

ATROPIN, PILOKARPIN, NO SISTEM, BPC 157 NA MIDRIJAZI U ŠTAKORA

Kokot, Antonio

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:893418>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Antonio Kokot

ATROPIN, PILOKARPIN, NO SISTEM, BPC 157 NA MIDRIJAZI U ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

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

Rad ima 57 listova.

Disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i na Katedri za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Ona predstavlja dio istraživanja obuhvaćenih znanstveno-istraživačkim projektom Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Pentadekapeptid BPC 157 – daljnja istraživanja“ (broj projekta: 108-1083570-3635).

ZAHVALA

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

Mentoru prof.dr.sc. Predragu Sikiriću na ogromnoj energiji, entuzijazmu, zalaganju i trudu koje je bio spreman uložiti na suradnju sa mnom i bez kojeg ovoga rada zasigurno ne bi ni bilo.

Djelatnicima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, osobito Ivanu Domagoju Drmiću, dr.med. i Ivanu Gržibovskom na pomoći pri manipuliranju sa životinjama i provođenju pokusa.

Prof.dr.sc. Aleksandru Včevu i prof.dr.sc. Radivoju Radiću na nesebičnoj potpori u svakodnevnom radu i na izradi ovog doktorata.

Svojoj supruzi Arijani na potpori, razumijevanju i strpljenju te roditeljima Darku i Mari na požrtvornosti, odricanju i životnim smjernicama bez kojih bih jako teško napredovao osobno i profesionalno.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU.....	VI
POPIS TABLICA.....	VIII
POPIS SLIKA.....	IX
1.1. Zjenica	1
1.2. Lijekovi s djelovanjem na zjenicu	2
1.2.1. Atropin	2
1.2.2. Pilokarpin	3
1.3. NO, NO-sintetaza, L-arginin, L-NAME	3
1.4. Pentadekapeptid BPC 157.....	4
1.5. Prikaz problema	5
2. HIPOTEZA	8
3. CILJEVI ISTRAŽIVANA.....	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. Eksperimetalne životinje i priprema	10
4.2. Ustroj studije.....	11
4.2.1. Eksperimentalne skupine	18
4.2.2. Kontrolne skupine	22
4.3. Supstancije korištene u istraživanju.....	23
4.4. Metode.....	23
4.5. Statistička obrada podataka.....	26
5. REZULTATI	27
6. RASPRAVA	39
7. ZAKLJUČCI.....	42
8. SAŽETAK	43
9. SUMMARY	44
10. LITERATURA.....	45
11. ŽIVOTOPIS	56

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

BPC	engl. „Body Protection Compound“
BPC 157	želučani pentadekapeptid BPC 157
F.O.	fiziološka otopina
i.p.	intraperitonealno
L-Arg	L-Arginin
L-NAME	N(G)-nitroL-Arginin metilester
NO	dušikov oksid
NOs	sintetaza dušičnog oksida
t.t.	tjelesna težina

Mjerne jedinice

μg	mikrogram
g	gram
h	sat
i.j.	internacionalna jedinica
kg	kilogram
L	litra

min	minuta
ml	mililitar
ng	nanogram
s	sekunda

POPIS TABLICA

Tablica 1. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – intraperitonealna primjena	13
Tablica 2. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – intraperitonealna primjena	14
Tablica 3. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – lokalna primjena	15
Tablica 4. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – intraperitonealna primjena	16
Tablica 5. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – lokalna primjena	17

POPIS SLIKA

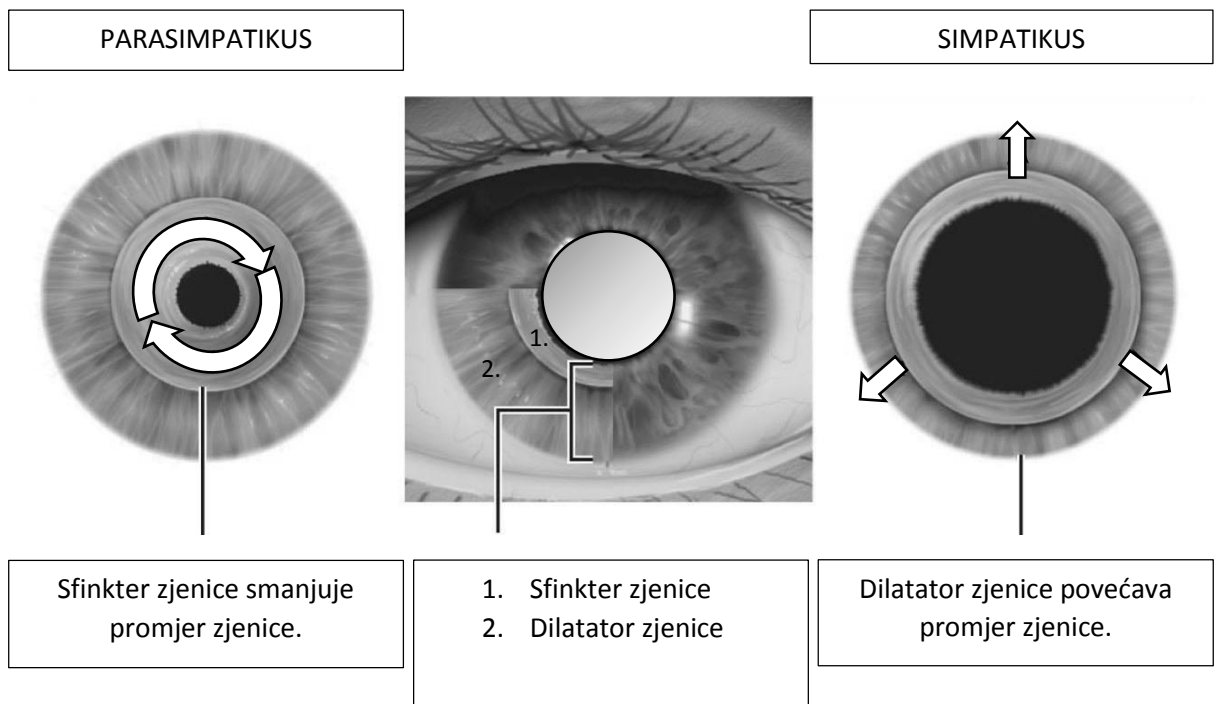
Slika 1. Prikaz zjenice, mišića sfinktera i dilatatora zjenice te djelovanja autonomnog živčanog sustava na njih.....	2
Slika 2. Proces nastajanja NO iz L-arginina i molekularnog kisika. Reakciju katalizira NO-sintetaza, a inhibira ju N(G)-nitro-L-arginin metil ester	4
Slika 3. Prikaz Albino Wistar štakora tijekom pokusa (2 pokusne skupine).....	11
Slika 4. Prikaz USB kamere Veho Discovery VMS-004 Deluxe	25
Slika 5. Kalibracija kamere prije mjerenja na milimetarskom papiru	25
Slika 6. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) s obzirom na vrijeme u intervalima od 4 sata. Nakon potvrđene maksimalne midrijaze uzrokovane atropinom (30 min nakon apliciranja atropina ((2 kapi 1% atropina/oko)) (početak neposredno prije apliciranja supstancija, vrijeme 0h, vertikalna strelica), sve koncentracije BPC 157 aplicirane intraperitonealno; 10µg/kg (BPC 157 µg), 10 ng/kg (BPC 157 ng), 10 pg/kg (BPC 157 pg) uzrokuju antagonizaciju midrijaze uzrokovanu atropinom. *P<0.05 najmanje nasuprot kontrolnoj skupini (con) (fiziološka otopina 5ml/kg aplicirana intraperitonealno).....	28
Slika 7. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od 4 sata. Nakon potvrđene maksimalne midrijaze uzrokovane atropinom (30 min nakon apliciranja atropina ((2 kapi 1% atropina/oko)) (početak neposredno prije apliciranja supstancija, vrijeme 0h, vertikalna strelica), sve supstancije aplicirane intraperitonealno; BPC 157 (10µg/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)) uzrokuju antagonizaciju midrijaze uzrokovanu atropinom. B,A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju *P<0.05, najmanje nasuprot kontrolnoj skupini (con) (fiziološka otopina 5ml/kg aplicirana intraperitonealno).....	29
Slika 8. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) s obzirom na vrijeme u intervalima od 4 sata. Nakon potvrđene maksimalne midrijaze uzrokovane atropinom (30 min nakon apliciranja atropina ((2 kapi 1% atropina/oko)) (početak neposredno prije apliciranja supstancija, vrijeme 0h, vertikalna strelica), sve supstancije aplicirane u obliku kapi za oči (2 kapi/oko); BPC 157 (10µg/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N),i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)) uzrokuje antagonizaciju midrijaze uzrokovanu atropinom. B, A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju *P<0.05 najmanje nasuprot kontrolnoj skupini (con) (destilirana voda 2 kapi/oko).	30
Slika 9. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) s obzirom na vrijeme u intervalima od 30 minuta (-0,3 prikazuje početno stanje prije aplikacije supstancija). Sve supstancije aplicirane intraperitonealno; BPC 157 (10µg/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)), osim BPC 157 samostalno uzrokuju miozu. A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolnoj skupini (con) (fiziološka otopina 5ml/kg intraperitonealno).....	31
Slika 10. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od 30 minuta (-0,3 prikazuje početno stanje prije aplikacije supstancija). Sve supstancije aplicirane u obliku kapi za oči (2 kapi/oko); BPC 157 (10µg/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)), osim BPC 157 samostalno uzrokuju miozu. A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolnoj skupini (con) (destilirana voda 2 kapi/oko).	32

Slika 11. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od 1 minute. Sve supstancije (osim pilokarpina) aplicirane su intraperitonealno; BPC 157 (10 μ g/kg), fiziološka otopina (5ml/kg). Stupci označeni * pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolne skupine (con).	33
Slika 12. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od pola sata. Sve supstancije (osim pilokarpina) aplicirane su intraperitonealno; BPC 157 (10 μ g/kg), BPC 157 (10ng/kg), fiziološka otopina (5ml/kg). Stupci označeni * pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolne skupine (con).....	34
Slika 13. Prikaz normalne širine zjenice štakora (r=0,36mm, C=2,25mm, P=0,40mm ²)	35
Slika 14. Prikaz zjenice štakora u maksimalnoj midrijazi 30 minuta nakon apliciranja atropina (2 kapi 1% atropina/oko) (r=2,35mm, C=14,76mm, P=17,35mm ²)	35
Slika 15. Prikaz normalne širine zjenice štakora skupine životinja koja je primila BPC 157 (10 μ g/kg). Nakon 44 h pokusa (aktivne supstancija aplicirane intraperitonealno) (r=0,38mm, C=2,36mm, P=0,44mm ²)	36
Slika 16. Prikaz normalne širine zjenice štakora skupine životinja koja je primila BPC 157 (10 μ g/kg). Nakon 44 h pokusa (aktivne supstancija aplicirane u obliku kapi za oči (2 kapi/oko)) (r=0,42mm, C=2,65mm, P=0,56mm ²)	36
Slika 17. Prikaz zjenice štakora u semimidrijazi kontrolne skupine životinja koja je primila fiziološku otopinu 5ml/kg. Nakon 28h pokusa (aktivne supstancija aplicirane u obliku kapi za oči (2kapi/oko)) (r=1,70mm, C=10,68mm, P=9,07mm ²).....	37
Slika 18. Prikaz zjenice štakora u semimidrijazi kontrolne skupine životinja koja je primila fiziološku otopinu 5ml/kg. Nakon 44h pokusa (aktivne supstancija aplicirane intraperitonealno) (r=0,89mm, C=5,61mm, P=2,50mm ²)	37
Slika 19. Prikaz zjenice štakora u miozi nakon 30 minuta pokusa (r=0,14mm, C=0,88mm, P=0,06mm ²)	38

1. UVOD

1.1. Zjenica

Zjenica je centralni otvor u šarenici koji regulira količinu svjetla koje ulazi u oko. Zjenica promjenom svoje veličine utječe na količinu svjetlosti koja ulazi u oko te umanjuje optičke aberacije refraktivnog sustava oka. Širina zjenice je vrlo važna za dobru vidnu oštrinu. U tamnom okruženju širina zjenice je veća, dok je u svijetlom okruženju i pri gledanju na blizinu širina zjenice manja. Širinu zjenice regulira ravnoteža dvaju mišića koji se nalaze u šarenici (1,2). To su sfinkter (koji stišće-m.sphincter pupillae) i dilatator (koji širi-m. dilatator pupillae) zjenice, oba građena od glatkih mišićnih stanica. Ta dva mišića su antagonisti, tj. suprotnog su djelovanja na veličinu zjenice i međusobno se nadopunjuju. Sfinkter zjenice je kružnog oblika u blizini zjeničnog ruba i pod utjecajem je parasimpatikusa, čije niti do njega dolaze putem 3. moždanog živca n.occulomotoriusa, dok je dilatator zjenice radijalno postavljen poput žbica na kotaču bicikla i pod utjecajem je simpatikusa čije niti do njega dolaze iz gornjeg vratnog ganglija putem arterije koja opskrbljuje oko krvlju (1,2). Oba mišića su pod utjecajem autonomnog živčanog sustava, što znači da nisu pod utjecajem naše volje. Stanje proširene zjenice naziva se midrijaza, dok se stanje sužene zjenice naziva mioza (2).



Slika 1. Prikaz zjenice, mišića sfinktera i dilatatora zjenice te djelovanja autonomnog živčanog sustava na njih

1.2. Lijekovi s djelovanjem na zjenicu

Stanje proširene zjenice naziva se midrijaza pa se stoga lijekovi koje koristimo za širenje zjenice nazivaju midrijatici. Stanje sužene zjenice naziva se mioza pa se stoga lijekovi koje koristimo za sužavanje zjenice nazivaju miotici. Široko rasprostranjeni, i od davnina u upotrebi, lijekovi za širenje i sužavanje zjenice su atropin i pilokarpin.

