



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Sanja Konosić

**UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157  
NA AGREGACIJU TROMBOCITA I  
VISKOELASTIČNA SVOJSTVA  
KRVNOG UGRUŠKA U ŠTAKORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Sanja Konosic

**EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE  
BPC 157 ON PLATELET AGGREGATION  
AND VISCOELASTIC PROPERTIES OF  
BLOOD CLOT IN RATS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Predraga Sikirića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Želim zahvaliti prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, na strpljivom i stručnom vodstvu kroz ovo istraživanje, na ukazanom povjerenju i brojnim vrijednim savjetima.

Veliko hvala doc. dr. sc. Višnji Ivančan, prof. dr. sc. Bojanu Biočini, dr. sc. Mati Petričeviću i doc. dr. sc. Mirjani Stupnišek na svesrdnoj organizacijskoj, stručnoj i ljudskoj pomoći u svakom trenutku.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Milanu Miloševiću na savjetima pri statističkoj obradi podataka, te Luciji Konosić na pomoći pri obradi i lektoriranju teksta.

Htjela bih također zahvaliti nastavnom osoblju Biološkog odsjeka PMF-a, osoblju Zavoda za Farmakologiju Medicinskog fakulteta, ljubaznim službenicama referade PDS-a, prijateljima, kolegama i svim ljudima koji su našli vremena i strpljenja za savjet, pravu riječ ili rješenje u trenucima kada mi je pomoć trebala.

Osobito zahvaljujem svojoj obitelji na bezrezervnoj podršci.

## **UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA AGREGACIJU TROMBOCITA I VISKOELASTIČNA SVOJSTVA KRVNOG UGRUŠKA U ŠTAKORA**

Sanja Konosić

Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Prethodna istraživanja pokazala su da BPC 157 sprječava nastanak okluzivnog tromba i ubrzava razgradnju već stvorenog ugruška nakon formiranja anastomoze aorte, a da, s druge strane, smanjuje vrijeme krvarenja kod štakora tretiranih varfarinom, heparinom i aspirinom. Temeljem toga, nametnula se potreba određivanja njegova utjecaja na agregaciju trombocita i viskoelastična svojstva krvnog ugruška. Za ispitivanje eventualne uključenosti NO sustava u djelovanje BPC 157 korišten je selektivni inhibitor topljive gvanilil ciklaze, ODQ.

Životinje (n=60) su najprije podijeljene u skupine ovisno o tome koji antiagregacijski lijek primaju (1.aspirin, 2.klopidogrel, 3.cilostazol), a te skupine su tada nasumično podijeljene u četiri podskupine koje su primale a) fiziološku otopinu, b) BPC 157, c) ODQ, d) BPC 157 + ODQ. Mjerenja su izvršena impendancijskom agregometrijom s 4 različita agonista (ADP, AA, AA/PGE1, kolagen), te rotacijskom tromboelastometrijom s 3 različita agonista (preko vanjskog i unutarnjeg puta zgrušavanja, te bez doprinosa trombocita). Iz rezultata dobivenih usporedbom podskupina a i b, te b i d unutar svake skupine možemo zaključiti da BPC 157 oporavlja inhibiranu agregaciju trombocita, ali da nema utjecaja na viskoelastična svojstva krvnog ugruška u ispitivanih štakora.

Stranica 109/ slika 29/ tablica 40/ literaturnih navoda 144/ jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: trombociti, agregacija, koagulacija, BPC 157, NO sustav

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Jelena Šuran

doc. dr. sc. Aleksandar Vojta

doc. dr. sc. Branka Golubić Čepulić

**EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 ON PLATELET AGGREGATION  
AND VISCOELASTIC PROPERTIES OF BLOOD CLOT IN RATS**

Sanja Konosic

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

As a natural extension of previous research that confirmed the role of BPC 157 in the prevention of obstructive thrombus formation and rapid destruction of an already formed one after aortic anastomosis, but also shortening of the bleeding time in rats treated with anticoagulants and aspirin, there was a necessity to determine how BPC 157 influences platelet aggregation and viscoelastic properties of the blood clot. To assess its relation to NO system, sCG selective inhibitor (ODQ) was used.

Rats (n=60) were divided into groups depending on the antiaggregatory drug they were treated with (1.aspirin, 2.clopidogrel, 3.cilostazol). Groups were further divided into four subgroups treated with a) normal saline, b) BPC 157, c) ODQ, d) BPC 157 + ODQ.

