

UTJECAJ PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA OSJETLJIVOST ROŽNICE ŠTAKORA NAKON TOPIČKE PRIMJENE LOKALNIH ANESTETIKA

Mirković, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:038818>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Mirković

UTJECAJ PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA OSJETLJIVOST
ROŽNICE ŠTAKORA NAKON TOPIČKE PRIMJENE LOKALNIH
ANESTETIKA

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Mirković

UTJECAJ PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA OSJETLJIVOST
ROŽNICE ŠTAKORA NAKON TOPIČKE PRIMJENE LOKALNIH
ANESTETIKA

Doktorska disertacija



Osijek, 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Antonio Kokot, dr. med.

Komentor rada: prof. dr. sc. Predrag Sikirić, dr. med.

Rad ima 60 listova.

Disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ona predstavlja dijelove znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske „Pentadekapeptid BPC 157 – daljnja istraživanja“ (broj projekta: 108-1083570-3635, voditelj prof. dr. sc. Predrag Sikirić) te projekta „*VIF2017-MEFOS-17*“ Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (voditelj doc. dr. sc. Antonio Kokot).

ZAHVALA

Na početku ovog rada želim zahvaliti osobama koje su mi pomogle u njegovoj izradi.

Kao prvo, mentoru doc. dr. sc. Antoniju Kokotu na mentorstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije, energiji uloženoj u ovaj rad, na bezbrojnim danima i noćima našeg zajedničkog rada koji su na kraju rezultirali ovom disertacijom. Komentoru prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, čije bogato iskustvo je dalo nezamjenjiv doprinos u ovome radu, na entuzijazmu i idejama koje su usmjeravale istraživanje.

Djelatnicima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, osobito Ivanu Gržibovskom na pomoći pri radu sa životinjama.

Kolegama u Općoj bolnici „Dr. J. Benčević“ u Slavonskom Brodu, za razumijevanje i što su uskakali uvijek kada mi je to bilo potrebno.

Djelatnicima Medicinskog fakulteta u Osijeku na strpljenju i uvažavanju mojih brojnih zamolbi i zahtjeva – ni bez toga ova disertacija ne bi bila završena u ovom obliku.

Svojoj obitelji, supruzi Emiliji, djeci Barbari i Božidaru, na strpljenju i potpori, uz isprike za čestu odsutnost iz kuće, bilo tijelom ili duhom. Sve propušteno pokušat ću vam nadoknaditi u budućnosti. Roditeljima Magdi i pokojnom Ivanu, sestri Ivani i bratu Tomislavu, jer sam od njih i uz njih naučio koji je ispravan put u životu...

Svatko od vas je dodao barem jednu kockicu u izgradnji ovog rada – HVALA VAM!

SADRŽAJ

| | |
|---|------|
| POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU..... | vii |
| POPIS SLIKA U RADU..... | viii |
| POPIS TABLICA U RADU..... | x |
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Lokalni anestetici..... | 1 |
| 1.2. Rožnica i anestezija rožnice..... | 4 |
| 1.3. Pentadekapeptid BPC 157..... | 7 |
| 1.4. Dušikov oksid..... | 8 |
| 1.5. Prikaz problema..... | 10 |
| 1.5.1. Osjetljivost rožnice..... | 10 |
| 1.5.2. Oštećenje rožnice lokalnim anesticima..... | 11 |
| 1.5.3. Utjecaj lokalnih anestetika na vlažnost rožnice..... | 12 |
| 2. HIPOTEZA..... | 13 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... | 14 |
| 4. MATERIJALI I METODE..... | 15 |
| 4.1. Ustroj studije..... | 15 |
| 4.2. Priprema i eksperimentalne životinje..... | 15 |
| 4.3. Lijekovi korišteni u pokusu..... | 17 |
| 4.4. Metode..... | 18 |
| 4.5. Statističke metode..... | 22 |
| 5. REZULTATI..... | 24 |
| 6. RASPRAVA..... | 37 |
| 7. ZAKLJUČAK..... | 42 |
| 8. SAŽETAK..... | 44 |
| 9. SUMMARY..... | 46 |
| 10. LITERATURA..... | 48 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 58 |

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU

| | |
|-----------|--|
| n. = | živac, lat. nervus |
| art. = | arterija |
| BPC = | tjelesna zaštitna tvar, engl. Body Protection Compound |
| BPC 157 = | pentadekapeptid BPC 157, aktivni dio BPC-ja |
| NO = | dušikov oksid |
| NOs = | sintetaza dušikovog oksida |
| L-NAME = | N(G)-nitro-L-arginin metil ester |
| L-arg = | L-arginin |
| cGMP = | ciklički guanozin monofosfat |
| NADPH = | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |

MJERNE JEDINICE KORIŠTENE U TEKSTU

| | |
|------|------------|
| µg = | mikrogram |
| mg = | miligram |
| g = | gram |
| kg = | kilogram |
| mm = | milimetar |
| cm = | centimetar |
| ml = | mililitar |

POPIS SLIKA U RADU

| | |
|---|----|
| <i>Slika 1.1. Struktura molekule amidnog i esterskog lokalnog anestetika</i> | 1 |
| <i>Slika 1.2. Anatomija oka</i> | 5 |
| <i>Slika 1.3. Senzorna inervacija oka</i> | 6 |
| <i>Slika 1.4. Proces nastajanja NO iz L-arginina i molekularnog kisika</i> | 9 |
| <i>Slika 4.1. Cochet-Bonnet esteziometar</i> | 18 |
| <i>Slika 4.2. Testiranje osjetljivosti rožnice štakora pomoću djelomično izvučene niti esteziometra</i> | 19 |
| <i>Slika 4.3. Krivulja osjetljivosti rožnice mjerena esteziometrom</i> | 20 |
| <i>Slika 4.4. Ocjenjivanje oštećenja rožnice korištenjem biomikroskopa - ilustracija</i> | 22 |
| <i>Slika 5.1. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina tetrakain, skupina BPC 157</i> | 27 |
| <i>Slika 5.2. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina tetrakain, skupine L-arg i L-arg + BPC 157</i> | 28 |
| <i>Slika 5.3. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina tetrakain, skupine L-NAME i L-NAME + BPC 157</i> | 28 |
| <i>Slika 5.4. Podskupina tetrakain. Učinak pojedinih testiranih tvari na krivulju osjetljivosti rožnice</i> | 29 |
| <i>Slika 5.5. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina oksibuprokain, skupina BPC 157</i> | 30 |
| <i>Slika 5.6. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina oksibuprokain, skupine L-arg i L-arg + BPC 157</i> | 31 |
| <i>Slika 5.7. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina oksibuprokain, skupine L-NAME i L-NAME + BPC 157</i> | 31 |
| <i>Slika 5.8. Podskupina oksibuprokain. Učinak pojedinih testiranih tvari na krivulju osjetljivosti rožnice</i> | 32 |
| <i>Slika 5.9. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, kontrola</i> | 33 |
| <i>Slika 5.10. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina BPC 157</i> | 33 |
| <i>Slika 5.11. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-arginin</i> | 34 |

Slika 5.12. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-arginin + BPC....34

Slika 5.13. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-NAME.....35

Slika 5.14. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-NAME + BPC....35

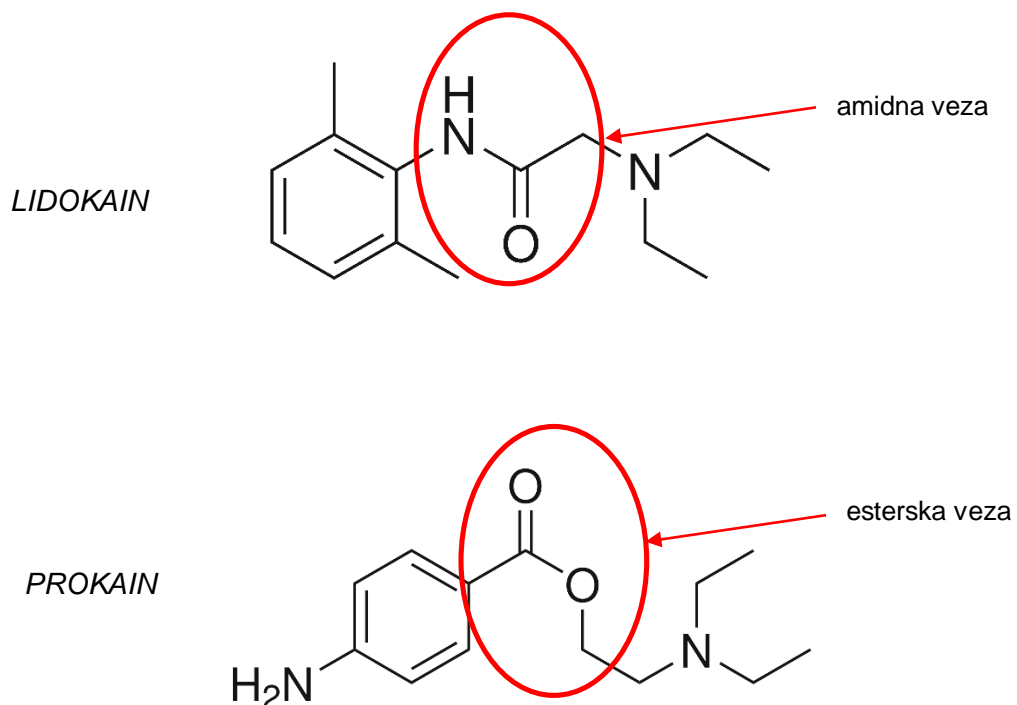
POPIS TABLICA U RADU

| | |
|---|-----------|
| <i>Tablica 1.1. Podjela lokalnih anestetika po duljini djelovanja.....</i> | <i>3</i> |
| <i>Tablica 4.1. Skupine ispitanika.....</i> | <i>16</i> |
| <i>Tablica 4.2. Konverzija izmjerenih vrijednosti duljine niti u pritisak (modificirano iz Uputa za korištenje esteziometra).....</i> | <i>19</i> |
| <i>Tablica 4.3. Ocjenjivanje oštećenja rožnice biomikroskopom.....</i> | <i>21</i> |
| <i>Tablica 5.1. Utjecaj testiranih tvari (BPC 157, L-arginin, L-NAME i njihovih kombinacija) na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) izazvane tetrakainom i duljinu vremenskog intervala u kojem se osjetljivost vratila na početne vrijednosti (T2).....</i> | <i>24</i> |
| <i>Tablica 5.2. Utjecaj testiranih tvari (BPC 157, L-arginin, L-NAME i njihovih kombinacija) na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) izazvane oksibuprokainom i duljinu vremenskog intervala u kojem se osjetljivost vratila na početne vrijednosti (T2).....</i> | <i>25</i> |
| <i>Tablica 5.3. Podskupina anestezirana tetrakainom. Utjecaj BPC-ja na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) i na vrijeme povratka početne osjetljivosti (T2) kod skupina s destiliranom vodom, L-argininom i L-NAMEom.....</i> | <i>25</i> |
| <i>Tablica 5.4. Podskupina anestezirana oksibuprokainom. Utjecaj BPC-ja na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) i na vrijeme povratka početne osjetljivosti (T2) kod skupina s destiliranom vodom, L-argininom i L-NAMEom.....</i> | <i>26</i> |
| <i>Tablica 5.5. Schirmerov test nakon topičke aplikacije tetrakaina na rožnicu štakora.....</i> | <i>36</i> |

1. UVOD

1.1. Lokalni anestetici

Lokalni anestetici su lijekovi koji se koriste za prevenciju i liječenje akutne, upalne, maligne ili kronične boli (1). Molekula lokalnog anestetika sastoji se od tercijarnog (rijetko sekundarnog) amina koji je povezan s aromatičnim prstenom putem lanca koji sadrži ili estersku ili amidnu vezu (2) (slika 1.1.).



Slika 1.1. Struktura molekula aminoamidnog i aminoesterskog lokalnog anestetika

Prema kemijskom sastavu, lokalne anestetike klasificiramo kao aminoesterske ili aminoamidne. Aminoesterski se razgrađuju putem plazmatskih kolinesteraza, a amidni enzimatskom degradacijom u jetri. Mehanizam njihovog djelovanja je putem privremene blokade ulaska natrija u živčane aksone čime sprječavamo nastanak akcijskih potencijala u njima (3). Sprječavanjem nastanka akcijskih potencijala, lokalni anestetici sprječavaju provođenje električnih impulsa na živčanim ili mišićnim membranama. Nakon aplikacije lokalni anestetik mora proći od mjesta na koje je

primijenjen kroz perineuralno tkivo do aksonalne membrane. Tek ako tamo ima dovoljnu koncentraciju za prolaz u lipidni sloj aksona živca, učinkovito će blokirati provođenje impulsa (4). Možemo ih primjeniti topički na sluznicu koju želimo anestetizirati, injekcijama u blizinu perifernih živčanih završetaka, u blizinu većih živaca ili živčanih snopova ili u epiduralni, subarahnoidalni ili drugi prostor kojim prolaze osjetna živčana vlakna.

Za klasifikaciju i metabolizam lokalnih anestetika važna je intermedijarna veza, no fizikalnokemijska svojstva (npr. potentnost, početak i duljinu djelovanja) određuje alkilna supstitucija na aromatskom prstenu ili na aminu i naboj tercijarnog amina. Općenito, stupanj topljivosti u lipidima pokazuje pozitivnu korelaciju s potentnošću lokalnih anestetika tako da su lokalni anestetici topljiviji u mastima, potentniji od onih manje topljivih. No situacija nije tako jednostavna pa osim topljivosti u mastima na fizikalnokemijska, a time i farmakokinetička svojstva lokalnih anestetika, utječu i drugi faktori, npr. vazodilatatorna svojstva anestetika i karakteristike tkiva u koje je lokalni anestetik primijenjen. Valja spomenuti i pK_a lokalnog anestetika i pH otopine u kojoj je anestetik otopljen kao faktore koji utječu na brzinu početka djelovanja te trajanje blokade. Oni nam govore o stupnju ioniziranosti lokalnog anestetika u tkivu, što je direktno povezano s brzinom difuzije kroz živčanu ovojnicu i membranu. Općenito lokalni anestetici imaju pK_a između 7,6 i 9,1, znači nešto viši od tkivnog pH. Lokalni anestetici koji imaju niži pK_a (sličniji tkivnom pH) manje su ionizirani te bolje penetriraju u tkiva i brže počinju djelovati. Na duljinu djelovanja lokalnih anestetika utječe i njihova sposobnost za vezanje na proteine. Kao što je već ranije spomenuto, lokalni anestetici djeluju vezanjem za membranske proteine koji imaju funkciju receptora na natrijskom kanalu živčane membrane. Mjerenjem vezanja lokalnog anestetika za proteine plazme, možemo aproksimirati stupanj vezanja za membranske proteine. Jače vezanje za proteine u plazmi znači jače vezanje za proteine na membrani i dulje trajanje blokade natrijskog kanalića, što dovodi do dulje anestezije (2). Prema duljini djelovanja, lokalni anestetici mogu se podijeliti na kratkodjelujuće, srednjedugodjelujuće i dugodjelujuće (tablica 1.1.).

Tablica 1.1. Podjela lokalnih anestetika po duljini djelovanja

| Kratkodjeljujući | Srednjedugodjeljujući | Dugodjeljujući |
|------------------|-----------------------|----------------|
| Prokain | Lidokain | Tetrakain |
| Kloroprokain | Mepivakain | Bupivacain |
| | Prilokain | Ropivacain |
| | | Etidokain |

Osim o vrsti lokalnog anestetika, trajanje lokalne anestezije ovisi o njegovoj dozi, dijelu tijela gdje je primijenjen i aditivima koji mu se mogu dodati. Najčešći aditivi koji se dodaju lokalnom anestetiku su vazokonstriktori (adrenalin, klonidin, dexmedetomidin). Njihovim dodavanjem smanjuje se sistemska apsorpcija i time produljuje lokalno djelovanje lokalnih anestetika. Oni nisu bez nuspojava – lokalno mogu nastati vazokonstrikcija i ishemija dijela tijela, ali i živčanog vlakna s mogućim trajnim posljedicama. Njihove nuspojave mogu nastati i sistemski, prije svega sistemski vazokonstriktorni učinak čime se može ugroziti bolesnika. Sljedeći po učestalosti su opijati (buprenorfin, morfij, fentanil i drugi) koji djeluju na periferne opijatske receptore i time produljuju djelovanje lokalnih anestetika na aksonskim membranama. Dodavanje opijata na periferiju može izazvati slične nuspojave kao sistemsko davanje – npr. pruritus, mučninu, povraćanje ili opstipaciju. Nakon dodavanja antiinflamatornih aditiva (npr. deksametazona) vidljiva je dulja anestezija. Nije poznato je li to učinak na perifernim živcima ili rezultat sistemske apsorpcije i protuupalnog djelovanja. Mogu se dodavati i NMDA antagonisti (ketamin, magnezij), inhibitor acetilkolinesteraze (neostigmin) ili rjeđe neki drugi lijekovi, svi s ciljem produljenja djelovanja i s mogućim lokalnim i sistemskim nuspojavama. Svi spomenuti aditivi dodaju se za ubrzanje početka djelovanja lokalnih anestetika, za usporenje apsorpcije, pojačanje intenziteta djelovanja ili produljenje trajanja lokalne anestezije (5).