1.2.1. Atropin

Lijekovi koje koristimo za širenje zjenice nazivamo midrijatici. Jedan od najstarijih poznatih takvih lijekova je iz porodice velebilja atropin (*Atropa belladonna*), vrlo jaki parasimpatolitik. Atropin se veže na muskarinske receptore (M1 i M2) uzrokujući njihovu blokadu pa se stoga naziva parasimpatolitik (3). Nuspojave primjene atropina su: iritacija oka i crvenilo, osjetljivost

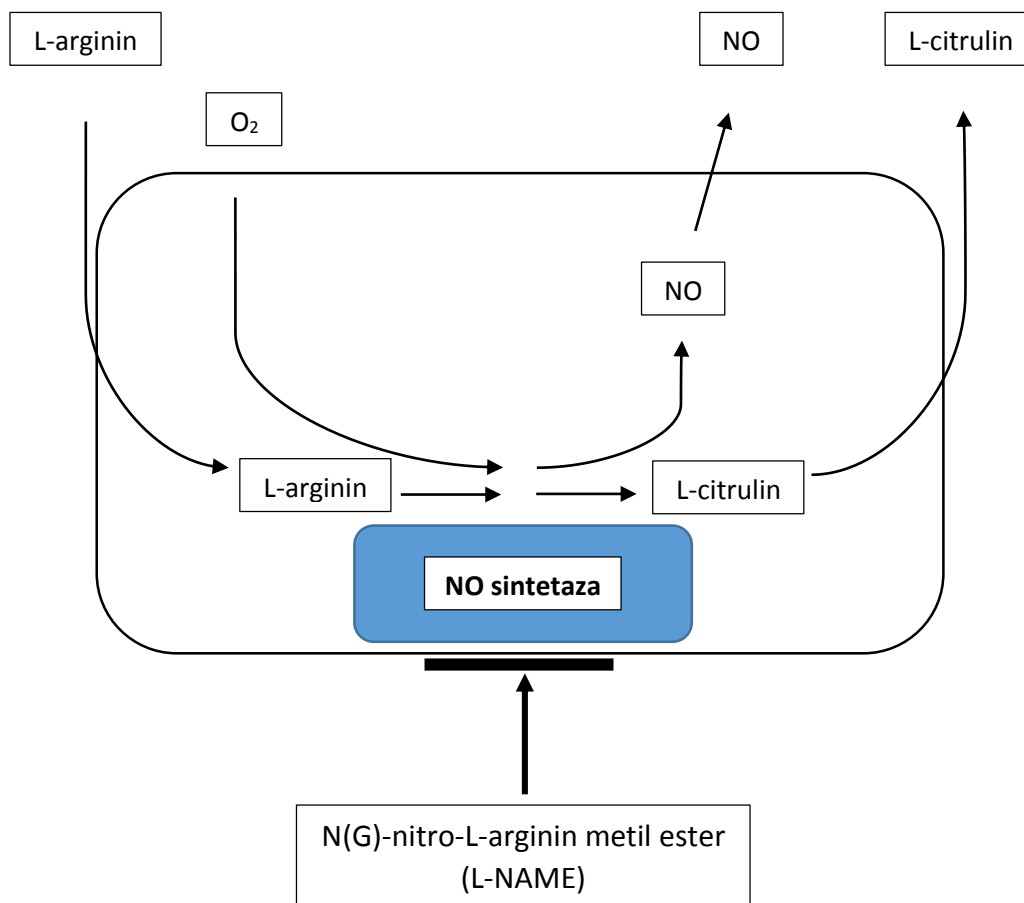
na jako svijetlo, suha usta, crvena ili suha koža, zamućen vid, povišeni očni tlak, (također i vrućica, iritabilnost, brzi puls, nepravilan srčani ritam, mentalna dezorijentacija, teškoće pri uriniranju) (3).

1.2.2. Pilocarpin

Lijekove koji sužuju zjenicu nazivamo miotici. Jedan od najpoznatijih miotika je pilokarpin. Pilocarpin je neselektivni agonist muskarinskih receptora (M3 u oku) pa se stoga naziva parasimpatomimetik (3). Nuspojave pilokarpina su: zamagljen ili zamućen vid, žuljanje oka, svrbež ili crvenilo oka, oticanje oka, crvenilo očnih rubova, glavobolja (također i znojenje, tremor mišića, nervozan želudac, povraćanje, dijareja, teškoće pri disanju, vrtoglavica, slabost) (3). Paradoksalno, u štakora, miševa i još nekih glodavaca pilokarpin nakon početne mioze uzrokuje midrijazu (4,5).

1.3. NO, NO-sintetaza, L-arginin, L-NAME

Dušikov oksid (NO) vrlo je bitan untarstanični i izvanstanični glasnik. L-arginin je esencijalna aminokiselina i prekursor je dušikova oksida. Dušikov oksid nastaje iz L-arginina katalitičkom reakcijom dušik oksid sintetaze (NOs) (6,7). Poluživot dušikova oksida je vrlo kratak, manje od 5 sekundi. Normalno nastaje u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama. Sudjeluje u organizmu u upalnim reakcijama, regulaciji krvnog tlaka, proliferaciji glatkih mišićnih stanica i inhibiciji agregacije trombocita (8,9). Dušikov oksid posjeduje antioksidativna i prooksidativna svojstva, te je kao takav važan medijator homeostatskih procesa u organizmu. N(G)-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je spoj koji se koristi u laboratorijskim uvjetima za inhibiciju NO-sintetaze. L-NAME inhibira NOs natjecanjem s L-argininom.



Slika 2. Proces nastajanja NO iz L-arginina i molekularnog kisika. Reakciju katalizira NO-sintetaza, a inhibira ju N(G)-nitro-L-arginin metil ester

1.4. Pentadekapeptid BPC 157

Želučani pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419) je anti-ulkusni peptid (10-19) iskušan u brojnim kliničkim istraživanjima. BPC 157 je uspješan u terapiji upalne bolesti crijeva (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva) (20,21) i u cijeljenju rana (22-28). Stabilan je u humanom želučanom soku (29) i nema zabilježeno toksično djelovanje (20,21). U organizmu pokazuje organoprotektivnu aktivnost. Istraživanja su pokazala citoprotektivan učinak BPC 157 na sluznicu želuca u štakora izloženu oštećenjima (alkohol, nesteroidni protuupalni lijekovi) (30-32). BPC157 antagonizira učinke etanola i nastanak akutnih i kroničnih lezija želuca i jetre (10,14,15,17,33-35) te lezija prouzročenih uporabom nesteriodnih protuupalnih lijekova (36). Pentadekapeptid BPC 157 dovodi do otpuštanja NO te antagonizira učinke

prekursora NO (L-arginin) kao i učinke blokatora NOs-a (L-NAME) (15-35). Osim toga, pentadekapeptid BPC 157 štiti somatosenzorne živce nakon primjene neurotoksina kapsaicina i obnavlja njihovu funkciju (37,38). BPC 157 poništava serotoninški sindrom u štakora (39).

Također, BPC 157 primijenjen odmah nakon anastomoze abdominalne aorte značajno je smanjio formiranje tromba i edem stijenke krvne žile, u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. U životinja tretiranih s BPC 157 i.p. 24 sata nakon zahvata, u vrijeme žrtvovanja (3 minute nakon tretmana) nije bilo očitih aortalnih okluzija, samo su eritrociti bili prisutni u lumenu (40). Učinak BPC 157, kao mogućeg organoprotektivnog medijatora, zapažen je u brojnim studijama koje su istraživale farmakodinamičke učinke BPC na različitim modelima oštećenja tkiva i organa pa tako između ostalog i na poremećaje u koagulaciji (41). Studija je pokazala da primjena BPC reducira vrijeme krvarenja i količinu izgubljene krvi u heparinom (1000 ij/kg i.p. 2 sata prije zahvata) tretiranih i netretiranih životinja kojima su bili napravljeni rezovi na repovima.

Najvažnije za ovaj rad, prethodna istraživanja su pokazala blagotvorne učinke BPC 157 na glatko mišićje od kojega su izgrađeni i sfinkter te dilatator zjenice. Pokazani su ubrzani oporavak donjeg jednjačnog sfinktera i piloričkog sfinktera u štakora s ezofagitisom (42,43), kao i ubrzani oporavak uretralnog sfinktera (44). Također, pokazano je ubrzano cijeljenje i anastomoza nakon masivne resekcije tankog crijeva u štakora (13,45).

1.5. Prikaz problema

U štakora smo testirali hipotezu da midrijaza uzrokovana atropinom ovisi o NO sistemu na poseban način i da će N(G)-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), blokator NOs, i L-arginin, prekursor NO uzrokovati miotski učinak (koji može biti međusobno antagoniziran), efekt koji do sada nije opisan u literaturi, i da midrijaza uzrokovana atropinom, kao i mioza uzrokovana s L-NAME i L-Argininom, te mioza i midrijaza uzrokovane pilokarpinom mogu biti antagonizirane sa stabilnim želučanim pentadekapeptidom BPC 157 s obzirom na njegovu interakciju s NO sistemom i funkcijom sfinktera (42-51). Za pokazivanje učinka u pokusima koristili smo lokalnu aplikaciju supstancija u obliku kapi za oči te sistemnu aplikaciju supstanci u obliku intraperitonealne injekcije (možda izbaciti). Kao što je već istaknuto, važnost dušikova

oksida (NO) (52) koji se tvori dušičnom sintetazom (NOs) od L-arginina, koji je supstrat ili prekursor (7), prepoznata je u fiziologiji opuštanja glatkih mišića, osobito vaskularnih glatkih mišića (7), kao i respiratornih (53), crijevnih (54-56) i genitourinarnih (57). Posebno, NOs je osobito prezentiran u očnom tkivu (58) što su pokazale in-vitro studije. Očni glatki mišići (trabekularna mreža, cilijarni mišić i sfinkter zjenice) reagiraju na egzogene „donore“ NO (59-62), dok je odgovor relaksacije izazvan stimulacijom električnim poljem inhibiran NOs inhibitorima (npr. L-NAME) (52). Topička aplikacija donora NO snižavaju intraokularni tlak (63,64), dok inhibitori NOS antagoniziraju efekte atropina, sugerirajući intrigantni paralelni efekt NOS supstrata i NOS inhibitora na atropinsku midrijazu kao i na miotski efekt koji i sami uzrokuju. Prethodno je u zečeva L-NAME antagonizirala miozu uzrokovanu morfinom i očnom upalom, dok L-arginin nije testiran (66-69). Međutim, nije poznato kako će primjena NOS blokatora (L-NAME) i NO supstrata (L-Arginin) samostalno ili zajedno djelovati na normalnu zjenicu ili na midrijazu uzrokovanu atropinom. Kao što je spomenuto stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 (istraživan u kliničkim istraživanjima kao originalni antiulkusni peptid, a trenutno i u kliničkim istraživanjima za multiplu sklerozu, kod kojeg letalna doza (LD-1) nije postignuta, bez dokazanih nuspojava) ima poseban efekt na odražavnje funkcije sfinktera (42-45,49-51). Osim posebnih učinaka na cijeljenje rana (uključujući oporavak rožnice nakon totalnog debridmana epitela nakon korištenja kapi BPC 157 (70)), krvne žile i krvarenje (40,71), BPC 157 uzrokuje poseban efekt na NO sistemu (uključujući razne modele (15,46-49,72-76) i razne životinjske vrste, interagira i/ili antagonizira efekte primjene inhibitora NOs sintetaze (L-NAME) i NOs supstrata (L-arginin) (15,46-49,72-76)), kao što je ranije opisano (46,47). Efekt BPC 157 na miozu uzrokovanu s L-NAME i L-argininom ili posebno na midrijazu uzrokovanu atropinom kao ni efekt L-NAME i/ili L-arginina na midrijazu uzrokovanu atropinom do sada nisu istraživani. Kao što tvrdimo (52), prikupljene informacije o interakciji dušičnog oksida i glatkih mišića (59-62) zahtijevaju istraživanje miotskog efekta L-NAME i L-Arginina te posljedično mogu definirati buduće moguće mehanizme za midrijazu uzrokovanu atropinom. Oni su istraživani lokalnom aplikacijom kao i sistemnom aplikacijom supstancija. Vrlo vjerojatno antagonizirajući efekt BPC 157 na midrijazu uzrokovanu atropinom i njegova interakcija sa supstancama koje utječu na NO sistem može doprinijeti postavljanju pouzdanih i efikasnih terapijskih pristupa i metoda.

Nuspojave primjene atropina i pilokarpina su mnogobrojne i navedene su u početku teksta. Oporavak funkcije mišića koji šire i skupljaju zjenicu nakon primjene istih preparata je od neizmjerne važnosti za normalno funkcioniranje organizma kako bi osoba kod koje su primijenjeni u terapijske i dijagnostičke svrhe postala što prije samostalna i radno sposobna. Kao što BPC 157 dovodi do oporavka glatkih mišića duž probavnog trakta, navedeno prije u tekstu, pretpostavljamo da dovodi i do oporavka intrinzičnih očnih mišića tako što skraćuje vrijeme potrebno da se zjenica vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja atropinom i pilokarpinom.

2. HIPOTEZA

Na temelju dosadašnjih spoznaja o utjecaju pentadekapeptida BPC 157 na glatko mišićje postavili smo sljedeće hipoteze u smislu djelovanja na oko:

- a) BPC 157 skraćuje vrijeme potrebno zjenici da se vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja atropinom (antagonizira djelovanje atropina)
- b) BPC 157 skraćuje vrijeme potrebno zjenici da se vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja pilokarpinom (antagonizira djelovanje pilokarpina)
- c) učinak je zavisn od djelovanja na NO sistem.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANA

Ciljevi istraživanja su:

- a) utvrditi vrijeme potrebno da se zjenica vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja životinje s BPC 157 i atropinom
- b) utvrditi vrijeme potrebno da se zjenica vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja životinje s BPC 157 i pilokarpinom
- c) utvrditi je li učinak zavisen od djelovanja na NO sistem

Ovim radom želim pokazati da BPC 157 skraćuje vrijeme potrebno zjenici da se vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja atropinom, odnosno pilokarpinom.

Svrha ovog istraživanja je proširenje dosadašnjih spoznaja o utjecaju pentadekapeptida BPC 157 na sustav intrinzičnih mišića oka nakon tretiranja istih atropinom, odnosno pilokarpinom te utvrditi je li učinak ovisan o djelovanju na NO sistem. Dosadašnje spoznaje o djelovanju BPC 157 na glatko mišićje postoje i idu u prilog ovom istraživanju, međutim, dosadašnji podaci o djelovanju na oko su oskudni ili ne postoje.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimetalne životinje i priprema

U istraživanju su korišteni nasumice odabrani štakori Albino soja Wistar (slika 3.), muškog spola, okvirne težine 200-250 grama, uzgoja Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, držani u kavezima pri sobnoj temperaturi ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) s 12-satnim svjetlosnim režimom dan-noć. Eksperimentalne životinje su za vrijeme pokusa koristile prehranu s komercijalnom hranom (Diets Standard, Mucedola s.r.l., Italija). Voda i hrana daju se *ad libitum*. Štakori su podijeljeni u 18 velikih skupina (ukupno 39 podskupina). Za pokuse će se koristiti po 5 štakora u svakoj eksperimentalnoj skupini, što ukupno iznosi 195 štakora (podijeljenih u skupine opisane u tablici 1. i 2.). Koristeći dostupne alate na internetu (<http://www.danielsoper.com/statcalc3/calc.aspx?id=47>) za računanje potrebne veličine uzoraka došao sam do minimalne veličine uzorka od 5 štakora po skupini za svoje istraživanje. Na osnovu provedene pilot studije izračunao sam da je „predviđena veličina efekta“ 4 (Cohen's $d \rightarrow$ definirana razlikom između srednjih vrijdnosti podataka dvije skupine podijeljena standardnom devijacijom navedenih podataka), statističku snagu testa postavio sam na 0.999 te „p“ vrijednost postavio na konvencionalno određenu vrijednost $p=0,05$.

