

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Ivan Maria Smoday, Vlasta Vuković, Katarina Oroz, Luka Kalogjera, Hrvoje Vraneš

Vaskularno i multiorgansko zatajenje nakon jednostranog kirurškog odstranjivanja nadbubrežne žlijezde u štakora: makroskopska, mikroskopska, funkcijska, molekularna i fizikalna FTIR spektroskopska studija *okluzijskog i okluziji-sličnog* sindroma te terapijski učinci pentadekapeptida BPC 157

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u laboratoriju za moždano-visceralne interakcije, pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta “Pentadekapeptid BPC-157 - daljnja istraživanja” (šifra: 108-1083570-3635) i Sveučilišne potpore B099 (šifra: 10106-22-3071) pod vodstvom voditelja projekta prof. dr. sc. Predraga Sikirića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

Popis i objašnjenja kratica

ACTH – adrenokortikotropni hormon
BPC 157 – stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 (eng. body protection compound 157)
CV – unakrsna validacija, eng. cross validation
Egr 1 – epidermal growth factor
EKG – elektrokardiogram
FN – lažno negativan, eng. false negative
FP – lažno pozitivan, eng. false positive
FTIR – eng. Fourier Transform Infrared
GADPH – gliceraldehid -3 - fosfat dehidrogenaza
GAG – glikozaminoglikani
HE – hematoksilin eozin
HO-1 – hem oksigenaza 1 (eng. heme oxygenase 1)
HSP – protein toplinskog šoka (eng. heat shock protein)
IFN γ – interferon gama
IL-6 – interleukin 6
iNOS – inducibilna sintaza dušikovog (II) oksida
L-NAME – L-NG-nitro arginin metil ester
MDA – malondialdehid
MN – Minneapolis
MODS – disfunkcija više organa (eng. multi organ dysfunction syndrome)
MOFS – zatajenje više organa (eng. multi organ failure syndrome)
mRNA – glasnička RNA (eng. messenger RNA)
NO – dušikov (II) oksid
NOS – sintaza dušikovog (II) oksida (eng. nitric oxide synthase)
NQO1 - Nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat kinon oksidoreduktaza (eng. NADPH quinon oxidoreductase)
NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. nonsteroidal anti-inflammatory drug)
NTP – national toxicology program
NY – New York
PCA – analiza glavnih komponenata (eng. principal component analysis)
PG – proteoglikani
RGB – red green blue
RNA – ribonukleinska kiselina (eng. ribonucleic acid)
ROS – reaktivne vrste kisika (eng. reactive oxygen species)
SAD – Sjedinjene Američke Države
SD – standardna devijacija
STT – student T-test
SV – srednja vrijednost
SVM – metoda potpornih vektora (eng. support vector machine)
TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. thiobarbituric acid reactive substances)
TN – ispravno negativan, eng. true negative
TP – ispravno pozitivan, eng. true positive
TIFF – tag image file format
TNF- α – faktor tumorske nekroze alfa (eng. tumour necrosis factor alpha)
TX – Texas
USB – universal serial bus
VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor)
VEGFR – receptor za VEGF (eng. vascular endothelial growth factor receptor)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Ideja rada	1
1.2. Princip perifernog i centralnog djelovanja nokse na krvne žile - <i>okluzijski/okluziji-sličan</i> sindrom i primjena na jednostranu adenalektomiju.....	1
1.3. Citoprotekcija pentadekapeptidom BPC 157.....	2
1.4. Regulacija krvotoka nadbubrežne žlijezde	3
2. Hipoteza	4
3. Opći i specifični ciljevi rada	4
3.1. Opći cilj	4
3.2. Specifični ciljevi	4
4. Materijal i metode	4
4.1. Korišteni materijali	4
4.2. Model jednostrane adenalektomije	4
4.3. EKG monitoring i evaluacija	5
4.4. Makroskopska evaluacija	5
4.5. Invazivno mjerenje tlakova	6
4.6. Patohistološka analiza	6
4.7. Određivanje tromba	7
4.8. Određivanje razina ROS i NO u uzorcima tkiva	8
4.9. Procjena ekspresije ciljnih gena u ostatnoj nadbubrežnoj žlijezdi	8
4.10. FTIR spektroskopija	9
4.11. Statistička analiza	10
5. Rezultati	10
5.1. Rezultati i analiza EKG zapisa	10
5.2. Rezultati makroskopske evaluacije	11
5.3. Izmjerene vrijednosti tlakova	12
5.4. Rezultati patohistološke obrade	12
5.5. Izmjereni trombi u žilama	18
5.6. Koncentracije ROS i NO	18
5.7. Ekspresija ciljnih gena u ostatnoj nadbubrežnoj žlijezdi	20
5.8. Rezultati FTIR spektroskopije	21
6. Rasprava	23
7. Zaključci	25
8. Zahvale	26
9. Popis literature	26
10. Sažetak	30
11. Summary	30

1. Uvod

1.1 Ideja rada

Ovaj rad prikazuje do sada neopisani *okluzijski/okluziji-sličan* sindrom, vaskularno i multiorgansko zatajenje nakon jednostrane adrenalektomije, dosad opisan kod okluzije velikih krvnih žila (Sikiric i sur., 2022.) te primjene drugih štetnih postupaka (Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.) koje sve teško oštećuju funkcije endotela te terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 već kod jednokratne aplikacije. Važnost ovog istraživanja je što će se po prvi puta istražiti učinak BPC 157 na uklanjanje neke endokrine žlijezde što prije nije opisano. Veliku važnost imaju i fizikalna FTIR spektroskopija kao dosad slabo korištena metoda za promatranje promjena aorte na molekularnoj razini nakon davanja farmakološkog agensa.

1.2. Princip perifernog i centralnog djelovanja nokse na krvne žile - *okluzijski/okluziji-sličan* sindrom i primjena koncepta na jednostranu adrenalektomiju

1.2.1. *Okluzijski/okluziji-sličan* sindrom

U čovjeka, opstrukcije velikih krvnih žila izazivaju hemodinamske poremećaje te su posljedice često vaskularne prirode, poput spontanih krvarenja, tromboza, diseminirane intravaskularne koagulacije i sl. Često su posljedice opisane disfunkcijom, kao tradicionalno shvaćenih, oprečnih fizioloških procesa (npr. povećano krvarenje i povećano zgrušavanje) (Pich i sur., 2015.). Uzevši prijašnje navedeno u obzir, tradicionalni farmakološki agensi neučinkoviti su po pitanju navedenih posljedica jer oni često funkcionalno zahvate određen fiziološki proces poput antikoagulantne terapije ili koagulacijskih faktora rasta i infuzije trombocita (Katzung, 2018.) I druge nokse izazivaju slične poremećaje, poput teških kirurških zahvata, akutnog pankreatitisa i dr. Noksa akutno izaziva poremećaj homeostaze i potiče stres kao reakciju koja nastoji neutralizirati učinke nokse. Jedna od spasonosnih reakcija naglo je preusmjeravanje krvotoka prema vitalnim organima i mjestu povišene metaboličke potrebe (metabolička vazodilatacija) (Gamulin i sur., 2018). Ako reakcija organizma nije dostatna da neutralizira učinke nokse, on ulazi u fazu disfunkcije, a zatim zatajenja više organskih sustava. Ako noksa kvantitetom i/ili kvalitetom uzrokuje značajan poremećaj homeostaze, MODS (eng. multi-organ dysfunction syndrome) će biti evidentan, a u sklopu njega bit će manifestna disfunkcija malih krvnih žila i endotela (Gamulin i sur., 2018). Kod štakorskih modela podvezivanja velikih krvnih žila poput gornje arterije i vene mezenterike, donje šuplje vene infrarenalno i suprarenalno, aorte, primjene Pringle manevra se i opisao skup poremećaja opisan s MODS i MOFS koji smo nazvali *okluzijski* sindrom (Sikiric i sur., 2022.). Slično kao i u drugim noksičnim zahvatima poput akutnog pankreatitisa, abdominalnog sindroma odjeljka, infarkta miokarda, akutne intoksikacija litijem i intoksikacije 99% alkoholom gdje smo ovaj sindrom opisali kao sindrom nalik onom kod podvezivanja ("*okluziji-sličan*" sindrom) (Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.). Neovisno o uzroku, manifestacija disfunkcije malih krvnih žila i endotela bila je evidentna u obliku tromboza, krvarenja te gubitka arterijsko-venske razlike tlakova cirkulacije centralno (središnji živčani sustav) i periferno (ostale komponente organizma). Djelujući zaštitno na male krvne žile, mehanizmom opisanim u idućem odjeljku, periferne su i centralne manifestacije disfunkcije endotela i malih krvnih žila neutralizirane što je neutraliziralo MODS i MOFS te se djelotvornije uspostavila funkcijska i strukturna homeostaza. Rezultati navedenih istraživanja objavljeni su u časopisima prve kvartile (Q1) visokog čimbenika odjeka. Kako su male krvne žile i endotel naizgled zajednička uzročno-posljedična točka mnoštvu

intenzivnih patoloških procesa, postavlja se pitanje je li moguće djelovati na male krvne žile periferno i centralno i ima li djelovanje na toj komponenti organizma značajnog utjecaja?

1.2.2. Jednostrana adrenalektomija i *okluzijski/okluziji-sličan* sindrom

Eksperimentalna adrenalektomija zahvat je koji se koristi za procjenu akutnog kompenzatornog odgovora ostatne nadbubrežne žlijezde te za opis ovisnosti farmakoloških agenasa (Dallman i sur., 1984.; Szabo i sur., 1983.). Opisano je da su živčana stimulacija i trofički učinak ACTH dominantni čimbenici u regulaciji trofike nadbubrežne žlijezde nakon adrenalektomije (Szabo i sur., 1983.). Nedostatak nadbubrežnih žlijezdi potaknuo je intenzivniji razvoj ulkusa izazvanih primjenom cisteamina, alkohola i drugih štetnih podražaja čime se dokazala citoprotektivna uloga nadbubrežne žlijezde (tzv. permisivna uloga kortikosteroida). Uz to, lezije izazvane cisteaminom pokazale su cirkadijanu ovisnost. Bile su izraženije u predvečernjim satima u odnosu na jutarnje sate („kortikosteroidna” ovisnost o lezijama), a ista ta ovisnost neutralizira se jednostranom adrenalektomijom kako ona izaziva poremećaje u osovini hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (Szabo i sur., 1983.; Szabo i sur., 1987.). Kortikosteroidi i kateholamini pokazali su modulatorne učinke na NO i ROS sustav, stoga bi akutni poremećaj organskog sustava koji regulira njihove učinke u obliku jednostrane adrenalektomije uzrokovao disfunkciju krvnih žila izazivajući poremetnje NO sustava (Szabó i sur., 1993.; Poon i sur., 2016.; Ravanelli i sur., 2013.; Muszbek i sur., 1971.). Česte komplikacije jednostrane adrenalektomije jesu krvarenja i tromboze oko i udaljeno od mjesta zahvata (Henry i sur., 2000.). Kod nesekretornih tumora kod kojih je održana funkcija zahvaćene nadbubrežne žlijezde, koja se uklanja zajedno s tumorom, ali i kod sekretornih tumor, često se daje potporna farmakološka terapija kortikosteroidima koja ostaje upitne djelotvornosti i individualiziranosti zbog nepredvidivosti utjecaja tumora na osovину hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (Di Dalmazi i sur., 2014.). Kirurški zahvat za sebe i uklanjanje nadbubrežne žlijezde pritom, predstavljaju primjenu iznimno noksličnog podražaja na organizam, te se u ovom radu pretpostavlja da će izazvati periferne i centralne deficite istovjetne onima koji nastaju kod podvezivanja velikih krvnih žila i drugih štetnih postupaka.

1.3. Citoprotekcija pentadekapeptidom BPC 157

Citoprotekcija je pojam koji opisuje zaštitu endotela i epitela (Sikiric i sur., 2010.). Prvotna istraživanja citoprotekcije učinjena su na modelu primjene 99% alkohola u želudac, čime su izazvane hemoragične lezije želuca. Ideja zaštite želuca bila je izuzetno bitna zbog teorijskog značaja Selye-ove teorije stresa koja nalaže da gastrointestinalne lezije nastaju neselektivno kod iznimnih stresova (Szabo i sur., 2017). Zaštitom probavnog trakta od posljedica stresa potencijalno bi se mogla riješiti “nesvrhovita” komponenta neselektivne reakcije organizma na noks. Primjenom prostaglandina primijetilo se da su oštećenja bila puno manja što je A. Robert interpretirao kao citoprotektivno svojstva prostaglandina (Robert i sur., 1979.). Poslije se opisalo da oštećenju sluznice želuca predisponira oštećenje endotela, čime se endotel uvodi kao bitnu ciljnu točku u održavanju sluznice želuca. Tako je endotel postao ciljna terapijska točka citoprotektivnih agenasa (Szabo i sur., 1985.). Međutim, promatrana istraživanja u području farmakološke citoprotekcije probavnog sustava, ukazala su na oštećenja endotela i izvan želuca nakon aplikacije apsolutnog alkohola u lumen probavne cijevi pa je zaštitom probavnog trakta uslijedila i zaštita ostalih oštećenih komponenti. Naša istraživačka grupa pokazala je da oštećenje endotela uslijed intoksikacije alkoholom ne nastaje samo u probavnom traktu, već u cijelom organizmu. Naime nastaju centralne (mozak) i periferne (probavni sustav, jetra, bubrezi, srca, pluća itd.)

disfunkcije i lezije (Gojkovic i sur., 2021.). Osim alkoholom induciranih lezija, pentadekapeptid BPC 157 je u studijama opetovano pokazao učinke periferne i centralne stanične protekcije na sindrom nastao uslijed podvezivanja krvnih žila i ostalih štetnih procesa, neutralizirajući centralne i periferne disfunkcije i oštećenja povezanih s disfunkcijom malih krvnih žila (Strbe S i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.;). Mehanizam kojim BPC 157 pentadekapeptid djeluje usko je vezan s NO sustavom preko kojeg promptno aktivira postojeće kolaterale, reorganizira krvotok i neutralizira svu patologiju povezanu s oštećenjem malih krvnih žila (krvarenja, tromboze, hematomi itd.) (Sikiric i sur., 2014.; Hsieh i sur., 2020.). Zaštitni učinci pentadekapeptida BPC 157 i njegova funkcija „ključa za zaobilaznje” snažno su podržani njegovom interakcijom sa NO i ROS sustavima. Prikaz utjecaja pentadekapeptida BPC 157 na vazomotorni tonus proveden je putem BPC 157-specifične aktivacije puta Src-caveolin-1-endotelne NO sintaze (eNOS)(Hsieh i sur., 2020.). Opisan je i učinak pentadekapeptida kao “hvatača” ROS-a preko njegove sposobnosti da promptno otvara kolaterale te sprječiti disfunkcije žila i endotela zbog kojih dolazi do njihova nakupljanja u tkivu (Duzel i sur., 2017.; Park i sur., 2020.). Interakcija BPC 157 sa standardnim angiogenim faktorima rasta (najviše s VEGFom) i svim vrstama sintaza dušičnog monoksida (NOS1, 2, 3) opsežno je opisana (Perovic i sur., 2022.; Vukojevic i sur., 2020.; Seiwert i sur., 2018.). Također istraživanja s BPC 157 i krvnim žilama uključuju spektroskopiju aorte koja je ukazala na promjene sastava torakalne aorte i smanjenje spektara oštećenja stanica čime se dodatno doprinosi integritetu krvotoka (Gamulin i sur., 2022.). Aktivirajući dodatno NO sustav otvaraju se male kolaterale, smanjuje se disfunkcija mikrocirkulacije lokalno, održava se funkcija tkiva čime se održava funkcija organizma. Održana funkcija organizma očituje se kao održana razlika arterijskog i venskog tlaka te kao smanjenje otpora uslijed otvaranja kolaterala, sve zbog moduliranja razine NO koja održava protok kroz tkiva. Time se neutraliziraju sve posljedice navedenih disfunkcija (Strbe i sur. 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.; Sikiric i sur., 2014.; Hsieh i sur., 2020.; Duzel i sur., 2017.; Park i sur. 2020.). Terapija BPC 157 pentadekapeptidom mogla bi stoga biti ključ zaobilaznja zbog svog učinka brze aktivacije zaobilaznih puteva i ukidanja kompleksnog sindroma inducirano istovremenom disfunkcijom esencijalnih arterijskih i venskih pritoka izazvanih jednostranom adrenalektomijom.