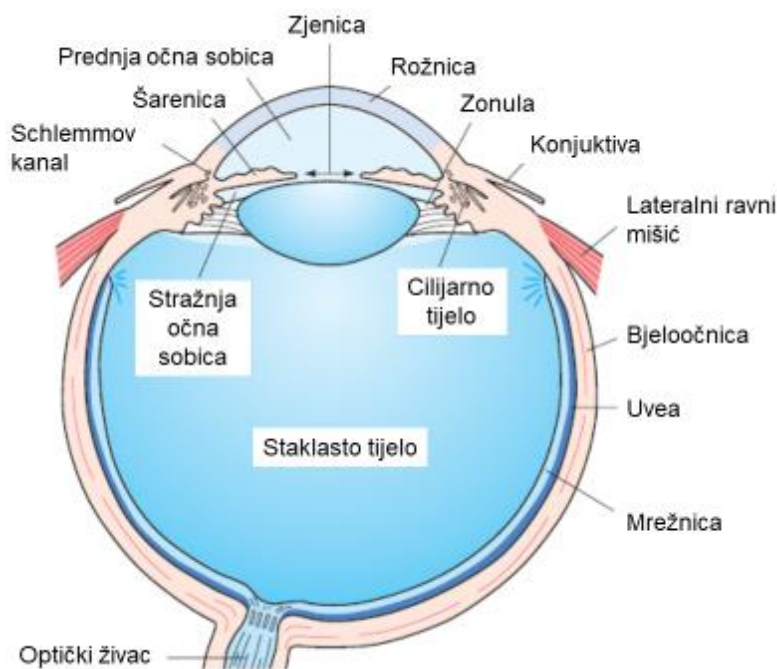
Sistemska toksičnost lokalnih anestetika je stanje koje nastaje sistemskom apsorpcijom veće količine lokalnog anestetika nego je previđeno planom anestezije. Povećana koncentracija lokalnog anestetika u cirkulaciji dovodi najčešće do kardiovaskularnih komplikacija i komplikacija središnjeg živčanog sustava koje mogu biti i životno ugrožavajuće. Kliničke manifestacije takve toksičnosti su od osjećaja utrnulosti jezika, smetenosti, poremećaja vida, poremećaja srčanog ritma do težih

poremećaja svijesti i respiratornog aresta (1). Stupanj sistemske toksičnosti ovisi o apliciranoj dozi, brzini primjene, lokaciji primjene te bolesnikovom stanju i dobi prilikom aplikacije.

1.2. Oko, rožnica i topička anestezija rožnice

Oči su smještene u koštane udubine u prednjem dijelu lubanje koje zovemo orbite. Orbita je kruškolika oblika i volumena je otprilike 30 ml. Sa stražnje strane orbite su koštani otvori kroz koje u oko ulaze optički živac, oftalmičke arterija i vena te drugi kranijalni živci koji motorno, simpatički i senzorno inerviraju orbitu i oko. Veći dio orbite ispunjava očna jabučica, kuglasta struktura promjera oko 24 mm. Zid očne jabučice sastoji se od tri sloja – vanjska ovojnica je sklera (bjeloočnica), srednja uvea i unutarnja retina (mrežnica). Središte očne jabučice ispunjeno je staklastim tijelom, prozirnom želatinoznom tvari koje ispunjava otprilike 80% očne jabučice (1). Na vanjsku očnu ovojnicu vežu se vanjski očni mišići zaduženi za pokretanje oka.

Rožnica je prozirni dio vanjske očne ovojnice, smještena je u prednjem dijelu oka i promjera 11-12 mm. Rožnica, zajedno s lećom, čini refrakcijski sustav oka na kojem se prelama svjetlo pri ulasku u oko. Prednja i stražnja strana rožnice nisu jednako zakrivljene pa, u stvari, ima funkciju optičke leće jakosti oko 43 dioptrije. Izvana je u kontaktu sa zrakom, a iznutra s očnom vodicom. Osim refrakcijske, ima i funkciju zaštitne barijere infekcijama i traumi (6, 7).



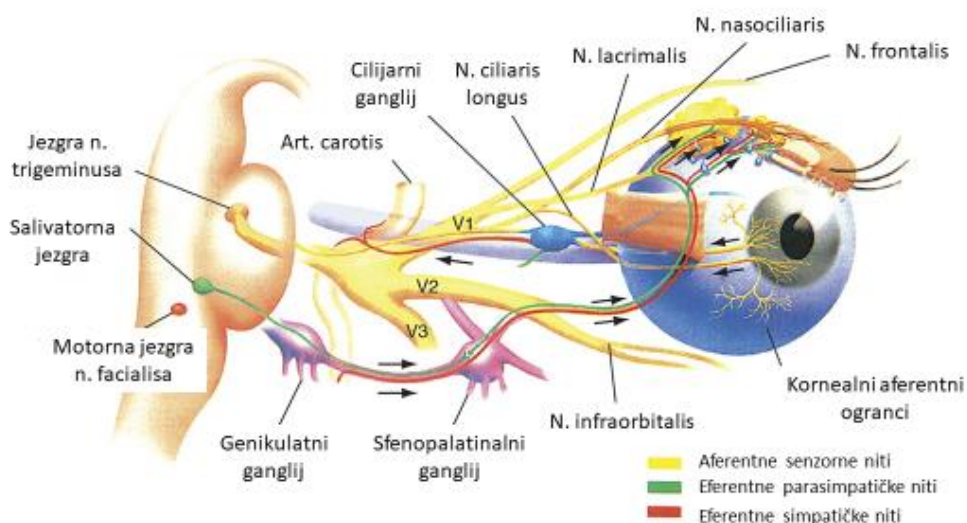
Slika 1.2. Anatomija oka

(reproducirano i modificirano uz dopuštenje izdavača. Longnecker DE, ur. Anesthesiology. New York: The McGraw-Hill Companies, 2008. Sl. 65.1, Anatomy of the eye; str. 1559) (1)

Za normalnu funkciju i prozirnost rožnice, kao i cijelog oka, nužno je održavati njezinu vlažnost. Za to služe suze, za čiju su proizvodnju zadužene suzne žlijezde. Vlažnost rožnice mjerimo Schirmerovim testom – postavljanjem filter papira standardiziranih dimenzija u konjunktivalni forniks. Nakon određenog vremenskog intervala (najčešće je to 5 minuta) možemo očitati koliki dio papira je vlažan i time posredno dobijemo mjeru vlažnosti rožnice (7). Ako Schirmerov test, po ranije opisanom protokolu, očitamo nakon aplikacije lokalnih anestetika to nazivamo Schirmer II test. Njime mjerimo „bazalnu“ produkciju suza.

Svu inervaciju oka provode kranijalni živci. Optički živac je senzorni živac i nosi informacije s fotoreceptora iz retine u više moždane strukture. Motornu inervaciju vanjskih mišića oka vrše okulomotorni živac, trohlearni živac i abducens, dok za unutarnje očne mišiće simpatičke i parasimpatičke niti nose okulomotorni i trigeminalni živac (1).

Senzorna inervacija rožnice, kao i cijelog oka vrši se putem oftalmičke grane trigeminalnog živca (8).



Slika 1.3. Senzorna inervacija oka

(reproducirano i modificirano uz dopuštenje izdavača. Pflugfelder SC. Tear dysfunction and the cornea: LXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol. 2011; Slika 2, Integrated lacrimal function unit;.str 902.) (9)

Obzirom da su njegovi završni senzorni ogranci tanki i povoljno locirani, u svakodnevnoj kliničkoj praksi za kratkotrajnu anesteziju rožnice prilikom izvođenja raznih bolnih zahvata na prednjem segmentu oka dovoljno je topički aplicirati lokalne okularne anestetike. Lokalni okularni anestetici dovode do izostanka osjetljivosti rožnice na manipulaciju poput dodira i zarezivanja (10, 11). Najčešće korišteni lokalni anestetici za anesteziju rožnice su proparakain, tetrakain, oksibuprokain i lidokain (11). Kako topički primijenjeni lokalni anestetici dovode do relativno kratkotrajne anestezije ovakva vrsta anestezije prikladna je za jednostavne zahvate na prednjem dijelu oka, za operatere kojima ne smeta pomicanje oka za vrijeme zahvata i za pacijente koji dobro surađuju (1).

1.3. Pentadekapeptid BPC 157

Želučani pentadekapeptid BPC 157 (sinonimi: PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva) dio je citoprotektivnog i organoprotektivnog želučanog proteina nazvanog BPC (engl. Body Protection Compound). Inicijalna istraživanja BPC-ja 157 pokazala su njegov gastroprotektivni i antiulkusni učinak – oštećenja želučane sluznice uspješno se preveniraju i saniraju nakon sistemskog tretmana BPC-jem 157 bez obzira koji je uzrok doveo do oštećenja – kemijski agens (etanol), protuupalni lijekovi (indometacin) ili stresno stanje (12 - 15). Kasnije je pokazano njegovo blagotvorno djelovanje na brojne crijevne bolesti i stanja: kod modela kemijski izazvane upalne bolesti crijeva BPC 157 uspješno je umanjio ili posve sanirao oštećenja sluznice i upalnu reakciju na debelom crijevu (16 - 18). Kod fistula gastrointestinalnog trakta s kožom, bez obzira je li primijenjen peroralno ili sistemski, BPC 157 ubrzava cijeljenje (19, 20). Sindrom kratkog crijeva kod štakora dovodi do gubitka tjelesne mase. Primjenom BPC-ja 157 tjelesna masa štakora počela je rasti, crijevne resice su postale dulje, kripte u crijevima dublje, a mišići crijeva deblji (21). Pokazano je i njegovo povoljno djelovanje na cijeljenje rana: rane od opekline ubrzano cijele nakon topičke aplikacije kreme s BPC-jem 157 (22, 23). Kod ozljeda Ahilove tetive značajno se povećava Achilles functional index (AFI; indeks koji opisuje funkciju Ahilove tetive) nakon primjene BPC-ja 157 te se uvećava broj monocita, fibroblasta, retikulina i kolagena u ozlijeđenom području što sve govori u prilog ubrzanog cijeljenja tetive (24 - 26). Nakon crush ozljeda mišića, kao i kod transekcije mišića, BPC 157 poboljšao je cijeljenje i makroskopski (manje hematoma i edema, manje kontraktura udova) i mikroskopski (između ozlijeđenih mišićnih segmenata nastaje više mišićnih vlakana, pojačava se dezminska aktivnost kao znak regeneracije, miofibrili su većeg promjera) i biokemijski (manje enzimske aktivnosti: kreatin kinaza, laktat dehidrogenaza, aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza) (27 - 29). Kod ozljeda kostiju, broj životinja s radiološki verificiranim potpunim cijeljenjem kostiju se statistički značajno povećao nakon aplikacije BPC-ja 157 (30, 31). Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja BPC 157 štiti somatosenzorne živce i obnavlja njihovu funkciju (32 - 34). BPC 157 umanjuje brojne nuspojave nesteroidnih protuupalnih lijekova. Dokazan je povoljan utjecaj na ozljede jetre i sluznice gastrointestinalnog trakta uzrokovane nesteroidnim protuupalnim lijekovima, produljenog vremena krvarenja i trombocitopenije izazvanog nesteroidima (35). BPC 157 primijenjen intraperitonealno bitno je skratio djelovanje općeg

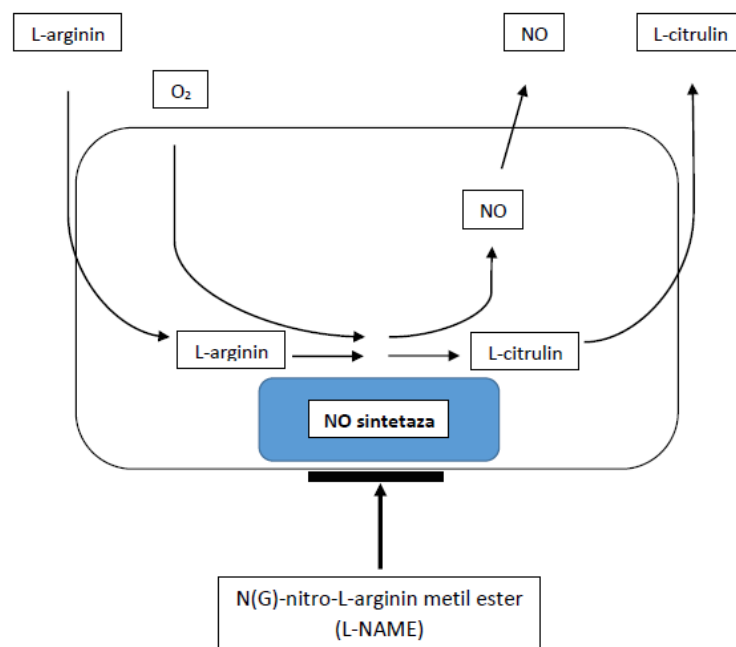
anestetika thiopentala (36). Aplikacijom BPC-ja 157 nakon primjene opijata dolazi do statistički značajne reverzije analgetskog učinka morfija, ali tek nakon 30-minutnog perioda (37). Primjenom BPC-ja 157 na rožnicu, ubrzava se cijeljenje kornealnih abrazija i perforativnih ozljeda rožnice s vrlo brzom negativizacijom fluoresceinskog i Seidelovog testa u tretiranih štakora. Valja napomenuti da se kod tih skupina cijeljenje odvija bez nastajanja novih krvnih žila što rezultira potpuno očuvanom prozirnošću rožnice što je definitivno veliki benefit (38, 39). Primjenom BPC-ja 157, u obliku očnih kapi, možemo poništiti lijekovima izazvanu midrijazu ili miozu (40). Nakon kirurškog odstranjenja suznih žlijezda nastaje sindrom suhih očiju. Lokalnom primjenom BPC-ja 157 u obliku očnih kapi to stanje uspješno možemo neutralizirati (41). BPC 157 učinkovit je u sprječavanju nastanka i liječenju srčanih aritmija uzrokovanih raznim faktorima: hiperkalemijom, medigoksinom, hipoksijom ili lijekovima (42 - 46). Nakon primjene ekstremne doze bupivakaina dolazi do nastanka kardiotoksičnosti što se prezentira bradikardijama, AV blokom, ventrikularnim ektopijama, ventrikularnom tahikardijom, elevacijom T vala i na kraju asistolijom. Sve te toksične učinke bupivakaina na srce možemo ublažiti i značajno povećati preživljenje testiranih životinja primjenom BPC-ja 157, bilo prije aplikacije lokalnog anestetika ili neposredno nakon nje (47).

Mehanizam djelovanja BPC-ja 157 je putem sustava dušičnog oksida (NO). Primjenom prekursora NO (L-arginin) ili blokatora NO sintetaze (L-NAME) može se mijenjati učinak BPC-ja 157 na razne organske sustave (36, 39, 40, 45).

1.4. Dušikov oksid

Dušikov oksid (NO, dušikov(II) oksid) vrlo je bitan unutarstanični i izvanstanični glasnik. Dušikov oksid nastaje iz L-arginina katalitičkom reakcijom koju potpomaže enzim dušik oksid sintetaza (NOs) (48 - 50). Poluživot dušikova oksida vrlo je kratak, između 0,1 i 10 sekundi. Fiziološki se stvara u cijelom organizmu, a najveći biološki učinak ima u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama (51, 52). Sudjeluje u organizmu u upalnim reakcijama, regulaciji krvnog tlaka (53), proliferaciji glatkih mišićnih stanica i inhibiciji agregacije trombocita. NO se otpušta iz endotelnih stanica krvnih žila i uzrokuje porast koncentracije cikličkog guanozin monofosfata (cGMP) u vaskularnim glatkim mišićima,

što dovodi do vazodilatacije. To je mehanizam kojim se u organizmu regulira krvni protok kroz određeni dio tijela i krvni tlak. U sepsi i endotoksičnom šoku nastaje velika količina NO što rezultira masivnom vazodilatacijom i svim posljedičnim kliničkim prezentacijama sepse (54). U mozgu se NO sintetizira u određenim neuronima čime se regulira otpuštanje nekoliko (u pravilu neuroekscitatornih) neurotransmitera. U interakciji s hemoglobinom u krvi se razgrađuje na nitrite (NO_2) i nitrate (NO_3) (55). Dušikov oksid poništava kisikove slobodne radikale i time pokazuje antioksidativna svojstva. Ipak, u određenim uvjetima njegovo dominantno djelovanje je proinflamatorno pa se može reći da je on kao takav medijator homeostatskih procesa u organizmu i važan citoprotektor (56). L-arginin je esencijalna aminokiselina i prekursor je dušikova oksida. Enzimatskom katalizom L-arginina nastaju L-citrulin i NO, za što su potrebni kisik i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). N(G)-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je derivat L-arginina koji se, kompetitivno s L-argininom, veže na NOs, ali na njoj ne nastaje ranije opisana reakcija stvaranja NO. Koristi se u laboratorijskim uvjetima kao potentan inhibitor NO-sintetaze. (57).