Istraživanje se provodilo pod laboratorijskim uvjetima i pravilima Zavoda, a u skladu s dobrom laboratorijskom praksom.

Istraživanje je provedeno u skladu s odredbama Zakona o dobrobiti životinja (NN 19/99) i Zakona o zaštiti životinja (NN 136/06) Republike Hrvatske, a odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku.



Slika 3. Prikaz Albino Wistar štakora tijekom pokusa (2 pokusne skupine)

4.2. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno u dvije faze:

1. faza se izvodila na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je provedeno tretiranje pokusnih životinja supstancijama i snimanje istih.
2. faza se provela obradom snimki (slike) pokusa posebnim softwareom za mjerenje promjera, opsega i površine zjenice. Slike će biti načinjene neposredno prije i nakon davanja BPC-157 te u intervalima od 4 sata, odnosno 30 minuta.

Nakon mjerenja težine i obilježavanja životinja na kontrolne i tretirane skupine, uslijedila je aplikacija supstancija korištenih u ovom istraživanju.

Nakon umirivanja eksperimentalnih životinja anestheticima aplicirano im je u svako oko 2 kapi 1 % otopine atropina, odnosno 2 kapi 1 % otopine pilokarpina. Nakon proteka određenog vremena (prema shemi opisanoj kasnije u tekstu i tablicama 1. i 2.) životinjama su aplicirani intraperitonealno, odnosno lokalno 1 mL, odnosno 2 kapi (0,2mcg) u oko otopine BPC 157, odnosno L-NAME, L-arginina, L-NAME i L-arginina (u odgovarajućoj koncentraciji i prema shemi prikazanima u Tablici 1., Tablici 2. i Tablici 3.).

Slikanje životinja vršilo se neposredno prije i neposredno nakon apliciranja BPC 157, odnosno fiziološke otopine kod kontrolne skupine životinja, u intervalima od 4 sata, odnosno 30 minuta, odnosno 1 minute. Završetkom slikanja eksperimentalnih životinja završava 1. faza pokusa. Po završetku 1.faze pokusa životinje su žrtvovane.

Nakon završetka 1. faze pokusa pristupilo se izvođenju 2. faze pokusa u koju je uključena obrada i analiza dobivenih podataka.

Tablica 1. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – intraperitonealna primjena

Br. skupine	Oznaka skupine	Broj životinja	Vrsta i doza lijeka	Doza BPC 157 ili ekvivalent F.O.	Napomena	Način aplikacije
1.	Skupina 1A	5	Atropin 1% otopina kontrola	Ekvivalent. F.O.		i.p.
2.	Skupina 1B	5	Atropin 1% otopina	10 µg/kg TT		i.p.
3.	Skupina 1C	5	Atropin 1% otopina	10 ng/kg TT		i.p.
4.	Skupina 1D	5	Atropin 1% otopina	10 pg/kg TT		i.p.
5.	Skupina 2A	5	Pilokarpin 1% otopina kontrola	Ekvivalent. F.O.	midrijaza	i.p.
6.	Skupina 2B	5	Pilokarpin 1% otopina	10 µg /kg TT	midrijaza	i.p.
7.	Skupina 2C	5	Pilokarpin 1% otopina	10 ng/kg TT	midrijaza	i.p.
8.	Skupina 3A	5	Pilokarpin 1% otopina kontrola	Ekvivalent. F.O.	mioza	i.p.
9.	Skupina 3B	5	Pilokarpin 1% otopina	10 µg /kg TT	mioza	i.p.

Tablica 2. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – intraperitonealna primjena

Br. skupine	Oznaka skupine	Broj životinja	Vrsta i doza lijeka	Doza BPC 157 ili ekvivalent F.O.	Napomena	Način aplikacije
10.	Skupina 4A	5	Atropin 1% otopina kontrola	Ekvivalent. F.O.	L-ARG	i.p.
11.	Skupina 4B	5	Atropin 1% otopina	10 µg/kg TT	L-ARG	i.p.
12.	Skupina 5A	5	Atropin 1% otopina kontrola	Ekvivalent. F.O.	L-NAME	i.p.
13.	Skupina 5B	5	Atropin 1% otopina	10 µg/kg TT	L-NAME	i.p.
14.	Skupina 6A	5	Atropin 1% otopina kontrola	Ekvivalent. F.O.	L-ARG + L-NAME	i.p.
15.	Skupina 6B	5	Atropin 1% otopina	10 µg/kg TT	L-ARG + L-NAME	i.p.

Tablica 3. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – lokalna primjena

Br. skupine	Oznaka skupine	Broj životinja	Vrsta i doza lijeka	Doza BPC 157 ili ekvivalent destilirana voda	Napomena	Način aplikacije
16.	Skupina 7A	5	Atropin otopina kontrola	1% - Ekvivalent destilirana voda		lokalno
17.	Skupina 7B	5	Atropin otopina	1% 10 µg/kg TT		lokalno
18.	Skupina 8A	5	Atropin otopina kontrola	1% - Ekvivalent destilirana voda	L-ARG	lokalno
19.	Skupina 8B	5	Atropin otopina	1% 10 µg/kg TT	L-ARG	lokalno
20.	Skupina 9A	5	Atropin otopina kontrola	1% - Ekvivalent destilirana voda	L-NAME	lokalno
21.	Skupina 9B	5	Atropin otopina	1% 10 µg/kg TT	L-NAME	lokalno
22.	Skupina 10A	5	Atropin otopina kontrola	1% - Ekvivalent destilirana voda	L-ARG + L-NAME	lokalno
23.	Skupina 10B	5	Atropin otopina	1% 10 µg/kg TT	L-ARG + L-NAME	lokalno

Tablica 4. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – intraperitonealna primjena

Br. skupine	Oznaka skupine	Broj životinja	Vrsta i doza lijeka	Doza BPC 157 ili ekvivalent destilirana voda	Napomena	Način aplikacije
24.	Skupina 11A	5		Ekvivalent. F.O.		i.p.
25.	Skupina 11B	5		10 µg/kg TT		i.p.
26.	Skupina 12A	5		Ekvivalent. F.O.	L-ARG	i.p.
27.	Skupina 12B	5		10 µg/kg TT	L-ARG	i.p.
28.	Skupina 13A	5		Ekvivalent. F.O.	L-NAME	i.p.
29.	Skupina 13B	5		10 µg/kg TT	L-NAME	i.p.
30.	Skupina 14A	5		Ekvivalent. F.O.	L-ARG + L-NAME	i.p.
31.	Skupina 14B	5		10 µg/kg TT	L-ARG + L-NAME	i.p.

Tablica 5. Raspored ispitivanih životinja i primijenjenih supstancija po skupinama – lokalna primjena

Br. skupine	Oznaka skupine	Broj životinja	Vrsta i doza lijeka	Doza BPC 157 ili ekvivalent destilirana voda	Napomena	Način aplikacije
32.	Skupina 15A	5		Ekvivalent destilirana voda		lokalno
33.	Skupina 15B	5		10 µg/kg TT		Lokalno
34.	Skupina 16A	5		Ekvivalent destilirana voda	L-ARG	lokalno
35.	Skupina 16B	5		10 µg/kg TT	L-ARG	lokalno
36.	Skupina 17A	5		Ekvivalent destilirana voda	L-NAME	lokalno
37.	Skupina 17B	5		10 µg/kg TT	L-NAME	lokalno
38.	Skupina 18A	5		Ekvivalent destilirana voda	L-ARG + L-NAME	lokalno
39.	Skupina 18B	5		10 µg/kg TT	L-ARG + L-NAME	lokalno

4.2.1. Eksperimentalne skupine

Skupine 1A, 1B, 1C i 1D: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran BPC 157 intraperitonealno u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 2A, 2B i 2C: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine pilokarpina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran BPC 157 intraperitonealno u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 3A i 3B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine pilokarpina te im je istovremeno intraperitonealno apliciran BPC 157 u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaku 1 minutu. Pokus je završio nakon 30 minuta praćenja.

Skupine 4A i 4B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran L-arginin (100 mg/kg) intraperitonealno te potom BPC 157 intraperitonealno u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC

157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 5A i 5B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran L-NAME (5 mg/kg) intraperitonealno te potom BPC 157 intraperitonealno u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 6A i 6B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima su aplicirani L-arginin (100 mg/kg) i L-NAME (5 mg/kg) intraperitonealno te potom BPC 157 intraperitonealno u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica se uslikalo neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 7A i 7B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 8A i 8B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran L-arginin (100 mg/kg) u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) te potom BPC 157 u obliku kapi za oči (2

kapi/oko) u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 9A i 9B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima je apliciran L-NAME (5 mg/kg) u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) te potom BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 10A i 10B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga im je ukapano u svako oko 2 kapi 1% otopine atropina. Nakon 30 minuta štakorima su aplicirani L-arginin (100 mg/kg) i L-NAME (5 mg/kg) u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) te potom BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svaka 4 sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 11A i 11B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga apliciran im je BPC 157 intraperitonealno u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio dogovorno nakon 5 sati.

Skupine 12A i 12B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga apliciran im je L-arginin (100 mg/kg) intraperitonealno u odgovarajućoj dozi te potom BPC

157, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 13A i 13B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga apliciran im je L-NAME (5 mg/kg) intraperitonealno u odgovarajućoj dozi te potom BPC 157, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 14A i 14B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga aplicirani su im L-arginin (100 mg/kg) i L-NAME (5 mg/kg) intraperitonealno u odgovarajućoj dozi te potom BPC 157, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu fiziološke otopine intraperitonealno. Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 15A i 15B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga apliciran im je BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi, a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode u obliku kapi za oči (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio dogovorno nakon 5 sati.

Skupine 16A i 16B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga apliciran im je L-arginin (100 mg/kg) u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi te potom BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko), a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode u obliku kapi za oči (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije

početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 17A i 17B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga apliciran im je L-NAME (5 mg/kg) u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi te potom BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko), a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode u obliku kapi za oči (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

Skupine 18A i 18B: Životinje su umirene malim dozama tiopentala i diazepama. Nakon toga aplicirani su im L-arginin (100 mg/kg) i L-NAME (5 mg/kg) u obliku kapi za oči (2 kapi/oko) u odgovarajućoj dozi te potom BPC 157 u obliku kapi za oči (2 kapi/oko), a kontrola je dobila ekvivalentnu količinu destilirane vode u obliku kapi za oči (2 kapi/oko). Stanje zjenica je slikano neposredno prije početka pokusa, neposredno prije i nakon apliciranja BPC 157, isto se ponavljalo svakih 30 minuta sata. Pokus je završio kada su se zjenice vratile u početno normalno stanje.

4.2.2. Kontrolne skupine

Kontrolne skupine činile su eksperimentalne životinje koje su podvrgnute istom tretmanu kao i ostale ispitivane životinje, ali su umjesto pentadekapeptida BPC 157 (koji je u istraživanju primijenjen kao ispitivana supstanca čiji se učinak na postavljeni model ispitivao), odnosno L-NAME i/ili L-arginina tretirane s ekvivalentnim volumenom fiziološke otopine primijenjene intraperitonealno, odnosno destilirane vode primijenjene lokalno u obliku kapi za oči.

4.3. Supstancije korištene u istraživanju

Supstancije korištene u istraživanju su:

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDALV, MW. 1419) (Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija) je isječak sekvence ljudskog proteina BPC iz želučanog soka, slobodno topivog u vodi pri pH 7.0, kao i u fiziološkoj otopini (Patent, primjerice Sikiric i sur, Pharmacologically active substance, the process for its preparation, and its use in the therapy. EP 0432400). Priprema se kao što je ranije opisano u protokolu (35 T). Peptid 99%-tne čistoće (HPLC) (1-d-Gly peptid kao nečistoća) otopljen u fiziološkoj otopini korišten je u svim eksperimentima. Početna doza koja se koristila u pokusu je uobičajena početna doza koja se koristila u prijašnjim sličnim pokusima s BPC 157, dok su ostale doze one koje dovode do postupnog nestajanja učinka pa sve do gubljenja učinka, tj. potpunog nestajanja učinka. Rezultati dobiveni u pilot studijama koje su napravljene pokazuju i više nego očit učinak te zbog takvog razmišljanja nisam našao svrsishodno istraživati veće doze od opisanih jer bi to bilo bezrazložno i neopravdano trošenje resursa i životinja, dok bi rezultati bili nerelevantni i beznačajni u znanstvenom smislu.

Apaurin (Diazepamum, Krka, Slovenija) (1 mL/kg → 0,2 mL/200g), Tiopental (Thiopental Inresa, Freiburg, Njemačka) (0,75 mL/kg → 0,15 mL/200g), fiziološka otopina/destilirana voda (Pliva, Zagreb, Hrvatska), komercijalno kupljeni i uobičajeno korišteni za induciranje i održavanje anestezije, tj. sediranje laboratorijskih životinja radi lakšeg manipuliranja s njima.

L-arginin (100 mg/kg → 20 mg/200g) i L-NAME (5 mg/kg → 1 mg/200g) su iz zaliha Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sve supstancije (lijekovi i/ili fiziološka otopina/destilirana voda) davane su u akutnoj primjeni, aplicirani intraperitonealno ili lokalno sukladno planu istraživanja. Svaki lijek pripremao se na dan pokusa.