1.4. Regulacija krvotoka u nadbubrežnoj žlijezdi

Studije su proučavale moguće efekte kateholamina, acetilkolina, adenzina i NO na regionalni protok krvi nadbubrežne žlijezde. Studije su se provodile na dva načina: djelovanjem egzogenog agonista i evaluacijom specifičnih receptora antagonista. NO je produkt endotelne stanice sa snažnim vazodilatatorskim svojstvima (Breslow, 1992). Dokazano je da je NO važan u održavanju vaskularnog tonusa u mirovanju i u posredovanju vazodilatacijskih učinaka raznih vazoaktivnih spojeva, uključujući acetilkolin i adenzin (Breslow, 1992). NO sintaza (NOS) se nalazi u živčanim stanicama, sugerirajući da NO također može funkcionirati kao neurotransmiter (Breslow, 1992). Ovi neuroni koji sadrže NOS bili su najzastupljeniji u mozgu, ali su također bili prisutni u srži nadbubrežne žlijezde i neurohipofizi. Primjena inhibitora NOS, N-nitro-L-arginin metilestera (40 mg/kg iv) smanjila je bazalni kortikalni i medularni protok krvi u pentobarbital-anesteziranih pasa za 47% odnosno 62% (Breslow, 1992). Nitroarginin je također značajno oslabio vaskularni odgovor medularnog krvotoka na stimulaciju splanhničkog živca bez utjecaja na sekretorni odgovor kateholamina. Ovi podaci upućuju na glavnu ulogu NO u održavanju bazalnog nadbubrežnog krvotoka te na ulogu posrednika neuralno

inducirane vazodilatacije. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio točan mehanizam nastanka neuralno posredovane vazodilatacije. Djelovanjem BPC 157 pentadekapeptida na NO-sustav unutar nadbubrežne žlijezde mogao bi se dati novi uvid u dosad neopisane molekularne mehanizme čime bi se dodatno objasnila priroda nadbubrežne žlijezde.

2. Hipoteza

BPC 157 pentadekapeptid neutralizira “okluziji-nalik” sindrom izazvan jednostranom adrenalektomijom.

3. Opći i specifični ciljevi rada

3.1. Opći Cilj

Procijeniti učinak pentadekapeptida BPC 157 na periferne i centralne promjene žila izazvanih jednostranom adrenalektomijom.

3.2. Specifični ciljevi

1. Procijeniti učinak jednostrane adrenalektomije na periferne i centralne promjene krvotoka.
2. Procijeniti učinak pentadekapeptida BPC 157 na periferne i centralne promjene krvotoka izazvane jednostranom adrenalektomijom.
3. Molekularnim metodama i FTIR spektroskopijom obrazložiti opisane fenomene kao razliku u količini i kvaliteti specifičnih molekularnih biljega i gena između skupine tretirane pentadekapeptidom BPC 157 i netretirane skupine.

4. Materijal i metode

4.1. Korišteni materijali

Eksperimenti su učinjeni na muškim albino Wistar štakorima, starim 12 tjedana, mase 200-250 g. Štakori su uzgojeni na Zavodu za Farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (dozvola br. HR-POK-007). Kavezi su polikarbonatni i prozirni, prostor u koji su postavljeni održava se na standardnim laboratorijskim uvjetima (20-24°C temperatura zraka, 40-70% vlažnost zraka i buka do 60 dB). Svaki kavez označen je datumom, oznakom skupine, dozom medikacije te ukupnim brojem štakora u dotičnom kavezu. 12 sati dnevno uključeno je umjetno fluorescentno osvjetljenje. Potpuna prehrana u obliku peleta i obična voda omogućeni su štakorima ad libitum. Ovu studiju je izvršena u sklopu projekta kojega je odobrilo lokalno Etičko povjerenstvo. Eksperimente su procijenili studenti-promatrači koji su bili “oslijepljeni” u pogledu tretiranja skupina. U pokusima su korišteni sljedeći agensi: Stabilni gastrički pentadekapeptid BPC 157 (Diagen, Slovenija), fiziološka otopina NaCl 0,9% (B Braun, Hrvatska), tiopental (Rotexmedica, Njemačka) i diazepam (Apaurin; Krka, Slovenija)

4.2. Model jednostrane adrenalektomije

Štakori su bili duboko anestezirani (intraperitonealno (ip) ubrizganim 40 mg/kg tiopentala (Rotexmedica, Njemačka) i 10 mg/kg diazepam (Apaurin; Krka, Slovenija). Resorptivnim 4-0 koncem podvežu se gornja i donja suprarenalna arterija te suprarenalna vena, zatim se ligirani pritoci izrežu te se nadbubrežna žlijezda uklanja iz organizma. Terapija fiziološkom otopinom u kontrolnim podskupinama (1 mL intraperitonealno)

odnosno otopinom pentadekapeptida BPC 157 u tretiranim podskupinama (10 ng/kg) bit će primijenjena jednom i odmah po završetku zahvata. Za životinje unutar vremenskog intervala od 5h i 24h zaštit će se rana do trenutka procjene. Metodama će se procjenjivati na 15 minuta, 5h i 24h od primijenjene terapije. Štakori su bili usmrćeni dvostrukom dozom primijenjenih anestetika (Szabo i sur., 1983.).

4.3. EKG monitoring i analiza

Elektrokardiogrami su bili kontinuirano snimani u duboko anesteziranih štakora prije žrtvovanja u tri glavna odvoda, postavljanjem elektroda od nehrđajućeg čelika na sva četiri uda pomoću EKG monitora s 2090 programatorom (Medtronic, Minneapolis, MN, SAD) spojenog na Waverunner LT342 digitalni osciloskop (LeCroy, Chestnut Ridge, NY, SAD). Ovakav raspored će omogućiti precizna snimanja, mjerenja i analizu QTc intervala (Strbe i sur., 2021.; Tepes i sur., 2021.; Gojkovic i sur., 2021.).

4.4. Makroskopska evaluacija

4.4.1. Makroskopska snimka

Snimanje edema mozga provedeno je u duboko anesteziranih štakora prije žrtvovanja nakon izvršene potpune kalvariektomije. Također, izvršena je laparotomija prije žrtvovanja za snimku makroskopske anatomije organa i krvnih žila (donja šuplja vena, abdominalna aorta, gornja mezenterična vena, portalna vena). Također, neposredno prije samog žrtvovanja izvršena je torakotomija i napravljena je snimka srca i vene azygos. Snimanje je izvedeno kamerom priključenom na VMS-004 Discovery Deluxe USB mikroskop (Veho, Sjedinjene Američke Države). Snimka je pohranjena u obliku videa, a kasnije su izdvojene fotografije za usporedbu i analizu kao kadrovi videa snimkom zaslona.

4.4.2. Procjena volumena organa

Na prethodno opisanim snimkama organa (mozak, srce, donja šuplja vena, abdominalna aorta, gornja mezenterična vena, portalna vena, vena azygos) na slici je označen rub organa pomoću softvera ImageJ te je zatim izmjerena površina organa funkcijom za mjerenje u pikselima. Ovo je provedeno sa slikama zdravih štakora pa u kontrolnoj (fiziološka otopina) skupini i u tretiranoj (BPC 157) skupini štakora u istim intervalima nakon procedure i nakon aplikacije, a prije žrtvovanja. Izračunate su aritmetičke sredine površina za svaki interval u obje skupine. Zatim je omjer ove dvije površine izračunat kao (A_{con} / A_{bpc}) , gdje je A_{con} aritmetička sredina površina nekog organa kontrolne skupine, a A_{bpc} je aritmetička površina nekog organa tretirane skupine. Počevši od zakona kvadrata-kuba (jednadžbe (1) i (2)), izveden je izraz za izračunavanje omjera volumena organa iz omjera volumena površine istog organa (6). U izrazima (1)–(5), l je definiran kao bilo koja proizvoljna jednodimenzionalna duljina mozga (na primjer, rostro-kaudalna duljina mozga za mozak), a koristi se isključivo za definiranje jednodimenzionalnog omjera (l_2/l_1) između dva promatrana organa kao međufaktor u izvodu konačnog izraza (6).

Zakon kvadrata-kuba : $A_2 = A_1 \times \left(\frac{l_2}{l_1}\right)^2$... (1) i $V_2 = V_1 \times \left(\frac{l_2}{l_1}\right)^3$... (2). Izvedeno iz (1) nakon dijeljenja

obje strane s A_1 : $\frac{A_2}{A_1} = \left(\frac{l_2}{l_1}\right)^2$... (3). Izvedeno iz (3) nakon korijenovanja obje strane: $\frac{l_2}{l_1} = \sqrt{\frac{A_2}{A_1}}$... (4).

Izvedeno iz (2) nakon dijeljenja obje strane s V_1 : $\frac{V_2}{V_1} = \left(\frac{l_2}{l_1}\right)^3 \dots(5)$. I na kraju uvrštavanjem izraza (4) u izraz

(5) dobivamo izraz: $\frac{V_2}{V_1} = \left(\sqrt{\frac{A_2}{A_1}}\right)^3 \dots(6)$.

4.5. Invazivno mjerenje tlakova

Tlakovi su mjereni invazivno u krvnim žilama duboko anesteziranih životinja nakon izvršene procedure, a prije žrtvovanja. Za mjerenje tlakova korišten je tlačni transdudktor (78534C MONITOR/TERMINAL; Hewlett Packard Houston, TX, USA) koji je putem cjevčice spojen na intravenske kanile (BD Neoflon™ Cannula) koje su postavljene direktno u žile u kojima je mjeran tlak. Vrijednosti tlaka su mjerene u gornjem sagitalnom sinusu, donjoj šupljoj veni, portalnoj veni i abdominalnoj aorti na razini bifurkacije aorte. Pristup donjoj šupljoj veni, portalnoj veni i abdominalnoj aorti omogućen je prethodno izvedenom laparatomijom, a pristup očuvanom gornjem sagitalnom sinusu pažljivo izvedenom kalvariektomijom (Strbe i sur., 2021.; Tepes i sur., 2021.; Gojkovic i sur., 2021.).

4.6. Patohistološka analiza i određivanje tromba

4.6.1. Patohistološka obrada

Od štakora, na kraju eksperimenta, nakon žrtvovanja, uzeti su jetra, preostala nadbubrežna žlijezda, bubrezi, želudac, jejunum, pluća i srce te se fiksirati u 4% otopini formaldehida te mozak koji se fiksira u 10% otopini formaldehida na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Reprezentativni uzorci tkiva su ugrađeni u parafin i isječeni na debljinu od 4 μ m, nakon toga su obojeni s hematoksilinom i eozinom te pregledani svjetlosnim mikroskopom uz korištenje digitalnog fotoaparata Olympus 71 i mikroskopa Olympus BX51 (Japan) povećanja 100x i 400x. Dobivene digitalne slike spremljene su kao nekomprimirane u RGB TIFF datoteke. Uzorke i slike analizirao je iskusni patolog koji nije bilo upoznat s podrijetlom materijala (Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.).

4.6.2. Skoriranje

4.6.2.1. Histologija mozga

Kao što je opisano u prijašnjim studijama (Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.) mozak je bio seciran u skladu s NTP-7, u 3. i 6. nivou s neuroanatomskim sublokacijama s tri obvezna presjeka. Koristio se semikvantitativan sistem skoriranja te suma analiziranih zahvaćenih regija (0-4) i kariopiknotičnih područja (0-4) koji su zbrojeni dali ukupan skor (0-8). Zahvaćena područja mozga koja su, moždana kora (NTP-7, nivo 3), hipokampus i hipotalamus (NTP-7, nivo 3) bila su opisana.

Specifične regije mozga koje su zahvaćene opisane su kako slijedi: mali, fokalni, potpuni ili djelomični infarkti (<10% regije zahvaćeno) (skor 1); djelomično konfluentni ili nepotpuni infarkti (20-30% regije zahvaćeno) (skor 2); veliki konfluentni infarkti (40-60% zahvaćene regije) (skor 3); totalna dezintegracija tkiva kore mozga i veliki potpuni infarkti (>75% regije zahvaćeno) (skor 4). Kariopiknotične stanice u zahvaćenim regijama mozga (0-4) u moždanoj kori (NTP-7, nivo 3), hipokampusu i hipotalamusu (NTP-7, nivo 3) analizirani su kako slijedi: malo kariopiknotičnih živčanih stanica (<20%) (skor 1); fokalna područja kariopiknotičnih stanica (50%)

(skor 2); opsežnija kariopiknotična područja (75%) (skor 3) i kompletno zahvaćene stanice kariopiknozom (100%) (skor 4). Također procijenjene su živčane patološke promjene u digitalnim snimkama, dobivenim kao 24-bit RGF TIFF datoteke u softverskom programu AnalySIS (Olympus Soft Imaging System GmbH, Munster, Germany) putem kvantitativne analize stupanja živčanog oštećenja u kariopiknotičkim regijama. Neuron kortikalne regije, hipokampus i hipotalamus brojani su u 10 vidnih polja velikog povećanja (VVP, 400x) i 3 do 5 serijskih sekcija za svaki uzorak. Koristila su se 4 kriterija za procjenu edema: blijed mijelin, mijelinska područja u obliku "haloa" dilatacije perivaskularnih i pericelularnih područja i vakuolarni izgled neuropila i sive tvari. Edem je skoriran kao diskretan ili nema edema, umjereno izražen i kao jako izražen, (skor 0–3). Intraventrikularno krvarenje je opisano kao prisutno ili odsutno.

4.6.2.2. Histologija pluća

Koristio se sustav skoriranja iz prijašnjih radova (Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.) za procjenu oštećenja pluća. Svaka komponenta oštećenja (fokalno zadebljanje alveolarne membrane, kongestija, plućni edem, intraalveolarno krvarenje, intersticijalna infiltracija neutrofila i intraalveolarna infiltracija neutrofila) ocijenjena je kao odsutna (0), prisutna kao blaga (1), umjerena (2) i teška (3) te je procijenjen konačni skor.

4.6.2.3. Histologija bubrega, jetre i srca

Koristio se isti sustav skoriranja iz prijašnjih radova (Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.) za procjenu stupnja bubrežne (degeneracija Bowmanovog prostora i glomerula, vakuolarne degeneracije proksimalnih i distalnih tubula, vaskularne kongestije i intersticijskog edema), jetrene (vakuolizacija hepatocita, piknotičke jezgre hepatocita, aktivacija Kupfferovih stanica i dilatacija sinusoida) i srčane histologije (dilatacija i kongestija koronarnih krvnih žila i krvnih žila unutar miokarda). Svaki uzorak skoriran je koristeći skalu od 0 do 3 (0 - odsutno; 1 - blago; 2 - umjereno; 3 - teško) za svaki kriterij te je procijenjen konačni skor (0 - odsutno, 1 - blago, 2 - umjereno i 3 - teško)

4.6.2.4. Histologija gastrointestinalnog sustava

Kao u prethodnim studijama, Koristio se scoring sistem od Chui i sur. (Chui i sur., 1970.) za procjenu oštećenja gastrointestinalnog tkiva, sa skoriranjem od 0-5 (odsutno do teško) u tri kategorije (sluznična ozljeda, upala, hiperemija/hemoragija) za ukupan skor od 0 do 15 kao što su opisali Lane i sur. (Lane i sur., 1997.). Oštećenje sluznice opisano je kao stupanj denudacije epitela resica i nekroza, upala (od fokalne do difuzne ovisno o infiltraciji lamine proprije i subendotelne infiltracije), hiperemija i krvarenja (fokalna do difuzne ovisno o infiltraciji lamine proprije ili subendotelne infiltracije).