Slika 1.4. Proces nastajanja NO iz L-arginina i molekularnog kisika. Reakciju katalizira NO-sintetaza, a inhibira ju N(G)-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) (reproducirano uz dopuštenje iz Kokot A. Atropin, pilokarpin, NO sistem, BPC 157 na midrijazi u štakora [disertacija]. Osijek: Sveučilište Josip Jurja Strossmayera, Medicinski Fakultet; 2015.) (57)

1.5. Prikaz problema

1.5.1. Osjetljivost rožnice

Prije svih procedura i zahvata na oku, koji su bolni i neugodni, oko je nužno anestetizirati. To se može postići općom anestezijom, regionalnom blokadom očnih živaca ili topičkom primjenom lokalnih anestetika. Izbor tehnike anestezije vrši se na temelju podataka o trajanju operacije, omjera rizika i koristi pojedine tehnike za svakog pacijenta te na temelju pacijentovog odabira. Opću anesteziju povezujemo s mučninom i povraćanjem i sporijim oporavkom od operacije nego kod regionalnih tehnika, a prednosti su joj stabilan intraokularni tlak i nepomično operacijsko polje (58). Za primjenu opće anestezije potrebno je dodatno osoblje, posebni uvjeti i uređaji koji nam za primjenu regionalnih tehnika nisu potrebni, što izvođenje operacija bitno poskupljuje. Primjena tehnika regionalne anestezije (npr. blokada facijalnog živca, retrobulbarni blok, stražnji peribulbarni blok ili „sub-tenon“ blok) osigurava akineziju u operativnom polju, dobru analgeziju, ali injekcija u području oka povezana je s neugodom i tjeskobom kod pacijenata, kao i opasnih komplikacija, koje su, doduše, rijetke. Zbog navedenih razloga ovakvi blokovi se u pravilu rade uz neku vrstu sedacije, što je opet povezano s komplikacijama kao kod opće anestezije. Razvojem tehnika mikroskopskih i mini incizija na prednjem segmentu oka, razvila se tehnika topičke anestezije, odnosno primjene lokalnih anestetika u obliku očnih kapi. Primjenom topičke anestezije izbjegavamo potencijalne komplikacije i opće anestezije i peribulbarnih injekcija. Negativne strane ove tehnike su pomicanje oka za vrijeme operacije i neugodan osjećaj od svjetla mikroskopa. Također, za ovu tehniku nisu prikladni nemirni i nekooperativni pacijenti.

Primjerenim odabirom vrste i doze lokalnog anestetika moramo omogućiti trajanje anestezije koje je dovoljno za izvršenje bolnog zahvata na oku. U slučaju da ne postoji lokalni anestetik koji farmakokinetički odgovara traženim zahtjevima, lokalnom anestetiku možemo dodati tvari koje mijenjaju njegova svojstva i time postići bolji učinak. Dodatkom aditiva u očne kapi trajanje lokalne anestezije možemo produljiti, ubrzati početak djelovanja lokalnih anestetika ili pojačati njihov učinak (5). Trajanje anestezije dulje od trajanja zahvata na oku je nužno i događa se svakodnevno u kliničkoj praksi. To operateru omogućava da u slučaju neplaniranog produljenja

zahvata ima zadovoljavajuće uvjete za završetak procedure. No anestezija koja traje i nakon provedenog zahvata nije stanje koje je posve sigurno. U periodu dok traje lokalna anestezija, a bolni zahvat je završio i površina oka nije pod kontrolom operatera niti ga pacijent osjeti, nastaju uvjeti da eventualno nehotično oštećenje na oku ostane neprimijećeno, da se kasnije započne liječenje i time nastane i trajno oštećenje. Podataka o učestalosti tih oštećenja nakon lokalne anestezije nema, no poznato je da barem 3 od 1000 bolesnika nakon opće anestezije (gdje površina oka također nije pod kontrolom bilo pacijenta, bilo stručne osobe) ima oštećenja na rožnici koja zahtijevaju liječenje (59). Zbog toga bi bilo uputno trajanje rezidualne anestezije svesti na minimum. Lijekovi za skraćivanje djelovanja lokalnih anestetika u redovnoj kliničkoj praksi ne postoje, niti se opisuju u znanstvenoj literaturi.

Poznato je da BPC 157 umanjuje sistemske toksične učinke lokalnih anestetika (47) i time je dokazano da djeluje na lokalne anestetike. U ovom istraživanju testirali smo utjecaj BPC-ja 157 na trajanje anestezije nakon primjene dva različita lokalna anestetika na rožnicu štakora. O navedenoj temi dosad nije bilo istraživanja.

Uz to, BPC 157 je u više radova korišten kao okularni terapeutik te je pokazano da je siguran za primjenu na rožnicu (38 - 40).

1.5.2. Oštećenje rožnice lokalnim anesticima

Nakon topičke aplikacije lokalnih anestetika na rožnicu, na njenom epitelu nastaju oštećenja, bez obzira koji lokalni anestetik koristimo. Uz to, prilikom pripreme lokalnog anestetika za primjenu na oko koriste se konzervansi kojima poboljšavamo njegova mikrobiološka, fizikalnokemijska ili farmakokinetička svojstva (11). Konzervansi su, kao i lokalni anestetici, kemijski aktivne tvari koje mogu napraviti oštećenja na epitelu rožnice. Oštećenja mogu biti različitog opsega – od pada broja mikronabora na membranama, do pucanja staničnih membrana i prolapsa staničnih jezgri vidljivih elektronskom mikroskopijom. Oštećenja mogu biti duboka nekoliko slojeva epitelnih stanica (60 - 62). Za BPC 157 je pokazano da može poboljšati oporavak rožnice nakon njezine perforacije ili debridmana rožnice (38, 39). U sklopu projekta, čiji je dio i istraživanje u sklopu ove disertacije, testirali smo utjecaj BPC-ja 157 i drugih testiranih

lijekova na oštećenja rožnice izazvana topičkom aplikacijom lokalnog anestetika tetrakaina.

1.5.3. Utjecaj lokalnih anestetika na vlažnost rožnice

Prozirna rožnica je preduvjet za dobar prolaz svjetlosnih zraka unutar oka, a za prozirnost je nužno održavati konstantnu vlažnost na njenoj površini. Vlažnost rožnice većim dijelom održavaju suzne žlijezde lučenjem suza. Suzne žlijezde smještene su u plitku udubinu u frontalnom dijelu orbite. Suze se formiraju seroznom sekrecijom acinoznih i mioepitelnih stanica suzne žlijezde i potom luče u prostor između kapka i očne jabučice. Treptanjem se suze rašire po cijeloj površini rožnice i time joj održavaju vlažnost (1). Osim funkcije vlaženja, suze na površini rožnice stvaraju tanki film i time predstavljaju mehaničku barijeru od vanjskih utjecaja na oko, a imaju funkciju u imunološkom odgovoru (7).

Poznato je da topički aplicirani lokalni anestetici smanjuju vlažnost rožnice kod zdravog oka, podjednako kao i kod oka s od ranije smanjenom vlažnošću, što se vidi u očitanjima Schirmerovog testa (63). Nakon kirurškog odstranjenja suznih žlijezda vlažnost sluznice rožnice, očekivano, pada. Za BPC 157 pokazano je da može ublažiti utjecaj takvog kirurškog zahvata na vlažnost sluznice rožnice (41).

U sklopu projekta, čiji je dio i istraživanje u sklopu ove disertacije, testirali smo i utjecaj BPC-ja 157 i drugih testiranih lijekova na vlažnost rožnice (mjerenu modificiranim Schirmerovim testom) nakon njezinog izlaganja lokalnom anestetiku tetrakainu. Rezultati i tih dijelova projekta neophodni su za razumijevanje djelovanja BPC-ja 157 na razna oštećenja rožnice štakora.

2. HIPOTEZA

Na temelju dosadašnjih spoznaja o utjecaju BPC-ja 157 na lokalne anestetike postavili smo hipotezu da lokalno primijenjeni BPC 157 skraćuje anesteziju rožnice štakora nakon primjene lokalnih anestetika te da je taj učinak posredovan sustavom dušičnog oksida.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Izmjeriti trajanje lokalne anestezije rožnice štakora nakon topičke aplikacije tetrakaina ili oksibuprokaina
2. Izmjeriti trajanje lokalne anestezije rožnice nakon topičke aplikacije BPC-ja 157, L-arginina, L-NAME ili njihovih kombinacija na rožnicu anesteziranu tetrakainom ili oksibuprokainom
3. Odrediti krivulju osjetljivosti rožnice nakon topičke aplikacije tetrakaina ili oksibuprokaina
4. Odrediti krivulju osjetljivosti rožnice nakon topičke aplikacije BPC-ja 157, L-arginina, L-NAME ili njihovih kombinacija na rožnicu anesteziranu tetrakainom ili oksibuprokainom

Cilj ovog rada je dokazati da lokalno primijenjeni BPC 157 skraćuje trajanje anestezije rožnice. Iako je poznat povoljan učinak BPC-ja 157 na toksičnost lokalnih anestetika, istraživanja o njegovom utjecaju na trajanje lokalne anestezije dosad nisu provedena. Dokazivanjem ovog njegovog djelovanja i uz dodatna istraživanja, BPC 157 bi u budućnosti mogao umanjiti važnost jednog svakodnevnog kliničkog problema – rezidualne anestezije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Za istraživanje je provedena studija u obliku randomiziranog slijepog kontroliranog pokusa.

Randomizacija je izvršena putem internet servisa specijaliziranog za randomizaciju (<http://www.randomization.com>). Tražena je randomizacija 60 ispitanika u 12 skupina.

Mjerenje osjetljivost izvodio je istraživač koji ni na koji način nije mogao znati kojoj skupini testirana životinja pripada i koje tvari su joj kapane u oči.

4.2. Priprema i eksperimentalne životinje

Svi članovi tima koji su sudjelovali u istraživanju educirani su i osposobljeni za rad s laboratorijskim životinjama (i istraživač i mentori su odslušali i položili tečaj za osposobljavanje osoba za planiranje i rad s laboratorijskim životinjama).

Prije početka istraživanja pribavljena su pozitivna mišljenja Etičkog povjerenstva i Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva za istraživanja Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Istraživanje je provedeno prema pravilima struke i propisima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu te u skladu s odredbama Zakona o zaštiti životinja (NN 135/2006) i Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili u druge znanstvene svrhe (NN 47/2011) Republike Hrvatske.

U istraživanju su korišteni nasumično odabrani štakori soja Wistar, muškog spola, okvirne težine 200-250 grama iz vlastitog uzgoja, prema odobrenju HR-POK-007 Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske. Istraživanje je provedeno na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Štakori uključeni u istraživanje osjetljivosti rožnice su randomizacijom podijeljeni u 12 skupina – po 6 skupina za svaki lokalni anestetik korišten u istraživanju. Skupine su označene kao:

Tablica 4.1. Skupine ispitanika

| Tetrakain + | Oksibuprokain + |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Destilirana voda (kontrola) | Destilirana voda (kontrola) |
| BPC 157 | BPC 157 |
| L-arginin | L-arginin |
| L-arginin + BPC 157 | L-arginin + BPC 157 |
| L-NAME | L-NAME |
| L-NAME + BPC 157 | L-NAME + BPC 157 |

Prije istraživanja provedena je pilot studija. Rezultate iz pilot studije koristili smo za određivanje koncentracija i doza lijekova koje ćemo koristiti u istraživanju i za određivanje veličine uzorka. Za odabir doze u pilot studiji koristili smo doze korištene ranije u sličnim studijama (37 - 39).

Prema rezultatima pilot studije i koristeći alate za računanje potrebne veličine uzorka dostupne na internetu (www.danielsoper.com/statcalc3/calc.aspx?id=47), izračunali smo da bi minimalna veličine uzorka trebala biti 5 štakora po skupini, pa je u svakoj eksperimentalnoj skupini i korišteno 5 štakora, što ukupno iznosi 60 štakora.

Štakori koji su korišteni za ispitivanje oštećenja rožnice lokalnim anestetikom randomizirani su u 6 skupina, te su im, nakon lokalnog anestetika, u svako oko aplicirane po dvije kapi testiranih tvari u obliku očnih kapi, ovisno o skupini kojoj pripadaju. Za svaku skupinu smo koristili također po 5 štakora.

I za mjerenje vlažnosti rožnice koristili smo po 5 štakora za svaku od 6 ispitivanih skupina. Koristili smo sličnu metodu rada – nakon topičke aplikacije lokalnog anestetika na rožnicu kapali smo po dvije kapi testiranih tvari u svako oko ovisno o skupini kojoj štakor pripada.

Nakon završetka pokusa svi štakori vraćeni su u nastambu. Obzirom da nisu ozlijeđeni i da u pokusu nisu uzimani uzorci za post mortem analizu, štakori će se, nakon eliminacije korištenih kemijskih tvari, moći koristiti za druge pokuse. Trajanje karence bit će 1 mjesec.

4.3. Lijekovi korišteni u pokusu

- **BPC 157** (Diagen Ltd., Ljubljana, Slovenija) čistoće 99%, otopljen u fiziološkoj otopini. Doza koja se koristila u pokusu određena je u pilot projektu i odgovara koncentraciji od 4 µg/mL. U svako oko kapali smo po dvije kapi što odgovara količini od 0,4 µg BPC-ja 157
- **L-arginin** (Sigma-Aldrich) otopljen u koncentraciji 20 mg/mL. Primjenom dvije kapi aplicirali smo 2 mg L-arginina
- **L-NAME** (N ω -Nitro-L-arginin methyl ester hydrochloride) (Sigma-Aldrich) otopljen u koncentraciji 1 mg/mL. Primjenom dvije kapi aplicirali smo 0,1 mg L-NAME.
- **Tetrakain** (Tetracain hydrochloridum 5 mg/mL, Gradska ljekarna Zagreb). Dvije kapi sadržavaju 0,5 mg tetrakaina.
- **Oksibuprokain** (Novesine 0,4%, OmniVision). Primjenom dvije kapi aplicirali smo 0,4 mg oksibuprokaina.
- **Diazepam** (Normabel otopina za injekcije 5 mg/mL, Belupo). Intraperitonealnom injekcijom aplicirali smo 4 mg/kg diazepamama.

Sve supstancije (lijekovi i destilirana voda) davane su u akutnoj primjeni, u obliku očnih kapi. Svaki lijek pripremao se na dan pokusa.

4.4. Metode

Na početku pokusa štakori su sedirani intraperitonealnom injekcijom benzodiazepina (4 mg/kg) (64), nakon čega je provedeno inicijalno testiranje osjetljivosti rožnice. Pet minuta nakon primjene sedacije, aplicirane su dvije kapi lokalnog anestetika, a potom i po dvije kapi testiranih supstanci u svako oko, ovisno o skupini kojoj životinja pripada. Skupine označene kao tetrakain + destilirana voda i oksibuprokain + destilirana voda kontrolne su skupine i njima su aplicirani samo lokalni anestetik i odgovarajući volumen destilirane vode, bez drugih testiranih tvari. Uz svaki ispitivani lokalni anestetik i istraživanu tvar BPC 157, testirali smo i djelovanje L-arginina, kao prekursora dušičnog oksida (NO), i L-NAME, kao blokatora sinteze NO, na osjetljivost rožnice te time ispitali povezanost djelovanja BPC-ja 157 sa sustavom dušičnog oksida.

Nakon aplikacije testiranih tvari nastavlja se kvantitativno testiranje osjetljivosti rožnice. Osjetljivost rožnice mjerili smo upotrebom Cochet-Bonnet esteziometra (Luneau Ophthalmologie, Chartres, France, slika 4.1.), uređaja za mjerenje osjetljivosti rožnice (65 - 67).



Slika 4.1. Cochet-Bonnet esteziometar

On se sastoji od najlonskog monofilamenta promjera 0,12 mm koji se može izvlačiti. Maksimalno izvučen filament dugačak je 6 cm. Pritiskom na rožnicu, proizvodi se sila pritiska na njegovom vrhu kojom želimo izazvati štakorov treptaj (slika 4.2.).



Slika 4.2. Testiranje osjetljivosti rožnice štakora pomoću djelomično izvučene niti esteziometra

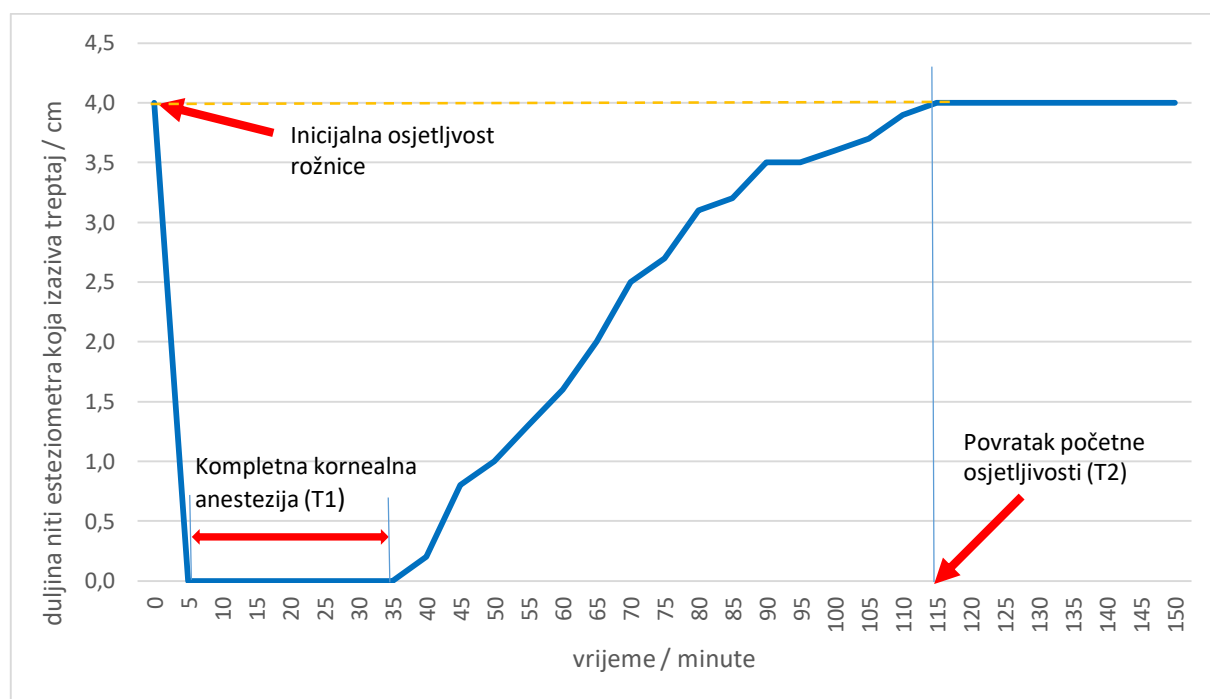
Kako je nit esteziometra standardiziranih fizikalnih svojstava, iz duljine niti kojom izazivamo treptaj možemo odrediti kojom silom pritišćemo rožnicu. Primijenjena sila je obrnuto proporcionalna duljini izvučenog dijela najlonskog monofilamenta (tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Konverzija izmjerenih vrijednosti duljine niti esteziometra u pritisak (modificirano iz Uputa za korištenje esteziometra)

| | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|------|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Duljina niti u mm | 60 | 55 | 50 | 45 | 40 | 35 | 30 | 25 | 20 | 15 | 10 | 5 |
| Vrijednosti pritiska u g/mm ² | 0,4 | 0,5 | 0,55 | 0,7 | 0,8 | 1 | 1,4 | 1,8 | 2,8 | 5,1 | 10,3 | 15,9 |

Testiranje osjetljivosti rožnice započinje nježnim dodiranjem vrhom esteziometra okomito na rožnicu te apliciranjem male sile kako bi se filament blago savinuo. Ukoliko štakor trepne, to se bilježi kao pozitivan odgovor. Svako oko testira se 3 puta kod svake

duljine, a za pozitivan rezultat potrebno je izazvati treptaj u barem 2 pokušaja. Ukoliko treptaj izostane, duljina filameta smanjuje se za 1 centimeter i postupak se ponavlja dok se ne dobije pozitivan odgovor. Izostanak pozitivnog odgovora kada je duljina filameta 1 centimeter definira se kao kompletna kornealna anestezija ili kompletni blok. Bilježi se duljina niti u centimetrima koja izaziva pozitivan odgovor (1 – 6) ili se odgovor označava s 0 ako pozitivnog odgovora nema (kompletni blok). Mjerenja se, nakon inicijalnog testiranja, ponavljaju svakih 5 minuta do prestanka djelovanja lokalnog anestetika, odnosno do povrata osjetljivosti rožnice koja je bila prije aplikacije lokalnog anestetika. Krivulju osjetljivosti rožnice dobijemo ako ucrtamo vrijednosti dobivene mjerenjem u svakoj vremenskoj točki na krivulju, gdje je vrijeme na osi x, a duljina niti na osi y. Tipična krivulja osjetljivosti koju dobijemo mjerenjem osjetljivosti rožnice nakon aplikacije lokalnog anestetika prikazana je na slici 4.3.