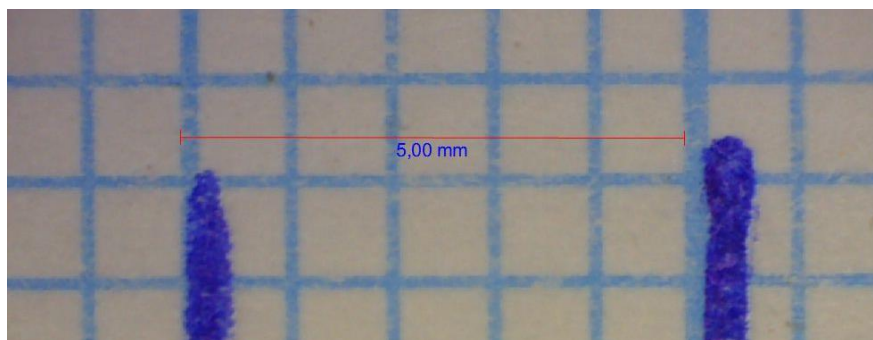
4.4. Metode

Sva apliciranja lijekova i supstancija su izvedena od strane doktoranda kao neposrednog vršitelja pokusa i veterinarskog tehničara zaposlenog na Zavodu za farmakologiju Medicinskog

fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Supstancije su aplicirane lokalno ili/i intraperitonealno. Kako bismo eliminirali faktore iz okoliša koji utječu na veličinu zjenice (npr. svjetlost) ili do kojih sami dovodimo (npr. stres nastao manipuliranjem životinjama ili sediranjem istih) u svaku seriju pokusa su paralelno uključene životinje iz svake skupine kako bi se pokus odvijao u istim uvjetima za svaku životinju izuzev primljene djelatne supstancije odnosno fiziološke otopine. Tako smo sigurni da su do pokazanog učinka dovele jedine 2 varijable koje čine jedinu razliku između kontrolne skupine životinje (koje su dobile fiziološku otopinu/destiliranu vodu) i skupine životinja koje su dobile djelatnu tvar (pentadekapeptid BPC 157) (slika 3.). Slikanje na početku pokusa, prije apliciranja djelatne tvari i u intervalima od svaka 4 sata, odnosno 30min, također se vršilo od strane doktoranda kao neposrednog vršitelja pokusa i veterinarskog tehničara Zavoda za farmakologiju. Slikanje je obavljeno USB mikroskopskom kamerom „Veho discovery VMS-004 deluxe“. Obrada slika je obavljena posebnim softwareom kupljenim s kamerom. Obrada slika podrazumijeva mjerenje polumjera, opsega i površine zjenice. Mjerna jedinica za polumjer je milimetar (mm), za opseg također milimetar (mm), dok će površina zjenice biti izražena u milimetrima kvadratnim (mm²). Prije svakog snimanja kamera je kalibrirana na milimetarskom papiru.



Slika 4. Prikaz USB kamere Veho Discovery VMS-004 Deluxe



Slika 5. Kalibracija kamere prije mjerenja na milimetarskom papiru

4.5. Statistička obrada podataka

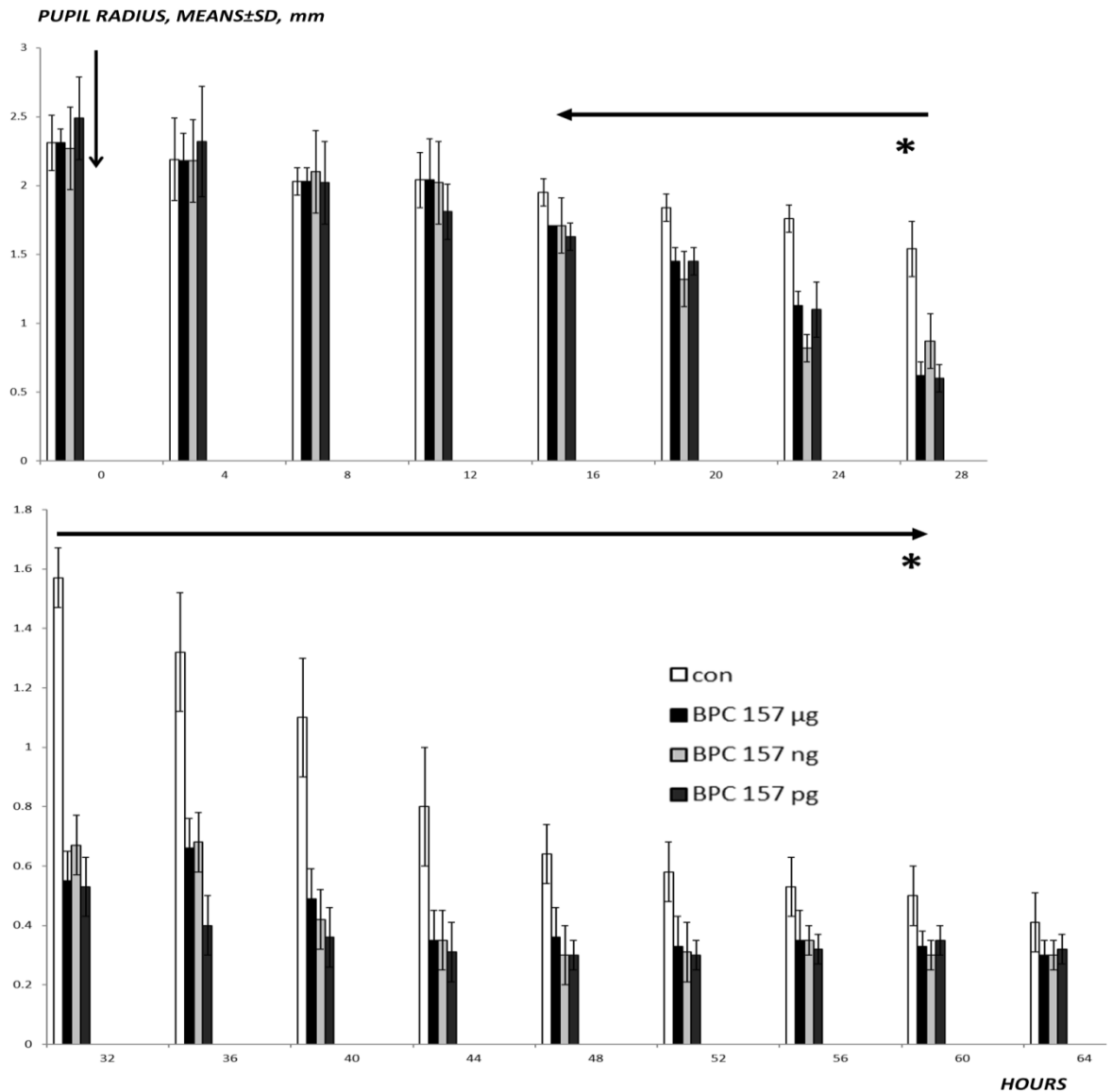
Numerički podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u slučaju raspodjela koje ne slijede normalnu razdiobu medijanom i interkvartilnim rasponom.

Statistička analiza je napravljena korištenjem parametrijskog dvosmjernog modela ANOVA (jedan faktor su ponavljana mjerenja) i student Newman-Keuls testa da bismo testirali razlike među grupama. Također, koristili smo i neprametrijski Kruskal Wallis i post hoc Mann Whitney U test. Test Fisherove točne vjerojatnosti smo koristili da bismo ocijenili frekvencije i razlike među grupama. Statistička analiza obavila se programom Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). P vrijednost 0,05 ili manje je uzeta kao statistički značajna.

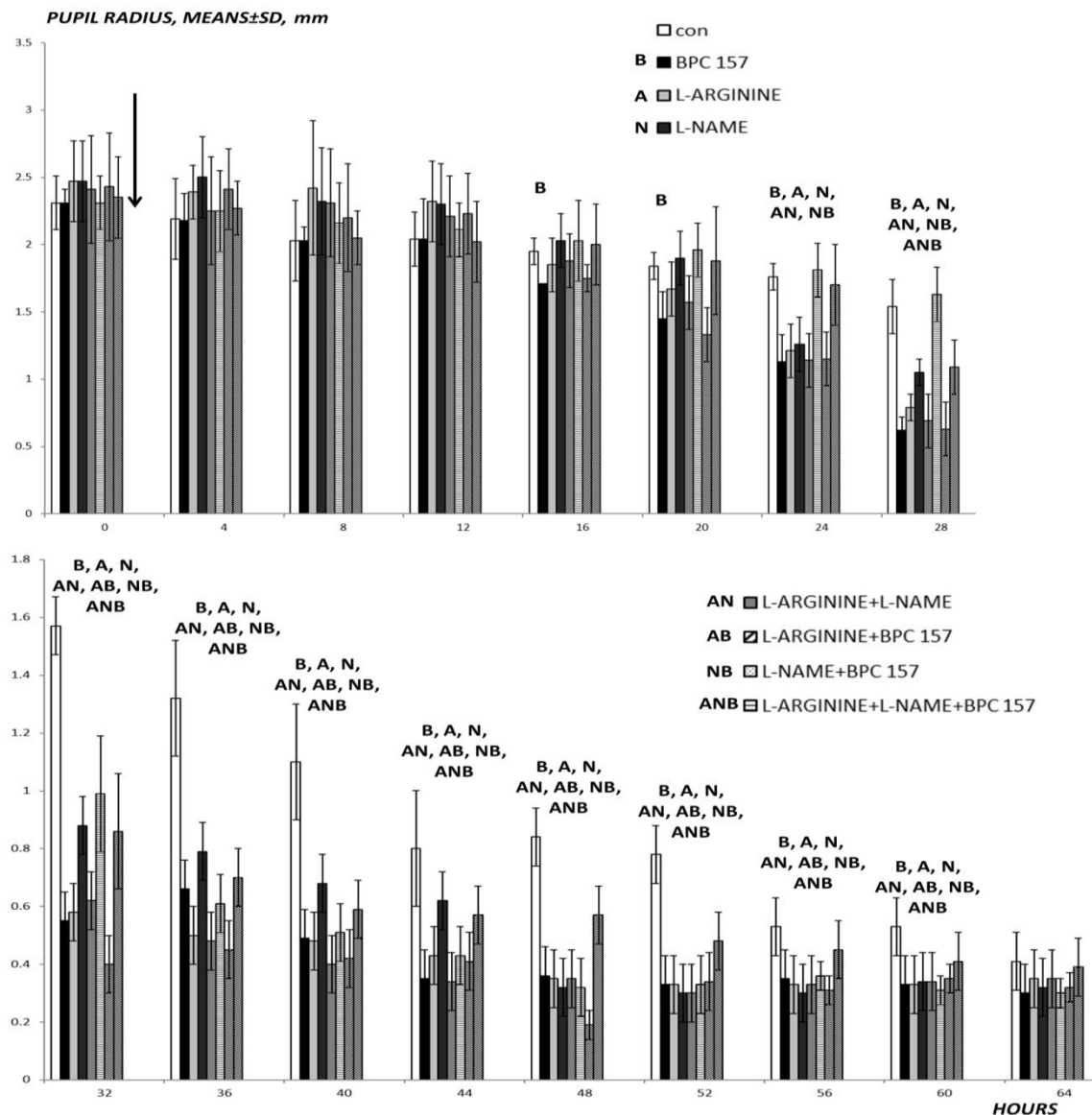
5. REZULTATI

Na zjenicama u štakora nakon lokalne ili sistemske primjene pokazali smo poseban modulatorni učinak stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 kako na dugotrajni miotski učinak nakon primjene L-NAME i/ili L-arginina (cca 3h) tako i na midrijazu uzrokovanu atropinom i miozu i midrijazu uzrokovanu pilokarpinom te da je djelovanje ovisno o stimulaciji i/ili blokadi NO sistema (Slika 6.-12.). Općenito, sve navedene supstancije koje mogu antagonizirati midrijazu uzrokovanu atropinom, a stoga i L-NAME-miozu i L-arginin-miozu te atropinsku midrijazu su osjetljive na NO sistem. Miotski učinak L-NAME i L-arginina je uglavnom paralelan (izraženiji učinak kada su primijenjeni lokalno i zajedno), ali i kompetitivan (pokazujući brže vraćanje zjenice u početno normalno stanje nakon intraperitonealne primjene L-NAME i L-arginina). Primijenjen lokalno ili sistemski, modulatorni antagonizirajući potencijal BPC 157 nema nikakvog evidentnog utjecaja na normalnu zjenicu, dok ima utjecaja na medikamentno izazvanu midrijazu i miozu.

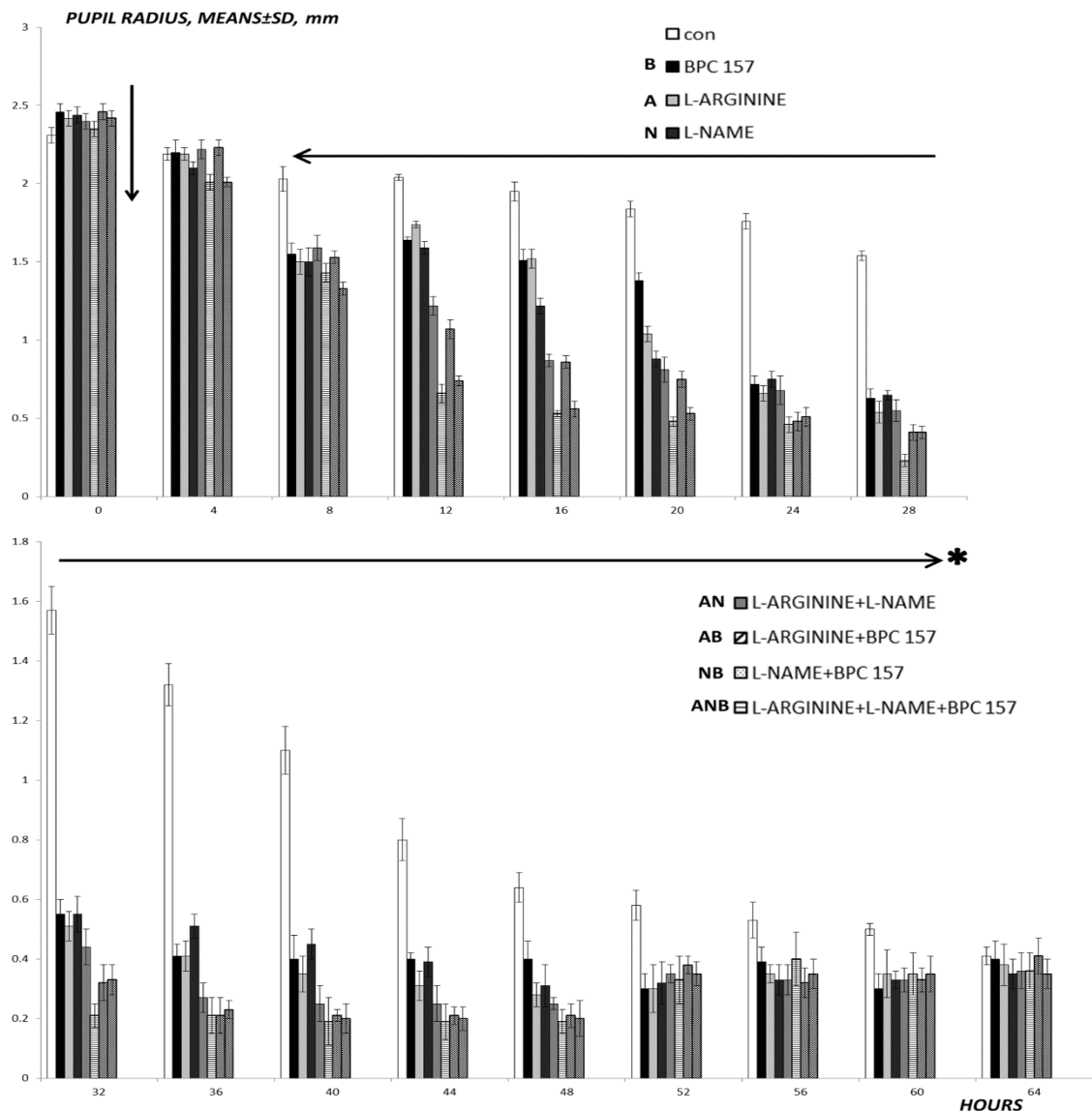
Primijenjen lokalno (u obliku kapi za oči) u štakora s normalnom širinom zjenice BPC 157 povećava miotski učinak L-arginina, antagonizira miotski učinak L-NAME, dok u antagoniziranju midrijaze uzrokovane atropinom, uz vlastiti antagonizirajući učinak, ima aditivni učinak primijenjen s L-argininom, s L-NAME ili s L-argininom i L-NAME primijenjenih zajedno. Primijenjen sistemski (intraperitonealno), BPC 157 skraćuje dužinu trajanja miotskog učinka intraperitonealno primijenjenih L-arginina, L-NAME ili L-arginina i L-NAME zajedno te također ne utječe na njihov antagonizirajući učinak na midrijazu uzrokovanu atropinom. Pokazali smo kako mioza u štakora traje kraće kod BPC 157 te ne postigne maksimalnu midrijazu kod pretretmana, a kod posttretmana midrijza kraće traje. Primijenjen sistemski na miozu kao i na midrijazu uzrokovanu pilokarpinom BPC 157 skraćuje vrijeme koje je potrebno zjenici da se vrati u normalno početno stanje te smanjuje maksimalnu midrijazu uslijed koje dolazi nakon primjene pilokarpina te time također pokazuje antagonizirajući potencijal skraćujući vrijeme trajanja mioze kao i manje izraženu maksimalnu midrijazu.