4.6.2.5. Histologija nadbubrežne žlijezde

Stupanj oštećenja kore nadbubrežne žlijezde temeljen je na gubitku lipidnih vakuola u citoplazmama stanica zone granuloze i zone fasciculate nadbubrežne žlijezde što je izraženo u postotku stanica zahvaćenih opisanim promjenama (Wexler i Kittinger, 1965.).

4.7. Određivanje tromba

Nakon žrtvovanja gornji sagitalni sinus, donja šuplja vena, portalna vena, abdominalna aorta i gornja mezenterična arterija uklonjene su iz životinja, a potom su iz navedenih žila izvađeni i izvagani ugrušci ako su bili prisutni (Strbe i sur., 2021.; Tepes i sur., 2021.; Gojkovic i sur., 2021.).

4.8. Određivanje razina ROS i NO u uzorcima tkiva

Izvršeno je mjerenje ROS-ova i NO kao u dosadašnjim studijama (Duzel i sur., 2017.; Vukojević i sur., 2020.). Nakon žrtvovanja životinja uzeti su uzorci tkiva (mozak, želudac, nadbubrežna žlijezda) koji su zatim zaleđeni u tekućem dušiku i očuvani na -80 °C do postupka mjerenja. Razine ROS-ova određene su kvantifikacijom TBARS-om kao ekvivalenti malondialdehida (MDA). Uzorci tkiva homogenizirani su u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (engl. phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,4) koja je sadržavala 0,1 mM butiliranog hidroksitoluena (BHT) (TissueRuptor, Qiagen, Valencia, CA, SAD). Uzorci su sonicirani 30 sekundi u ledenoj kupelji (ultrazvučna kupelj, Branson, MO, SAD). Homogenatu je dodana trikloroetena kiselina (TCA, 10%), smjesa je centrifugirana na 3000 okretaja u minuti, 5 minuta, a zatim je supernatant sakupljen. Dodana 1% tiobarbituratna kiselina (TBA) i uzorci su kuhani (95 °C, 60 minuta). Potom su epruvete držane na ledu 10 minuta. Nakon centrifugiranja (14 000 okretaja u minuti, 10 minuta) određena je apsorbancija smjese na valnoj duljini od 532 nm. Koncentracija MDA je očitana sa standardne kalibracijske krivulje iscrtane pomoću 1,1,3,3'-tetraetoksipropana (TEP). Opseg peroksidacije lipida izražen je kao MDA pomoću koeficijenta molarne ekstinkcije za MDA od $1,56 \times 10^5$ mol/L/cm (Duzel i sur., 2017.). Kvantificiranje NO-a učinjeno je pomoću komercijalnog kita za Griessovu reakciju (Griess Reagent System; Promega, SAD) (Luetić i sur., 2017.). Tkivo mozga, želuca i nadbubrežne žlijezde homogenizirano kako je navedeno u prijašnjem odlomku inkubirano je sa sulfonilamidom te je potom dodan N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorid. Tako je konačni produkt Griessove reakcije bazirane na diazotaciji 12 bio kromoforni azo derivat. Apsorbancija je izmjerena na 540 nm, koristeći otopinu natrijeva nitrata kao standard. Vrijednosti NO-a izražene su u $\mu\text{mol/mg}$ proteina. Koncentracija proteina bila je determinirana pomoću komercijalnog kita DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, SAD) (Duzel i sur., 2017.).

4.9. Procjena ekspresije ciljnih gena u ostatnoj nadbubrežnoj žlijezdi

S obzirom na prijašnje studije u kojima su opsežno proučavani molekularni mehanizmi i ekspresija gena u središnjem živčanom sustavu i gastrointestinalnom sustavu, u ovoj studiji fokusirali smo se na ekspresiji gena unutar nadbubrežne žlijezde, a sama analiza ekspresije gena učinjena je kao u dosadašnjim studijama (Vukojević i sur., 2020.). Uzorci tkiva (nadbubrežna žlijezda) zamrznuti su u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C do provedbe analize. Za izolaciju ukupne RNA tkivo je homogenizirano te je izolacija učinjena pomoću TRIzol reagensa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), prema uputama proizvođača. Nakon izolacije RNA, koncentracija i čistoća RNA determinirana je pomoću DeNovix DS-11 spektrofotometra (DeNovix, DE, SAD). Na temelju dobivenih podataka, načinjeni su izračuni za reverznu transkripciju koja je učinjena koristeći set kemikalija High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i uređaj ProFlex PCR System machine (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za procjenu ekspresije gena korišteni su TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) i TaqMan Gene Expression Master Mix reagensi. Endogena kontrola bila je GAPDH. Analizirana je relativna ekspresija gena čiji su translacijski produkti enzimi ključni za: sintezu NO-a (Nos1; Nos2, Nos3) (Sikiric i sur., 2014.; Hsieh i sur., 2020.; Vukojević i sur., 2020.; Perovic i sur. 2022.) i VEGF sustav (VEGFa) (Perovic i sur., 2022.; Seiwert i sur., 2018.). Instrument Cobas z 480 (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Švicarska) korišten je za izvođenje qPCR-a prema sljedećem protokolu: 2 min na 50 °C, 10 min na 95 °C, 45 ciklusa od 15 s na 95 °C i 1 min na 60 °C.

Razlika u ekspresiji gena između uzoraka tretiranih i kontrolnih skupina analizirana je pomoću formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, u kojoj je $\Delta\Delta Ct$ razlika između ΔCt u tretiranih uzoraka i ΔCt u kontrolnih uzoraka.

4.10. FTIR spektroskopija

4.10.1. Uzorci tkiva

Korišteni su uzorci tkiva abdominalne aorte po 6 štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 (10 ng/kg ip) ili fiziološkom otopinom (5 ml/kg ip) nakon jednostrane adenalektomije. Uspoređivane su tri skupine životinja: žrtvovane nakon 15 minuta, 5 sati i 24 sata od postupka jednostrane adenalektomije. Tkivo torakalne aorte (0.5 - 1 cm) svakog štakora smrznuto je u kapljici destilirane vode. Nadalje, od aorte svakog štakora načinjeno je 20 uzoraka debljine 60 μm koji su postavljeni na silicijske pločice. Višak tekućine u tkivu uklonjen je dehidracijom u vakuumu jer je FTIR spektroskopija osjetljiva na vodu. Svaki od 20 uzoraka iskorišten je za spektroskopiju.

4.10.2. FTIR spektroskopija Vibracijski spektri snimani su uporabom uređaja *PerkinElmer Spectrum GX* opremljenog MCT detektorom. Za snimanje uzoraka korištene su silicijske pločice, a prije toga snimljeno je 1000 skenova pozadinskog spektra (engl. *background*) same pločice koji je automatski oduzet od spektara uzoraka. Za dobivanje vibracijskog spektra svakog uzorka snimljeno je 400 skenova što je po uzorku trajalo otprilike 6 minuta. Podaci o spektrima dobiveni su u rasponu valnih brojeva 450 - 4000 cm^{-1} s rezolucijom 4 cm^{-1} . Svaki je spektar korigiran te mu je uklonjena pozadina uzrokovana vanjskim čimbenicima. Konačni spektar uzorka rezultat je doprinosa svih svojih komponenti koje zasebno imaju karakteristične apsorpcijske vrpce sa specifičnim valnim duljinama. Ovisno o biokemijskom sadržaju, međudjelovanjem uzorka tkiva i infracrvenog zračenja, nastaju različiti vibracijski spektri.

Tablica 1. Asignacija relevantnih apsorpcijskih vrpce FTIR spektra.

Valni broj (cm^{-1})	Spoj	Asignacija	Referenca
~2920	CH_2	Asimetrične vibracije u zasićenim masnim kiselinama	Dreissig i sur., 2009.
~2852	CH_2	Simetrične vibracije u zasićenim masnim kiselinama	Dreissig i sur., 2009.
~1660	C=O	Kolagen tipa I (amid I)	Camacho i sur., 2001.
~1655	C=O	Elastin (amid I)	Singh, 1999.
~1651	C=O	Aortni kolagen (amid I)	Jastrzebska i sur., 2006.
~1640	C=O	Proteoglikani (amid I)	Camacho i sur., 2001.
~1545	$\text{C-N} + \text{N-H}$	Proteoglikani (amid II)	Camacho i sur., 2001.
~1456	CH_2	Asimetrične <i>bending</i> vibracije u kolagenu tipa I	Camacho i sur., 2001.
~1204	CH_2	Vibracije kolagena s CH_2 <i>wagging</i> vibracijama iz glicinske okosnice i bočnog lanca prolina	Jackson i sur., 1995.
~1134	C-O-S	Asimetrični <i>stretching</i> GAG-a	Servaty i sur., 2001.
~924		Proteoglikan agrekan	Camacho i sur., 2001.

4.11. Statistička analiza

Statistička analiza provedena je u GraphPad Prism 9.5.1. za Windows 10. Za uspoređivanje statističke razlike među skupinama korišteni su neparametrijski Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U test. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) i kao minimum/medijan/maksimum. Razlike među skupinama smatrane su statistički značajnima za vrijednost $p < 0,05$.

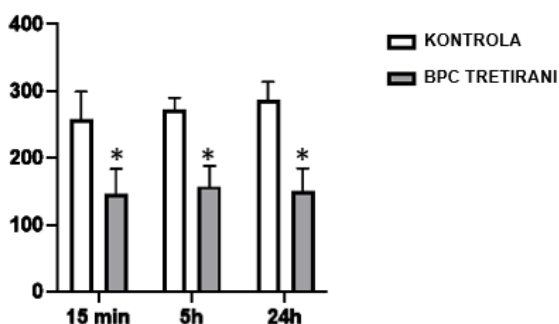
4.11.1. FTIR analiza podataka

Za analizu dobivenih spektara korišteni su programi *Mathlab R2010b* (Mathworks, MA, USA) i *PLS_Toolbox* (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Provedena je multivarijantna analiza glavnih komponentata (PCA, engl. *principal component analysis*), metoda potpornih vektora (SVM; *support vector machine*) i Student T-test (STT). PCA je statistička metoda formiranja umjetnih, nepovezanih varijabli (principal components; PC) koje su linearne kombinacije izvornih varijabli. PCA metoda transformira podatke u novi, nižedimenzionalni potprostor te se na taj način može efikasno reducirati dimenzija seta podataka na nekoliko onih koji daju najveću varijaciju među podacima (Rudež, 2021.). Najčešće se koriste prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) jer prezentiraju najveću varijaciju među analiziranim podacima. Koristeći PCA napravljen je kvantifikacijski model koji pokazuje razliku između FTIR spektara uzoraka aorte kontrolnog i tretiranog štakora. Za izradu klasifikacijskog modela korištena je metoda SVM (engl. *support vector machine*), a cross-validacijom (CV; engl. *Cross-Validation*) provjerena je točnost modela. SVM konstruira hiperravninu (ravnina u višedimenzionalnom prostoru) ili skup hiperravnina, koje se mogu koristiti za klasifikaciju ili regresiju odnosno mogu razdvojiti dvije skupine podataka (Rudež, 2021.). Student t-test parametrijski je statistički test koji se koristi za određivanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina dvaju nezavisnih skupova uzoraka. Razlike među skupinama smatrane su statistički značajnima za vrijednost $p < 0,05$ za termin 5 sati i $p < 0,02$ za termine 15 minuta i 24 sata.

5. Rezultati

5.1. Rezultati i analiza EKG zapisa

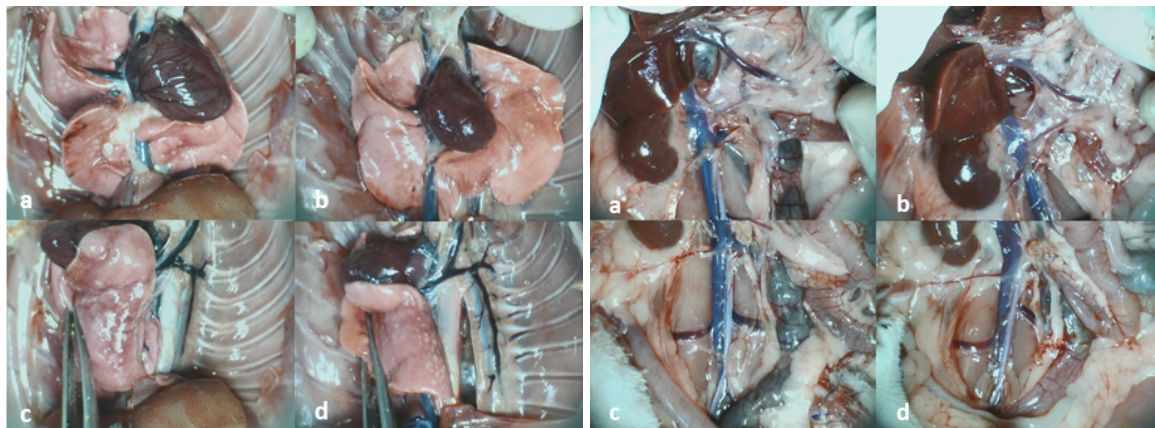
Analizom EKG zapisa utvrđen je značajno duži QTc interval u kontrolnih životinja. Duljina je QTc intervala u tretiranih životinja unutar referentnih vrijednosti (80 - 160 ms). (Slika 1)



Slika 1. QTc interval (ms), $SV \pm SD$ u sva tri termina

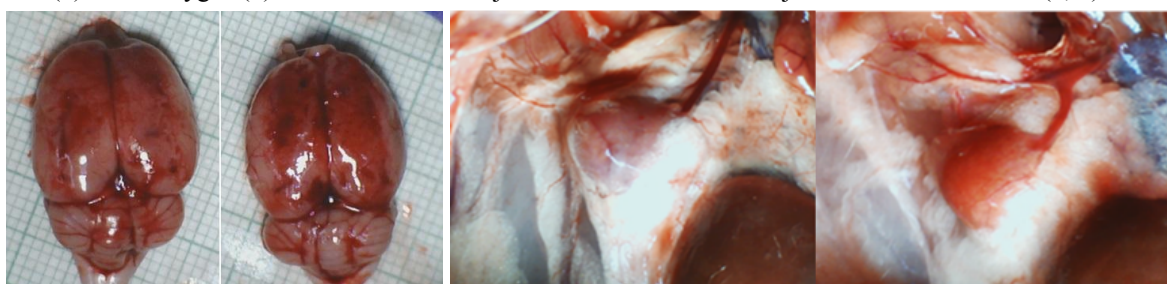
5.2. Rezultati makroskopske evaluacije

Na izračunatim omjerima volumena iz makroskopskih snimki nadene su statistički značajne razlike, volumeni vene porte (slika 3), donje šuplje vene (slika 3), srca (slika 2) i mozga (slika 4) su veći u kontrolne skupine u odnosu na tretiranu, a volumeni aorte (slika 3) i vene azygos (slika 2) su smanjeni u kontrolnih životinja u odnosu na tretiranu skupinu. (slika 6, slika 7)



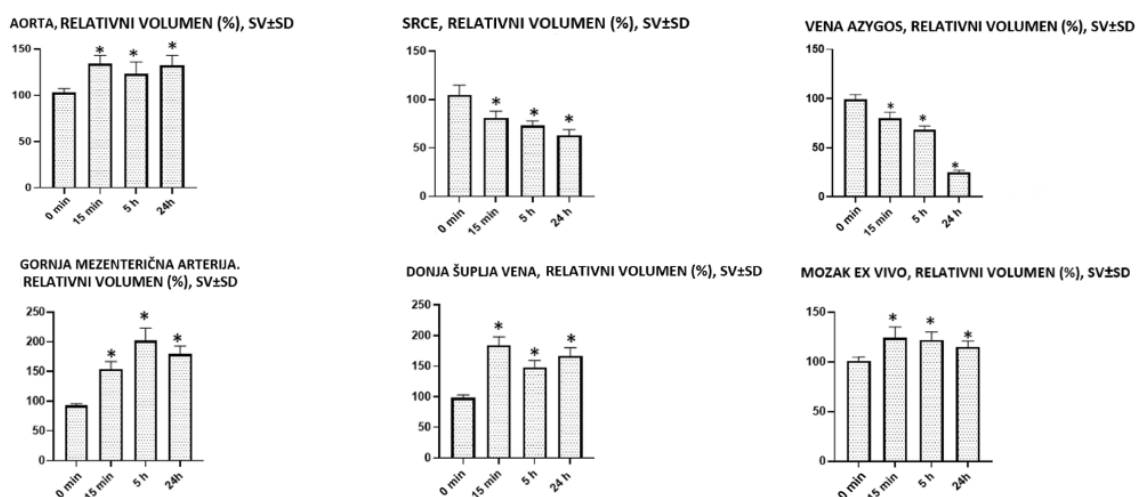
Slika 2 (lijevo). Unilateralna adrenalektomija; Prikaz srca (a) i vene azygos (c) kod kontrolne životinje; srce (b) i vena azygos (d) kod tretirane životinje.