Impedance aggregometry measurements with four agonists (ADP, AA, AA/PGE1 and collagen), and also rotational thromboelastometric measurements with 3 agonists (for initiating external and internal coagulation pathway and without platelet contribution) were performed. Based on the results obtained by comparing subgroups a versus b, and b versus d in each group, we can conclude that BPC 157 rescues inhibited platelet aggregation, but it has no effect on viscoelastic properties of the blood clot.

Pages 109/ figures 29/ tables 40/ references 144/ original in croatian language

Keywords: platelets, aggregation, coagulation, BPC 157, NO system

Supervisor: Prof. Predrag Sikiric, PhD

Reviewers: Assist. Prof. Jelena Suran, PhD

Assist. Prof. Aleksandar Vojta, PhD

Assist. Prof. Branka Golubic Cepulic, PhD

## SADRŽAJ

|  |     |
|--|-----|
| <b>1. UVOD</b> .....                         | 1   |
| 1.1. Svrha rada.....                         | 1   |
| 1.2. Hipoteza.....                           | 2   |
| 1.3. Specifični ciljevi rada.....            | 2   |
| <b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....           | 3   |
| 2.1. Povijest istraživanja koagulacije.....  | 3   |
| 2.2. Trombociti.....                         | 5   |
| 2.3. Klasični model koagulacije.....         | 15  |
| 2.4. Stanični model koagulacije.....         | 17  |
| 2.5. Fibrinoliza.....                        | 20  |
| 2.6. Antiagregacijska terapija.....          | 23  |
| 2.7. Impendancijska agregometrija.....       | 26  |
| 2.8. Rotacijska tromboelastometrija.....     | 29  |
| 2.9. BPC 157.....                            | 34  |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....          | 39  |
| 3.1. Životinje.....                          | 39  |
| 3.2. Lijekovi.....                           | 39  |
| 3.3. Uređaji i reagensi.....                 | 40  |
| 3.4. Grupe i protokol primjene lijekova..... | 41  |
| 3.5. Uzorkovanje krvi.....                   | 42  |
| 3.6. Mjerenja.....                           | 43  |
| 3.7. Statistička obrada.....                 | 45  |
| <b>4. REZULTATI</b> .....                    | 46  |
| <b>5. RASPRAVA</b> .....                     | 88  |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b> .....                    | 96  |
| <b>7. CITIRANA LITERATURA</b> .....          | 98  |
| <b>8. ŽIVOTOPIS AUTORA</b> .....             | 109 |

## KRATICE

|        |   |
|--------|---|
| AA     | arahidonska kiselina  |
| ADP    | adenozin difosfat   |
| AGG    | agregacija<br>(eng. <i>aggregation</i> )  |
| aPTV   | aktivirano protrombinsko vrijeme  |
| ASK    | aspirin   |
| AUC    | površina pod krivuljom<br>(eng. <i>area under curve</i> )                           |
| AT     | antitrombin   |
| cAMP   | ciklički adenzin monofosfat   |
| CFT    | vrijeme do stvaranja stabilnog ugruška<br>(eng. <i>clot firmness time</i> )         |
| cGMP   | ciklički gvanozin monofosfat  |
| CILO   | cilostazol  |
| COX 1  | ciklooksigenaza   |
| CT     | vrijeme zgrušavanja<br>(eng. <i>clotting time</i> )                                 |
| KLO    | klopidogrel   |
| LI     | tromboliza<br>(eng. <i>lysis</i> )  |
| L-NAME | N-nitro-L-arginin metil-ester   |
| MCF    | maksimalna čvrstoća ugruška<br>(eng. <i>maximal clot firmness</i> )                 |
| NO     | dušični oksid   |
| NOS    | sintetaza dušičnog oksida   |
| ODQ    | 1H-[1,2,4]oksidiazol[4,3-a]kvinoksalin-1-1  |
| PAI    | inhibitor aktivatora plazminogena<br>(eng. <i>plasminogen-activator inhibitor</i> ) |
| PAR    | proteazom aktivirani receptor<br>(eng. <i>protease activated receptor</i> )         |
| PDE    | fosfodiesteraza   |