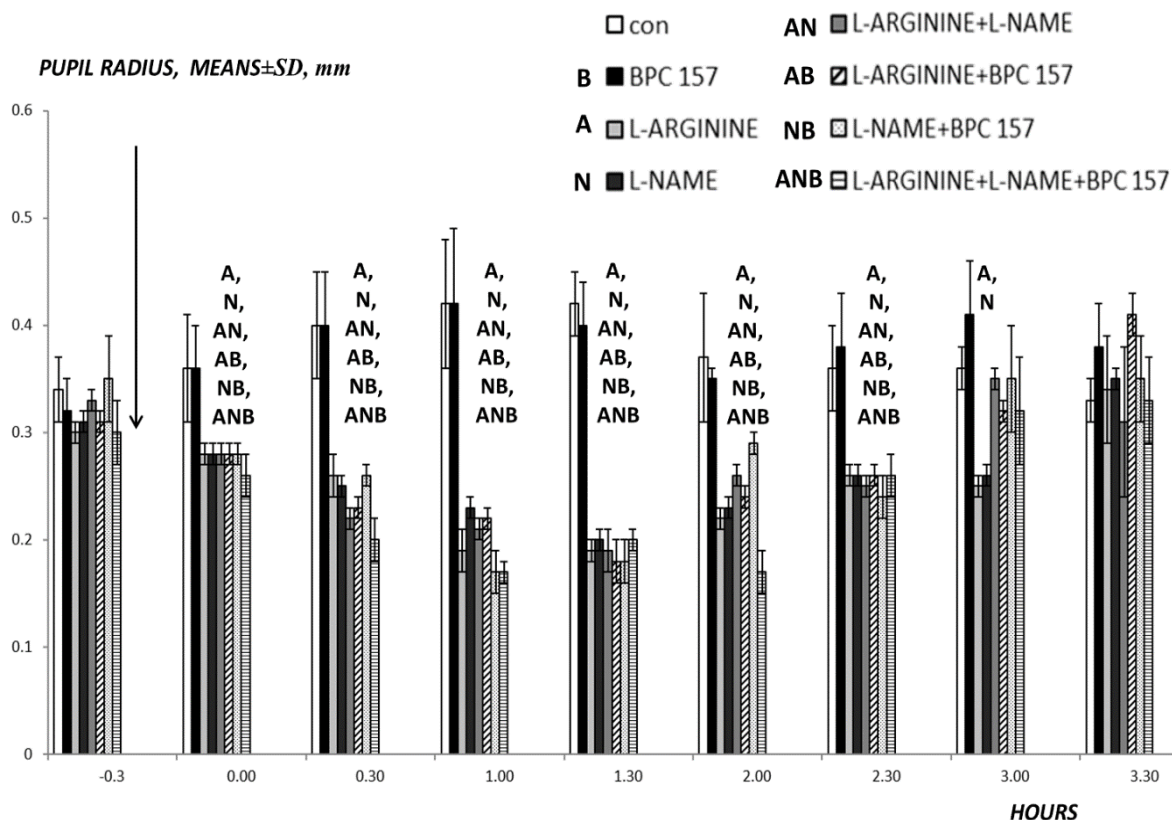
Slika 6. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) s obzirom na vrijeme u intervalima od 4 sata. Nakon potvrđene maksimalne midrijaze uzrokovane atropinom (30 min nakon apliciranja atropina ((2 kapi 1% atropina/oko)) (početak neposredno prije apliciranja supstancija, vrijeme 0h, vertikalna strelica), sve koncentracije BPC 157 aplicirane intraperitonealno; 10µg/kg (BPC 157 µg), 10 ng/kg (BPC 157 ng), 10 pg/kg (BPC 157 pg) uzrokuju antagonizaciju midrijaze uzrokovanu atropinom. *P<0.05 najmanje nasuprot kontrolnoj skupini (con) (fiziološka otopina 5ml/kg aplicirana intraperitonealno).



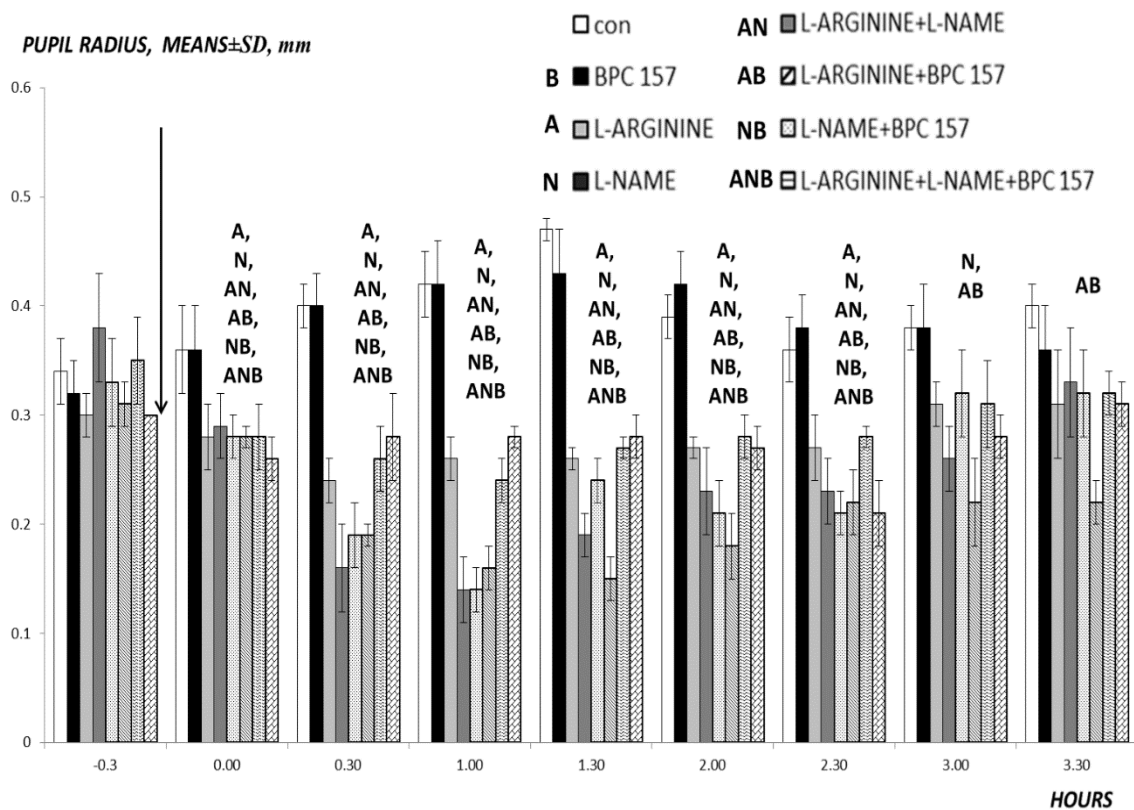
Slika 7. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od 4 sata. Nakon potvrđene maksimalne midrijaze uzrokovane atropinom (30 min nakon apliciranja atropina ((2 kapi 1% atropina/oko)) (početak neposredno prije apliciranja supstancija, vrijeme 0h, vertikalna strelica), sve supstancije aplicirane intraperitonealno; BPC 157 (10 μ g/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)) uzrokuju antagonizaciju midrijaze uzrokovanu atropinom. B,A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju *P<0.05, najmanje nasuprot kontrolnoj skupini (con) (fiziološka otopina 5ml/kg aplicirana intraperitonealno).



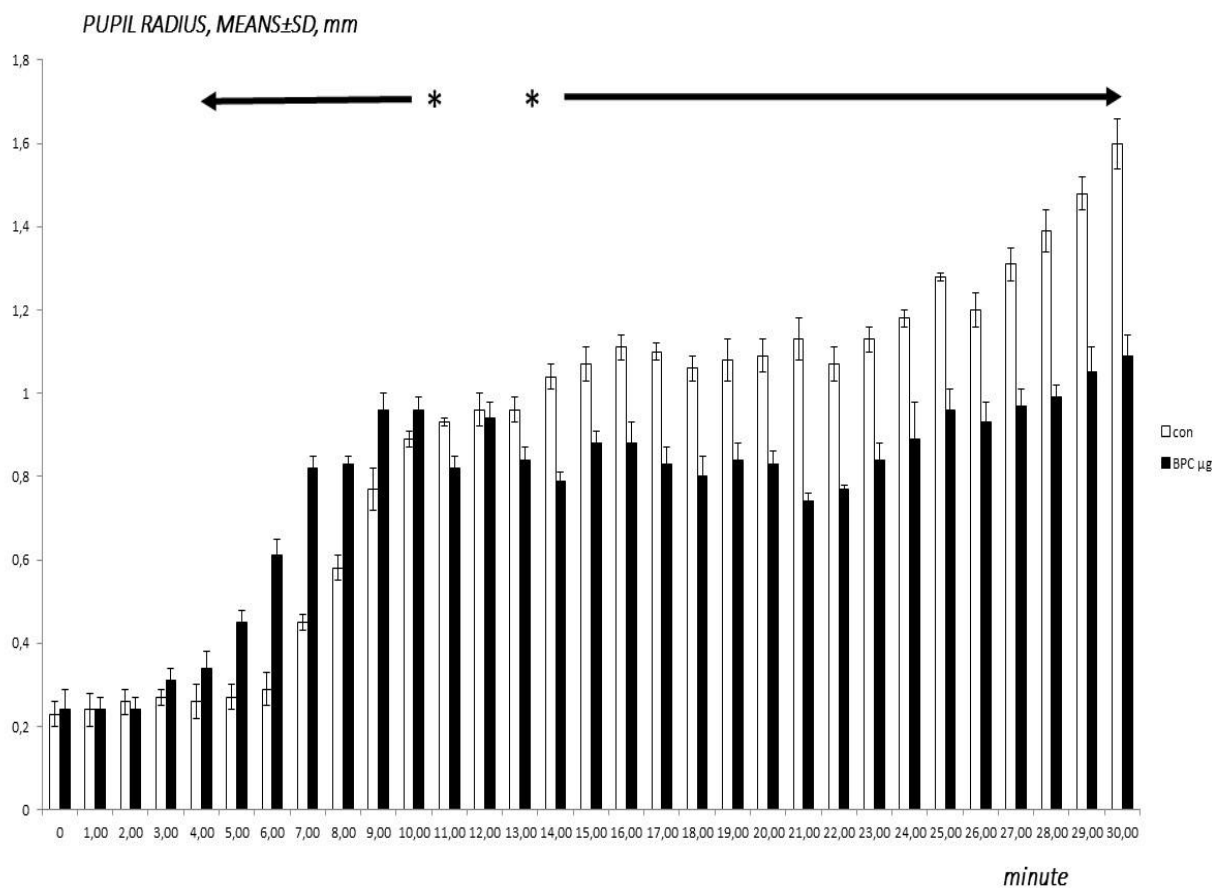
Slika 8. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) s obzirom na vrijeme u intervalima od 4 sata. Nakon potvrđene maksimalne midrijaze uzrokovane atropinom (30 min nakon apliciranja atropina ((2 kapi 1% atropina/oko)) (početak neposredno prije apliciranja supstancija, vrijeme 0h, vertikalna strelica), sve supstancije aplicirane u obliku kapi za oči (2 kapi/oko); BPC 157 (10µg/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)) uzrokuje antagonizaciju midrijaze uzrokovanu atropinom. B, A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju *P<0.05 najmanje nasuprot kontrolnoj skupini (con) (destilirana voda 2 kapi/oko).