Slika 4.3. Krivulja osjetljivosti rožnice mjerena esteziometrom

Nakon inicijalnog mjerenja osjetljivosti i aplikacije lokalnih anestetika i testiranih tvari na rožnicu dobijemo potpunu neosjetljivost rožnice na vanjske podražaje. Period u kojem ne možemo izazvati treptaj niti s najvećim pritiskom esteziometra nazivamo kompletna kornealna anestezija i označavamo ga s T1. U nastavku mjerenja,

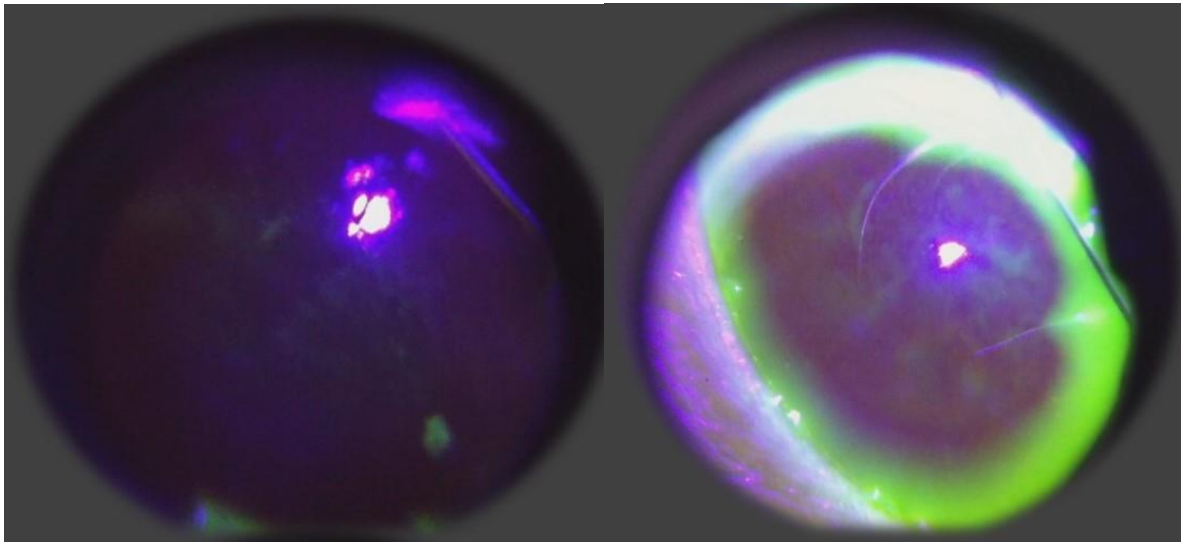
djelovanje lokalnih anestetika se smanjuje i stimulacijom rožnice sve manjim pritiskom (i sve duljom niti esteziometra) izazivamo treptaj. Sljedeća točka važna za rezultate je trenutak kada djelovanje lokalnih anestetika prestaje pa se osjetljivost rožnice vrati na početnu vrijednost – na slikama i u tablicama je označena kao T2.

U sklopu projekta, kojega je dio i ova disertacija, provedena su ispitivanja utjecaja BPC-ja 157, L-arginina, L-NAME i njihovih kombinacija na oštećenja rožnice nastala nakon topički primijenjenog lokalnog anestetika tetrakaina na rožnicu štakora, kao i utjecaja testiranih lijekova na vlažnost rožnice nakon topički primijenjenog tetrakaina. Navedena testiranja su nužna za razumijevanje šire slike utjecaja BPC-ja 157 i mehanizma njegovog djelovanja na oštećenja rožnice.

Poznato je da svi lokalni anestetici primijenjeni na sluznicu rožnice prave oštećenja njenog epitela. U ovom pokusu odredili smo kolika su ta oštećenja 30, 60 i 150 minuta od početka pokusa kod podskupine štakora anestetiziranih tetrakainom, u svakoj tretiranoj skupini. Protokol sedacije i aplikacije lijekova bio je isti kao kod ranije opisanog dijela pokusa s mjerenjem osjetljivosti. Oštećenja rožničnog epitela pregledavana su biomikroskopom s kobaltno plavim filterom (PSL – eng. Portable Slit Lamp, Reichert, Buffalo, USA) nakon bojanja standardnim fluoresceinskim trakicama (Fluorescein Sodium Ophthalmic strips, Optitech Eyecare). Test je bio pozitivan ako su postojali defekti rožnice, a negativan ako nisu. Skoriranje je provedeno subjektivnim određivanjem površine na kojoj postoje defekti – od skora 0 (bez defekata) do skora 4 (skoro cijela površina rožnice ima epitelne defekte, tablica 4.3., slika 4.4.).

Tablica 4.3. Ocjenjivanje oštećenja rožnice biomikroskopom

| Ocjena | Površina rožnice zahvaćena bojanjem |
|--------|-------------------------------------|
| 0 | Rožnica bez defekata |
| 1 | ≤ 1/4 rožnice |
| 2 | ≤ 2/4 rožnice |
| 3 | ≤ 3/4 rožnice |
| 4 | > 3/4 rožnice |



Slika 4.4. Ocjenjivanje oštećenja rožnice korištenjem biomiskroscopa – ilustracija, lijevo: skor 1, desno: skor 3

Za određivanje utjecaja BPC-ja 157 na djelovanje lokalnih anestetika na vlažnost rožnice odabrali smo skupinu štakora lokalno anestetiziranih tetrakainom, a nakon toga tretiranih drugim testiranim lijekovima (BPC 157, L-arginin, L-NAME) ili njihovim kombinacijama prema protokolu opisanom ranije. Njima smo nakon 30, 60 i 120 minuta napravili Schirmerov test. Kontrolna skupina je nakon tetrakaina dobila samo odgovarajuću količinu destilirane vode. Test je rađen standardnom test trakicom, ali širine 2 mm zbog prilagodbe veličini štakorovog oka. Mjerenja su izvršena nakon što je trakica bila postavljena 1 mm u donji konjuktivalni forniks u trajanju od 5 minuta.

4.5. Statističke metode

Numerički podaci opisani su sredstvima deskriptivne statistike ovisno o njihovoj raspodjeli, što je testirano Kolmogorov-Smirnovim testom za normalnu distribuciju. Podaci s normalnom raspodjelom opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u slučaju raspodjela koje ne slijede normalnu razdiobu medijanom i interkvartilnim rasponom. Trajanje kompletnog bloka (T1) i vremenskog intervala do povratka osjetljivosti rožnice na početne vrijednosti (T2) za dva lokalna anestetika (tetrakain i oksibuprokain) u odnosu na testirane tvari (destilirana voda, BPC 157, L-arginin, L-NAME i njihove kombinacije) opisane su analizom varijance (ANOVA).

Razlike u učincima pojedinih testiranih tvari na trajanje anestezije rožnice izazvanu tetrakainom ili oksibuprokainom detaljno su opisane Mann-Whitneyjevim testom za nezavisne uzorke, nakon čega je slijedila Benjamini i Hochbergova procedura za provjeru stope lažnih nalaza (engl. False Discovery Rate – FDR). Statistika korištena za testiranje oštećenja rožnice lokalnim anestheticima i testiranje vlažnost rožnice bila je slična onoj opisanoj za osjetljivost rožnice – testiranje normalne distribucije Kolmogorov-Smirnovim testom, potom Mann-Whitneyjevim testom za nezavisne uzorke i Benjamini i Hochbergova procedura za provjeru stope lažnih nalaza. Sve statističke analize provedene su korištenjem MedCalc-a 9.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). P vrijednosti jednake ili manje od 0,05 uzete su kao statistički značajne.

5. REZULTATI

U provedenom ispitivanju vidljivo je da primjena dvije kapi lokalnog anestetika u obliku očnih kapi kod štakora izaziva dugotrajnu anesteziju rožnice u obje testirane podskupine (tablice 5.1. i 5.2.). Primjenom BPC-ja 157, vremena trajanja anestezije se statistički značajno skraćuju u obje tretirane podskupine. Isto tako, primjena prekursora dušikovog oksida (L-arginina) skraćuje trajanje lokalne anestezije, dok se primjenom blokatora sinteze dušičnog oksida (L-NAME) njeno trajanje produljuje.

Tablica 5.1. Utjecaj testiranih tvari (BPC 157, L-arginine, L-NAME i njihovih kombinacija) na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) izazvane tetrakainom i duljinu vremenskog intervala u kojem se osjetljivost vratila na početne vrijednosti (T2).

| TETRAKAIN + | Srednja vrijednost (minute) ± standardna devijacija | | | |
|-----------------------------|---|--------|------------|--------|
| | T1 | P* | T2 | P* |
| Destilirana voda (KONTROLA) | 59 ± 5,2 | | 109 ± 12,5 | |
| BPC 157 | 45 ± 4,6 | <0.001 | 94 ± 7,0 | 0.008 |
| L-arginin | 51 ± 8,5 | 0.029 | 90 ± 5,3 | 0.002 |
| L-arginin + BPC 157 | 34 ± 5,8 | <0.001 | 72 ± 5,8 | <0.001 |
| L-NAME | 84 ± 7,7 | <0.001 | 126 ± 8,4 | 0.005 |
| L-NAME + BPC 157 | 65 ± 7,1 | 0.089 | 100 ± 9,4 | 0.165 |

** U usporedbi s kontrolnom skupinom. Mann-Whitneyjev test za nezavisne uzorke, potom Banjamini i Hochbergova procedura za provjeru stope lažnih nalaza (engl. False Discovery Rate – FDR)*

Tablica 5.2. Utjecaj testiranih tvari (BPC 157, L-arginine, L-NAME i njihovih kombinacija) na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) izazvane oksibuprokainom i duljinu vremenskog intervala u kojem se osjetljivost vratila na početne vrijednosti (T2)

| OKSIBUPROKAIN + | Srednja vrijednost (minute) ± standardna devijacija | | | |
|-----------------------------|---|--------|-----------|--------|
| | T1 | P* | T2 | P* |
| Destilirana voda (KONTROLA) | 64 ± 5,7 | | 126 ± 3,9 | |
| BPC 157 | 51 ± 5,0 | <0.001 | 106 ± 7,4 | <0.001 |
| L-arginin | 56 ± 6,9 | 0.015 | 112 ± 5,9 | <0.001 |
| L-arginin + BPC 157 | 48 ± 5,9 | <0.001 | 96 ± 5,5 | <0.001 |
| L-NAME | 89 ± 5,7 | <0.001 | 137 ± 7,9 | 0.002 |
| L-NAME + BPC 157 | 71 ± 7,6 | 0.075 | 104 ± 7,0 | <0.001 |

* U usporedbi s kontrolnom skupinom. Mann-Whitneyjev test za nezavisne uzorke, potom Banjamini i Hochbergova procedura za provjeru stope lažnih nalaza (engl. False Discovery Rate – FDR)

Dodavanjem BPC-ja 157, u svakoj skupini tretiranih štakora, kod oba testirana lokalna anestetika, trajanje anestezije se statistički značajno skraćuje (tablice 5.3. i 5.4.).

Tablica 5.3. Podskupina anestezirana tetrakainom. Utjecaj BPC-ja 157 na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) i na vrijeme povratka početne osjetljivosti (T2) kod skupina s destiliranom vodom, L-argininom i L-NAMEom

| TETRAKAIN + | Srednja vrijednost (minute) ± standardna devijacija | | | |
|-----------------------------|---|--------|------------|--------|
| | T1 | P* | T2 | P* |
| Destilirana voda (KONTROLA) | 59 ± 5,2 | | 109 ± 12,5 | 0.008 |
| BPC 157 | 45 ± 4,6 | <0.001 | 94 ± 7,0 | |
| L-Arginin | 51 ± 8,6 | <0.001 | 90 ± 5,3 | <0.001 |
| L-Arginin + BPC 157 | 34 ± 5,8 | <0.001 | 72 ± 5,8 | <0.001 |
| L-NAME | 84 ± 7,7 | <0.001 | 126 ± 8,4 | <0.001 |
| L-NAME + BPC 157 | 65 ± 7,1 | <0.001 | 100 ± 9,4 | <0.001 |

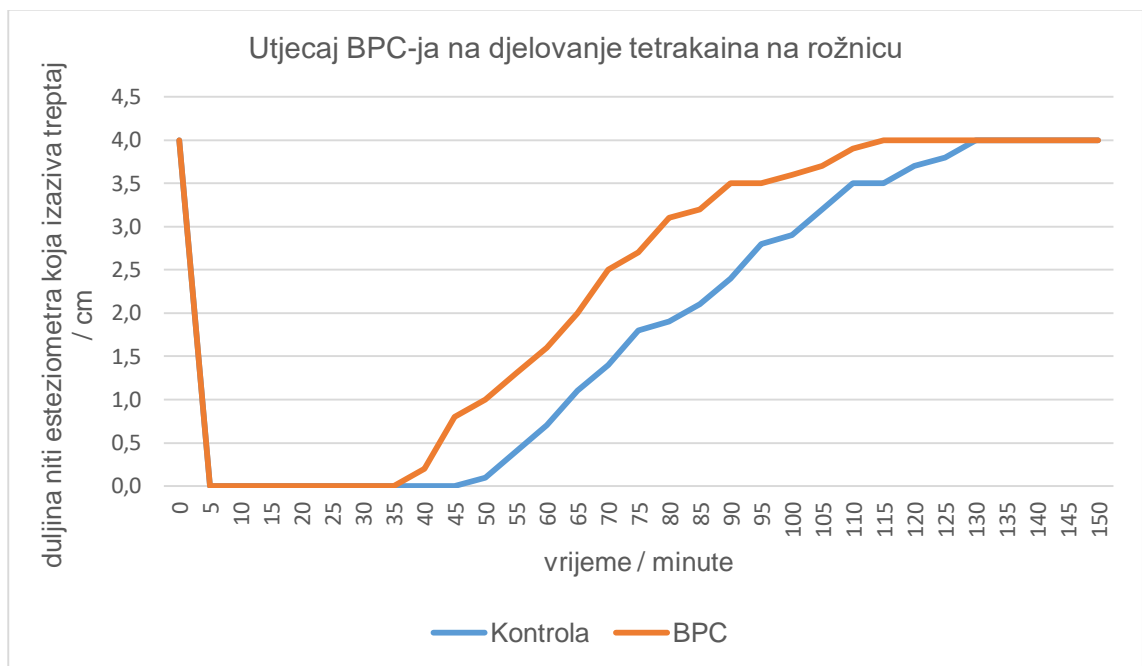
* U usporedbi sa skupinom bez BPC-ja 157. Mann-Whitneyjev test za nezavisne uzorke, potom Banjamini i Hochbergova procedura za provjeru stope lažnih nalaza (engl. False Discovery Rate – FDR)

Tablica 5.4. Podskupina anestezirana oksibuprokainom. Utjecaj BPC-ja 157 na trajanje kompletne kornealne anestezije (T1) i na vrijeme povratka početne osjetljivosti (T2) kod skupina s destiliranom vodom, L-argininom i L-NAMEom