Slika 3 (desno). Unilateralna adrenalektomija; Prikaz portalne (a) i donje šuplje vene (c) kod kontrolne životinje u odnosu na tretiranu (b, d).



Slika 4. Mozak *ex vivo*; lijevo kontrola, desno tretirani.

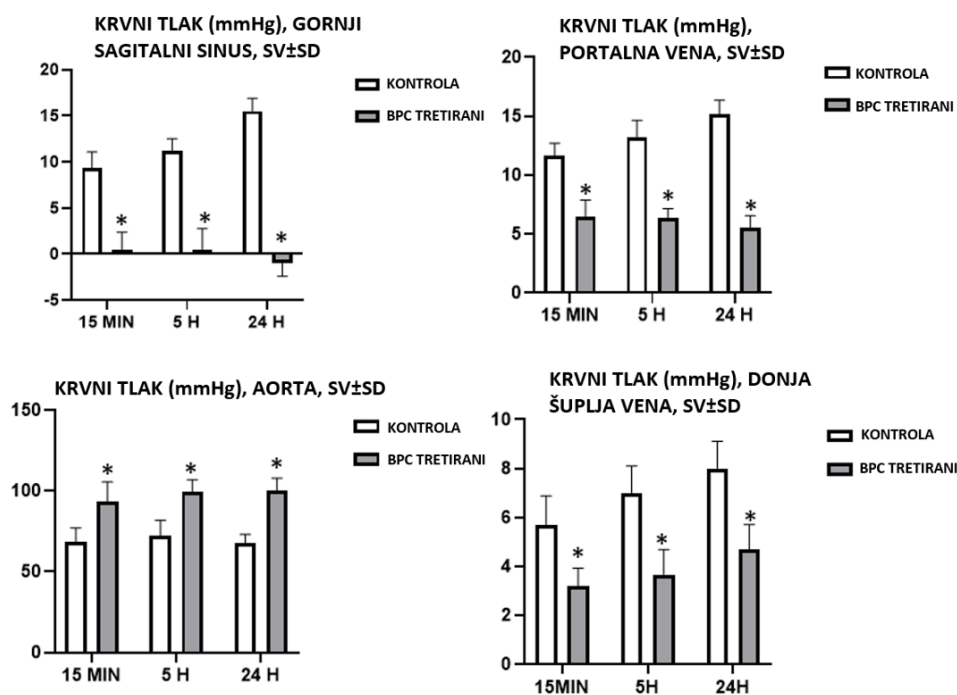
Slika 5. Makroskopski vidljiva kongestija nadbubrežne žlijezde u kontrolne (lijevo) i hiperemija kod BPC 157 životinje (desno).



Slika 6. Relativni volumen (%) krvnih žila, srca i mozga izražen kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dobiven ImageJ procjenom volumena preko zakona "kub-kvadrat"

5.3. Izmjerene vrijednosti tlakova

Invazivnim mjerenjem tlaka nađene su značajne razlike između tretirane i kontrolne skupine životinja. Kod kontrolne životinje zabilježene su hipertenzija u gornjem sagitalnom sinusu, portalnoj i kavalnoj veni. Mjerenjem tlaka u aorti zabilježena je hipotenzija. Suprotno tome, u BPC-om 157 tretirane životinje izmjerene vrijednosti tlaka u gornjem sagitalnom sinusu značajno su manje od kontrolnih te poprimaju vrijednosti oko nule ili negativne vrijednosti koje su karakteristične zdravoj životinji (od -24 do -27 mmHg). Ostale vrijednosti tlakova tretirane životinje u aorti, portalnoj i donjoj šupljoj veni bliske su ili unutar referentnih vrijednosti za zdravu životinju. (slika 8) U donjoj šupljoj veni i portalnoj veni zdrave životinje tlak poprima vrijednosti od 3 do 5 mmHg, a u aorti od 100 do 120 mmHg. (Tepes i sur., 2021)



Slika 8. Izmjerene vrijednosti tlakova u gornjem sagitalnom sinusu, portalnoj veni, gornjoj šupljoj veni i aorti po terminima. *p < 0.05

5.4. Rezultati patohistološke analize

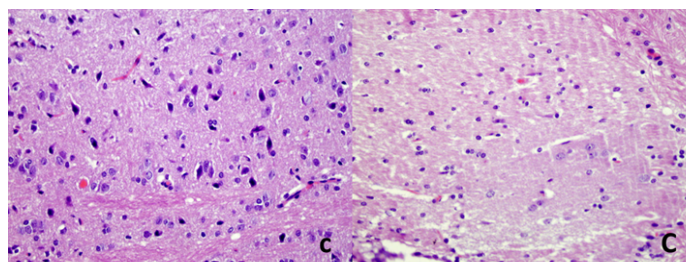
5.4.1. Centralne lezije

Naglašen edem i hiperemija bili su vidljivi u svim analiziranim dijelovima središnjeg živčanog sustava u sva tri vremenska intervala (15 min, 5 sata i 24 sata). U kontrolnim skupinama su se pogoršavali s vremenom, a edem je bio manje naglašen u BPC 157 tretiranim skupinama. Hemoragijske promjene bile su vidljive također u svim analiziranim dijelovima središnjeg živčanog sustava, a najviše naglašene bile su na 24 sata; u tretiranim skupinama nije bilo vidljivih znakova krvarenja. Intraventrikularna krvarenja koja zahvaćaju treću komoru i lateralne komore vidljive su u kontrolnim skupinama na 24h, dok kod BPC 157 tretiranih skupina nisu bila primjetna. Kontrolne životinje pokazale su znatne neurodegenerativne promjene u središnjem živčanom sustavu.

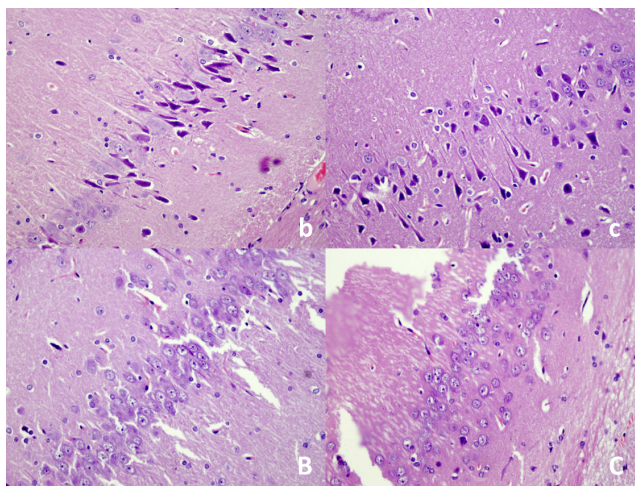
Opisan je povećan broj kariopiknotičkih stanica koje su znatno zahvaćale hipotalamus, hipokampus i mali mozak s pogoršanjem kroz vrijeme dok su te promjene neutralizirane s terapijom pentadekapeptidom BPC 157.

Tablica 2. Semikvantitativna analiza oštećenja tkiva središnjeg živčanog sustava

Centralno	15 minuta	5 sati	24 sata
Interval			
Tretman		Veliki mozak (skor 0-8, min-med-max)	
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Kariopiknotička područja (% aritmetička sredina ± SD, 10 hpf, 400x)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	50 ± 15
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5*
	Krvarenje (% ukupne površine)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Edem (skor 0-3, min-med-max)		
Kontrola	2-2-2	2-2-2	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	1-1-1*	1-1-1*
	Hipotalamus (skor 0-8, min-med-max)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Kariopiknotička područja (% aritmetička sredina ± SD, 10 hpf, 400x)		
Kontrola	0 ± 0	25 ± 5	50 ± 15
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5*
	Krvarenje (% ukupne površine)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Edem (skor 0-3, min-med-max)		
Kontrola	2-2-2	2-2-2	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	1-1-1*	1-1-1*
	Hipokampus (skor 0-8, min-med-max)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Kariopiknotička područja (% aritmetička sredina ± SD, 10 hpf, 400x)		
Kontrola	0 ± 0	30 ± 5	50 ± 15
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	1 ± 0	5 ± 5*
	Krvarenje (% ukupne površine)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Edem (skor 0-3, min-med-max)		
Kontrola	2-2-3	2-2-3	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	1-1-1*	1-1-1*
	Mali mozak (skor 0-8, min-med-max)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Kariopiknotička područja (% aritmetička sredina ± SD, 10 hpf, 400x)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Krvarenje (% ukupne površine)		
Kontrola	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BPC 157 10 ng/kg	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Edem (skor 0-3, min-med-max)		
Kontrola	2-2-2	2-2-2	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	1-1-1*	2-1-1*



Slika 9. Ilustrativna mikroskopska prezentacija hipotalamusa (HE bojenje; povećanje 200x) u kontrolnim (c) i tretiranim (C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminu od 24 sata. Izražena kariopiknoza neurona u kontrolnim skupinama (c) i tek blaga kariopiknoza u tretiranim skupina (C).



Slika 10. Ilustrativna mikroskopska prezentacija hipokampusa (HE bojenje; povećanje 200x) u kontrolnim (b,c) i tretiranim (B,C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminima od, 5h (b,B) i 24h (c,C). Izražena kariopiknoza neurona u kontrolnim skupinama (b,c), uz vremensku progresiju, dok je u tretiranim skupinama nađen tek blagi stupanj kariopiknoze na 5 sati (B) i 24-satnom žrtvovanom razdoblju (C).

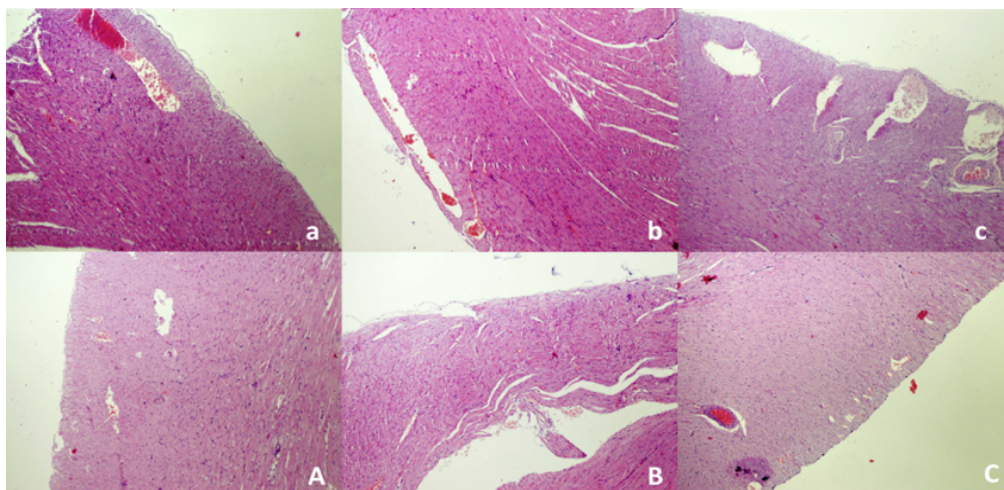
5.4.2. Periferne lezije

Tablica 3. Semikvantitativna analiza oštećenja tkiva perifernih organa

Periferno	15 minuta	5 sati	24 sata
Interval			
Tretman		Srce (skor 0-3, min-med-max)	
Kontrola	2-2-2	2-2-2	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	0-0-0*	1-1-1*	1-1-1*
		Pluća (skor 0-3, min-med-max)	
Kontrola	2-2-2	2-2-2	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	1-1-1*	1-1-1*
		Jetra (skor 0-3, min-med-max)	
Kontrola	3-3-3	3-3-3	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	1-1-1*	1-1-1*
		Želudac (skor 0-15, min-med-max)	
Kontrola	3-3-3	6-6-6	8-8-8
BPC 157 10 ng/kg	1-1-1*	0-0-0*	0-0-0*
		Tanko crijevo (skor 0-15, min-med-max)	
Kontrola	5-5-5	5-5-5	5-5-5
BPC 157 10 ng/kg	0-0-0*	0-0-0*	0-0-0*
		Bubrezi (skor 0-3, min-med-max)	
Kontrola	3-3-3	3-3-3	3-3-3
BPC 157 10 ng/kg	0-0-0*	1-1-1*	1-1-1*
		Nadbubrežna žlijezda zona glomerulosa (gubitak lipidnih vakuola)	
Kontrola	80,00%	80,00%	20,00%
BPC 157 10 ng/kg	10%*	<5%*	<5%*
		Nadbubrežna žlijezda zona fasciculata (gubitak lipidnih vakuola)	
Kontrola	60,00%	50,00%	80,00%
BPC 157 10 ng/kg	60,00%	<5%	<5%*

5.4.2.1. Srce

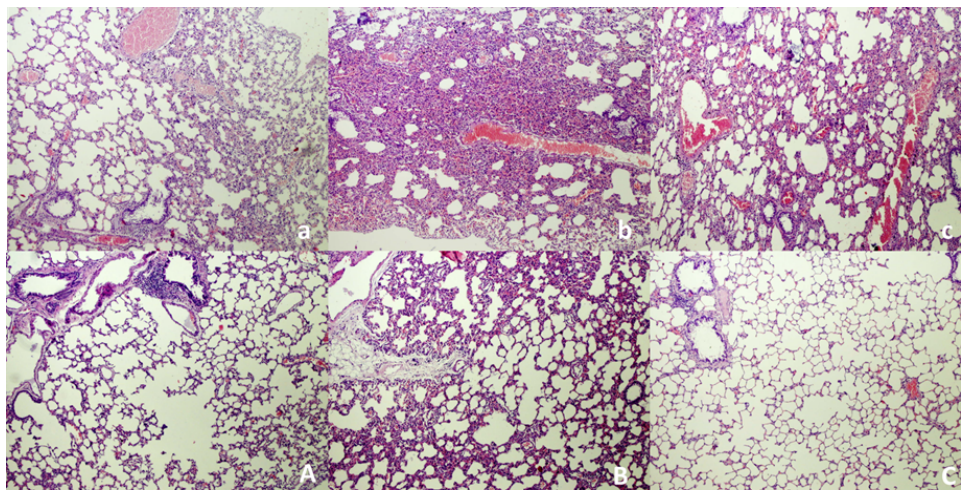
Kongestija i dilatacija krvnih žila miokarda redovito je prikazana u svim vremenskim intervalima te je progredirala s vremenom u kontrolnim skupinama dok je kod skupina tretiranih BPC-om 157 bila tek blago izražena.