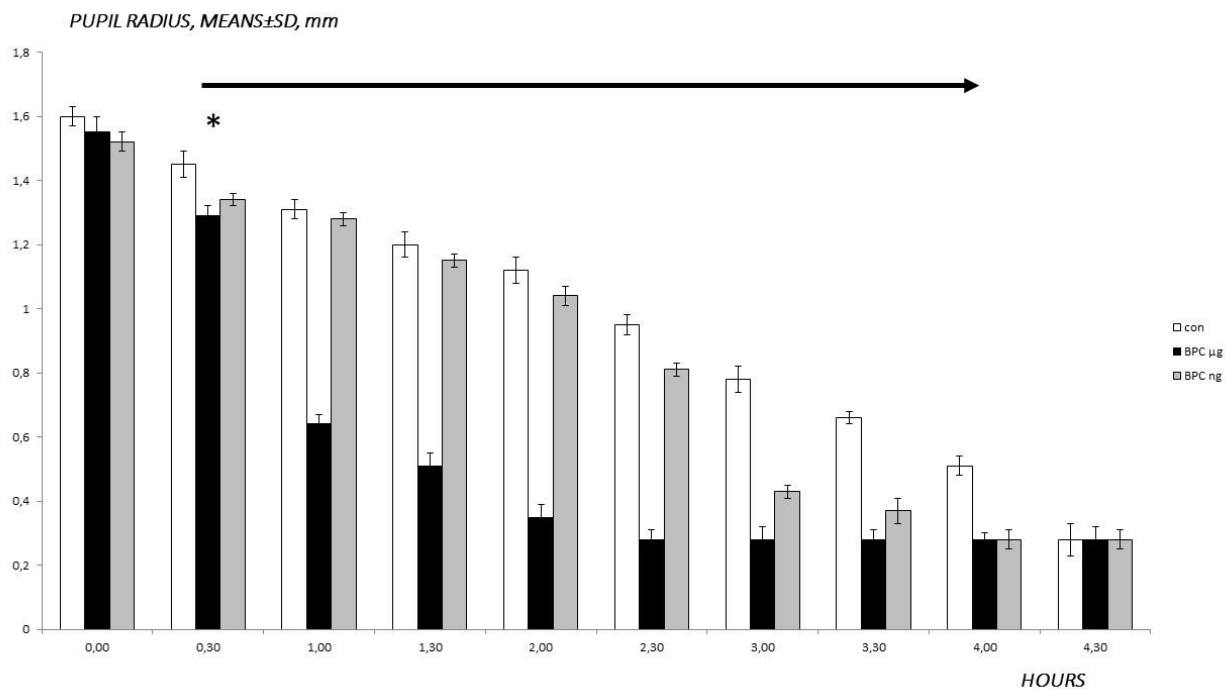
Slika 9. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) s obzirom na vrijeme u intervalima od 30 minuta (-0,3 prikazuje početno stanje prije aplikacije supstancija). Sve supstancije aplicirane intraperitonealno; BPC 157 (10 μ g/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)), osim BPC 157 samostalno uzrokuju miozu. A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolnoj skupini (con) (fiziološka otopina 5ml/kg intraperitonealno).



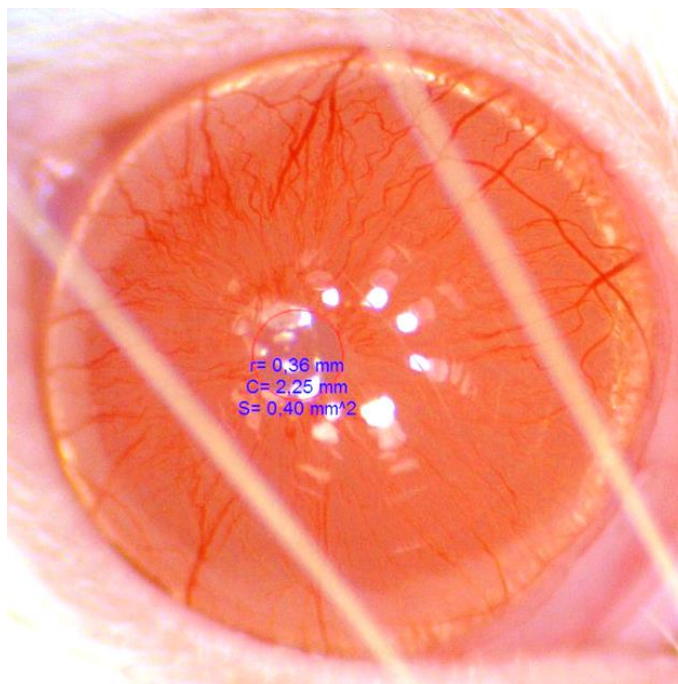
Slika 10. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od 30 minuta (-0,3 prikazuje početno stanje prije aplikacije supstancija). Sve supstancije aplicirane u obliku kapi za oči (2 kapi/oko); BPC 157 (10 μ g/kg) (B), L-arginine (100 mg/kg) (A) i L-NAME (5 mg/kg)(N), i njihova kombinacija (L-arginine+L-NAME (AN), L-arginine+BPC 157 (AB), L-NAME+BPC 157 (NB), L-arginine+L-NAME+BPC 157 (ANB)), osim BPC 157 samostalno uzrokuju miozu. A, N, AN, AB, NB, ANB pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolnoj skupini (con) (destilirana voda 2 kapi/oko).



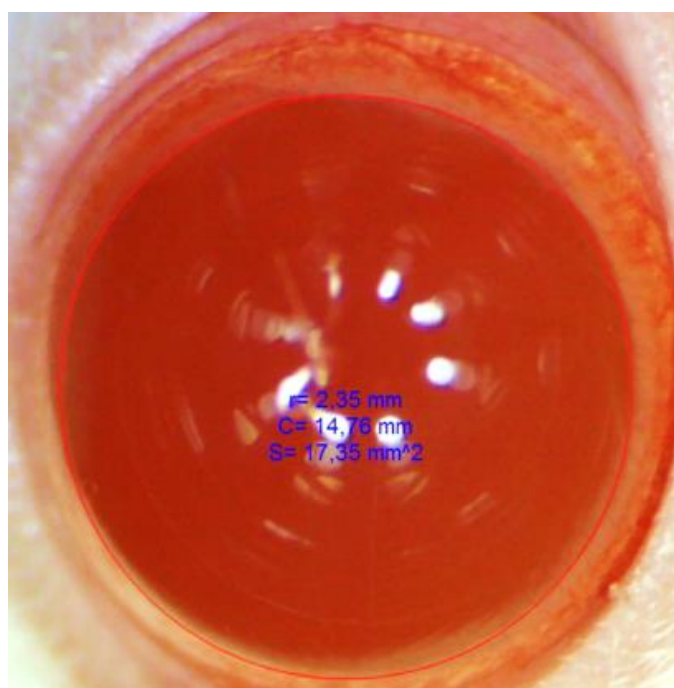
Slika 11. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od 1 minute. Sve supstancije (osim pilokarpina) aplicirane su intraperitonealno; BPC 157 (10 μ g/kg), fiziološka otopina (5ml/kg). Stupci označeni * pokazuju najmanje P<0.05 nasuprot kontrolne skupine (con).



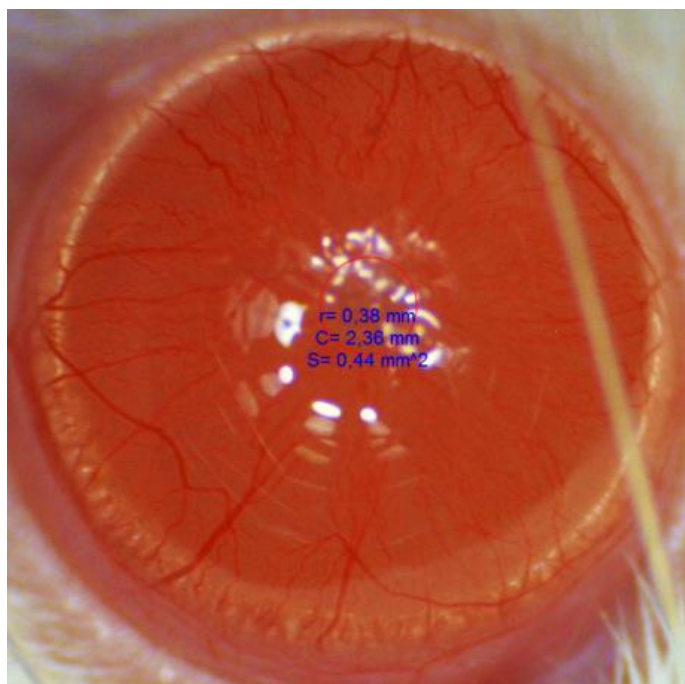
Slika 12. Graf prikazuje kretanje polumjera zjenice (izraženo u milimetrima) obzirom na vrijeme u intervalima od pola sata. Sve supstancije (osim pilokarpina) aplicirane su intraperitonealno; BPC 157 (10µg/kg), BPC 157 (10ng/kg), fiziološka otopina (5ml/kg). Stupci označeni * pokazuju najmanje $P < 0.05$ nasuprot kontrolne skupine (con).



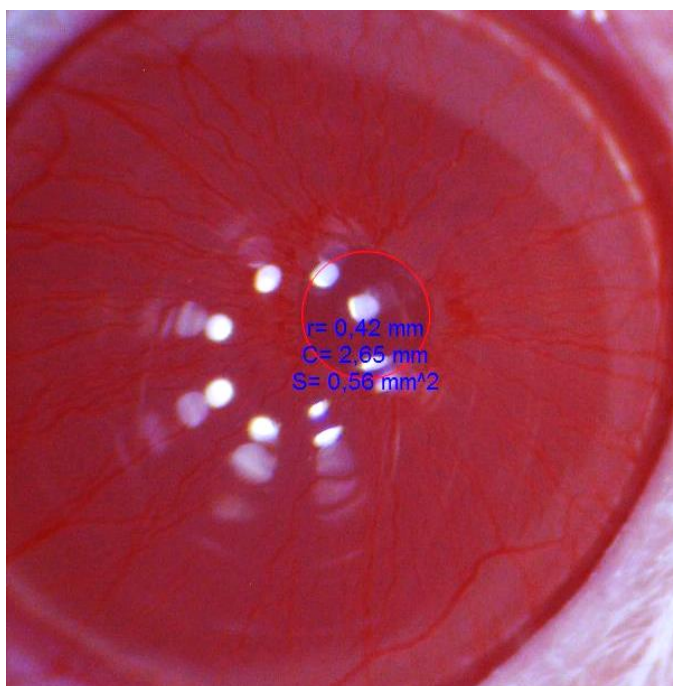
Slika 13. Prikaz normalne širine zjenice štakora ($r=0,36\text{mm}$, $C=2,25\text{mm}$, $P=0,40\text{mm}^2$)



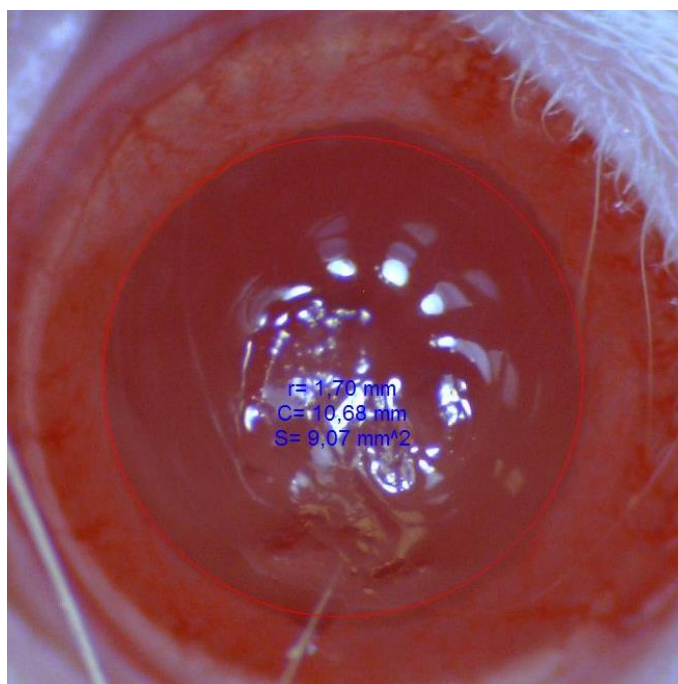
Slika 14. Prikaz zjenice štakora u maksimalnoj midrijazi 30 minuta nakon apliciranja atropina (2 kapi 1% atropina/oko) ($r=2,35\text{mm}$, $C=14,76\text{mm}$, $P=17,35\text{mm}^2$)



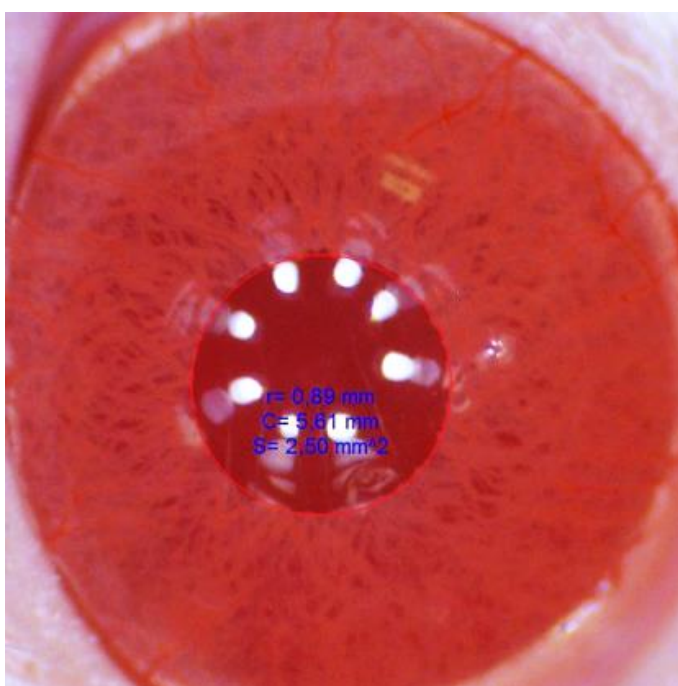
Slika 15. Prikaz normalne širine zjenice štakora skupine životinja koja je primila BPC 157 ($10\mu\text{g}/\text{kg}$). Nakon 44 h pokusa (aktivne supstancija aplicirane intraperitonealno) ($r=0,38\text{mm}$, $C=2,36\text{mm}$, $P=0,44\text{mm}^2$)



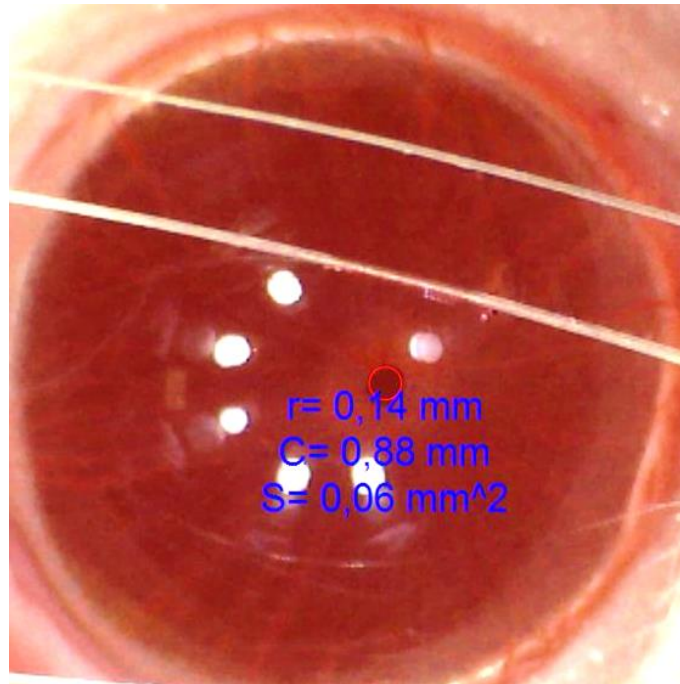
Slika 16. Prikaz normalne širine zjenice štakora skupine životinja koja je primila BPC 157 ($10\mu\text{g}/\text{kg}$). Nakon 44 h pokusa (aktivne supstancija aplicirane u obliku kapi za oči (2 kapi/oko)) ($r=0,42\text{mm}$, $C=2,65\text{mm}$, $P=0,56\text{mm}^2$)