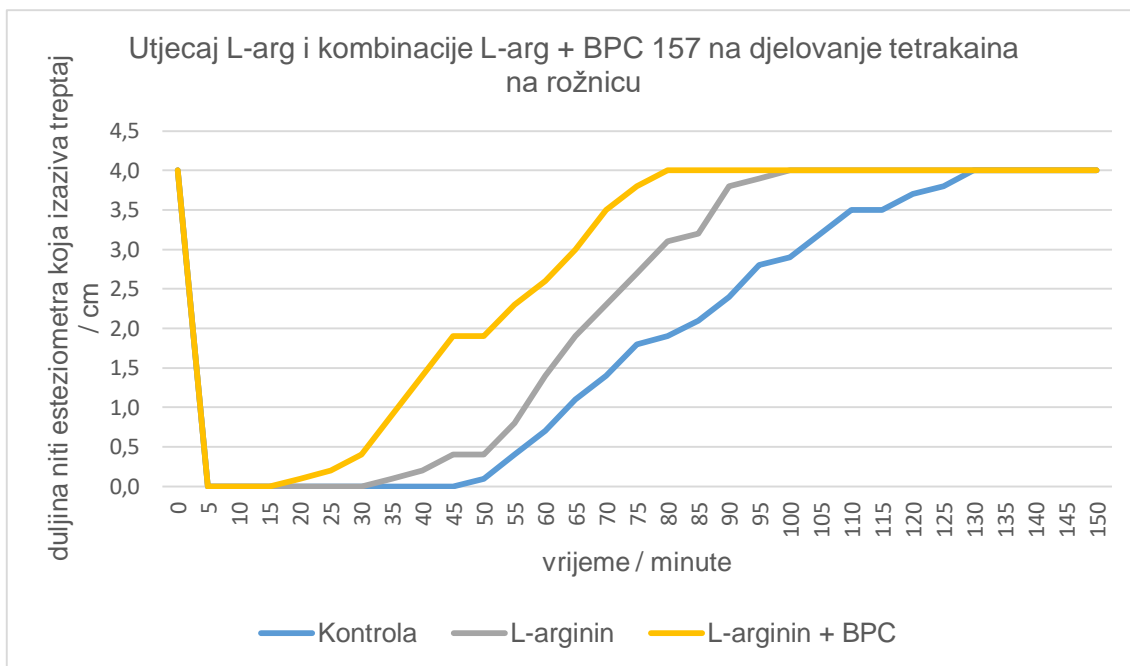
| OKSIBUPROKAIN + | Srednja vrijednost (minute) ± standardna devijacija | | | |
|-----------------------------|---|--------|-----------|--------|
| | T1 | P* | T2 | P* |
| Destilirana voda (KONTROLA) | 64 ± 5,7 | <0.001 | 126 ± 3,9 | <0.001 |
| BPC 157 | 51 ± 5,0 | | 106 ± 7,4 | |
| L-Arginin | 56 ± 6,9 | 0.029 | 112 ± 5,9 | <0.001 |
| L-Arginin + BPC | 48 ± 5,9 | | 96 ± 5,5 | |
| L-NAME | 89 ± 5,7 | <0.001 | 137 ± 7,9 | <0.001 |
| L-NAME + BPC | 71 ± 7,6 | | 104 ± 7,0 | |

* U usporedbi sa skupinom bez BPC-ja 157. Mann-Whitneyjev test za nezavisne uzorke, potom Benjamini i Hochbergova procedura za provjeru stope lažnih nalaza (engl. False Discovery Rate – FDR)

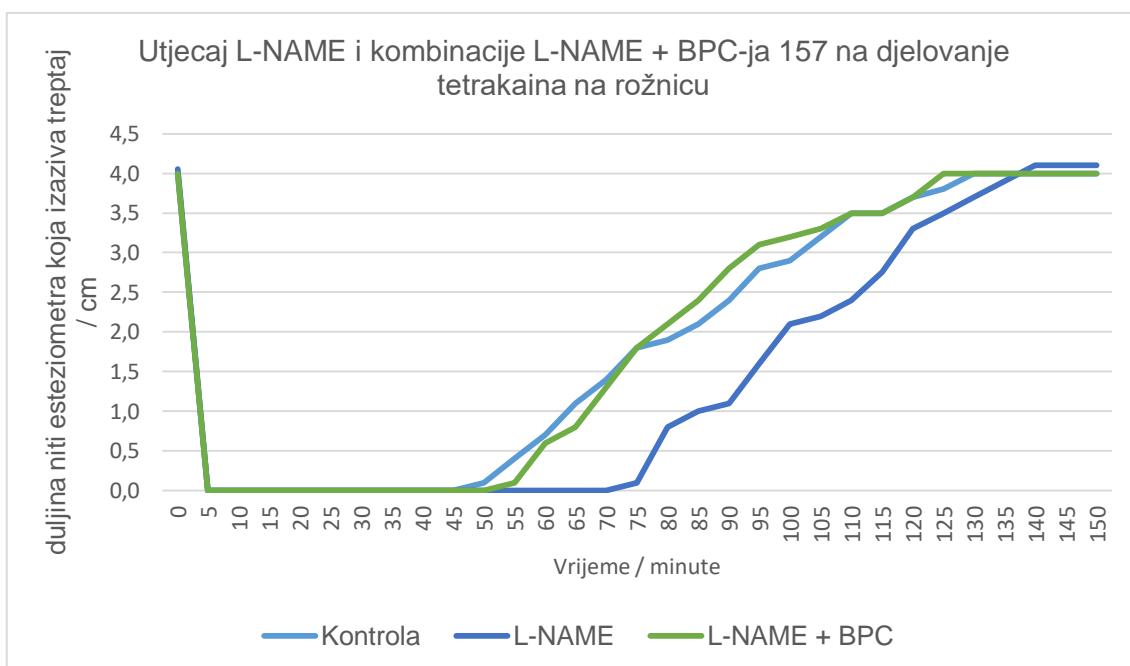
Na prikazu krivulja osjetljivosti rožnice za podskupinu anestetiziranu tetrakainom (slike 5.1., 5.2., 5.3. i 5.4.) vidljivo je da je anestezija štakora, osim što je kraća, statistički značajno i plića (manji stimulus izaziva reakciju) kod skupina tretiranih BPC-jem, L-argininom i kombinacijom L-arginina i BPC-ja. Kod skupine tretirane L-NAME-om anestezija je dulja i dublja, dok kod skupine L-NAME + BPC 157 nema statistički značajne razlike.



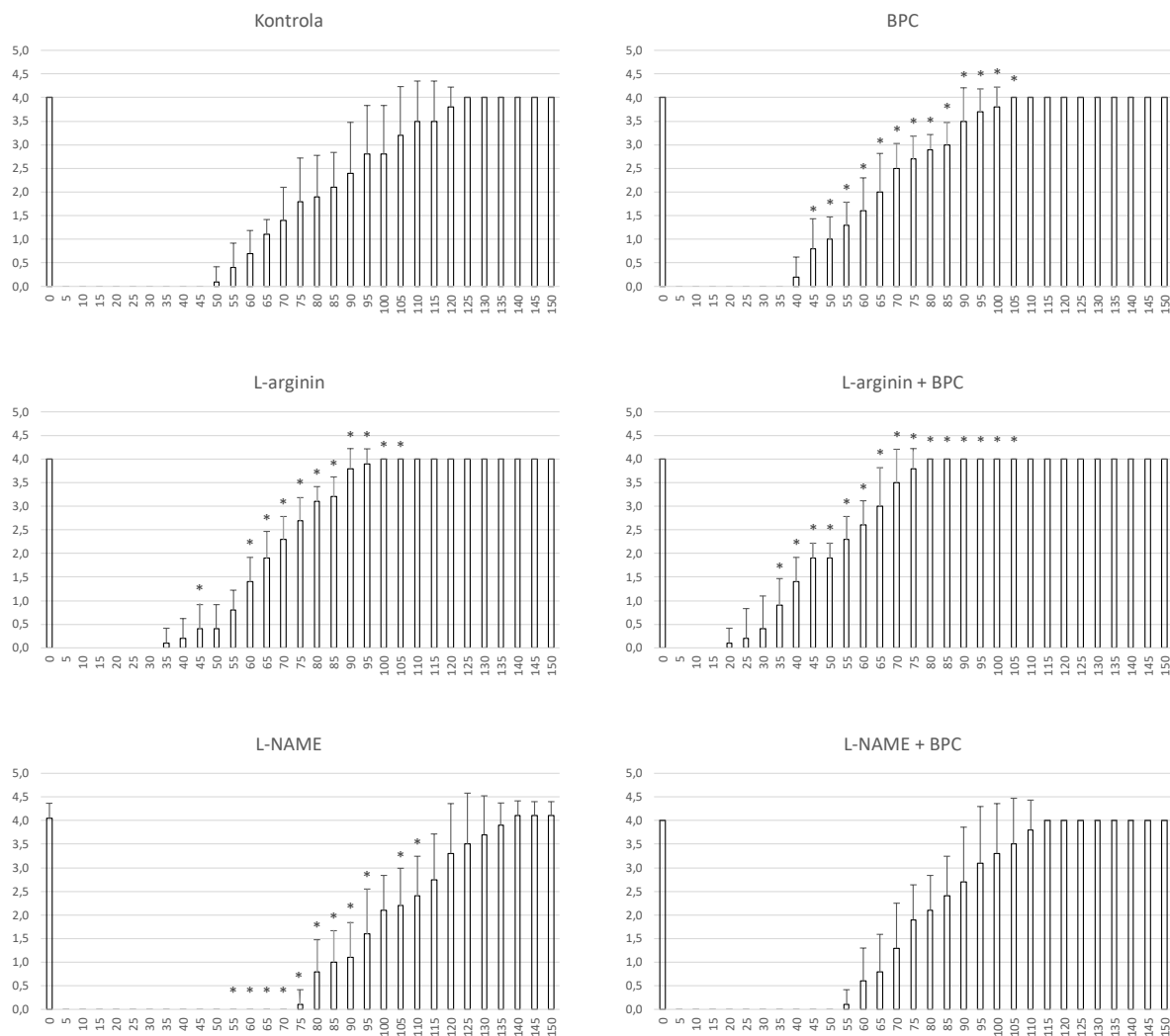
Slika 5.1. Krivulja osjetljivosti rožnice u vremenu - podskupina tetrakain, skupina BPC



Slika 5.2. Krivulja osjetljivosti rožnice u vremenu - podskupina tetrakain, skupine L-arg i L-arg + BPC 157

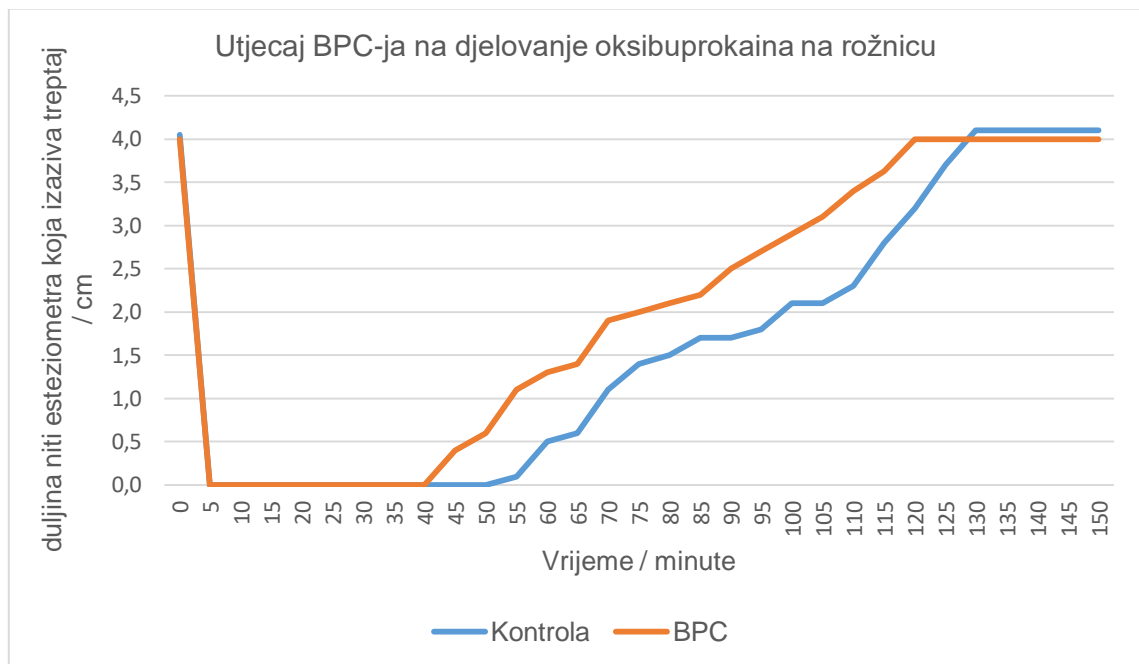


Slika 5.3. Krivulja osjetljivosti rožnice u vremenu - podskupina tetrakain, skupine L-NAME i L-NAME + BPC 157

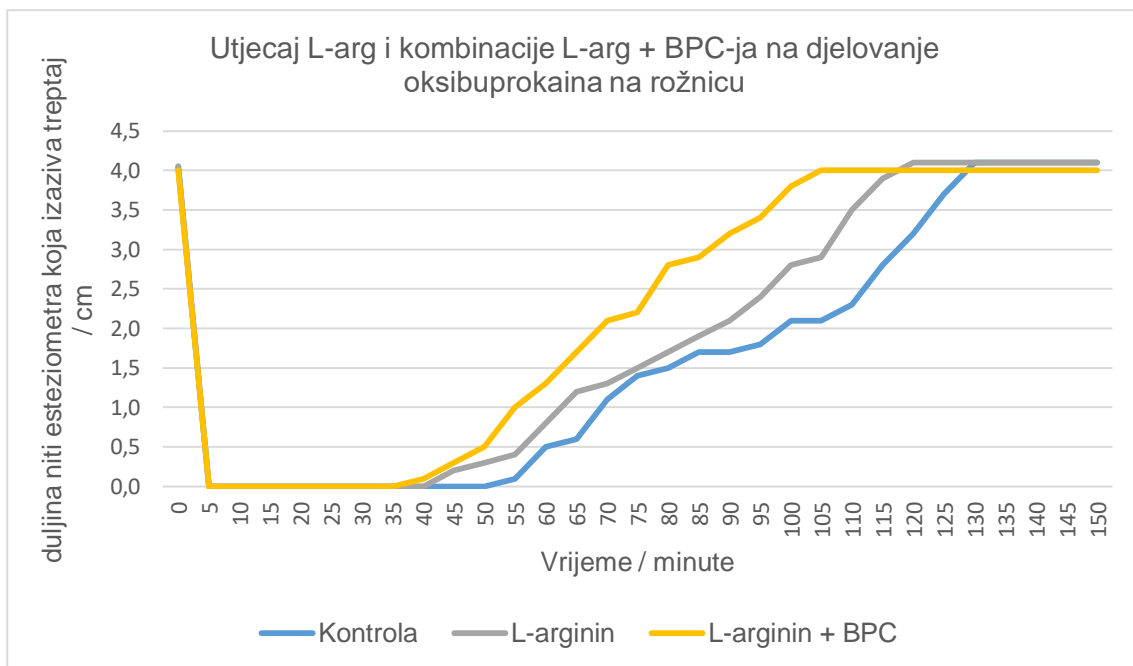


Slika 5.4. Podskupina tetrakain. Učinak pojedinih testiranih tvari na krivulju osjetljivosti rožnice. Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom.

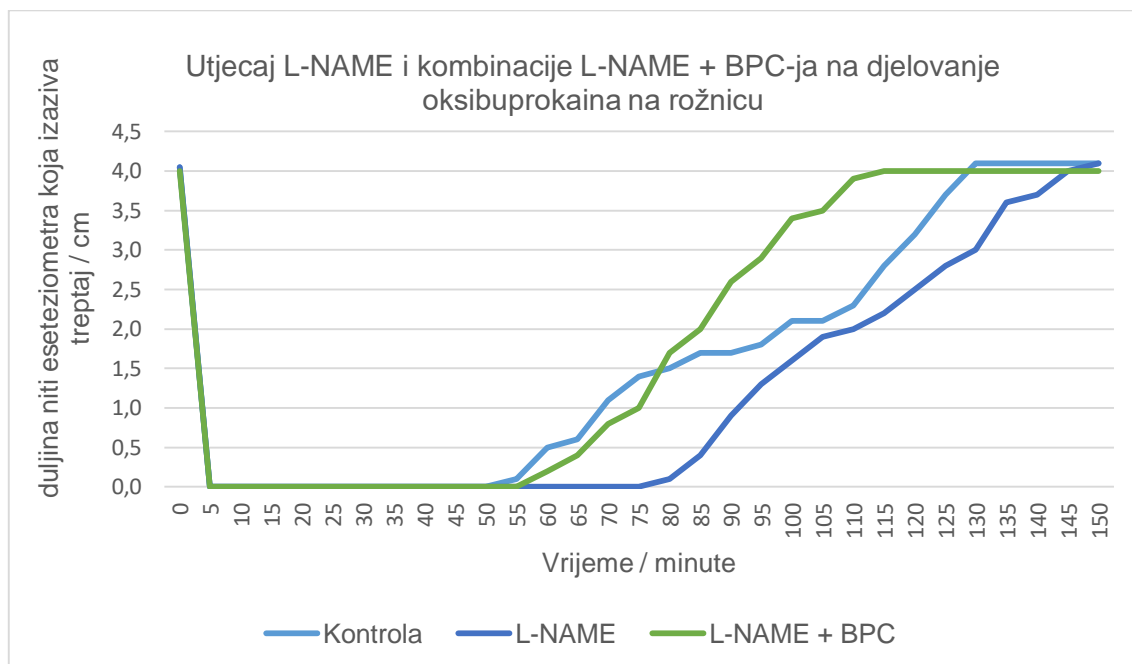
Na prikazu krivulja osjetljivosti kod podskupine štakora anesteziranih oksibuprokainom (slike 5.5., 5.6., 5.7. i 5.8.) dobijemo slične rezultate: anestezija je kraća nakon dodavanja otopine BPC-ja 157, L-arginina (kao prekursora NO) i pogotovo kod skupine tretiranih i L-argininom i BPC-jem 157. Skupina tretirana L-NAME-om ima dulju i dublju anesteziju, dok dodavanje BPC-ja 157 skupini s L-NAME-om taj učinak većim dijelom poništavamo.