Slika 11. Ilustrativna mikroskopska prezentacija srčane kongestije (HE bojenje; povećanje 100x) u kontrolnim (a,b,c) i tretiranim (A,B,C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminima od 15 min (a,A), 5h (b,B) i 24h (c,C). Izražena kongestija miokarda dosljedno je primijećena u svim kontrolnim skupinama (a,b,c), uz vremensku progresiju, dok je u tretiranim skupinama nađena tek blaga kongestija u 24-satnom žrtvovanom razdoblju primjene (C).

5.4.2.2. Pluća

Kongestija intersticija bila je izražena u kontrolnim skupinama svih vremenskih intervala te se značajno pogoršavala s vremenom uz prisutno intraalveolarno krvarenjem na 24 sata. Navedene pojave neutralizirane su kod BPC-om 157 tretiranih životinja.



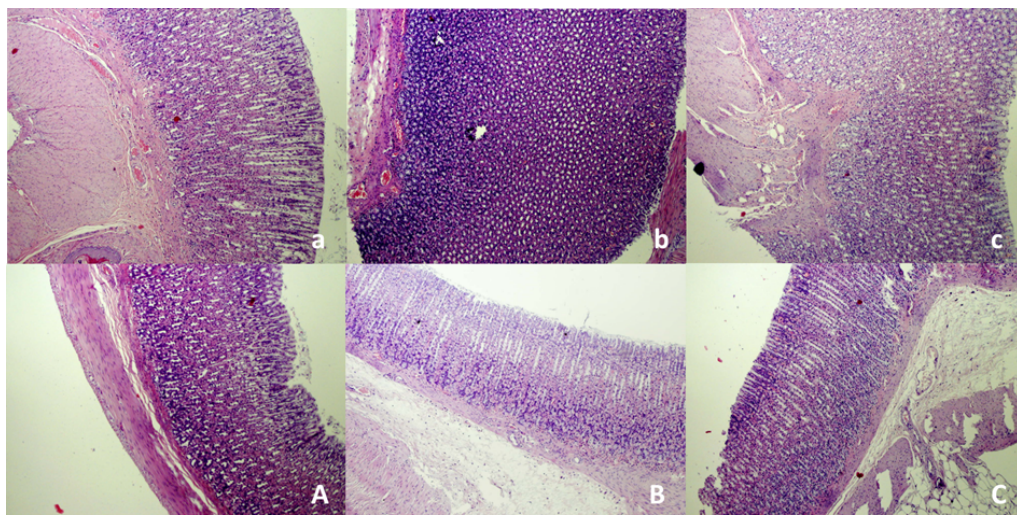
Slika 12. Ilustrativna mikroskopska prezentacija oštećenja plućnog tkiva (HE bojenje; povećanje 100x) u kontrolnim (a,b,c) i tretiranim (A,B,C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminima od 15 min (a,A), 5h (b,B) i 24h (c,C). U kontrolnim skupinama, izražena kongestija plućnog parenhima konzistentno je primijećena uz progresivno intraalveolarno krvarenje u 24-satnom terminu (a,b,c). U tretiranim skupinama pronađena je blaga kongestija plućnog tkiva tek u razdoblju od 24h nakon zahvata (A,B,C).

5.4.2.3. Jetra

Značajni znakovi kongestije i širenja krvnih žila u portalnim prostorima, centralnim venama i dilatacija sinusoida, vidljivi su u sva tri vremenska intervala. Suprotno tome, skupine tretirane pentadekapeptidom BPC 157 pokazale su samo blage promjene takvog karaktera.

5.4.2.4. Želudac

U kontrolnim skupinama prikazane su umjerene hiperemične promjene u stijenci želuca u sva tri vremenska intervala. BPC 157 tretman pokazao je zaštitne učinke na te promjene u svim vremenskim intervalima.



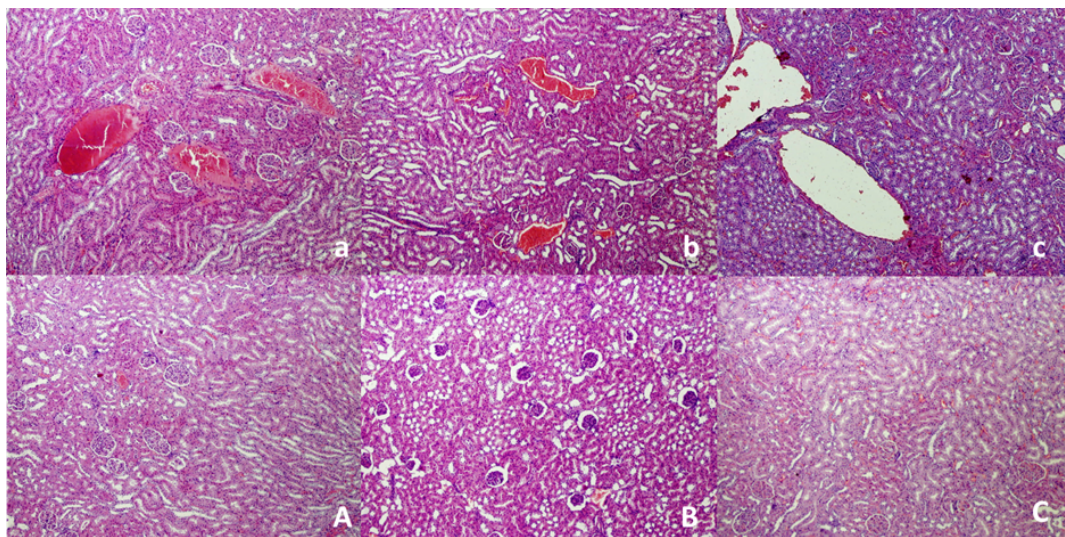
Slika 13. Ilustrativna mikroskopska prezentacija oštećenog želučanog tkiva (HE bojenje; povećanje 100x) u kontrolnim (a,b,c) i tretiranim (A,B,C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminima od 15 min (a,A), 5h (b,B) i 24h (c,C). Primijećena je kongestija stijenke želuca u progresiji s vremenskim intervalom u kontrolnim skupinama (a,b,c)

5.4.2.5. Tanko crijevo

U tankom crijevu opisana je značajna kongestija u svim vremenskim intervalima, sa značajnim promjenama na 24h. Životinje tretirane pentadekapeptidom BPC 157 pokazala je samo blage promjene na 24h.

5.4.2.6. Bubrezi

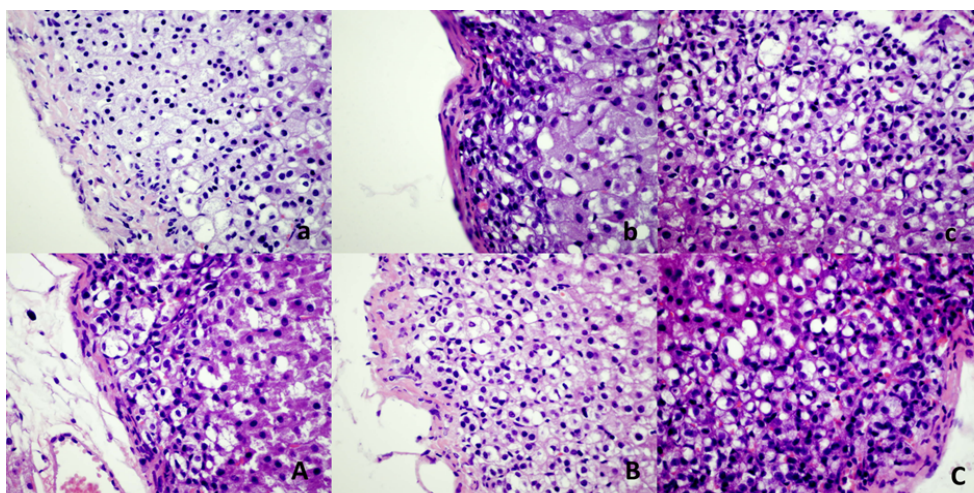
Jako izražena dilatacija i zastoj krvi u malim, srednje velikim te velikim krvnim žilama parenhim bubrega kao i u kapilarnom klupku glomerula redovito su opisane u svim vremenskim intervalima u kontrolnim skupinama. Suprotno tome, pentadekapeptid BPC 157 neutralizirao je ove promjene.



Slika 14. Ilustrativna mikroskopska prezentacija oštećenja bubrežnog tkiva (HE bojenje; povećanje 100x) u kontrolnim (a,b,c) i tretiranim (A,B,C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminima od 15 min (a,A), 5h (b,B) i 24h (c,C). U kontrolnim skupinama, pronađeni su u svim vremenskim intervalima, dok su isti neutralizirani pentadekapeptidom BPC 157 uz blagu dilataciju i kongestiju krvnih žila u vremenskom intervalu od 24h (C).

5.4.2.7. Nadbubrežna žlijezda - zona glomerulosa

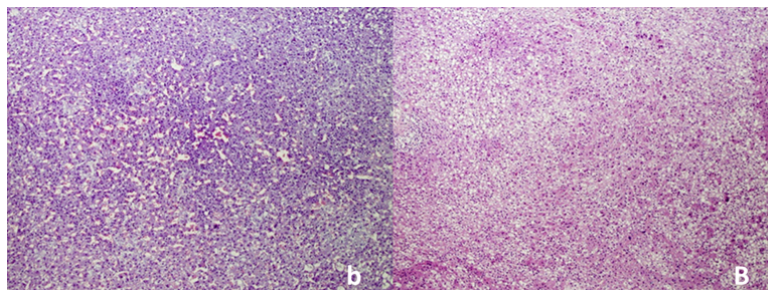
Prikazana je zona glomerulosa sa značajnim gubitkom lipidnih vakuola u prva dva termina, uz minimalne promjene u 24 satnom terminu, dok su lipidne vakuole impresivno očuvane kod BPC 157 tretiranih životinja u sva tri vremenska intervala.



Slika 15. Ilustrativna mikroskopska prezentacija promjena nadbubrežne žlijezde u zoni glomerulozi (HE bojenje; povećanje 200x) u kontrolnim (a,b,c) i tretiranim (A,B,C) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminima od 15 min (a,A), 5h (b,B) i 24h (c,C). U kontrolnim životinjama prikazan je gubitak lipidnih vakuola. U BPC 157 tretiranih životinja gubitak lipidnih vakuola u usporedbi s kontrolnim životinjama.

5.4.2.8. Nadbubrežna žlijezda, zona fascikulata

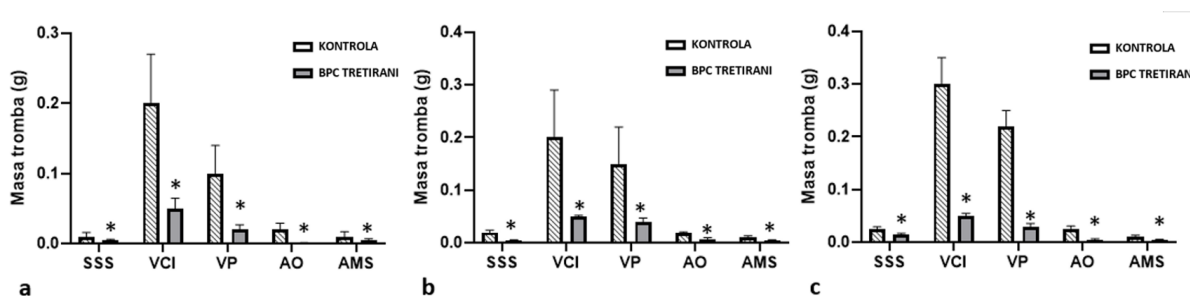
Suprotno zoni retikulozi, gubitak lipidnih vakuola s vremenom se povećavao u zoni fascikulati. Početno se i kod tretiranih životinja smanjio broj lipidnih vakuola u BPC 157 tretiranih životinja, dok je u terminima 5 sati i 24 sata gubitak vakuola bio minimalan.



Slika 16. Ilustrativna mikroskopska prezentacija naglašenih zastojnih promjena nadbubrežnih žlijezda u srži (HE bojenje; povećanje 100x) u kontrolnim (b) i fiziološka hiperemija u tretiranim (B) skupinama životinja na kraju vremenskog razdoblja od zahvata u terminu od 5 sati.

5.5. Izmjereni trombi u žilama

Kod kontrolnih životinja nađeni su i izmjereni trombi u gornjem sagitalnom sinusu, portalnoj veni i donjoj šupljoj veni. Trombozirane su također bile i gornja mezenterična arterija te aorta. Trombi u žilama tretiranih štakora bili su značajno manji ili ih gotovo nije bilo. (slika 17)

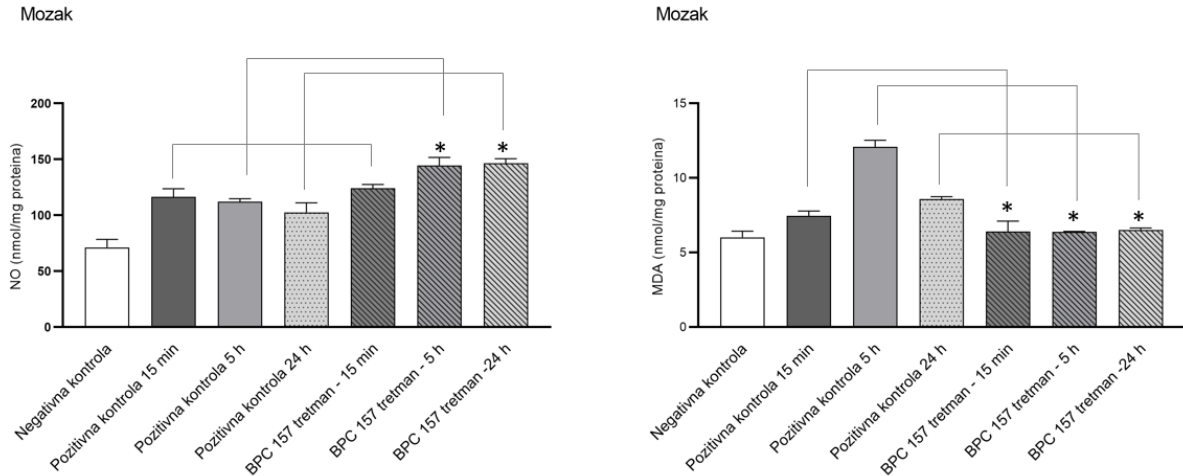


Slika 17. Masa tromba u gramima izmjerena u pojedinim žilama; izražena kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija, u terminu 15 minuta (a), 5 sati (b) i 24 sata (c). (SSS - gornji sagitalni sinus, VCI - donja šuplja vena, VP - portalna vena, AO - aorta, AMS - gornja mezenterična arterija)

5.6. Koncentracije ROS i NO

5.6.1. Mozak

Koncentracija NO u mozgu povišena je kod kontrolnih i tretiranih životinja u svim terminima u odnosu na zdravu životinju. Povišenje NO veće je u tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu životinju, pri čemu statistički značajno za termine 5h i 24h. Rezultati koncentracije MDA ukazuju na statistički značajno više ROS-ova u kontrolnih životinja u svim terminima u odnosu na zdrave životinje i tretirane životinje. (slika 18) S druge strane, vrijednost ROS-ova u mozgu tretiranih životinja podjednaka je razini kod zdravih životinja te razlika između vrijednosti nije statistički značajna.

