anterior cruciate insufficiency. Arthroscopic analysis. *J Bone Joint Surg (Br).* 1992;74:403–5.
192. Shirakura K, Terauchi M, Kizuki S, Moro S, Kimura M. The natural history of untreated anterior cruciate tears in recreational athletes. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;317:227–36.
193. Lohmander LS, Roos H. Knee ligament injury, surgery and osteoarthritis. Truth or consequences? *Acta Orthop Scand.* 1994;65:605–9.
194. Sharma L, Eckstein F, Song J, Guermazi A, Prasad P, Kapoor D, et al. Relationship of meniscal damage, meniscal extrusion, malalignment, and joint laxity to subsequent cartilage loss in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1716–26.
195. Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;149:283–90.
196. Englund M, Roos EM, Lohmander LS. Impact of type of meniscal tear on radiographic and symptomatic knee osteoarthritis: a sixteen-year followup of meniscectomy with matched controls. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2178–87.
197. Hunter DJ, Zhang YQ, Niu JB, Tu X, Amin S, Clancy M, et al. The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:795–801.
198. Lotz MK, Kraus VB. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):211.
199. Kuhn K, D’Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12:1–16.
200. Quinn TM, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD. Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. *J Orthop Res.* 1998;16:490–499.
201. D’Lima D, Hashimoto S, Chen P, Colwell C, Lotz M. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9:712–719.
202. Duda GN, Eilers M, Loh L, Hoffman JE, Kaab M, Schaser K. Chondrocyte death precedes structural damage in blunt impact trauma. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;393:302–309.

203. Levin A, Burton-Wurster N, Chen CT, Lust G. Intercellular signaling as a cause of cell death in cyclically impacted cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9:702-711.
204. Morel V, Quinn TM. Short-term changes in cell and matrix damage following mechanical injury of articular cartilage explants and modelling of microphysical mediators. *Biorheology*. 2004;41:509-519.
205. Colwell CW Jr, D'Lima DD, Hoenecke HR, Fronck J, Pulido P, Morris BA, et al. In vivo changes after mechanical injury. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;391:116-123.
206. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998;10:263-8.
207. Linton SD. Caspase inhibitors: a pharmaceutical industry perspective. *Curr Top Med Chem*. 2005;5:1697-1717.
208. Cornelis S, Kersse K, Festjens N, Lamkanfi M, Vandenameele P. Inflammatory caspases: targets for novel therapies. *Curr Pharm Des*. 2007;13:367-385.
209. Chevalier X, Giraudeau B, Conrozier T, Marliere J, Kiefer P, Goupille P. Safety study of intraarticular injection of interleukin-1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study. *J Rheumatol*. 2005;32:1317-1323.
210. Henson FM, Bowe EA, Davies ME: Promotion of the intrinsic damage-repair response in articular cartilage by fibroblastic growth factor-2. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13:537-544.
211. Inoue A, Takahashi KA, Arai Y, Tonomura H, Sakao K, Saito M, et al. The therapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Arthritis Rheum*. 2006;54:264-270.
212. Hellio Le Graverand-Gastineau MP. OA clinical trials: current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:1393-1401.

ŽIVOTOPIS

Zoran Krstonijević rođen je 22. rujna 1975. g. u Zagrebu.

Nakon završene osnovne škole i matematičke gimnazije, 1994. g. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem diplomira 2000. g. s prosjekom ocjena 4,29. Pripravnički staž za doktore medicine odrađuje pri Zavodu za javno zdravstvo Grada Zagreba, nakon kojeg 2002. g. polaže državni ispit. Tijekom služenja vojnog roka 2002. g. radi kao liječnik opće medicine 7. gardijske brigade HV-a u Varaždinu.

Specijalizaciju iz opće kirurgije započinje 2003. g. na Klinici za kirurgiju KB-a Sveti Duh u Zagrebu, gdje nakon položenog specijalističkog ispita 2007. g. nastavlja raditi kao specijalist opće kirurgije na Odjelu za traumatologiju. Užu specijalizaciju iz traumatologije započinje 2010. g. i nakon položenog subspecijalističkog ispita 2012. g. nastavlja raditi u svojstvu užeg specijalista traumatologije. Ujedno, od 2010. g. radi kao voditelj medicinske službe Škole nogometa „NK Lokomotiva Zagreb“.

Doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo pohađa od 2003. do 2006. godine, tijekom specijalizacije iz opće kirurgije, te se počinje baviti znanstveno-istraživačkim radom u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Član je Hrvatskog traumatološkog društva (HTD). Kontinuirano se usavršava pohađanjem međunarodnih AO tečajeva iz traumatologije.