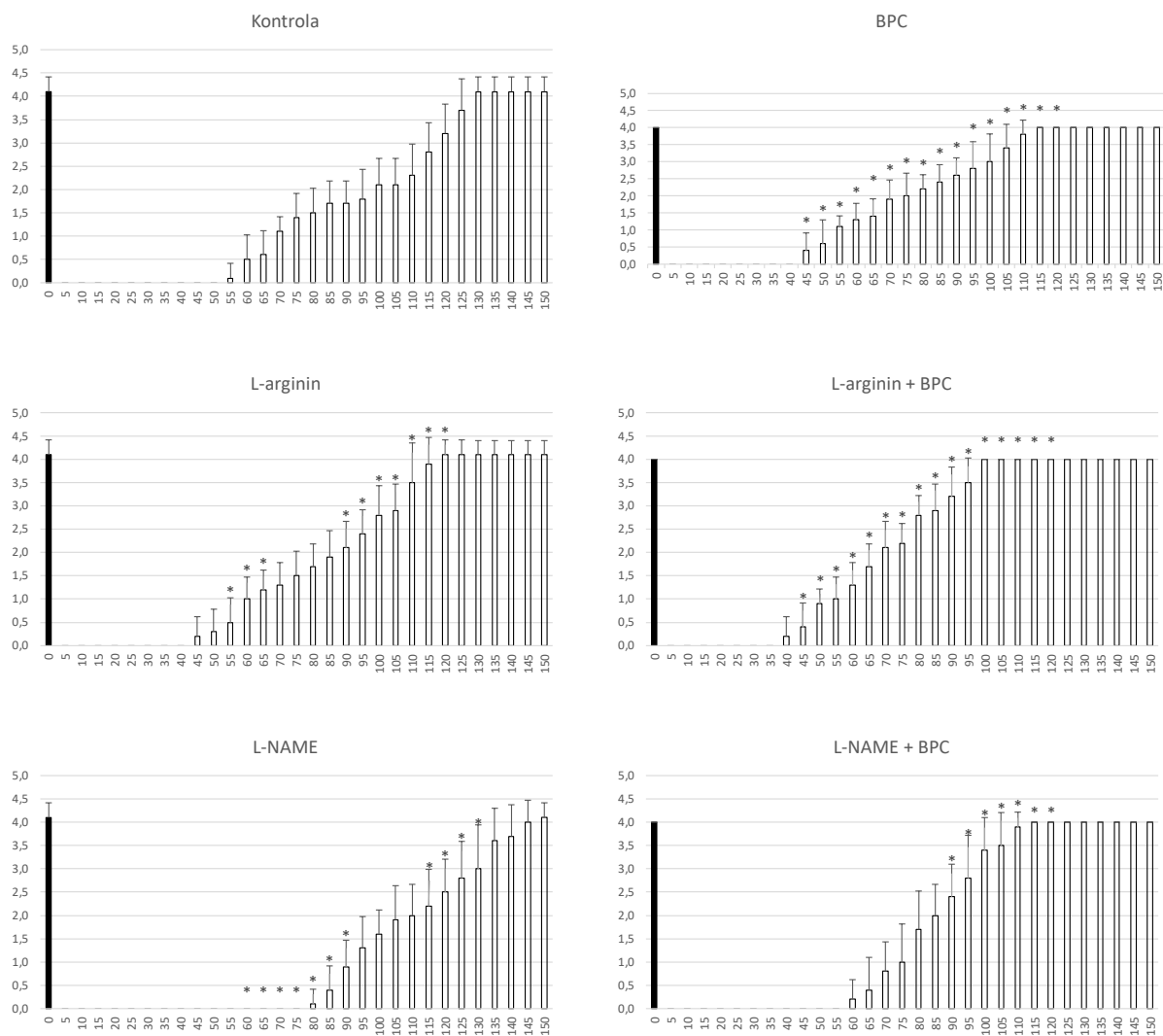
Slika 5.5. Krivulja osjetljivosti rožnice u vremenu - podskupina oksibuprokain, skupina BPC



Slika 5.6. Krivulja osjetljivosti rožnice u vremenu - podskupina oksibuprokain, skupine L-arg i L-arg + BPC-ja 157

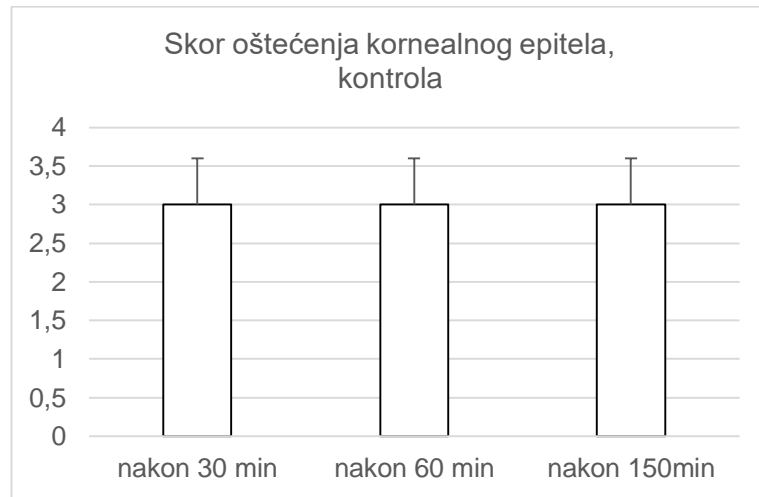


Slika 5.7. Krivulja osjetljivosti rožnice - podskupina oksibuprokain, skupine L-NAME i L-NAME + BPC 157



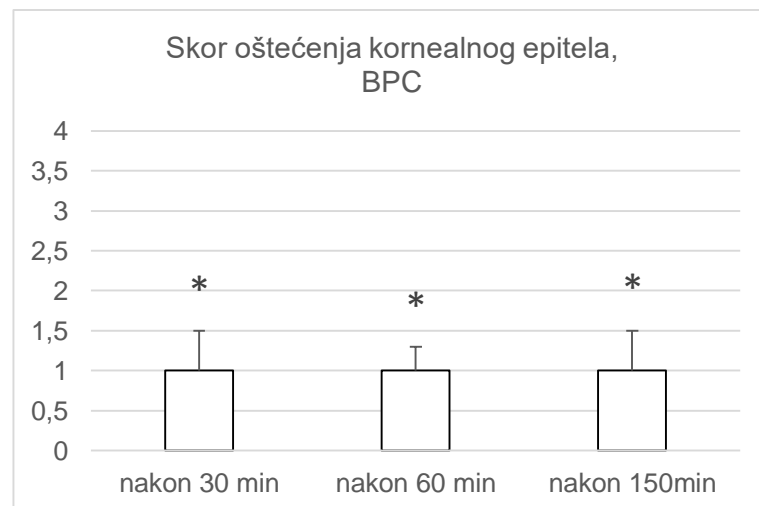
Slika 5.8. Podskupina oksibuprokain. Učinak pojedinih testiranih tvari na krivulju osjetljivosti rožnice. Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom.

Rezultati testiranja oštećenja rožnice pokazuju da topičkom aplikacijom lokalnih anestetika na rožnici nastaju oštećenja. Ta su oštećenja statistički bitno manja kod skupina lokalno tretiranih BPC-jem 157, L-argininom i kombinacijom L-arginin i BPC-ja (slike 5.9., 5.10., 5.11., 5.12.). Nakon tretmana L-NAME-om ili kombinacijom L-NAME i BPC-jem 157 nema statistički značajne razlike u oštećenju (slike 5.13. i 5.14.).



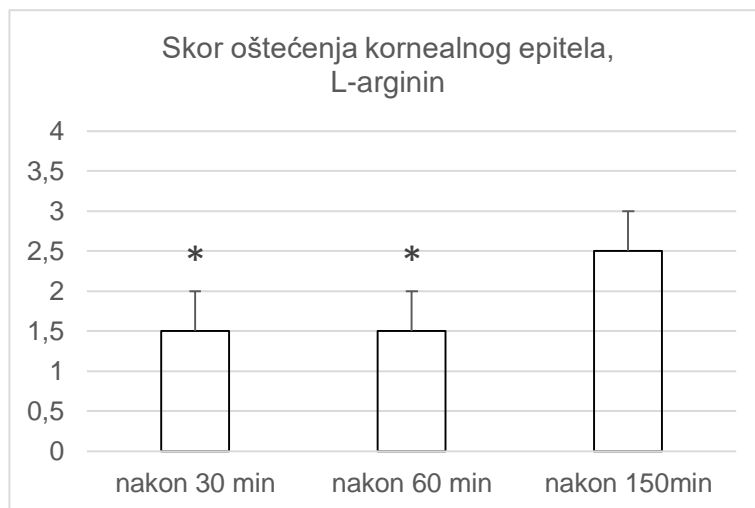
Slika 5.9. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, kontrola.

Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija

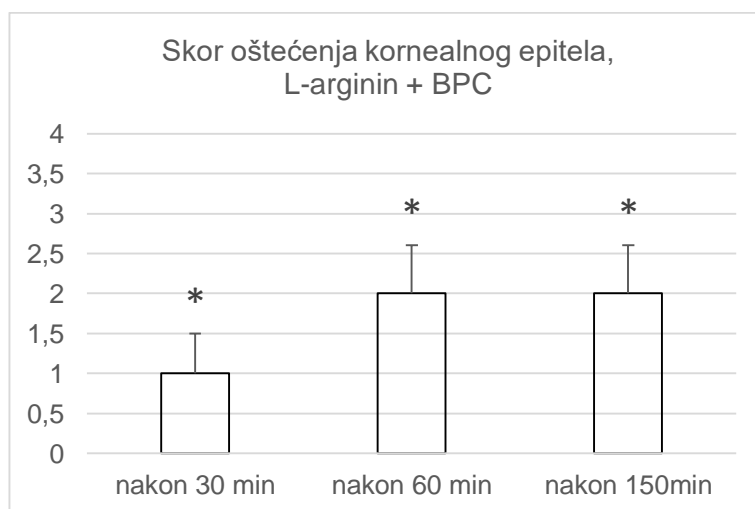


Slika 5.10. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina BPC.

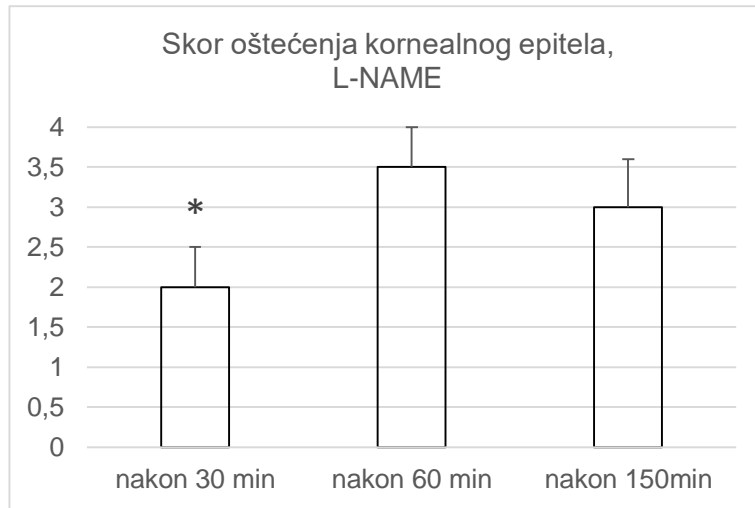
Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom



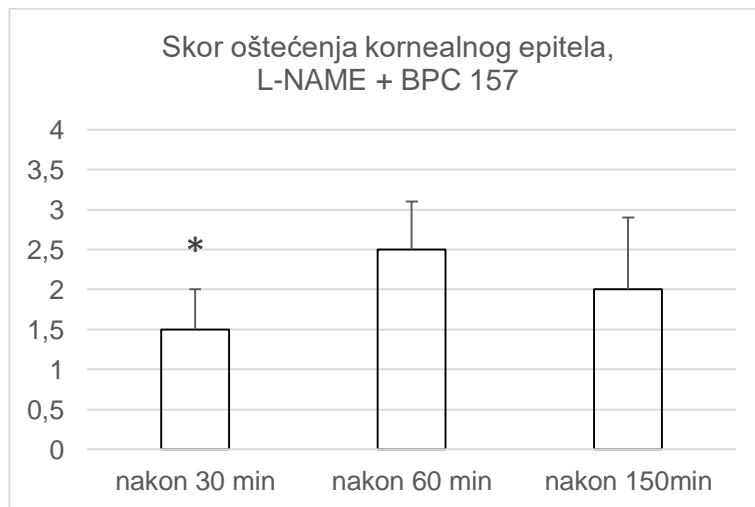
Slika 5.11. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-arginin. Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi sa kontrolom



Slika 5.12. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-arginin + BPC. Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom



Slika 5.13. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-NAME.
 Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom



Slika 5.14. Oštećenje kornealnog epitela izazvano tetrakainom, skupina L-NAME + BPC 157.
 Stupac: srednja vrijednost, linija: standardna devijacija, * = $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom

Nakon topičke aplikacije lokalnih anestetika, vlažnost rožnice i proizvodnja suza mjereni Schirmerovim testom se smanjuju. Tretman BPC-jem, L-argininom i kombinacijom L-arginina i BPC-ja 157, vlažnost rožnice štakora vraća se u vrijednosti koje su uobičajene za netretirane štakore. L-NAME primijenjen sam, ne mijenja vlažnost rožnice, dok kombinacijom L-NAME i BPC-ja 157 vlažnost raste do normalnih vrijednosti (tablica 5.5.).

Tablica 5.5. Schirmerov test nakon topičke aplikacije tetrakaina na rožnicu štakora. Korištene su 2 mm široke trakice, prilagođene veličini oka štakora, umetnute 1 mm u donji konjunktivalni forniks.

| Skupina | Nakon 30 min | Nakon 60 min | Nakon 150 min |
|---------------------|--------------|--------------|---------------|
| Kontrola | 2.5 ± 0.5 | 2 ± 0.6 | 2 ± 0.6 |
| BPC 157 | 6.5 ± 0.5* | 5 ± 0.6* | 5.5 ± 0.5* |
| L-arginin | 5.5 ± 0.5* | 3.5 ± 0.5* | 3 ± 0.9 |
| L-arginin + BPC 157 | 5.5 ± 0.5* | 6 ± 0.6* | 6 ± 0.6* |
| L-NAME | 3.5 ± 0.5* | 2.5 ± 0.5 | 1 ± 0.6* |
| L-NAME + BPC 157 | 4 ± 0.6* | 4.5 ± 0.5* | 5.5 ± 0.5* |

Rezultat u milimetrima, 5 minuta nakon postavljanja u definirani položaj.

*Srednja vrijednost ± standardna devijacija, * = p < 0,05 u usporedbi s kontrolnom skupinom*

6. RASPRAVA

Djelovanje okularnih lokalnih anestetika dulje nego što je potrebno za kirurški zahvat ili bilo koju drugu bolnu intervenciju na oku, predstavlja klinički problem za koji dosad nije pronađeno optimalno rješenje. Odabir primjerenog anestetika je jedino rješenje, no izbor lokalnih anestetika nije takav da bi našli idealan za svaku kliničku situaciju. Parcijalno rješenje je dodavanje aditiva lokalnim anestheticima kojima možemo prilagoditi farmakokinetska svojstva anestetika (5, 68, 69). Korištenjem danas dostupnih aditiva, djelovanje lokalnog anestetika možemo ubrzati, a anesteziju produbiti ili produljiti joj trajanje. Znači, ni jedan od dostupnih aditiva ne rješava problem rezidualne anestezije. Aditiv koji bi poništio ili skratio djelovanje lokalnih anestetika, a koji bi u isto vrijeme bio neškodljiv za rožnicu trenutno nije dostupan ni u kliničkoj primjeni niti je opisan u literaturi. Iako se koriste svakodnevno u kliničkoj praksi, lijekovi koji se koriste kao aditivi lokalnim anestheticima nisu službeno registrirani za primjenu kao dodatak lokalnoj ili regionalnoj anesteziji, a takva, „*off label*“, primjena bilo koje tvari nosi rizike na koje svi korisnici moraju pristati. Za anesteziju rožnice specifično je što dodavanjem aditiva u otopinu lokalnog anestetika time izlažemo površinu rožnice dodatnim kemijskim oštećenjima koje bismo svakako željeli izbjeći.

Za BPC 157 je već ranije pokazano da ima utjecaj na djelovanje lokalnih anestetika (47). U svom radu autorica Zivanović fokusirala se na jednu od nuspojava lokalnog anestetika bupivakaina – njegovu kardiotoksičnost. Nakon tog dokaza bilo je logično istražiti je li utjecaj BPC-ja 157 ograničen samo na održavanje homeostaze i ublažavanje nuspojava predoziranja lijekom ili je njegov učinak prisutan i kod pravilno primijenjenog i doziranog lijeka. Nevezano za to istraživanje, BPC 157 i inače ima jako povoljan učinak na poremećaje rada srca kod raznih drugih uzroka (42 - 46).

BPC 157 se već ranije primjenjivao na rožnicu pa znamo da je takav način primjene siguran (38 - 40). Dapače, u istraživanjima autora Masnec i Lazić pokazano je da BPC 157 ima povoljan utjecaj na zarastanje rana na rožnici, bez obzira radi li se o perforativnoj ozljedi rožnice ili totalnom debridmanu kornealnog epitela. Nakon primjene BPC-ja 157 lokalno, u obliku očnih kapi, djelovanje mu je u tim istraživanjima bilo vrlo slično učinku njegove sistemske administracije. Osim što je siguran za topičku primjenu, prema dosadašnjim studijama, ni nakon sistemske primjene BPC-ja 157 nisu

izazvane značajne nuspojave, a LD1 (letalna doza kod 1% ispitanika) nije postignuta (70).