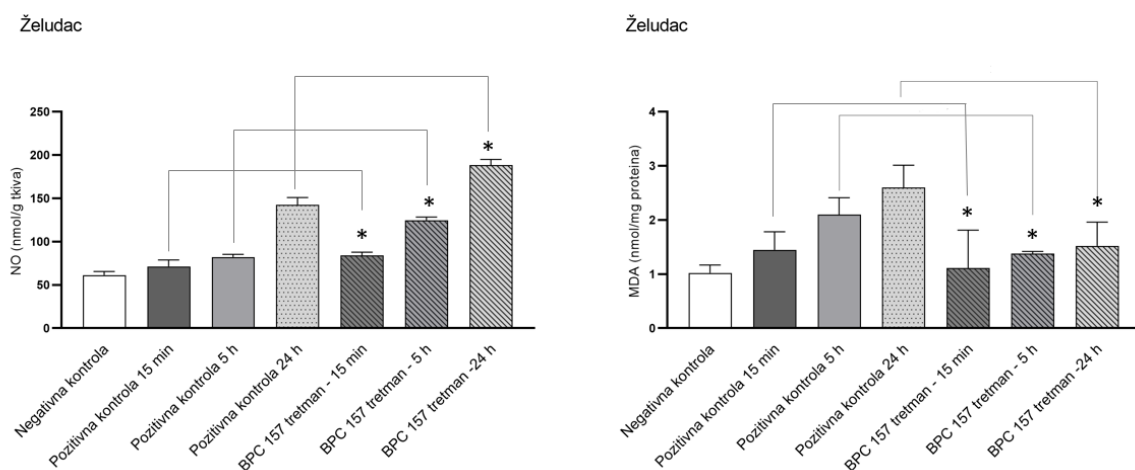


Slika 18. Procjena koncentracije NO i ROS u mozgu. * $p < 0.05$

5.6.2. Želudac

Koncentracija NO u želudcu povišena je u svim terminima kontrolnih i tretiranih životinja u odnosu na zdrave životinje, s važnom razlikom da nakon 15 minuta nema statistički značajne razlike između zdravih i kontrolnih životinja. Drugim riječima povišenje razine NO događa se ranije kod tretiranih nego kod kontrolnih životinja.

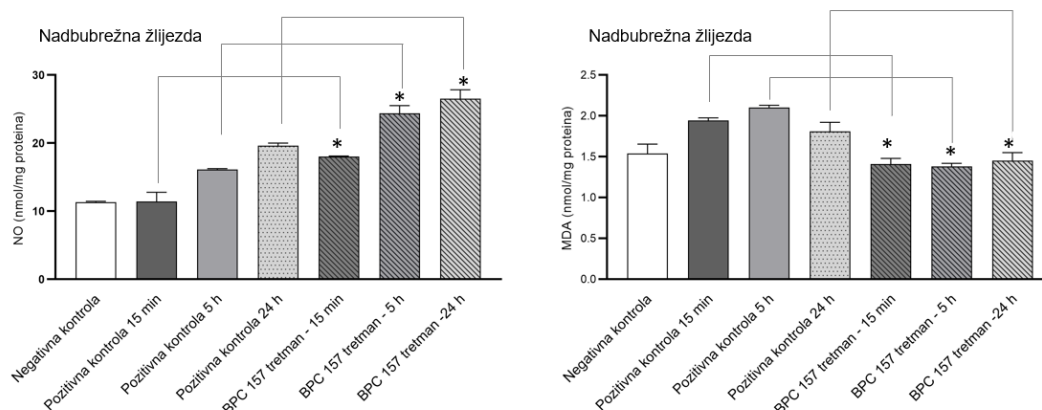
Uspoređivanjem skupina (kontrolne i tretirane) po terminima, utvrđeno je značajno više NO kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolne. Uspoređujući razinu ROS-ova dviju skupina s razinom u zdravih životinja, utvrđeno je značajno više ROS-ova u svim terminima obje skupine, izuzev termina 15 minuta u BPC-om tretirane skupine. Dakle, razine radikala u terminu 15 minuta tretirane skupine, bliske su razinama kod zdrave životinje. Unatoč povišenim razinama ROS-ova u obje skupine, povišenje je značajno veće u kontrolnoj skupini u odnosu na tretiranu skupinu u svim terminima. (slika 19)



Slika 19. Procjena koncentracije NO i ROS u želucu. * $p < 0.05$

5.6.3. Nadbubrežna žlijezda

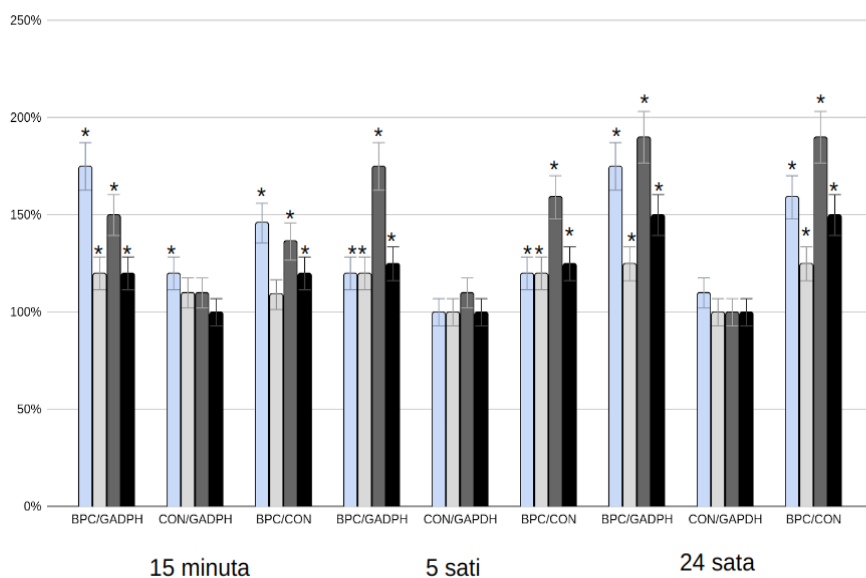
Koncentracija NO u nadbubrežnoj žlijezdi povišena je u svim terminima kontrolnih i tretiranih životinja u odnosu na zdrave životinje, s izuzetkom kao i kod želuca; u terminu 15 minuta nema statistički značajne razlike između zdravih i kontrolnih životinja. Drugim riječima povišenje razine NO događa se ranije kod tretiranih nego kod kontrolnih životinja. Razina ROS-ova značajno je veća u svim terminima kod kontrolne skupine u odnosu na zdrave životinje (slika 20), dok su razine tretirane skupine slične razinama zdravih životinja i nema statistički značajne razlike niti u jednom terminu. Sukladno tome, razine ROS-ova više su kod kontrolne skupine nego kod tretirane skupine u svim terminima.



Slika 20. Procjena koncentracije NO i ROS u nadbubrežnoj žlijezdi. * $p < 0.05$

5.7. Ekspresija ciljnih gena u ostatnoj nadbubrežne žlijezde

Analiza gena pokazala je povećanu ekspresiju Nos1, Nos3 I VEGFa u BPC 157 tretiranih životinja u usporedbi s ekspresijom Nos1 i Nos3 u kontrolnim životinjama i housekeeping genom GAPDH, dok je ekspresija Nos2 uglavnom ostala nepromijenjena u usporedbi s kontrolnim skupinama. Životinje kontrolnih i BPC 157 tretiranih skupina pokazale su relativno povećanje ekspresije svih navedenih gena u usporedbi s housekeeping genom GAPDH. (slika 21)



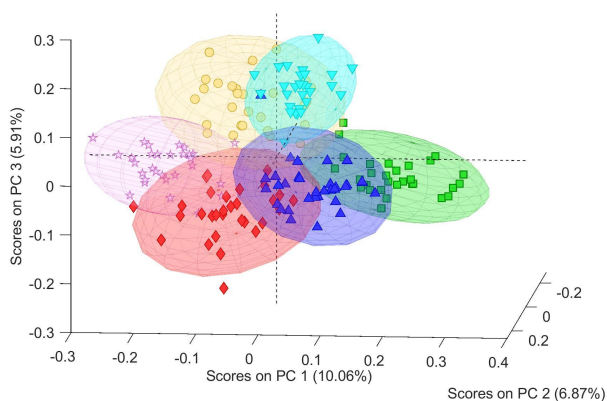
Slika 21. Procjena ekspresije ciljnih gena preko mRNA koncentracije NOS1 (svijetlo plava), NOS2 (svijetlo siva), NOS3 (tamno siva) i VEGFa (crna). Prikazani su rezultati u obliku aritmetičke sredine postotka sa standardnom devijacijom. $p < 0.05$ *

5.8. Rezultati FTIR spektroskopije

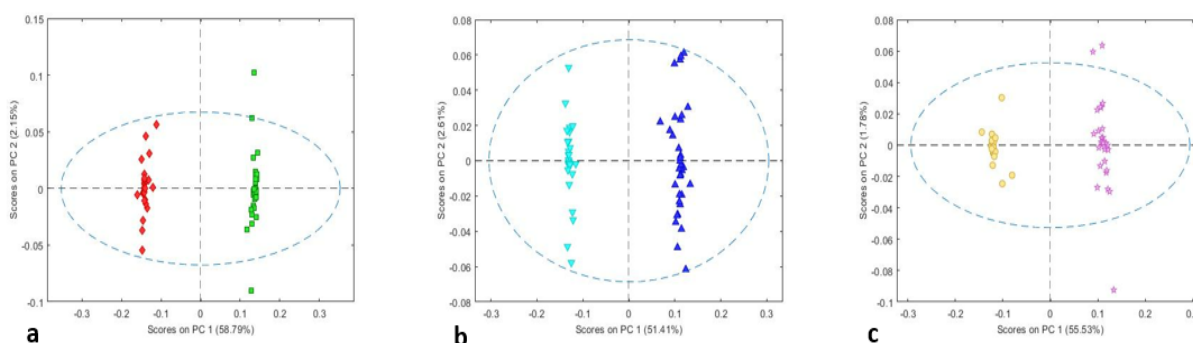
Temeljem snimljenih spektara kreiran je PCA model koji jasno razdvaja uzroke štakora tretiranih BPC-om 157 i kontrolnih štakora. Slika 22 prikazuje ovisnost prvih triju glavnih komponenata analiziranih spektara koji

potječu od svih 6 skupina uzoraka (sva tri termina tretiranih i kontrolnih uzoraka). Unatoč preklapanjima između pojedinih spektara različitih skupina, postavljeni PCA model uspješno razdvaja analizirane podatke u trodimenzionalnom prikazu.

Slika 22. Scores plot - PC1-PC2-PC3 ovisnost. Razdvajanje podataka prikupljenih FTIR spektroskopijom uzoraka aorte tretiranih i kontrolnih štakora; Crveni rombovi - NT, 15 min; plavi trokuti - NT, 5h; ljubičaste zvjezdice - NT, 24h. Zeleni kvadrati - T, 15 min; tirkizni obrnuti trokuti - T, 5h; žuti krugovi - T 24h.



PCA analizom uzoraka kontrolnih i tretiranih štakora za termin 15 minuta, 5h i 24h dobiva se značajno razdvajanje uglavnom po prvoj glavnoj komponenti (slika 23).



Slika 23. Scores plot PC1-PC2 ovisnost; **(a)** termin 15 minuta. crveni rombovi - NT; zeleni kvadrati - T. **(b)** termin 5h; plavi trokuti - NT; tirkizni obrnuti trokuti - T. **(c)** termin 24h; ljubičaste zvjezdice - NT; žuti krugovi - T.

PCA analizom dobiven je loadings PC1 koji je za sva tri termina povećan 6 puta. Oduzimanjem srednjih spektara dobiven je diferencijalni spektar dviju skupina uzoraka za termine 15 minuta, 5 sati i 24 sata. Na svakoj točki spektra proveden je STT s ciljem utvrđivanja statistički značajnih razlika između intenziteta spektara navedenih skupina (slika 24). Statistički značajna razlika označena je crvenim zvjezdicama.

Tablica 4 u dijelu *Model results* prikazuje rezultate SVM analize kojom je postavljen klasifikacijski model, a u dijelu *CV results* rezultate *cross*-validacije kojom je provjerena točnost modela. Izradom modela (Model results) dobiveni su vrlo visoki TP i TN, uz odgovarajuće male FN i FP. Drugim riječima, korišteni model s visokom točnošću razdvaja analizirane podatke u šest skupina.

Tablica 4. SVM prikaz modela.

MODEL RESULTS

Confusion Matrix:

Class:	TPR	FPR	TNR	FNR	N	Err	P	F1
Class 1	1.00000	0.00000	1.00000	0.00000	30	0.00000	1.00000	1.00000
Class 2	1.00000	0.00000	1.00000	0.00000	31	0.00000	1.00000	1.00000
Class 3	0.96970	0.00000	1.00000	0.03030	33	0.00556	1.00000	0.98462
Class 4	1.00000	0.00658	0.99342	0.00000	28	0.00556	0.96552	0.98246
Class 5	1.00000	0.00000	1.00000	0.00000	30	0.00000	1.00000	1.00000
Class 6	1.00000	0.00000	1.00000	0.00000	28	0.00000	1.00000	1.00000

Confusion Table:

	Actual Class 1	Actual Class 2	Actual Class 3	Actual Class 4	Actual Class 5	Actual Class 6
Predicted as Class 1	30	0	0	0	0	0
Predicted as Class 2	0	31	0	0	0	0
Predicted as Class 3	0	0	32	0	0	0
Predicted as Class 4	0	0	1	28	0	0
Predicted as Class 5	0	0	0	0	30	0
Predicted as Class 6	0	0	0	0	0	28
Predicted as Unassigned	0	0	0	0	0	0