|       |   |
|-------|---|
| PGE 1 | prostaglandin E1  |
| PLC   | fosfolipaza C   |
| PV    | protrombinsko vrijeme   |
| sGC   | topljiva gvanilil ciklaza<br>(eng. <i>soluble gvanlyl cyclase</i> )                                     |
| TAFI  | trombinom-aktiviran inhibitor fibrinolize<br>(eng. <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i> ) |
| TF    | tkivni faktor   |
| TFPI  | inhibitor puta tkivnog faktora<br>(eng. <i>tissue factor pathway inhibitor</i> )                        |
| TNF   | čimbenik tumorske nekroze<br>(eng. <i>tumor necrosis factor</i> )                                       |
| TXA 2 | tromboksan A2   |
| VEL   | brzina agregacije trombocita<br>(eng. <i>velocity</i> )   |
| VEGF  | čimbenik rasta vaskularnog endotela<br>(eng. <i>vascular endothelial growth factor</i> )                |
| vWF   | von Willebrandov faktor   |

## 1. UVOD

### 1.1. Svrha rada

U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da BPC 157 djeluje na koagulacijski sustav štakora sprječavajući nastanak okluzivnog tromba i ubrzavajući razgradnju već nastalog krvnog ugruška nakon formiranja termino-terminalne anastomoze abdominalne aorte (Hrelec i sur., 2009.), a da, s druge strane, smanjuje vrijeme krvarenja nakon amputacije repa u životinja tretiranih aspirinom, varfarinom, heparinom (Stupnisek i sur., 2012.). Kao prirodna ekstenzija ovih pokusa s naizgled suprotnim zaključcima, nametnula se potreba određivanja utjecaja BPC-a 157 na agregaciju trombocita i viskoelastična svojstva krvnog ugruška.

Sa svrhom definiranja tog utjecaja dizajnirali smo pokus u kojem će životinje biti tretirane antiagregacijskim lijekovima od kojih je svaki predstavnik jedne skupine: 1. aspirin (djeluje prije razine receptora kao inhibitor ciklooksigenaze (COX) i stvaranja aktivnog agonista tromboksana A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)), 2. klopidogrel (inhibiciju agregacije ostvaruje na razini receptora kao direktni blokator P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> receptora) i 3. cilostazol (inhibitor fosfodiesteraze III (PDE III) koji sprječava agregaciju na razini unutarstaničnih signalnih puteva).

Agregacija će se mjeriti metodom impendancijske agregometrije, po aktivaciji različitih putova djelovanja sljedećim agonistima: adenzin difosfatom (ADP) (koji je direktni agonist P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> i P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptora), arahidonskom kiselinom (AA) (koja pospješuje stvaranje TXA<sub>2</sub>, agonista TP receptora), kolagenom (koji je direktni adhezivni agonist GP VI receptora) te prostaglandinom E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) (koji je direktni agonist IP receptora).

Viskoelastična svojstva krvnog ugruška će se mjeriti metodom rotacijske tromboelastometrije, i to po aktivaciji vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom, unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom te bez doprinosa trombocita nakon djelovanja citohalazina D.

Odnos BPC-a 157 sa sustavom dušičnog oksida ispitat ćemo međudjelovanjem sa selektivnim inhibitorom topljive gvanilil ciklaze (sGC), 1H-[1,2,4]oksidiazol[4,3-a] kvinoksalin-1-1 (ODQ).

## 1.2. Hipoteza

Pentadekapeptid BPC 157 inhibira agregaciju trombocita i ubrzava razgradnju nastalog krvnog ugruška.

## 1.3. Specifični ciljevi

Za agregometrijska mjerenja:

1. utvrditi utjecaj BPC 157 na maksimalni nagib i visinu, te površinu ispod krivulje agregacije trombocita po aktivaciji agregacije ADP-om, arahidonskom kiselinom, kombinacijom arahidonske kiseline i prostaglandina E1, te kolagenom u životinja tretiranih aspirinom, klopidogrelom i cilostazolom.
2. utvrditi utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC 157 na iste parametre.

Za tromboelastomeriju:

1. utvrditi utjecaj BPC 157 na vrijeme zgrušavanja, vrijeme do postizanja stabilnog ugruška, brzinu stvaranja i maksimalnu čvrstoću ugruška, postotak trombolize nakon 30 minuta i maksimalnu trombolizu ugruška po aktivaciji vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom, unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom, te nakon inhibicije doprinosa trombocita zgrušavanju citohalazinom D u životinja tretiranih klopidogrelom i cilostazolom.
2. utvrditi utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC 157 na iste parametre.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Povijest istraživanja koagulacije

Prvi pisani tragovi o istraživanju hemostatskih mehanizama datiraju iz razdoblja prije 400. godine pr. n. e. kada je Hipokrat zabilježio da krv prelazi iz tekućeg u gel stanje dok se hladi u metalnoj posudi. Aristotel i Galen smatrali su također da je uzrok zgrušavanju krvi njezin kontakt sa zrakom i hlađenje izvan tijela, a ovo uvriježeno mišljenje opovrgnuto je tek 1627. godine Mercularisovim otkrićem da krv može koagulirati i unutar cirkulacijskog sustava pri tjelesnoj temperaturi (Michelson i sur., 2013.).