Ovim istraživanjem je pokazano da BPC 157 skraćuje i ublažava anesteziju rožnice, inače povoljan i očekivan učinak lokalnih anestetika na rožnicu. Osjetljivost rožnice oporavlja se brže i kod štakora anesteziranih tetrakainom i kod onih anesteziranih oksibuprokainom nakon aplikacije BPC-ja 157. Zanimljivo je da je osjetljivost ublažena i kod blokade NO sintetaze (skupine L-NAME + BPC 157) i kod dodavanja supstrata za NO sintetazu (skupine L-arginin + BPC 157). Davanje očnih kapi L-arginina ili L-NAME i bez BPC-ja 157 ima utjecaj na anesteziju rožnice – L-arginin ublažuje anesteziju rožnice, a L-NAME ju pojačava. Time smo dokazali djelovanje BPC-ja 157 na sustav dušikovog oksida, ali i djelovanje sustava dušikovog oksida na lokalne anestetike.

Poznato je da BPC-jem 157 moduliramo sustav dušikovog oksida (71, 72) i poznati su mehanizmi djelovanja sustava NO. Istraživanja mehanizma djelovanja dušikovog oksida započeta su krajem dvadesetog stoljeća. Istraživanja faktora opuštanja krvnih žila kojeg luči endotel krvnih žila (EDRF, eng. *endothelium derived relaxing factor*) dovelo je do otkrića enzima sintetaze dušikovog oksida koji sintetizira pikomole dušikovog oksida na endotelu krvnih žila nakon stimulacije odgovarajućih receptora (48, 73, 74). Relaksacija mišićnih stanica krvnih žila dovodi do vazodilatacije, a baš vazodilatacijom možemo objasniti brojne učinke BPC-ja. Npr. u radu Vukojevića i suradnika (75), primjenom BPC-ja 157 nakon ligacije donje šuplje vene uspješno ubrzavamo nastanak kolateralne cirkulacije, smanjujemo trombotska zbivanja i hemodinamske reperkusije. Tu je posebno istražena i potvrđena pojačana ekspresija VEGFR2 gena (eng. *vascular endothelial growth factor receptor 2*) kod skupina štakora koji su BPC-jem 157 tretirani prije istraživanog događaja i kod skupina tretiranih BPC-jem 157 nakon ligacije donje šuplje vene, za razliku od kontrolne skupine gdje takve pojačane ekspresije nema. Time je osim vazodilatacije potvrđen i utjecaj BPC-ja i sustava dušikovog oksida na ekspresiju gena važnih za stresne događaje. U radu Duzel i suradnika (76), nakon ishemijske ozljede debelog crijeva koja je izazvana podvezivanjem segmenta lijeve količne arterije i pripadajuće vene, mikrokamerom je praćena perfuzija ciljanog segmenta crijeva, prije i nakon skidanja ligature. Ciljani segment je post mortem poslan na patohistološku analizu. Dobivenim rezultatima nedvojbeno je pokazano da primjenom BPC-ja 157 poboljšavamo

neoangiogenezu u ishemičnom periodu već unutar 15-ak minuta od nastanka ishemije, dok u periodu reperfuzije postićemo bolji oporavak i krvnih žila i crijevne mukoze. Slični rezultati pokazani su i u više drugih studija (77 - 79).

No, kako rožnica nije dobro vaskularizirano tkivo, model vazodilatacije za ovu studiju nije vjerojatan mehanizam djelovanja BPC-ja 157.

Drugi mehanizam djelovanja BPC-ja 157 je mehanizam citoprotekcije i organoprotekcije, tj. održavanja homeostaze. U radu Sikirića i suradnika (70) sumirani su podaci iz drugih studija i na jednom mjestu pokazana važna uloga BPC-ja 157 u odgovoru na stresni događaj. Dokumentirana je njegova interakcija s dopaminergičkim i serotoninergičkim sustavima te utjecaj na pro-upalne prostaglandine. Ranije je opisano i djelovanje BPC-ja 157 na brojne čimbenike važne za staničnu homeostazu – od aktivacije gena (EGR-1, eng. *early growth response*, i njegovog korepresora - gena NAB2, eng. *NGFI-A-binding-2*) (80), djelovanja na stanične receptore (VEGFR2 i receptore za hormone rasta) (81, 82) do aktivacije staničnih puteva (VEGFR2-aAKT-eNOS, ERK ½, FAK-paxillin i drugih) (82, 83). Kang i suradnici u svom radu (84) predlažu BPC 157 kao moguće rješenje za tumorsku kaheksiju. Poznato je da je ta vrsta kaheksije posredovana ili regulacijom centralnog živčanog sustava ili je povezana s kroničnom upalom. Uz ovu vrstu kaheksije idu i hipoanabolizam i hiperkatabolizam. Dosadašnje terapijske mogućnosti - nutritivna potpora i protuupalni agensi koji su do sada bili primjenjivani za ovu namjenu (megesterol) nisu bile posebno uspješne. Iz njihove studije je evidentno da primjenom BPC-ja 157 poništavamo porast protuupalnih citokina (interleukin-6, faktor tumorske nekroze-alfa) kod ovih stanja, zaustavlja se gubitak mišićnih vlakana i potiče miogeneza, a sve putem promjena u ekspresiji staničnih signalnih proteina (FoxO3a, p-AKT, p-mTOR i P-GSK-3β) koji su odgovorni za hipoanabolizam i hiperkatabolizam.

BPC 157 ima i direktan učinak na stabilizaciju staničnih membrana. In vitro studije su potvrdile njegov inhibirajući učinak na depolarizaciju HEK293 stanica izazvanu bupivakainom (47). Ako se iste stanice izlože hiperkalemiji, BPC 157 uspješno inhibira depolarizaciju stanice (42), a istovjetni rezultati dobiveni su i nakon izlaganju stanica povišenim koncentracijama magnezija (85). Primjena BPC-ja 157 u svim navedenim stanjima na staničnoj membrani dovodi do deaktivacije natrijskih kanalića čime

membrana postaju refraktorna ili s povišenim pragom za stvaranje akcijskog potencijala.

Mehanizmi citoprotekcije i mehanizmi održavanja homeostaze, kao i direktna stabilizacija stanične membrane su vjerojatni mehanizmi djelovanja BPC-ja 157 na staničnoj razini nakon topičke aplikacije lokalnih anestetika na rožnicu.

Oštećenja epitela rožnice uobičajeno rezultiraju brzim zarastanjem. Za regeneraciju su ključne matične stanice iz limbusa, dijela vanjske ovojnice očne jabučice koji okružuje rožnicu. Taj događaj kontrolira intrinzička kaskada koja uključuje interakcije između epitelnih stanica, stromalnih keratocita, kornealnih živaca i imunološkog sustava posredovana autokrinim i parakrinim citokinima (86).

Ovim istraživanjem pokazano je da se oštećenja rožnice izazvana lokalnim anestetikom tetrakainom mogu uspješno ublažiti primjenom BPC-ja 157 u obliku očnih kapi. I u ovom dijelu pokusa, primjena prekursora NO sintetaze dovodi do oporavka oštećenja rožnice, no nakon blokade NO sintetaze (skupina L-NAME) oštećenja ostaju prisutna, čak i nakon primjene BPC-ja 157. Možemo izvući zaključak da djelovanjem BPC-ja 157 poništavamo štetni učinak lokalnog anestetika na rožnicu, da je učinak BPC-ja 157 posredovan sustavom dušikovog oksida, a da se, nakon blokade NO sintetaze, gubi učinak BPC-ja 157 na oporavak oštećenja izazvano tetrakainom. Evidentno je da se aplikacijom BPC-ja 157 i moduliranjem sustava dušikovog oksida uplićemo u intrinzičnu kaskadu koja regulira oporavak oštećenih epitelnih stanica. Osim na oštećenja oka, BPC 157 ima blagotvoran učinak i na zarastanje raznih drugih ozljeda – u gastrointestinalnom traktu (72), mišićima, tetivama i kostima, (24 - 31), genito-urinarnom traktu (87), živcima (88) i drugdje pa se može smatrati da se primjenom BPC-ja 157 i aktivacijom sustava NO i inače minimaliziraju oštećenja i ubrzava zacjeljivanje.

Sindrom suhog oka (eng. *dry eye syndrome*) nastaje zbog nedovoljne količine suza na površini rožnice, tankog ili nepostojećeg suznog filma ili njegovog promijenjenog sastava na površini oka. Klinički se prezentira kao osjećaj suhoće u oku, iritacije i goruće boli što osobi s tim tegobama može praviti fizičke, socijalne, ali i psihičke tegobe (89, 90). Sindrom suhog oka možemo simulirati kirurškim odstranjenjem suzne žlijezde. Spomenut je već povoljan utjecaj BPC-ja 157 na vlažnost rožnice nakon kirurškog odstranjenja suzne žlijezde (41). Obzirom da suznih žlijezda u navedenoj

studiji nije bilo, mjesto djelovanje BPC-ja 157 je na površini rožnice. Vlažnost rožnice se smanjuje i direktnim djelovanjem nekih lijekova ili konzervansa u kojem su otopljeni na površini oka. Između ostalih lijekova tu pojavu vidimo i nakon aplikacije lokalnih anestetika (63).

Ovim istraživanjem pokazali smo da BPC 157 može ublažiti djelovanje lokalnog anestetika na vlažnost rožnice. Djelovanje BPC-ja 157 je i ovdje posredovana putem sustava dušikovog oksida. Nakon aplikacije L-arginina vlažnost rožnice raste, a nakon L-NAME bitno pada. BPC 157 pokazao je sposobnost ubrzanog povratka na uobičajene vrijednosti vlažnosti rožnice – i samostalno i u kombinaciji s L-argininom i L-NAME-om vrijednosti Schirmerovog testa se vraćaju na vrijednosti koje su uobičajene prije aplikacije lokalnog anestetika. Rezultati našeg istraživanja svakako dosljedno prate rezultate ranije izvedenih istraživanja te potvrđuju kako povećane razine NO-a dovode do pojačanog rada suzne žlijezde, a posljedično i do pojačanog stvaranja suza i vlaženja rožnice što smo potvrdili i našim istraživanjem i doprinijeli potvrdi teze o interakciji i povezanosti s NO sistemom (70).

Istraživanjem smo pokazali djelovanje testiranih tvari (BPC 157, L-arginin, L-NAME) i njihovih kombinacija na više različitih učinaka lokalnih anestetika na rožnicu štakora. Pokazali smo da primjena BPC-ja 157 značajno ublažuje i željene i neželjene učinke oba testirana lokalna anestetika na rožnicu. Manipulacijom sustavom dušikovog oksida (prekursor L-arginin i blokator NO sintetaze L-NAME) pomičemo rezultate istraživanja u sve 3 komponente istraživanja – osjetljivost rožnice, oštećenja rožnice lokalnim anestetikom i vlažnost rožnice. Evidentno je, i ovim istraživanju opetovano potvrđeno, da BPC 157 ima funkciju citoprotekcije i općenito doprinosi homeostazi organizma (68).

Možemo reći da na temelju saznanja iz ovog istraživanja možemo potvrditi da BPC 157, primijenjen u obliku očnih kapi, značajno ublažuje djelovanje lokalnih anestetika na rožnicu štakora. To djelovanje BPC-ja 157 nije ograničeno samo na osnovnu funkciju lokalnih anestetika i onu aktivnost koju njihovom primjenom želimo postići (anesteziju rožnice) nego i na nuspojave koje nastaju djelovanjem lijekova na rožnicu (toksična oštećenja rožnice i suhe oči). U nekoj budućnosti, ako dodatna istraživanja potvrde rezultate o njegovom djelovanju, BPC 157 će se moći koristiti i kao antidot za željene i neželjene učinke lokalnih anestetika.

Najveći znanstveni doprinos ovog istraživanja je proširivanje dosadašnjih spoznaja i znanja o učincima pentadekapeptida BPC-ja 157 te spoznaja o njegovom djelovanju i interakcijama što će svakako doprinijeti boljem shvaćanju opisanih mehanizama te stvoriti pretpostavke za izradu kvalitetnijih budućih studija s ciljem istraživanja supstance i njenog djelovanja.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Djelovanjem BPC-ja 157 skraćuje se trajanje anestezije nakon topičke aplikacije lokalnih anestetika na rožnicu štakora
- L-arginin također skraćuje anesteziju rožnice štakora
- L-NAME produljuje trajanje anestezije rožnice štakora
- Analizom krivulja osjetljivosti vidljivo je da i BPC 157 i L-arginin pomiču krivulju u lijevo (anestezija je plića), a L-NAME u desno (anestezija je dublja)
- Iz svega navedenoga evidentno je da je mehanizam djelovanja BPC-ja 157 putem sustava dušikovog oksida

Osim što proširujemo spoznaje o djelovanju BPC-ja 157 na organizam, dokazivanjem da BPC 157 može ublažiti djelovanje lokalnih anestetika, a nakon dodatnih istraživanja, možemo dodati izvorni znanstveni doprinos koji će se možda moći koristiti i na dobrobit bolesnika u budućoj kliničkoj praksi.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Kako prolongirani učinak lokalnih anestetika na oko može imati štetne posljedice, pokušali smo dokazati da lokalno primijenjeni BPC 157 skraćuje anesteziju rožnice nakon topičke primjene lokalnih anestetika. Taj je učinak posredovan sustavom dušičnog oksida.

Nacrt studije: Za istraživanje je provedena studija u obliku randomiziranog slijepog kontroliranog pokusa.

Materijal i metode: Nakon intraperitonealne sedacije diazepamom, muškim Wistar štakorima smo Cochet-Bonnet esteziometrom mjerili osjetljivost rožnice nakon anesteziranja rožnice lokalnim anestetikom – 0,5% tetrakainom ili 0,4% oksibuprokainom, Nakon lokalnih anestetika, štakori su tretirani nekom od istraživanih tvari (BPC 157, L-arginin, L-NAME) ovisno u koju su grupu randomizirani. Cochet-Bonnet esteziometar sastoji se od najlonskog monofilamenta koji se može izvlačiti i koji proizvodi silu pritiska na svom vrhu. Ta je sila obrnuto proporcionalna duljini izvučenog dijela filameta. Filament je promjera 0,12 mm i maksimalne duljine 6 cm. Mjerenje osjetljivosti rožnice započeli smo nježnim dodirrom rožnice vrhom maksimalno izvučenog filameta okomito na rožnicu i primjenom malog pritiska kojim nježno savijemo filament. Ako je štakor trepnuo, to smo zabilježili kao pozitivan odgovor. Ako ne bi trepnuo, nit bismo skratili za 1 cm i ponavljali testiranje dok ne dobijemo pozitivan odgovor. Odsutnost pozitivnog odgovora kada je nit izvučena na duljinu od 1 cm se definira kao kompletni kornealni blok. Bilježili smo duljinu niti koja bi izazvala pozitivan odgovor ili 0 u slučaju kompletnog bloka. Testiranje smo inicijalno izveli prije aplikacije lokalnih anestetika i kasnije u intervalima od 5 minuta do povratka početne osjetljivosti.

Rezultati: I u tetrakainskoj i u podskupini anesteziranoj oksibuprokainom evidentno je skraćenje kompletne anestezije rožnice (T1) i vrijeme povratka početne osjetljivosti (T2) kod skupine tretirane BPC-jem 157.

tetrakain T1: kontrola $59 \pm 5,2$ min, BPC 157 $45 \pm 4,6$ min, $p < 0,001$

T2: kontrola $109 \pm 12,5$ min, BPC 157 $94 \pm 7,0$ min, $p = 0,008$

oksibuprokain T1: kontrola $64 \pm 5,7$ min, BPC 157: $51 \pm 5,0$ min, $p < 0,001$

T2 kontrola: $126 \pm 3,9$ min, BPC 157: $106 \pm 7,4$ min, $p < 0,001$.

Skraćenje anestezije pojavilo se i kod skupina tretiranih L-argininom, dok se kod skupina tretiranih L-NAMEom anestezija produljila.

Zaključak: Djelovanjem putem sustava dušikovog oksida, BPC 157 uspješno je skratio trajanje anestezije rožnice štakora nakon topičke aplikacije lokalnih anestetika na nju. Temeljem provedenog istraživanja pokazali smo da se BPC 157 može koristiti kao antagonist učinku lokalnih anestetika na rožnici štakora.

Ključne riječi: Arginin; BPC 157; Dušikov oksid; Lokalni anestetici; NG-Nitroarginin Metil Ester; Rožnica; Štakori

9. SUMMARY

Effect of BPC 157 on corneal sensitivity after topical application of local anesthetics

Objectives: As prolonged effect of local anesthetics can be harmful to the eye, we tried to prove that locally applied BPC 157 shortens corneal anesthesia after topical application of local anesthetics and that this effect is nitric oxide mediated.

Study design: Randomized blind controlled experiment was conducted.

Material and methods: First, the male Wistar rats were intraperitoneally sedated with diazepam. Then, using the Cochet-Bonnet esthesiometer (Luneau Ophtalmologie, Chartres, France), the corneal sensitivity measurement device, corneal sensitivity was measured in 0.5% tetracaine- or 0.4% oxybuprocaine-treated rats. After ocular anesthetics, the rats received one or more tested substances (BPC, L-arginine, L-NAME), depending to which group the rats were randomized. Briefly, Cochet-Bonnet esthesiometer consists of nylon monofilament that can be pulled out and produces a pressure force at its top which is inversely proportional to the length of the elongated portion of the monofilament. The nylon filament is 0.12 mm in diameter and is 6 centimeters long. Corneal sensitivity testing started with a gentle touch of the fully extended tip of the esthesiometer perpendicular to the cornea and applying a small force to finely distort the filament. If the rat blinked, it was recorded as a positive response. If the blinking response was absent, filament length was reduced by 1 centimeter and the procedure was repeated until a positive response was obtained. The absence of the positive response when the filament length is 1 centimeter is defined as a complete corneal block. The length of filament in centimeters that caused positive response was recorded. In case of complete block, the value 0 was recorded. Corneal sensitivity tests were performed initially before the corneal anesthesia, and later in 5 minute intervals until full sensitivity was restored.