CV RESULTS

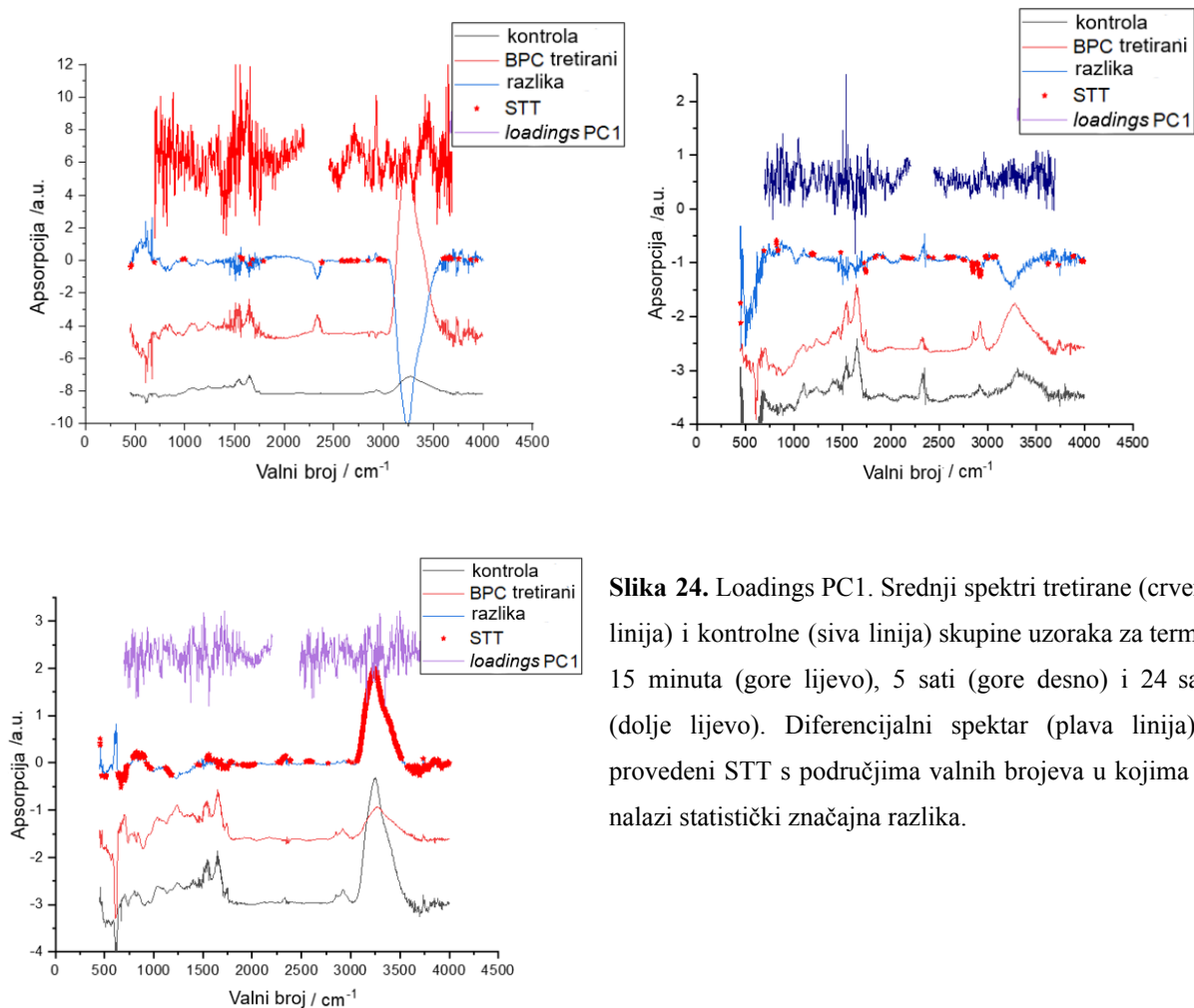
Confusion Matrix (CV):

Class:	TPR	FPR	TNR	FNR	N	Err	P	F1
Class 1	0.83333	0.01333	0.98667	0.16667	30	0.03889	0.92593	0.87719
Class 2	0.93548	0.00000	1.00000	0.06452	31	0.01111	1.00000	0.96667
Class 3	0.96970	0.02041	0.97959	0.03030	33	0.02222	0.91429	0.94118
Class 4	0.96429	0.02632	0.97368	0.03571	28	0.02778	0.87097	0.91525
Class 5	1.00000	0.02667	0.97333	0.00000	30	0.02222	0.88235	0.93750
Class 6	0.85714	0.00000	1.00000	0.14286	28	0.02222	1.00000	0.92308

Confusion Table (CV):

	Actual Class 1	Actual Class 2	Actual Class 3	Actual Class 4	Actual Class 5	Actual Class 6
Predicted as Class 1	25	1	0	1	0	0
Predicted as Class 2	0	29	0	0	0	0
Predicted as Class 3	2	1	32	0	0	0
Predicted as Class 4	0	0	1	27	0	3
Predicted as Class 5	3	0	0	0	30	1
Predicted as Class 6	0	0	0	0	0	24
Predicted as Unassigned	0	0	0	0	0	0

Diferencijalni spektar za sva tri termina najveću razliku pokazuje u vibracijskim vrpčama oko 1540 cm^{-1} što odgovara amid II vrpci te oko 1660 cm^{-1} što odgovara amid I vrpci, pritom je razlika statistički značajna za termine 15 minuta i 24 sata. (slika 24) Uzorci termina 15 minuta statistički značajnu razliku pokazuju i oko 1450 cm^{-1} , zatim 1170 – 1102 cm^{-1} i 955 – 926 cm^{-1} . Sve navedene vrpce bile su jačeg intenziteta u uzorcima BPC-om tretiranih životinja u odnosu na kontrolne uzorke.



Slika 24. Loadings PC1. Srednji spektri tretirane (crvena linija) i kontrolne (siva linija) skupine uzoraka za termin 15 minuta (gore lijevo), 5 sati (gore desno) i 24 sata (dolje lijevo). Diferencijalni spektar (plava linija) i provedeni STT s područjima valnih brojeva u kojima se nalazi statistički značajna razlika.

U terminu 5h razlike u amid I i amid II vrpce nisu statistički značajne, ali postoje i u skladu su s nalazima u druga dva termina. Značajne diferencijacije nalaze se oko 1204 cm^{-1} što je područje amid III vrpce, a ukazuje na *wagging* vibracije CH₂ veze. Vrpce velikog intenziteta nađene oko 2850 cm^{-1} te $2930 - 2919\text{ cm}^{-1}$ označavaju vibracije CH veze unutar lipida.

6. Rasprava

Jednostrana adrenalektomija predstavlja ujedno induciranje kirurškog stresa i izazivanje disfunkcije osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Taj noksični podražaj očitovao se na razini krvotoka slično kao i kod podvezivanja velikih krvnih žila i drugih štetnih podražaja (Sikiric i sur., 2022.; Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.). Disfunkcija malih krvnih žila periferno i centralno očitovala se gubitkom arterijsko-venske razlike tlakova (smanjen aortalni tlak, povećani tlakovi u gornjem sagitalnom sinus, donjoj šupljoj veni i veni porti), EKG poremetnjama (produljen QTc), posljedično smanjenim protokom kroz tkiva, što izaziva disfunkciju tkiva (posebice endotela i nakupljanje ROS-ova), veći ulazak intravaskularne tekućine u tkiva i veću sklonost agregaciji trombocita i eritrocita u obliku formiranih trombova u velikim venama i arterijama (gornji sagitalni sinus, donja šuplja vena, vena porte, gornje mezenterična arterija, aorta). Patohistološka obrada pokazala je lezije periferno i centralno (mozak, srce, pluća, jetra, želudac, tanko crijevo, bubrezi) koje su gotovo istovjetne onima nastalim kod podvezivanja velikih krvnih žila i drugih štetnih postupaka. Budući da su te hemodinamske i patohistološke promjene vaskularne prirode, djelovanje na mehanizme koji reguliraju krvotok se nameće kao potencijalna točka farmakološkog djelovanja. Pentadekapeptid BPC 157 neutralizirao je navedene promjene održavanjem endotelne funkcije i učinkovitijim preusmjeravanjem krvotoka otvaranjem kolaterala. (Sikiric i sur., 2022.; Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.). U usporedbi s kontrolnim skupinama, tretirane skupine imaju veću arterijsko-vensku razliku tlakova te je povećana razina NO-a u mozgu, želucu i nadbubrežnoj žlijezdi s ulogom smanjenja otpora protoku zbog posljedičnog otvaranja kolateralnih tokova što opisuje povećan protok kroz ta tri tkiva u usporedbi s onim u kontrolnim životinjama. Posljedično je smanjeno oštećenje tkiva i nakupljanje ROS-ova. Procjena volumena ciljanih anatomskih struktura preko kvadrat-kub zakona u programu ImageJ pokazala je da postoji sklonost kongestiji velikih vena i srca te povećanju volumena mozga nakon kalvariektomije, dok se volumen aorte i vene azygos smanjio. U životinja tretiranih s BPC 157 takav ishod se ispravlja, naime vena azygos u tretiranih životinja ima povećan volumen kao aktiviran kolateralni tok, a aorta nije smanjenog volumena, što odgovara vrijednostima izmjerenih invazivnim mjerenjem tlakova. Dodatno, rezultati spektroskopije ukazuju na to da je najveća diferencijacija u spektrima pronađena u područjima vibracijskih vrpce oko 1540 cm^{-1} što odgovara amid II vrpce te oko 1660 cm^{-1} što odgovara amid I vrpce. Amid II i amid I vrpca jačeg su intenziteta u aorti BPC-om 157 tretiranih životinja. Navedene vrpce potječu od vibracija veza unutar amidnih skupina. Amid I vrpca rezultat je C=O *stretchinga*, a amid II vrpca N-H *bendinga* proteina (Kazarian i Chan, 2006.). U kontekstu tkiva koje promatramo, amid I vrpca valnog broja 1654 cm^{-1} odgovara kolagenu (Twardowskiv i sur., 1994.), a vrpca 1655 cm^{-1} odgovara elastinu (Singh, 1999.). Drugim riječima, rezultati spektroskopije upućuju na veću razinu kolagena i elastina u tkivu aorte tretiranog štakora u odnosu na kontrolnu životinju. U terminu 15 minuta, diferencijaciji spektara pridonosi i vrpca oko

1450 cm^{-1} koja označava asimetrične *bending* vibracije unutar kolagena tipa I. Nadalje, amid II vrpca u području 1545 cm^{-1} označava prisutnost proteoglikana (Camacho i sur., 2000.), važne sastavnice ekstracelularnog matriksa. Vrpce 1170 – 1102 cm^{-1} i 955 – 923 cm^{-1} ukazuju na prisutnost glikozaminoglikana, a intenzitet je značajno slabiji u kontrolnoj skupini uzoraka. Navedeni rezultati, u kontekstu rezultata drugih metoda, govore u prilog narušenom integritetu aorte u kontrolnih životinja. Sastav aorte promijenjen je u smislu manjka glavnih gradivnih elemenata, kolagena i elastina, ali sastav ekstracelularnog matriksa značajno narušava i manjak proteoglikana (PG) i glikozaminoglikana (GAG). Aorta tretirane životinje u odnosu na kontrolnu, ima više kolagena i elastina, a detektirano je i više proteoglikana i glikozaminoglikana. Navedene razlike u sastavu i posljedična promijenjena biomehanička sposobnost aorte, mogle bi objasniti njenu smanjenu tlakotvornu funkciju. Otprije je poznata važna uloga kolagena i elastina u biomehaničkim svojstvima aorte i arterija uopće (Ghadie i sur., 2021). Kolagenska vlakna održavaju strukturni integritet aorte, a elastin je ključan za ekspanziju i prilagodbu zida aorte na deformacije nastale tijekom pulzacija. Očuvana elastična svojstva aorte potpomažu cikličko pumpanje srca što se naziva Windkesselovim efektom (Wagenseil i Mecham, 2009.). U posljednje vrijeme naglasak se stavlja na važnost PG/GAG u biomehaničkim svojstvima aorte, iako čine samo 2 – 5 % suhe tvari aorte (Wight, 1980.). Dokazana je njihova direktna uloga u održavanju integriteta zida aorte mehanizmom bubrenja (Ghadie i sur., 2021); kao negativno nabijene molekule nejednako raspoređene u arterijskom zidu, GAG-i navlače vodu, posebice pri promjeni osmolarnosti. Uz to, uklanjanjem GAG-a, dokazano je njihovo međudjelovanje s kolagenom pri kojem primarno mijenjaju valovitost kolagena. Tim, ali i drugim još uvijek neutvrđenim mehanizmima, PG/GAG-i značajno doprinose biomehaničkim svojstvima aorte. (Mattson i sur., 2017.) Narušeni sastav ekstracelularnog matriksa aorte svakako smanjuje viskoelastičnost tkiva i utječe na stvaranje pulzacijskog vala (Wagenseil i Mecham, 2009.). Održana tlakotvorna funkcija u tretirane životinje može se dijelom objasniti očuvanim integritetom i održanim viskoelastičnim svojstvima stijenke aorte. S obzirom na principe koji vrijede i za ekstracelularni matriks drugih arterija (Mattson i sur., 2017.), postojani sastav stijenke arterijskog sustava mogao bi objasniti odolijevanje čitavog sustava generaliziranom *okluzijskom/okluziji-sličnom* sindromu koji nastaje uslijed uklanjanja nadbubrežne žlijezde. Procjena ekspresije gena pokazala je veću ekspresiju NOS1 i NOS3 u BPC 157 tretiranim skupinama. Analiza gena pokazala povećanu je ekspresiju NOS1, NOS3 i VEGFa u BPC 157 tretiranih životinja u usporedbi s ekspresijom NOS1 i NOS3 u kontrolnim životinjama i housekeeping genom GAPDH, dok je ekspresija NOS2 uglavnom ostala nepromijenjena u usporedbi s kontrolnim skupinama. Životinje kontrolnih i BPC 157 tretiranih skupina pokazale su relativno povećanje ekspresije svih navedenih gena u usporedbi s housekeeping genom GAPDH. Ovo bi mogao biti specifičan učinak, na primjer, terapija koja je spriječila i rano i odgođeno neuralno oštećenje hipokampusu, postizući potpuni funkcionalni oporavak, neutraliziralo ishemijsku i reperfuzijsku ozljedu, što je pripisano pojačanoj ekspresiji gena Egr1, Akt1, Kras, Src, Foxo, Srf, VEGFR2, NOS3, i NOS1 kod štakora (Vukojevic i sur., 2020.). U interakciji s brojnim molekularnim putovima, ovo bi mogao biti dokaz da BPC 157 i NO-sustav održavaju funkciju endotela i suzbijaju trombozu u vaskularnim studijama (Vukojevic i sur., 2020., Sikiric i sur., 2022.), bez utjecaja na koagulacijske putove. Daljnji argumenti mogu uključivati modulatorne učinke pentadekapeptida BPC 157 na NO-sustav: BPC 157 je sam inducirao oslobađanje NO (tj. oponiranje hipertenzije i učinak L-NAME), ali i prilagodio učinak na prekomjernu stimulaciju NO (tj. oponiranje

hipotenzije i učinak L-arginina) (Sikiric i sur., 2014.) kontrolirajući vazomotorni tonus i aktivaciju puta Src-Caveolin-1-eNOS (Hsieh i sur., 2020.; Hsieh i sur., 2017.). Postoje i modulatorni učinci na sustav prostaglandina (Park i sur., 2020.; Sikiric i sur., 2013.), a BPC 157 je neutralizirao i toksičnost NSAID-a (Sikiric i sur., 2013.) i indometacinom induciranog sindroma propusnih crijeva (Park i sur., 2020). Konačno, BPC 157 bi mogao djelovati i putem povećanja ekspresije proteina ZO-1 tijesnog spoja i povećanja transepitelne otpornosti, inhibirajući mRNA medijatore upale (iNOS, IL-6, IFN γ i TNF- α) i povećanje ekspresije HSP 70 i 90, i antioksidativnih proteina, kao što su HO-1, NQO-1, glutation reduktaza, glutation peroksidaza 2 i GST-pi te bi se na taj bi način suzbio sindrom propusnih crijeva (Park i sur., 2020). Također, pojačani adrenalni stres izazvan ovim zahvatom oponaša promjene u ostatnoj nadbubrežnoj žlijezdi slične onima koji se pojavljuju u iznimnim stresnim događajima koje je Selye opisao kao “hipertrofiju i hiperemiju” nadbubrežne žlijezde. Te su se promjene pripisivale utjecaju povećanih količina ACTH (Szabo i sur., 2017.). Manje poznate studije opisuju da inervacija ostatne nadbubrežne žlijezde ima veću ulogu u prvim stadijima kompenzacije nego ACTH. Uklanjanjem inervacije u ostatnoj nadbubrežnoj žlijezdi izostale su akutne kompenzatorne morfološke promjene dok kod hipofizektomije to nije slučaj (Dallman i sur., 1984.). Ti nalazi indikativno nalažu da direktna stimulacija živaca ima bitnu ulogu u ranim kompenzacijskim fazama nakon unilateralne adenalektomije. Stimuliranjem adrenalne inervacije potakne se intenzivna vazodilatacija koja se doima NO-posredovanom (Breslow, 1992). Također, pentadekapeptid BPC 157 je povećao razinu NO-a, što ukazuje da su potencijalno isti mehanizmi prisutni u nadbubrežnoj žlijezdi, mozgu i želucu. Ovdje je opisan pretpostavljeni mehanizam regulacije NO-a na temelju dobivenih rezultata, a to je održavanje funkcije endotela, smanjivanje oštećenja nastalih stvaranjem ROS-eva te poticanje ekspresije NOS1, NOS3 i VEGFa. Međutim potrebne su daljnje studije s L-NAME, L-Argininom i drugim standardnim angiogenim faktorima rasta (PDGF, EGF, bFGF) da bi se dodatno opisali ti procesi.