Francuski kirurg Jean-Louis Petit je 1720. godine opisao da krvarenje nakon amputacije noge prestaje tek kad se u krvnim žilama stvore krvni ugrušci, čime je prvi puta povezana hemostaza sa zgrušavanjem krvi.

Otkriće novih krvnih tjelešaca manjih od eritrocita i leukocita, tada nazvanih trombocitima, datira iz 18. stoljeća, a prvi ih je spomenuo William Hewson 1780. godine. Među istraživačima koji su od 1865. do 1877. godine intenzivno proučavali nove krvne pločice prednjačio je Max Schultze kojemu pripisujemo njihov prvi iscrpan i uvjerljiv opis. Nažalost, unatoč velikom interesu istraživači toga doba još uvijek nisu imali uvid u njihovo porijeklo, važnost ili funkciju.

Giulio Bizzozzero je 1883. godine prvi utvrdio ključnu ulogu trombocita u hemostazi proučavajući pod mikroskopom slijed zbivanja nakon ozljeđivanja krvne žile vrhom igle. Primjetio je da trombociti tada prionu uz zid krvne žile i promijene svoj oblik pružajući izdanke različitih dužina nakon čega agregiraju međusobno te s okolnim eritrocitima i leukocitima. Opisao je da taj proces napreduje dok se ne stvori čvrsta mreža vlakana među krvnim zrnima. Bizzozzerov pokus prva je jasna demonstracija fiziološke uloge trombocita u hemostazi (Gazzaniga i sur., 2001.; Michelson i sur., 2013.).

Rudolf Virchow je u drugoj polovici 18. stoljeća zabilježio sposobnost krvnih ugrušaka da emboliziraju i opisao vjerojatnu funkciju fibrinogena spominjući tako prvi put topljive čimbenike zgrušavanja plazme.

Klasičnu teoriju koagulacije temeljenu na međudjelovanju četiriju koagulacijskih faktora plazme, prvu kojom se mogla naslutiti kompleksnost sustava zgrušavanja, predložio je Paul Morowitz 1905. godine tvrdeći da se, u prisutnosti kalcija i tromboplastina, protrombin pretvara u trombin koji tada potiče pretvorbu fibrinogena u fibrin na čijoj se osnovi formira krvni ugrušak.

Početak modernog shvaćanja biokemijskih procesa u koagulaciji držimo trenutak kada je Paul Owren 1944. godine otkrio faktor V. Naredne godine dovele su do spoznaja funkcije i drugih koagulacijskih faktora topljivih u plazmi koji su označavani rimskim brojevima prema redoslijedu otkrivanja (Charles i sur., 2001.).

Dvije različite grupe istraživača 1960-ih godina gotovo su istovremeno predložile kaskadni model koji sekvencijalnim aktiviranjem profaktora zgrušavanja plazme kroz vanjski i unutarnji put dovode do stvaranja trombina (Davie i sur., 1964.; Macfarlane i sur., 1964.). Iako je dobro korelirao s rezultatima klasičnih laboratorijskih testova, ovaj model ipak nije mogao u potpunosti objasniti sva zbivanja prilikom koagulacije *in vivo*.

Daljnja istraživanja rezultirala su danas prihvaćenim staničnim modelom koagulacije predstavljenim 2001. godine od Hoffmana i suradnika, po kojem se ovaj precizno regulirani proces odvija na površini stanica koje imaju receptore za pojedine koagulacijske faktore i njihove komplekse (Hoffman i sur., 2001.).