Slika 17. Prikaz zjenice štakora u semimidrijazi kontrolne skupine životinja koja je primila fiziološku otopinu 5ml/kg. Nakon 28h pokusa (aktivne supstancija aplicirane u obliku kapi za oči (2kapi/oko)) ($r=1,70\text{mm}$, $C=10,68\text{mm}$, $P=9,07\text{mm}^2$)



Slika 18. Prikaz zjenice štakora u semimidrijazi kontrolne skupine životinja koja je primila fiziološku otopinu 5ml/kg. Nakon 44h pokusa (aktivne supstancija aplicirane intraperitonealno) ($r=0,89\text{mm}$, $C=5,61\text{mm}$, $P=2,50\text{mm}^2$)



Slika 19. Prikaz zjenice štakora u miozi nakon 30 minuta pokusa ($r=0,14\text{mm}$, $C=0,88\text{mm}$, $P=0,06\text{mm}^2$)

6. RASPRAVA

Primijenjeni lokalno ili sistemski, pokazali smo poseban modulatorni učinak BPC 157 na zjenicu u štakora (koji nema utjecaja na normalnu zjenicu kada se primjenjuje samostalno, dok utječe na midrijazu (uzrokovanu atropinom) i miozu (L-NAME i/ili L-arginin)), kao i na zajednički dugotrajni miotski učinak (cca 3h) uzrokovan primjenom L-NAME i L-arginin bez obzira bili primijenjeni lokalno ili sistemski koji bi mogli biti vrlo važni u razjašnjenju djelovanja na midrijazu uzrokovanu atropinom (posebice imajući u vidu da su primijenjeni na maksimalnu atropinsku midrijazu). Miotski učinak L-NAME i L-arginina je uglavnom paralelan i osjetljiv s obzirom na NO sistem jer obje supstancije znatno antagoniziraju midrijazu uzrokovanu atropinom. Njihova značajnija učinkovitost kada su primijenjeni lokalno i kombinirano analogna je prevladavanju blokade s kolinomimeticima kada su primijenjeni u odgovarajućoj dozi i učestalosti, u odnosu na količinu korištenog atropina (77). S obzirom da se atropin produženo akumulira u oku (78), učinkovitost sistemske primjene L-NAME i/ili L-arginina (kao i ranije s lokalnom primjenom) može pokazivati specifičan efekt na posebne događaje u vezi s midrijazom uzrokovanom atropinom. U ovim pokusima pokazana aktivnost BPC 157 (46,47) (nema utjecaja na promjer normalne zjenice kada se primjenjuje samostalno, bilo da je primijenjen lokalno ili sistemski) sugerira da bi mogao posebno modulirati miotski efekt uzrokovan s L-argininom i L-NAME, kao i midrijazu uzrokovanu atropinom te miozu uzrokovanu s L-NAME i L-arginiom nakon midrijaze uzrokovane atropinom. Stoga bi mogao posebno modulirati učinke NO sistema i atropina.

L-NAME i L-arginin miotski učinci uglavnom su paralelni (izraženiji učinak kada su primijenjeni lokalno i zajedno), ali i kompetitivni (uzrokujući nakon intraperitonealne primjene kraće vrijeme vraćanja zjenice u početno normalno stanje kod štakora koji su primili L-NAME i L-arginin zajedno). Lokalno, u štakora s normalnom širinom zjenice, BPC 157 pojačava miotski efekt L-arginina, dok istovremeno antagonizira miotski efekt L-NAME. Ipak, kod primjene nakon atropina, i direktne i lokalne primjene supstancija, BPC 157 ima aditivni učinak zajedno s L-argininom, aditivni učinak zajedno s L-NAME, kao i aditivni učinak zajedno s L-NAME i L-argininom pružajući pri tome jasnu antagoniziranu inhibiciju parasimpatičkog tonusa (77) i zadržan odgovor acetilkolina (sličnih parasimpatičkih spojeva) na ovim mjestima nakon blokade atropinom. U pokusima sa sistemskom primjenom, BPC 157 skraćuje vrijeme potrebno da se

zjenica vrati u normalno početno stanje nakon mioze uzrokovane L-argininom, L-NAME i zajedno L-argininom i L-NAME te ne utječe na njihovu sposobnost antagonizacije midrijaze uzrokovane atropinom. Pritom, s obzirom na opće preklapanje kod lokalne i sistemske primjene agensa (npr. BPC 157 nema utjecaja na normalnu širinu zjenice, antagonizacija medikamentno uzrokovane mioze i posebno midrijaze uzrokovane atropinom) različiti učinci, bez obzira bile supstancije primijenjene lokalno ili sistemski, mogu biti povezani s različitom prezentacijom spoja/spojeva na mjestima blokade atropinom, lokalno ili sistemski. Stoga zaključujemo, učinak BPC 157 na miozu i midrijazu uzrokovanu atropinom je sukladan odražavanju funkcije sfinktera ranije opisano u uvodu (42-45,48-51) (npr. u zdravih štakora BPC 157 je povećao pritisak donjeg jednjačnog sfinktera i smanjio tlak piloričkog sfinktera, dok je u ozlijeđenih štakora sa smanjenim tonusom sfinktera vratio tonus sfinktera na normalne vrijednosti (42-45,48-51)) i antagoniziranju učinka L-NAME na funkciju sfinktera (48,49). Isto tako, BPC 157 uglavnom interferira s NO sistemom, NOs blokatorom (L-NAME) i NOs supstratom (L-arginin), i antagonizira učinak L-NAME više nego L-arginin (46-49) (ovdje kod mioze, L-NAME je prekrila/prevladala učinak L-arginina, ali su oba u potpunosti antagonizirana s BPC 157). Konačno, potencijacija acetilkolina kroz ili NOs inhibiciju, ili primjenu NOs supstrata, paralelno djelovanje i L-NAME i L-arginina može biti poduprto dokazima da i NOs blokatori i NOs supstrati mogu uzrokovati (inducirati) kvantitativno sličan odgovor (79,80). Na primjer, u koroidalnom spletu, inhibicija Na(+)-K(+)-ATPase je blokirana s inhibitorom NOs (L-NAME) dok je jednako blokirana i postignut je identičan odgovor NO agonistom natrijevim nitroprusidom (79). Omogućavanje peristaltike u crijevima zamoraca je potaknuto natrijevim nitroprusidom i s L-NAME (81).

Isti kvantitativni odgovor mogao bi upućivati da bi ovakvi odnosi i rezultati mogli biti povezani s posebnim i specifičnim odnosima NO sistema i acetilkolina. Uobičajeno, otpuštanju NO prethodi stimulacija kolinergičkih živaca u brojnim tkivima (79). Slično, L-arginin može oponašati učinak NO donora koji bi mogao imati učinak poput karbahola. S druge pak strane uzimajući u obzir L-NAME, miozu i antagonizaciju midrijaze uzrokovane atropinom u drugim tkivima (npr. ileum) NOs inhibitori bi mogli povećati otpuštanje acetilkolina (82). Opuštanje (relaksacija) vanjske i unutarnje očne arterije primjenom atropina je poništeno s NG-nitro-L-arginine (L-NA), inhibitorom NOs (65) i na taj način bi također i L-NAME mogao očigledno antagonizirati midrijazu uzrokovanu atropinom. Zaključno, midrijaza uzrokovana atropinom

ovisi o NO sistemom povezanim mehanizmima na poseban način i L-NAME, NOS blokator i L-arginin, NOS supstrat, uzrokuju antagonizaciju i miozu (koja također može biti antagonizirana), učinak koji do sada nije opisan u literaturi, dakle, upućuje da je to NO sistem fenomen. Midrijaza uzrokovana atropinom, mioza uzrokovana s L-NAME i L-argininom, mogu biti antagonizirane s BPC 157 zbog njegove interakcije s NO sistemom i funkcijom sfinktera (46) te sposobnostima cijeljenja (42-45,48-51). Opisani učinci mogu doprinijeti daljnjoj izgradnji pouzdanih i učinkovitih terapijskih metoda.

Pilokarpin paradoksalno u štakora izaziva kratkotrajnu miozu te potom midrijazu (4,5). Pretpostavljamo da do midrijaze dolazi zbog grča mišića sfinktera zjenice koji nakon nekog vremena popusti i prevlada djelovanje mišića dilatatora zjenice što uzrokuje midrijazu. Pokazali smo kako mioza u štakora traje kraće kod BPC 157 te ne postigne maksimalnu midrijazu kod pretretmana, a kod posttretmana midrijaza kraće traje. Navedeno upućuje na antagonistirajući potencijal BPC 157 te da je učinak modulatoran i nastoji uspostaviti homeostazu.

Opisani učinci mogu doprinijeti daljnjoj izgradnji pouzdanih i učinkovitih terapijskih metoda.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i analizom dobivenih podataka zaključuje se kako pentadekapeptida BPC 157 skraćuje vrijeme potrebno zjenici da se vrati u normalno početno stanje nakon tretiranja atropinom ili pilokarpinom neovisno je li primijenjen sistemski ili lokalno.

Također, može se jasno zaključiti kako je opisani učinak zavisao od djelovanja na NO sistem jer pentadekapeptid BPC 157 uzrokuje antagonizaciju miozije uzrokovane atropinom ili pilokarpinom, a nakon toga i mioze u nastavku uzrokovane s L-NAME, L-argininom i L-NAME i L-argininom te također uzrokuje antagonizaciju mioze uzrokovane s L-NAME, L-argininom i L-NAME i L-argininom.

Ova saznanja potiču na daljnja istraživanja, uzimajući u obzir posebnu pozadinu i vrlo veliku sigurnost primjene BPC 157 (1,2), kao što je do sada pokazano, koja bi mogla rezultirati uspješnom primjenom BPC 157 u dijagnostičke i terapijske svrhe.

8. SAŽETAK

Pokazali smo u štakora posebne modulatorne učinke želučanog pentadekapeptida BPC 157 (10 μ g, 10ng, 10pg/kg) primijenjenog u obliku kapi za oči ili sistemski na dugotrajni (cca 3h) miotski učinak nakon primjene L-NAME (5mg/kg) ili L-arginina (100 mg/kg) na midrijazu uzrokovanu atropinom (2 kapi 1% atropina u svako oko, supstancije primijenjene u stanju maksimalne midrijaze), kao i na midrijazu i miozu uzrokovanu pilokarpinom (2 kapi pilokarpina u svako oko, supstancije primijenjene zajedno i u posttretmanu) te osjetljivost s obzirom na blokadu i stimulaciju NO sistema. Općenito, sve navedene supstancije koje mogu antagonizirati atropinsku i pilokarpinsku midrijazu i također s L-NAME, L-arginin i pilokarpinom uzrokovanu miozu imaju utjecaj na NO sistem. L-NAME i L-arginin miotski učinci su uglavnom paralelni (izraženiji učinak kada su primijenjeni lokalno i zajedno), ali i kompetitivni (uzrokujući nakon intraperitonealne primjene kraće vrijeme vraćanja zjenice u početno normalno stanje kod štakora koji su primili L-NAME i L-arginin zajedno). Primijenjen lokalno ili sistemski, BPC 157 nema učinka na normalnu zjenicu kada se primjeni samostalno, dok utječe na induciranu i miozu i midrijazu. Lokalno primijenjen, u štakora s normalnom zjenicom, BPC 157 povećava miotski efekt L-arginina, antagonizira miotski efekt L-NAME; u antagonizaciji atropinske midrijaze, bez obzira na vlastiti antagonizirajući potencijal, BPC 157 ima aditivni učinak primijenjen s L-argininom, s L-NAME-om i s primijenjenima zajedno L-NAME i L-argininom. Intraperitonealno primijenjen, BPC 157 skraćuje vrijeme mioze koju je uzrokovao intraperitonealno primijenjeni L-arginin, L-NAME i njihova kombinacija te ne utječe na njihov antagonizirajući efekt na midrijazu uzrokovanu atropinom. Također, BPC 157 antagonizira pilokarpinsku miozu (skraćujući vrijeme vraćanja u normalno početno stanje i smanjujući maksimalnu midrijazu) i midrijazu (koja kraće traje). Zaključno, atropinska midrijaza na poseban način ovisi o NO sistemu; L-NAME, blokator NOs, i L-Arginin, prekursor NO-a, uzrokuju antagonizaciju i miozu (koja se neutralizira kasnije, poništi), efekt koji do sada nije opisan u literaturi. Midrijaza uzrokovana atropinom i pilokarpinom, mioza uzrokovana s L-NAME, L-arginin i pilokarpinom mogu se, očito, antagonizirati s BPC 157 s obzirom na njegovu interakciju s NO sistemom i funkcijom sfinktera zjenice.

9. SUMMARY

„Atropine, pilocarpine, NO system, BPC 157 on mydriasis in rats“

In living rats' pupil after either eye drops or systemic administration (intraperitoneal), we revealed particular modulatory effects after gastric pentadecapeptide BPC 157 (10µg, 10ng, 10pg/kg) as well as a common long-standing (cc 3h) miotic effect after L-NAME (5mg/kg) or L-arginine (100mg/kg), and atropine-mydriasis (2 drops of 1% atropine/eye, agents at the maximal atropine-mydriasis) and pilocarpine miosis and mydriasis (2 drops of 1% atropine/eye, agents together or in posttreatment) sensitivity to NO-system blockade and/or stimulation. In general, all these agents might counteract atropine-mydriasis and pilocarpine-mydriasis, and thereby, L-NAME-miosis, L-arginine-miosis and pilocarpine-miosis were NO-sensitive. L-NAME and L-arginine miotic effects were mostly parallel (more effectiveness when applied locally and combined), but competitive (providing after intraperitoneal administration sooner returning to normal pupil size in L-NAME+L-arginine-rats). Applied locally or systemically, modulatory BPC 157 counteracting potential characterizes no influence on normal pupils when given alone while BPC 157 affects induced both miosis and mydriasis. Locally, in rat with normal pupil, BPC 157 augments the miotic effect of L-arginine, counteracts the miotic effect of L-NAME; in counteracting atropine-mydriasis, besides own counteracting potential, BPC 157 has an additive effect with L-arginine, with L-NAME and with L-NAME+L-arginine. Intraperitoneally, BPC 157 shortens the miotic effects of intraperitoneal L-arginine, L-NAME, and L-arginine+L-NAME and does not affect their counteracting effect on atropine-mydriasis. Also, BPC 157 counteract pilocarpine-myosis (shortens time and maximal mydriasis) and pilocarpine mydriasis (shorter duration). Concluding, the atropine-mydriasis depends on NO-related mechanisms in a particular way and both L-NAME, a NOS-blocker and L-arginine, a NOS-substrate, exhibit a counteraction and miosis (that could be mutually counteracted), an effect thus far undescribed; the atropine-mydriasis, L-NAME-miosis and L-arginine-miosis, may consequently be counteracted by BPC 157 due to its interactions with the NO-system and sphincter function.