7. Zaključci

Jednostrana adenalektomija izaziva periferne i centralne promjene krvnih žila koje su istovjetne onima koje se pojavljuju u kurativnoj jednostranoj adenalektomiji, ali i kod podvezivanja velikih krvnih žila i ostalih štetnih postupaka (Sikiric i sur., 2022.; Strbe i sur., 2021.; Barisic i sur., 2022.; Tepes i sur., 2021.; Smoday i sur., 2022.; Gojkovic i sur., 2021.). Opisane su promjene na razini NO i ROS unutar nadbubrežne žlijezde, mozga i želuca u akutnim fazama kompenzacije što dosad nije literaturno opisano u kontekstu jednostrane adenalektomije. Pentadekapeptid BPC 157 je neutralizirao ove promjene djelujući na male krvne žile i zaštitom endotela periferno i centralno na razini sustava NO. Molekularni putevi na koje djeluje pentadekapeptid BPC 157 nalaze se u nadbubrežnoj žlijezdi te ovi rezultati doprinose znanju regulacije krvotoka unutar nadbubrežne žlijezde. Osim fiziološkog i farmakološkog značaja, prikazani rezultati ukazuju na to da bi se pentadekapeptid BPC 157 mogao koristiti u humanoj jednostranoj adenalektomiji u svrsi neutraliziranja komplikacija, međutim potrebni su rezultati dodatnih bazičnih i kliničkih studija da opišu mogućnost terapije pentadekapeptidom BPC 157 u kontekstu bolesti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Daljnje studije s L-NAME i s L-Argininom će pobliže opisati regulaciju krvotoka na razini sustava NO koji se pokazao kao najbitniji čimbenik održavanja krvotoka unutar nadbubrežne žlijezde. FTIR spektroskopijom pokazana je značajna

promjena sastava stijenke aorte BPC-om tretiranog štakora. Analiza vrpca u kojima su nađene najveće razlike upućuje na održanje integriteta stijenke zahvaljujući očuvanju glavnih elemenata ekstracelularnog matriksa: kolagena, elastina i proteoglikana. Budući da su navedene sastavnice ključne u biomehanici aorte i stvaranju pulzacijskog vala, ovo je pretpostavljen mehanizam održavanja arterijskog tlaka i adekvatne perfuzije. U kontekstu budućih istraživanja valja napomenuti i veliku vrijednost FTIR spektroskopije kao dosad slabo korištene metode za promatranje promjena na razini aorte uslijed davanja farmakološkog agensa.

8. Zahvale

Zahvalili bismo prvo našem mentoru prof. dr. sc. Predragu Sikiriću na mudrosti, znanju i resursima s kojima smo odradili ovaj rad. Zahvale i izv. prof. dr. sc. Ozrenu Gamulinu za iznimnu podršku i strpljenje pri primjeni spektroskopije aorte. Dr.sc. Josipa Vlainić za podršku pri primjeni kvantifikacijskih metoda procjene NO i ROS. Dr.sc. Marija Milavić i dr.sc. Sunčana Sikirić za podučavanje i pomoć pri primjeni analize ekspresije gena unutar nadbubrežne žlijezde. Prof. dr. sc. Aniti Škrtić za pomoć pri izrađivanju i interpretaciji patohistoloških nalaza. Zahvaljujemo se i našem tehničaru Ivanu Gržibovskom na pomoći u izvođenju eksperimenata.

9. Popis literature

Barisic I, Balenovic D, Udovicic M i sur. P. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 May Counteract Myocardial Infarction Induced by Isoprenaline in Rats. *Biomedicines*. 2022 Jan 26;10(2):265.

Breslow MJ. Regulation of adrenal medullary and cortical blood flow. *Am J Physiol*. 1992 May;262(5 Pt 2):H1317-30.

Camacho NP, West P, Torzilli PA, Mendelsohn R. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers*. 2001;62(1):1-8.

Chui, C.J.; McArdle, A.H.; Brown, R. i sur. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. *Arch. Surg*. 1970, 101, 478–483.

Dallman MF. Control of adrenocortical growth in vivo. *Endocr Res*. 1984-1985;10(3-4):213-42.

Di Dalmazi G, Berr CM, Fassnacht M i sur. Adrenal function after adrenalectomy for subclinical hypercortisolism and Cushing's syndrome: a systematic review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Aug;99(8):2637-45.

Dreissig I, Machill S, Salzer R, Krafft C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2009 Jan;71(5):2069-75.

Duzel A, Vlainic J, Antunovic M i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in the treatment of colitis and ischemia and reperfusion in rats: New insights. *World J Gastroenterol*. 2017 Dec 28;23(48):8465-8488.

- Gamulin O, Oroz K, Coric L i sur.. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Reveals Molecular Changes in Blood Vessels of Rats Treated with Pentadecapeptide BPC 157. *Biomedicines*. 2022 Dec 4;10(12):3130.
- Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. *Patofiziologija*. 8.ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
- Ghadie NM, St-Pierre JP, Labrosse MR. The Contribution of Glycosaminoglycans/Proteoglycans to Aortic Mechanics in Health and Disease: A Critical Review. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2021 Dec;68(12):3491-3500.
- Gojkovic S, Krezic I, Vranes H i sur. Robert's Intragastric Alcohol-Induced Gastric Lesion Model as an Escalated General Peripheral and Central Syndrome, Counteracted by the Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. *Biomedicines*. 2021 Sep 23;9(10):1300.
- Henry JF, Defechereux T, Raffaelli M i sur.. Complications of laparoscopic adrenalectomy: results of 169 consecutive procedures. *World J Surg*. 2000 Nov;24(11):1342-6.
- Hsieh MJ, Lee CH, Chueh HY i sur. Modulatory effects of BPC 157 on vasomotor tone and the activation of Src-Caveolin-1-endothelial nitric oxide synthase pathway. *Sci Rep*. 2020 Oct 13;10(1):17078.
- Hsieh MJ, Liu HT, Wang CN, i sur. Therapeutic Potential of Pro- Angiogenic BPC157 Is Associated With VEGFR2 Activation and Up-Regulation. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(3):323–333.
- Jackson M, Choo LP, Watson PH i sur. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Jan 25;1270(1):1-6.
- Jastrzebska M, Zalewska-Rejda J, Mróz I i sur. Atomic force microscopy and FT-IR spectroscopy investigations of human heart valves. *Gen Physiol Biophys*. 2006 Sep;25(3):231-44.
- Katzung, Bertram G.. *Basic & clinical pharmacology*. 14th New York: McGraw-Hill, 2018.
- Kazarian SG, Chan KL. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1758(7):858-67.
- Lane, J.S.; Todd, K.E.; Lewis, M.P. i sur. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery* 1997, 122, 288–294.
- Luetic K, Sucic M, Vlajic J i sur. Cyclophosphamide induced stomach and duodenal lesions as a NO-system disturbance in rats: L-NAME, L-arginine, stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Inflammopharmacology*. 2017 Apr;25(2):255-264.
- Mattson JM, Turcotte R, Zhang Y. Glycosaminoglycans contribute to extracellular matrix fiber recruitment and arterial wall mechanics. *Biomech Model Mechanobiol*. 2017 Feb;16(1):213-225.

Muszbek L, Csaba B, Kovács K. The effect of adrenalectomy on protease sensitivity and anaphylactic protease production in the rat. *Acta Allergol.* 1971 Aug;26(4):308-14.

Park JM, Lee HJ, Sikiric P, Hahm KB. BPC 157 Rescued NSAID-cytotoxicity Via Stabilizing Intestinal Permeability and Enhancing Cytoprotection. *Curr Pharm Des.* 2020;26(25):2971-2981.

Perovic D, Milavic M, Dokuzovic S i sur. Novel Therapeutic Effects in Rat Spinal Cord Injuries: Recovery of the Definitive and Early Spinal Cord Injury by the Administration of Pentadecapeptide BPC 157 Therapy. *Curr Issues Mol Biol.* 2022 Apr 27;44(5):1901-1927.

Pich, Henryk, Axel R. Heller. "Obstruktiver Schock." *Der Anaesthesist* 64 (2015): 403-419.

Poon YY, Tsai CY, Cheng CD i sur. Endogenous nitric oxide derived from NOS I or II in thoracic spinal cord exerts opposing tonic modulation on sympathetic vasomotor tone via disparate mechanisms in anesthetized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 Sep 1;311(3):H555-62.

Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology.* 1979 Sep;77(3):433-43.

Rudež LK. Uloga FTIR spektroskopije u ranoj dijagnostici glaukoma [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2021

Servaty R, Schiller J, Binder H, Arnold K. Hydration of polymeric components of cartilage--an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Int J Biol Macromol.* 2001 Jan 10;28(2):121-7.

Sikiric P, Skrtic A, Gojkovic S i sur. Cytoprotective gastric pentadecapeptide BPC 157 resolves major vessel occlusion disturbances, ischemia-reperfusion injury following Pringle maneuver, and Budd-Chiari syndrome. *World J Gastroenterol.* 2022 Jan 7;28(1):23-46.

Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L i sur. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Des.* 2010;16(10):1224-34.

Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Pharm Des.* 2013;19(1):76-83.

Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R i sur.. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des.* 2011;17(16):1612-32.

Singh, Bal R. "Infrared analysis of peptides and proteins : principles and applications." (1999).

Smoday IM, Petrovic I, Kalogjera L i sur. Therapy Effect of the Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 on Acute Pancreatitis as Vascular Failure-Induced Severe Peripheral and Central Syndrome in Rats. *Biomedicines*. 2022; 10(6):1299.

Soriano RN, Ravanelli MI, Batalhao ME i sur.. Glucocorticoids downregulate systemic nitric oxide synthesis and counteract overexpression of hepatic heme oxygenase-1 during endotoxin tolerance. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013 Oct;91(10):861-5.

Strbe S, Gojkovic S, Krezic I i sur. Over-Dose Lithium Toxicity as an Occlusive-like Syndrome in Rats and Gastric Pentadecapeptide BPC 157. *Biomedicines*. 2021 Oct 20;9(11):1506.

Szabo S, Gallagher GT, Horner HC i sur. Role of the adrenal cortex in gastric mucosal protection by prostaglandins, sulfhydryls, and cimetidine in the rat. *Gastroenterology*. 1983 Dec;85(6):1384-90.

Szabo S, Pihan G. Development and significance of cysteamine and propionitrile models of duodenal ulcer. *Chronobiol Int*. 1987;4(1):31-42.

Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology*. 1985 Jan;88(1 Pt 2):228-36.

Szabo S, Yoshida M, Filakovszky J, Juhasz G. "Stress" is 80 Years Old: From Hans Selye Original Paper in 1936 to Recent Advances in GI Ulceration. *Curr Pharm Des*. 2017;23(27):4029-4041.

Szabó C, Thiemermann C, Vane JR. Inhibition of the production of nitric oxide and vasodilator prostaglandins attenuates the cardiovascular response to bacterial endotoxin in adrenalectomized rats. *Proc Biol Sci*. 1993 Sep 22;253(1338):233-8.

Twardowski, Jacek, Pavel Anzenbacher and M. R. Masson. "Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry." (1994).

Tepes M, Gojkovic S, Krezic I i sur. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 Therapy for Primary Abdominal Compartment Syndrome in Rats. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 13;12:718147.

Vukojević J, Vrdoljak B, Malekinušić D, i sur. The effect of pentadecapeptide BPC 157 on hippocampal ischemia/reperfusion injuries in rats. *Brain Behav*. 2020;10(8):e01726.

Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*. 2009 Jul;89(3):957-89.

Wexler BC, Kittinger GW. STEROIDS PRODUCED IN VITRO BY ADRENAL GLANDS OF NORMAL AND ARTERIOSCLEROTIC RATS DURING AND AFTER DRUG-INDUCED MYOCARDIAL NECROSIS.

Circ Res. 1965 Apr;16:322-31. Wight TN. Vessel proteoglycans and thrombogenesis. Prog Hemost Thromb. 1980;5:1-39.

10. Sažetak

Uvod: Jednostrana adrenalektomija je kirurški zahvat koji se koristi u eksperimentalnim i terapijskim kontekstima. Pretpostavljeno je da će izazivati sindrom zatajivanja žila s posljedičnom multiorganskom disfunkcijom. Pentadekapeptid BPC 157 pokazao je blagotvorne učinke na mnogo patoloških stanja, protektivnim djelovanjem na endotel i otvaranjem kolaterala, te bi mogao biti učinkovit u neutraliziranju sindroma izazvanog jednostranom adrenalektomijom

Metode: Jednostrana adrenalektomija je provedena na bijelim Wistar muškim štakorima. Kontrolne životinje su primile fiziološku otopinu dok su tretirane životinje primile otopinu pentadekapeptida intraperitonealno.

Na 15 min, 5 sati i 24 sata od operacije promatrani su idući parametri: makroskopska, mikroskopska, funkcijska, molekularna evaluacija i fizikalna FTIR spektroskopija.

Rezultati: Makroskopska procjena pokazala je kongestije vena, srca i nadbubrežne žlijezde. Venski tlakovi su narasli dok se aortni spustio ispod fizioloških razina. EKG je pokazao produljenje QTc intervala. Povećana je razina fenomena povezanih sa zatajenjem žila na patohistološkoj razini. Nađena ROS razina je povećana te su se povećale ekspresije ciljanih gena povezanih s funkcijom krvnih žila u nadbubrežnoj žlijezdi. Pentadekapeptid je imao blagotvorne učinke na sve navedene opise djelujući na razine NO-a, stimulirajući sintezu NOS1, NOS3 i VEGFa.

Zaključci: Jednostrana adrenalektomija izazvala je periferni i centralni poremećaj žila. Pentadekapeptid BPC 157 je neutralizirao poremećaj preko svojih modulatornih učinaka na NO sustav.

Ključne riječi: Eksperimentalna kirurgija; Ekspresija gena; FTIR spektroskopija; Pentadekapeptid BPC 157

11. Summary

Introduction: Unilateral adrenalectomy is a surgical procedure used in experimental and human contexts. It is hypothesized that it will cause a syndrome of vascular failure with consequent multiorgan dysfunction. Pentadecapeptide BPC 157 has shown to have beneficial effects on various pathological states by protecting the endothelium with collaterals and could be effective in neutralizing the syndrome caused by unilateral adrenalectomy.

Methods: Unilateral adrenalectomy was done on white male Wistar rats. Control animals got a saline solution, while the treated group got a pentadecapeptide BPC 157 solution intraperitoneally. The following parameters were observed at 15 min, 5 hours and 24 hours after surgery and treatment: macroscopic, microscopic, functional, molecular and physical FTIR spectroscopy evaluation

Results: Macroscopic evaluation showed signs of venous, heart and adrenal congestion. Venous pressures rose, while aortic pressure fell below physiologic values. ECG analysis showed prolongation of QTc interval. Vascular failure related phenomena was evident pathohistologically. ROS levels were elevated and selected genes were affected. Pentadecapeptide had beneficial effects on all of the mentioned descriptions, elevating the NO levels in tissues by upregulating NOS1, NOS3 and VEGFa.

Conclusions: Unilateral adrenalectomy caused peripheral and central vascular dysfunction. Pentadecapeptide BPC 157 had beneficial effects through its modulation of the NO system.

Key words: Experimental surgery; Gene expression; FTIR spectroscopy; Pentadecapeptide BPC 157