## 2. 2. Trombociti

Trombociti nastaju u koštanoj srži kao subcelularni fragmenti citoplazme megakariocita. Proces proliferacije regulira trombopoetin koji se stvara u koštanoj srži, bubrezima, jetri i slezeni. Normalan broj trombocita je 150 000-450 000 u  $\mu\text{l}$  humane krvi, a 650 000-1,100 000 u  $\mu\text{l}$  kod štakora. Dvije trećine trombocita cirkulira u krvi, a jedna je trećina pohranjena u slezeni. Životni vijek im je 7-10 dana kod ljudi i 4-5 dana kod štakora, te nakon tog perioda bivaju odstranjeni iz krvotoka fagocitozom od strane makrofaga u slezeni i jetri (Gazzaniga i sur., 2001.).

### 2.2.1. *Struktura trombocita*

Trombociti su jedinstveni po svojoj strukturoj uređenosti prvenstveno stoga što, unatoč brojnim fiziološkim procesima u koje su uključeni, nemaju jezgru. Dok su neaktivni cirkuliraju u krvi diskoidnog oblika i glatke površine. Elektronskom mikroskopijom mogu se razlučiti različiti strukturni odjeljci: periferna zona, sol-gel zona, membranski sustav i zona organela (Michelson i sur., 2013.).

Perifernu zonu čini plazma membrana koja je relativno glatka kada ju uspoređujemo s, primjerice, membranom leukocita. Ipak, elektronskom mikroskopijom se može vidjeti da i ona ima fino naboranu strukturu, poput sulkusa na površini mozga. Pretpostavljena uloga nabora je osiguravanje dodatne površine prilikom aktivacije i agregacije. Trombociti imaju vanjski omotač, glikokaliks, koji je nešto deblji od onog kod drugih cirkulirajućih stanica. On ne služi samo kao sloj koji odvaja unutrašnjost trombocita od okoline, već predstavlja i dinamičnu strukturu koja je prva u kontaktu s vaskularnim strukturama i osluškuje promjene koje zahtijevaju hemostatski odgovor na mjestu eventualne ozljede. Glikokaliks je prekriven receptorima koji omogućavaju adheziju trombocita na oštećenu stijenku krvne žile, započinju njihovu aktivaciju, promoviraju agregaciju i međustaničnu interakciju s ostalim staničnim elementima krvi. Glavni glikoproteini uključeni u hemostatske procese su GP Ib-IX-V i GP IIb-IIIa kompleks. Postoji oko 25000 GP Ib-IX i oko 80000 GP IIb-IIIa receptora koji pokrivaju vanjsku površinu, ali i kanale otvorenog kanalikularnog sustava neaktivnog trombocita. GP Ib-IX kompleks je vezan na submembranozni citoskelet preko aktin-vežućeg

proteina, a GP IIb-IIIa je vezan na isti citoskelet preko svojih citoplazmatskih izdanaka. Izlaganje vaskularnog subendotela visokim silama trenja rezultira trenutnim vezanjem GP Ib-IX kompleksa za von Willebrandov faktor (vWF) koji pokriva kolagenska vlakna izložena traumom. Dva kolagenska receptora, GP IV i integrin  $\alpha 2\beta 1$ , stabiliziraju ovu vezu, a GP IV zajedno s GP Ib-IX aktivira GP IIb-IIIa koji se veže na fibrinogen i fibronektin stijenke krvne žile. Vezanje GP Ib-IX na vWF također uzrokuje stvaranje filamenata aktina i reorganizaciju citoskeleta te egzocitozu granula. Novopridošli trombociti tada adheriraju uz ovaj prvi sloj krvnih pločica vezan na ozlijeđeno mjesto, vežući se preko svojih GP IIb-IIIa receptora na fibrinogen što rezultira daljnjom agregacijom. Važna karakteristika oba kompleksa glikoproteina jest mobilnost u lipidnom dvosloju kako bi se, prilikom promjene oblika trombocita nakon aktivacije, vanjskoj okolini izložio što veći broj receptorskih mjesta. Dvoslojni lipidni omotač trombocita je strukturno sličan onom u drugim stanicama, ali ima značajno drugačiju ulogu obzirom da služi kao površina na kojoj se odvija proces zgrušavanja. Fosfolipidna membrana trombocita sadrži arahidonsku kiselinu koja je snažan prekursor za tromboksan A<sub>2</sub>, agonist koji potiče agregaciju trombocita i spazam krvnih žila. Submembranozni dio periferne zone leži neposredno ispod lipidnog dvosloja i kroz njega se prostiru citoplazmatski izdanci transmembranskih receptora kojima prolaze signalni putovi za aktivaciju trombocita.