10. LITERATURA

1. Fanghanel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. i urednici. Waldeyerova anatomija čovjeka. 1. izd. Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga; 2009.
2. Bušić M, Elabjer-Kuzmanović B, Bosnar D. Seminaria ophtalmologica. 1.izd. Osijek: Cerovski d.o.o.; 2011.
3. Brunton L L, Blumenthal D K, Murri N, Dandan R H, Knollmann B C. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition. New York: McGraw-Hill, 2011.
4. Barnard R., Cholinergic Porphyrin Lacrymation and Paradoxical Mydriasis in Rat. Possible Hame Nature of Choline Esterase. Exp Biol Med (Maywood) 1943 54:254.
5. Koval R, Korczyn AD. Pilocarpine mydriasis in mice. J Ocul Pharmacol. 1985 Summer;1(2):169-76.
6. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. New Eng J Med 1993;329:2002-2011.
7. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Phamacol Rev. 1991;43:109-1142.
8. 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. 23.
9. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. Brain Pathol 1999;9:119-131.

10. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, et al. The beneficial effect of BPC 157, a 15aminoacid 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, dopaminepromoters and gut peptides. *Life Sci* 1994; 54: PL63-8.
11. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, Brcic L, Blagaic Boban A, Batelja L, et al. 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.
12. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (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.
13. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2070-83.
14. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris* 2001; 95: 295-301.
15. 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-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol.* 1997 Jul 30;332(1):23-33.
16. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. 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.

17. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. 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.
18. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G, Perovic D, Staresinic M, Anic T, et al. Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. *J Physiol Paris* 2001; 95: 283-8.
19. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Balen I, Aralica G, Gjurasin M, et al. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. *J Physiol Paris* 2001; 95: 261-70.
20. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B, Brajsa K, Bubenik M, Stipanovic S, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut* 2003; 51 (Suppl III): A309.
21. 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.
22. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, et al. 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, et al. 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, et al. 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. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, Jukic I, Radic B, Pevec D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008; 38: 716-25.
27. Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situm K, et al. 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.
28. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S, et al. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006; 24: 1109-17.
29. Veljaca M, Chan K, Guglietta A. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-15 in human gastric juice. *Gastroenterology* 1995; 108: A761.
30. Robert A. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979; 77: 761-7
31. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Hanchar AJ. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am J Physiol* 1983; 245: G113-21.

32. Robert A. Cytoprotection and adaptive cytoprotection. In: Nelis GF, Boeve J, Misiewicz JJ, Eds. Peptic ulcer disease: Basic and clinical aspects. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers 1985; pp. 297-316.
33. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 285-90.
34. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G, Perovic D, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *J Physiol Paris* 2001; 95: 315-24.
35. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, et al. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med Sci Monit* 2006; 12(1): 36-45.
36. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. 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.
37. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Perovic D, Konjevoda, et al. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry*. 1998;43:511-519.
38. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Marovic A, Perovic D, et al. 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]

39. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *European J Pharmacol.* 2005;512:173-179
40. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko S, Seiwert S, et al. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 (Suppl 7): 161-165.
41. Sikiric P, Petek M, Rucman R, Seiwert S, Grabarevic Z, Rotkvic I, et al. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris* 1993; 87: 313-27.
42. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, Batelja L, Kokic N, Tonkic A, Mise S, Baotic T, Staresinic M, Radic B, Jakir A, Vuksic T, Anic T, Seiwert S, Sikiric P. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2006 Nov;102(3):269-77.
43. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, i sur. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2007 May;104(1):7-18.
44. Jandric I, Vrcic H, Jandric Balen M, Kolenc D, Brcic L, Radic B, Drmic D, Seiwert S, Sikiric P. Salutary effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 in two different stress urinary incontinence models in female rats. *Med Sci Monit Basic Res.* 2013 Mar 12;19:93-102.
45. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today.* 2007;37(9):768-77.

46. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Des.* 2013 Jun 10.,
47. Seiwerth S, Brcic L, Batelja Vuletic L, Kolenc D, Aralica G, Misic M, Zenko A, Drmic D, Rucman R, Sikiric P. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des* 2013.
48. 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 Feb 10;181:50-66. doi: 10.1016/j.regpep.2012.12.007. Epub 2013 Jan 14.
49. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujic D, Drmic D, i sur. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur J Pharmacol.* 2013 Feb 15;701(1-3):203-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.055. Epub 2012 Dec 7.
50. Petrovic I, Dobric I, Drmic D, Sever M, Klicek R, Radic B, i sur. BPC 157 therapy to detriment sphincters failure-esophagitis-pancreatitis in rat and acute pancreatitis patients low sphincters pressure. *J Physiol Pharmacol.* 2011 Oct;62(5):527-34.
51. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, i sur. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des.* 2011;17(16):1612-32. Review.
52. Pianka P, Oron Y, Lazar M, Geyer O. Nonadrenergic, noncholinergic relaxation of bovine iris sphincter: role of endogenous nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Mar;41(3):880-6
53. Tucker JF, Brave SR, Charalambous L, Hobbs AJ, Gibson A. L-NG-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolatetracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1990;100:663-664.

54. Toda N, Minami Y, Okamura T. Role of nitric oxide in non-adrenergic non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn J Pharmacol.* 1990;53:281–284.
55. Lefebvre RA, Smits GJ, Timmermans JP. Study of NO and VIP as non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol.* 1995;116:2017–2026.
56. Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of age on cholinergic and inhibitory nonadrenergic noncholinergic responses in the rat ileum. *Eur J Pharmacol.* 1996;303:79–86.
57. Dokita S, Smith SD, Nishimoto T, Wheeler MA, Weiss RM. Involvement of nitric oxide and cyclic GMP in rabbit urethral relaxation. *Eur J Pharmacol.* 1994;266:269–275.
58. Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol.* 1997;42:71–82.
59. Chuman T, Chuman H, Nao-i N, Sawada A, Yamamoto R, Wada A. Nitric oxide-sensitive and -insensitive contractions of the isolated rabbit iris sphincter muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1437–1443.
60. Chuman H, Chuman T, Nao-i N, et al. Different responsiveness to nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in cholinergic and tachykinergic contractions of the rabbit iris sphincter muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:1719–1725.
61. Wiederholt M, Sturum A, Lepple–Wienhues A. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:2515–2520.
62. Goh Y, Hotehama Y, Mishima HK. Characterization of ciliary muscle relaxation induced by various agents in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:1188–1196

63. Nathanson JA. Nitrovasodilators as a new class of ocular hypotensive agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260:956–965.
64. Behar-Cohen FF, Goureau O, D'Hermies F, Courtois Y. Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide donors is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996 Jul;37(8):1711-5.
65. Wang Y, Okamura T, Toda N. Mechanisms of acetylcholine-induced relaxation in dog external and internal ophthalmic arteries. *Exp Eye Res.* 1993 Sep;57(3):275-81.
66. Dortch-Carnes J, Russell KR. Morphine-induced reduction of intraocular pressure and pupil diameter: role of nitric oxide. *Pharmacology.* 2006;77(1):17-24.
67. Bonfiglio V, Bucolo C, Camillieri G, Drago F. Possible involvement of nitric oxide in morphine-induced miosis and reduction of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 18;534(1-3):227-32.
68. Wang ZY, Waldeck K, Grundemar L, Håkanson R. Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br J Pharmacol.* 1997 Apr;120(8):1491-6.
69. Wang ZY, Alm P, Håkanson R. The contribution of nitric oxide to endotoxin-induced ocular inflammation: interaction with sensory nerve fibres. *Br J Pharmacol.* 1996 Jul;118(6):1537-43.
70. Lazić R, Gabrić N, Dekaris I, Bosnar D, Boban-Blagaić A, Sikirić P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. *Coll Antropol.* 2005 Jun; 29 (1):321-5.
71. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, Hrelec M, Kolenc D, Radic B, Bojic D, Vcev A, Seiwert S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia

after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb Res.* 2012 May;129(5):652-9. doi: 10.1016/j.thromres.2011.07.035. Epub 2011 Aug 15

72. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, et al. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris* 1997; 91: 139-49.
73. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, et al. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009;156: 83-9.
74. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I, Horvat I, Udovicic M, Uzun S, et al. Mortal furosemide-hypokalemia-disturbances in rats NO-system related. Shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 more than with L-arginine. *J Clin Exp Cardiol* 2012; 3: 201.
75. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, i sur. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci.* 2008 Sep;108(1):7-17.
76. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwerth S, Rogic D, Kusec V, i sur. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci.* 2004 May;95(1):19-26.
77. Raczak-Gutknecht J, Frąckowiak T, Nasal A, Kaliszan R. Mydriasis model in rats as a simple system to evaluate α 2-adrenergic activity of the imidazol(in)e compounds. *Pharmacol Rep.* 2013;65(2):305-12.

78. Salazar M, Patil PN. An explanation for the long duration of mydriatic effect of atropine in eye. *Invest Ophthalmol.* 1976 Aug;15(8):671-3.
79. Ellis DZ, Nathanson JA, Sweadner KJ. Carbachol inhibits Na(+)-K(+)-ATPase activity in choroid plexus via stimulation of the NO/cGMP pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Dec;279(6):C1685-93.
80. Barsam PC. Comparison of the effect of pilocarpine and echothiophate on intraocular pressure and outflow facility. *Am J Ophthalmol.* 1972 May;73(5):742-9.
81. Holzer P, Lippe IT, Tabrizi AL, Lénárd L Jr, Barthó L. Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Jan;280(1):154-61.
82. Mang CF, Truempler S, Erbelding D, Kilbinger H. Modulation by NO of acetylcholine release in the ileum of wild-type and NOS gene knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Nov;283(5):G1132-8.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 16.11.1984.g. u Osijeku. Osnovnu školu Josipa Kozarca u Semeljcima završio sam 1999.g. Maturirao sam u III. matematičkoj gimnaziji 2003.g. kada upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij za doktora medicine na Medicinskom fakultetu Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomirao sam 2009.g. te se iste godine zapošljam na Katedri za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek u suradničkom zvanju asistenta i upisujem poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Osijek. Također, u periodu od 2009.g. do 2012.g. predajem predmet „Anatomija i fiziologija“ u srednjoj medicinskoj školi u Osijeku. Za vrijeme studija bio sam 4 godine voditelj podružnice Osijek i član upravnog odbora međunarodne udruge studenata medicine (CroMSIC/IFMSA). Pripravnički staž odradio sam u KBC Osijek, državni ispit za samostalno obavljanje liječničke prakse pri Ministarstvu zdravlja položio sam početkom 2011.g. U svibnju 2012.g. krenuo sam sa specijalizacijom Oftalmologije i optometrije, dijelom na Odjelu oftalmologije KBC Osijek, a dijelom na Klinici za očne bolesti KB Sveti Duh. U 2013.g. upisujem poslijediplomski specijalistički studij kliničke epidemiologije na Medicinskom fakultetu Osijek, a u 2014.g. upisujem poslijediplomski specijalistički studij oftalmologije i optometrije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. godine suradnik sam na znanstveno-istraživačkom projektu pod nazivom „Pentadekapeptid BPC 157 - daljnja istraživanja“ (voditelj projekta prof.dr.sc. Predrag Sikirić Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). U svom dosadašnjem stručnom i znanstveno-istraživačkom radu aktivno sam (usmena izlaganja, poster prezentacije) i pasivno sudjelovao na 20-ak znanstvenih i stručnih skupova u zemlji i inozemstvu te osvojio nagradu za najbolje predavanje mladih oftalmologa (2014.g. prof. Čupak memorial days on KBC Zagreb). Sudjelovao sam na nekoliko poslijediplomskih tečajeva stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije (Medicinski fakultet Osijek) od kojih bih istaknuo samo 4: 2012.g.: "Medical and surgical treatment of diseases of the posterior segment of the eye (Wet-lab: Intravitreal application of drugs)" by assist. prof. Damir Bosnar, MD, PhD; 2013.g.: "Ultrasound in ophthalmology" by prof. Biljana Kuzmanović Elabjer, MD, PhD; 2014.g.: "Laser treatment of glaucoma" by assist. prof. Dubravka Biuk, MD, PhD; 2014.g.: "Diagnosis of diseases of the posterior segment of the eye" by assist. prof. Damir Bosnar, MD, PhD. U 2008.g. sudjelovao sam u međunarodnoj razmjeni

studenata medicine u sklopu koje sam proveo mjesec dana na odjelu dječje kardiokirurgije u Wolfson Medical Center u Tel-Avivu, Izrael. U 2014.g. proveo sam 2 tjedna na odjelu vitreoretinalne kirurgije pod supervizijom dr. Filippo Maria Di Tizio u Casa di Cura "Villa Tiberia" u Rimu, Italija. Aktivno sam sudjelovao u projektu "Prevenција prekomjerne tjelesne težine" radom u savjetovalištu jednom tjedno pod organizacijom Medicinskog fakulteta Osijek, Gradskog društva Crvenog križa Osijek i Ministarstva zdravlja. Od 2012.g. do 2014.g. sudjelovao sam u projektu "Amblyopia in four year old children in Zagreb " (registered at NIH, ClinicalTrials.gov NCT01430247 under the label) pod supervizijom prof. dr. sc. Mladen Bušić, dr.med. Koautor sam poglavlja 3 sveučilišna udžbenika: Bušić M., Plavljanic Đ., Mikačić I., Kuzmanović Elabjer B., Bosnar D. Pharmacotherapia Ophthalmologica, pharmacotherapeutic manual of ophthalmology. Osijek -Zagreb, Cerovski d.o.o. (2013.); Bušić M., Kuzmanović Elabjer B., Bosnar D., Čima I., Bjeloš Rončević M., Miletić D., Matić S. Operacija katarakte za žutokljunce, web edition (2013.) Translation of web edition Oetting A. Thomas. Cataract Surgery for Greenhorns, University of Iowa, Iowa City; Bušić M, Kuzmanović Elabjer B., Bosnar D., Šarić B., Brzović Šarić V., Predović J., Miletić D., Bjeloš M., Čima I. Atlas of posterior eye segment: OCT and FA (Atlas stražnjeg segmenta oka: Optička koherentna tomografija i fluoresceinska angiografija). Osijek - Zagreb Cerovski d.o.o. (2014.). Kao koautor do sada sam objavio 1 rad indeksiran u bazi Current Contents.