Results: In both tetracaine and oxybuprocaine subgroups shortening of both complete corneal anesthesia (T1) and initial sensitivity restoration time (T2) were evident in groups treated with BPC 157.

Tetracaine: T1: control $59 \pm 5,2$ min, BPC $45 \pm 4,6$ min, $p < 0,001$,

T2: control $109 \pm 12,5$ min, BPC $94 \pm 7,0$ min, $p = 0,008$,

Oxybuprocaine: T1: control $64 \pm 5,7$ min, BPC: $51 \pm 5,0$ min, $p < 0,001$,

T2: control: $126 \pm 3,9$ min, BPC: $106 \pm 7,4$ min, $p < 0,001$.

Anesthesia shortenings were also evident in groups treated with L-arginine, while in L-NAME treated groups anesthesia was prolonged.

Conclusion: BPC 157 effectively shortens rat's corneal anesthesia after topically applying local anesthetics. Its mechanism of action is nitric oxide mediated. Based on the study data we showed that BPC 157 can be used as a local anesthetic's antagonist on the rat's cornea.

Key words: Anesthetics, local; Arginine; BPC 157; Cornea; NG-Nitroarginine Methyl Ester; Nitric oxide; Rats

10. LITERATURA

1. Longnecker DE, ur. Anesthesiology. New York: The McGraw-Hill Companies, 2008.
2. Berde CB, Strichartz GR. Local anesthetics. U: Miller RD, ur. Miller's anesthesia, 8. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. Str. 1028-54.
3. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. 3. izd. Sunderland: Sinauer Associates, 2001.
4. Salinas FV. Local Anesthetics. U: Barash PG, ur. Clinical Anesthesia Fundamentals, Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. Str. 209-227.
5. Heavner JE. Additives to Local Anesthetics. Techniques Reg Anesth Pain Manage. 2004;8:105–40.
6. Rauz S, Kolli S. Cornea. U: Denniston AKO, Murray PI, ur. Oxford Handbook of Ophthalmology, 3. izd. Oxford: Oxford University Press; 2014. Str. 215-217.
7. Smith GT, Dart, JKG. Cornea. U: Jackson TL, ur. Moorfields Manual of Ophthalmology, 2. izd. London: JP Medical Ltd; 2014. Str. 157-163.
8. Ripart J, Merhige K, Rocca R. Local & Regional Anesthesia for eye surgery. U: Hadzic A, ur. Textbook of regional anesthesia and Acute pain management. New York: The McGraw-Hill Companies, 2007. Str 361-370.
9. Pflugfelder SC. Tear dysfunction and the cornea: LXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol. 2011;152(6):900-9.
10. Wang L, Shankarappa SA, Tong R, Ciolino JB, Tsui JH, Chiang HH, i sur. Topical drug formulations for prolonged corneal anesthesia. Cornea. 2013;32(7):1040–5.
11. McGee HT, Fraunfelder FW. Toxicities of topical ophthalmic anesthetics. Expert Opin Drug Saf. 2007;6(6):637-40.

12. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, i sur. The beneficial effect of BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci.* 1994;54:PL63-8.
13. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, i sur. A. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginin methylester and L-arginin effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol.* 1997;332(1):23-33.
14. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both nonsteroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris.* 1997;91:113-22.
15. 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. *Dig Dis Sci.* 1996;41:1604-14.
16. 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.* 2010;19:126–32.
17. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B, Brajsa K, Bubenik M, Stipanagic S, i sur. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut.* 2003;51(Suppl III):A309.
18. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M, Oreskovic K, Peterson J. Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL 14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2005;128:A584.

19. 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 (PL 14736, Pliva), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: the role of NO-system. *J Pharm Sci.* 2008;108:7-17.
20. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, Brcic L, Blagaic Boban A, Batelja L, i sur. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig Dis Sci.* 2009;54:46-56.
21. 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;54:2070-83.
22. 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.
23. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns.* 2001;27:817-27.
24. 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;21:976-83.
25. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J Orthop Res.* 2006;24:982-9.
26. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Su Pang JH. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. *J Appl Physiol.* 2011;110:774–780.

27. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, Jukic I, Radic B, Pevec D, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today*. 2008;38:716-25.
28. 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;24:1109-17.
29. Gwyer D, Wragg NM, Wilson SL. Gastric pentadecapeptide body protection compound BPC 157 and its role in accelerating musculoskeletal soft tissue healing. *Cell Tissue Res*. 2019;377(2):153-9.
30. Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. BPC 157 and standard angiogenic growth factors, gastrointestinal tract healing, lessons from tendon, ligament, muscle and bone healing. *Curr Pharm Des*. 2018;24:1972–89.
31. Šebečić B, Nikolić V, Sikirić P, Seiwerth S, Šoša 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;24:195–202
32. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Perovic D, Konjevoda, i sur. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry*. 1998;43:511-19.
33. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Marovic A, Perovic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;379:19-31.
34. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *European J Pharmacol*. 2005;512:173-179.

35. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Pharm Des.* 2013;19:76–83.
36. Zemba M, Cilic AZ, Balenovic I, Cilic M, Radic B, Suran J, i sur. BPC 157 antagonized the general anaesthetic potency of thiopental and reduced prolongation of anaesthesia induced by L-NAME/thiopental combination. *Inflammopharmacology.* 2015;23(6):329-36.
37. Boban Blagaic A, Turcic P, Blagaic V, Dubovecak M, Jelovac N, Zemba M, i sur. Gastric pentadecapeptide BPC 157 counteracts morphine-induced analgesia in mice. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60 Suppl 7:177-81.
38. Masnec S, Kokot A, Zlatar M, Kalauz M, Kunjko K, Radic B, i sur. Perforating corneal injury in rat and pentadecapeptide BPC 157. *Exp Eye Res.* 2015;136:9-15.
39. Lazić R, Gabrić N, Dekaris I, Bosnar D, Boban-Blagaic A, Sikirić P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. *Coll Antropol.* 2005 Jun;29(1):321-5.
40. Kokot A, Zlatar M, Stupnisek M, Drmic D, Radic R, Vcev A, i sur. NO system dependence of atropine-induced mydriasis and L-NAME- and L-arginine-induced miosis: Reversal by the pentadecapeptide BPC 157 in rats and guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2016 Jan 15;771:211-9.
41. Kralj T, Kokot A, Kasnik K, Drmic D, Zlatar M, Seiwerth S, i sur. Effects of pentadecapeptide BPC 157 on experimental rat model of dry eye. *FASEB J.* 2017;31(1):993.3.
42. Barisic I, Balenovic D, Klicek R, Radic B, Nikitovic B, Drmic D, i sur. Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. *Regul Pept.* 2013;181:50-66
43. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, i sur. Inhibition of methyl digoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept.* 2009;156:83-9

44. Bosnjak ZJ, Graf BM, Sikiric P, Stowe DF. Protective effects of newly isolated gastric peptide following hypoxic and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *FASEB J.* 1994;8(4):A129.
45. Stambolija V, Stambolija TP, Holjevac JK, Murselovic T, Radonic J, Duzel V, i sur. BPC 157. The counteraction of succinylcholine, hyperkalemia, and arrhythmias. *Eur J Pharmacol.* 2016;781:83-91.
46. Strinic D, Belosic Halle Z, Luetic K, Nedic A, Petrovic I, Sucic M, i sur. BPC 157 counteracts QTc prolongation induced by haloperidol, fluphenazine, clozapine, olanzapine, quetiapine, sulpiride, and metoclopramide in rats. *Life Sci.* 2017;186:66-79.
47. Zivanovic-Posilovic G, Balenovic D, Barisic I, Strinic D, Stambolija V, Udovicic M, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 and bupivacaine. *Eur J Pharmacol.* 2016;793:56-65.
48. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med.* 1993;329:2002-11.
49. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-142.
50. Moncada S. Nitric oxide. *J Hypertens Suppl.* 1994;12(10):S35-S39.
51. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogenes. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res.* 1999;443:37-52.
52. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999;9:119-131.
53. Calver A, Collier J, Vallance P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol.* 1993;78:303-326.
54. J. A. M. Avontuur á S. L. C. E. Buijk á H. A. Bruining. Distribution and metabolism of N G-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54: 627±631

55. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*. 1995; 82: 1598–1610.
56. Kirkboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999;43:275–288.
57. Kokot A. Atropin, pilokarpin, NO sistem, BPC 157 na midrijazi u štakora [disertacija]. Osijek: Sveučilište Josip Jurja Strossmayera, Medicinski Fakultet; 2015.
58. Feldman MA. Anesthesia for eye surgery. U: Miller RD, ur. *Miller's anesthesia*, 8. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. Str. 2513-22.
59. Deljou A, Weingartner TN, Mahr MA, Sprung J, Martin DP. Postoperative Corneal Injuries: Incidence and Risk Factors. *Anesth Analg*. 2019;129(3):737-742.
60. Brewitt H, Honegger H. The influence of local anesthetics on corneal epithelium. A scanning electron microscopic study (author's transl). *Klin Monbl Augenheilkd*. 1978 Sep;173(3) 347-54.
61. Brewitt H, Bonatz E, Honegger H. Morphological changes of the corneal epithelium after application of topical anaesthetic ointments. *Ophthalmologica*. 1980;180(4):198-206.
62. Judge AJ, Najafi K, Lee DA, Miller KM. Corneal endothelial toxicity of topical anesthesia. *Ophthalmology*. 1997 Sep;104(9):1373-9.
63. Herreras JM, Perez S, Perez H, Calonge M, Pastor JC. Influence of topical anesthesia on tests diagnostic of blepharitis-associated dry eye syndrome. *Ocul Immunol Inflamm*. 1997;5(1):33-41.
64. Gaertner DJ, i sur. Anesthesia and analgesia for laboratory rodents. U: Fish RE, i sur. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 2. izd. London: Academic Press; 2008. Str 239-297

65. Faulkner WJ, Varley GA. Corneal diagnostic techniques. U: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. Cornea. 2. izd. Philadelphia: Elsevier/Mosby; 2005. Str. 229-35.
66. Sharrow-Reabe K, Townsend WM, Effects of action of proparacaine and tetracaine topical ophthalmic formulations on corneal sensitivity in horses. J Am Vet Med Assoc. 2012;241:1645–9.
67. Costa D, Peña MT, Ríos J, Leiva M. Evaluation of corneal anaesthesia after the application of topical 2 per cent lidocaine, 0.5 per cent bupivacaine and 1 per cent ropivacaine in dogs. Veterinary Record. 2014;174:478.
68. Kirksey MA, Haskins SC, Cheng J, Liu SS. Local Anesthetic Peripheral Nerve Block Adjuvants for Prolongation of Analgesia: A Systematic Qualitative Review. PLoS ONE;2015:10(9):e0137312.
69. Swain A, Nag DS, Sahu S, Samaddar DP. Adjuvants to local anesthetics: Current understanding and future trends. World J Clin Cases. 2017;5(8):307–323.
70. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. Curr Pharm Des. 2010;16:1224–34.
71. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. Curr Pharm Des. 2014;20:1126–35.
72. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des. 2011;17:1612–32.
73. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6.
74. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988;333:664-6.

75. Vukojević J, Siroglavić M, Kašnik K, Kralj T, Stancic T, Kokot A, i sur. Rat inferior caval vein (ICV) ligation and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Vascul Pharmacol.* 2018;106:54–66.
76. Duzel A, Vlainic J, Antunovic M, Malekinusic D, Vrdoljak B, Samara M, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in treatment of colitis and ischemia and reperfusion in rats: New insights. *World J Gastroenterol* 2017; 23(48): 8465-88.
77. Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M, i sur. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des.* 2014;20:1121-25.
78. Keremi B, Lohinai Z, Komora P, Duhaj S, Borsi K, Jobbagy-Ovari G, i sur. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60 Suppl 7:115–122.
79. Amic F, Drmic D, Bilic Z, Krezic I, Zizek H, Peklic M, i sur. Bypassing major venous occlusion and duodenal lesions in rats, and therapy with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157, L-NAME and L-arginine. *World J Gastroenterol.* 2018;24(47):5366–78.
80. Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situmi 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.
81. Chang CH, Tsai WC, Hsu YH, Pang JH. Pentadecapeptide BPC 157 enhances the growth hormone receptor expression in tendon fibroblasts. *Molecules.* 2014;19:19066-77.
82. Hsieh MJ, Liu HT, Wang CN, Huang HY, Lin Y, Ko YS, i sur. Therapeutic potential of proangiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and up-regulation. *J Mol Med (Berl).* 2017;95:323-33.
83. Radelj S, Seiwerth S, Sikiric P. BPC 157 inhibits cell growth and VEGF signalling via the MAPK kinase pathway in the human melanoma cell line. *Melanoma Res* 2004;14:A14-A15

84. Kang EA, Han YM, An JM, Park YJ, Sikiric P, Kim DK, i sur. BPC157 as potential agent rescuing from cancer cachexia. *Curr Pharm Des.* 2018;24:1947-56.
85. Medvidovic-Grubisic M, Stambolija V, Kolenc D, Katancic J, Murselovic T, Plestina-Borjan I, i sur. Hypermagnesemia disturbances in rats, NO-related: pentadecapeptide BPC 157 abrogates, L-NAME and L-arginine worsen. *Inflammopharmacology* 2017;25:439-49.
86. M. Ziaei, Green C, Green CR. Wound healing in the eye: Therapeutic prospects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;126:162–76.
87. Jandric I, Vrcic H, Jandric Balen M, Kolenc D, Brcic L, Radic B, i sur. BPC 157 and stress urinary incontinence. *Med Sci Monit Basic Res.* 2013; 19: 93-102.
88. 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;160:33-41.
89. Meng ID, Barton ST, Mecum NE, Kurose M. Corneal sensitivity following lacrimal gland excision in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(5):3347–3354.
90. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5:75–92.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podaci

Ime i prezime: Ivan Mirković

Datum rođenja: 31. 8. 1976.

Adresa Posao: Štampareva ulica 42, 35000 Slavonski Brod

Kućna: Berislavićeva ulica 82, 35000 Slavonski Brod

Državljanstvo: hrvatsko

Telefon Posao: 035 / 201615

Kuća: 035 / 277030

Mobitel: 091 / 5849121

Elektronička pošta: ivanmirk@gmail.com

Zaposlenje

Naziv radnog mjesta: Specijalist anesteziolog, liječnik na Odjelu za anesteziju, reanimaciju i intenzivno liječenje

Ustanova zaposlenja: Opća bolnica „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod

Školovanje

1991.-1995. Prirodoslovno-matematička gimnazija „Matija Mesić“ u Slavonskom Brodu

1995.-2001. Studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2001.-2002. liječnički pripravnički staž

2003.-2007. specijalizacija iz anesteziologije

2017.-2019. subspecijalizacija intenzivna medicina

Stručne aktivnosti:

Aktivno sam sudjelovao na više tečajeva stalnog medicinskog usavršavanja, domaćih i inozemnih kongresa i simpozija.

Popis kongresnih sažetaka:

- Mirkovic I, Matic I, Kopic J, Pitlovic H. Comparison of regional and general anesthesia for major shoulder surgery, prospective study. 5th International Symposium on regional anaesthesia and pain therapy
- Mirkovic I, Kopic J, Ratkovic S. Potential organ donor transport – our experience. European Organ Donation Congress, 24th ETCO-EDC
- Mirkovic I, Jurjevic M, Matic I, Mrzljak-Vucinic N. Pain management in laparoscopic procedures. 11. hrvatski kongres endoskopske kirurgije

Popis predavanja na stručnim skupovima:

- Tečaj Klinička nutricija u intenzivnoj i perioperacijskoj medicini, Slavonski Brod, ožujak 2019. - predavač
- Međunarodni tečaj mehaničke ventilacije, Slavonski Brod, ožujak 2019. - predavač
- Tečaj neinvazivne mehaničke ventilacije, Slavonski Brod, studeni 2018. - predavač
- Međunarodni tečaj zbrinjavanja masovnih nesreća - CroMRMI, Slavonski Brod, listopad 2018. - predavač, instruktor
- Tečaj mehanička respiracijska potpora. Dubrovnik, listopad 2016. – predavač

Publikacije:

Sudjelovao sam u izradi i koautor sam u nekoliko stručnih studija i članaka.

- Matic I, Danic D, Majeric-Kogler V, Jurjevic M, Mirkovic I, Mrzljak Vucinic N. Chronic obstructive pulmonary disease and weaning of difficult-to-wean patients from mechanical ventilation: randomized prospective study. *Croat Med J.* 2007;48:51-8.
- Rutovic S, Dikanovic M, Mirkovic I, Lojen G, Marcikic M. Intracerebellar hemorrhage caused by superwarfarin poisoning. *Neurol Sci.* 2013;34:2071.
- Matic I, Majeric-Kogler V, Sakic-Zdravcevic K, Jurjevic M, Mirkovic I. Comparison of invasive and noninvasive mechanical ventilation for patients with COPD. *Indian J Anaesth.* 2008;52:419.
- Kopic J, Mirkovic I, Lucic I, Ajdinovic A, Jurjevic M. First measured intrathoracic blood volume in ICU patients indicates the appropriateness of circulatory volume management. *Signa vitae.* 2007;2:18-20.