Sol-gel zona je građena od dva sustava visoko specijaliziranih i organiziranih filamenata, mikotubula i mikrofilamenata. Smatra se da je funkcija uzvojne organizacije mikrotubula prvenstveno održavanje diskoidne strukture neaktiviranih trombocita. Aktin-miozinska mreža mikrofilamenata, s druge strane, omogućuje promjenu oblika trombocita nakon aktivacije, te kontrakciju i retrakciju formiranog hemostatskog čepa. Drži se da su trombociti zapravo vrsta mišićnih stanica zbog ovako razvijenog sustava kontraktilnih filamenata.

Membranski sustav čine dvije zasebne i potpuno odvojene sastavnice. Jedna je otvoreni membranski sustav, koji je spojen ne samo s površinskom membranom već njegove invaginacije tuneliraju i kroz čitavu citoplazmu poput serpentina. On svojom duljinom sudjeluje u povećavanju okolini izložene površine aktiviranih trombocita i do 420%. Osim toga, predstavlja glavni put kojim se iz plazme u  $\alpha$ -granule transportiraju tvari poput fibrinogena i faktora koagulacije. Drugu sastavnicu čine kanali gustog tubularnog sustava koji

također nepravilno invaginiraju od površine kroz citoplazmu, a potječu od zrnatog endoplazmatskog retikuluma megakariocita. Imaju ulogu u regulaciji unutarstanične koncentracije kalcija i sintezi prostaglandina (Michelson i sur., 2013.).

Zona organela sadrži četiri vrste granula (alfa, delta, lizosomalne i T granule) koje služe kao spremnici proteina i drugih biološki aktivnih tvari važnih za funkciju trombocita. One se razvijaju u megakariocitima fuzijom malih vezikula koje pupaju iz Golgijevih kompleksa.

Alfa granule ( $\alpha$ -granule) su najbrojnije, a broj im ovisi o veličini trombocita. U pojedinačnoj stanici obično ih se nalazi 40-80 i u neaktiviranim trombocitima su odijeljene jedne od drugih kao jasne podstrukture staničnog matriksa. Ovalnog su oblika, veličine 200-500 nm u promjeru. Sadrže presintetizirane receptore, P-selektin, von Willebrandov faktor, faktor V, XI i XIII, fibrinogen, te mnoge druge proteine kao što su PF4, B-tromboglobulin, inhibitor aktivatora plazminogena, fibronektin, vitronektin i trombospondin. Ovi proteini uključeni su u koagulaciju, cijeljenje, upalna zbivanja i angiogenezu.

Delta granule (eng. *delta* ili *dense granules*) su neregularnog oblika, a veličinom su znatno manje od  $\alpha$ -granula. Obično ih je 3-8 po trombocitu, a predstavljaju drugi najvažniji skladišni prostor. One sadrže molekule važne za funkciju trombocita: kateholamine, adenozin difosfat, adenozin trifosfat, pirofosfate, serotonin, kalcijeve ione i magnezij. Imaju ključnu ulogu u primarnoj hemostazi služeći kao mehanizam povratne sprege, stimulirajući aktivaciju trombocita ADP-om preko P2Y<sub>12</sub> receptora.

U svakom trombocitu nalaze se i 1-3 lizosomske granule koje sadrže različite hidrolitičke enzime (katepsine, heksozaminidaze,  $\beta$ -galaktozidaze, arilsulfataze,  $\beta$ -glukuronidaze, kisele fosfataze). Njihova uloga u fiziologiji koagulacije još nije precizno utvrđena, ali se pretpostavlja da sudjeluju u fibrinolizi i razgradnji fagocitiranih mikroorganizama, slično kao i neke druge stance s jezgrom. Također, moguće je da sekrecija lizosomalnog sadržaja ima važnu ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa i remodeliranju vaskulature (Heijnen i sur., 2015.). Novotkrivena tjelešca nazvana su T-granule po svom tubularnom izgledu, a njihova funkcija još nije ustanovljena.

Sekrecija granula je precizno regulirana različitim signalnim mehanizmima kojima je zajedničko podizanje unutarstanične koncentracije kalcijevih iona što dovodi do promjene oblika trombocita i fuzije granula sa plazmatskom membranom te posljedičnim otpuštanjem njihovog sadržaja u okolinu.



### 2.2.2. Trombocitni receptori i njihovi agonisti

Receptori na površini određuju način na koji trombociti reagiraju na vanjske podražaje koje s njima komunicira okolina putem mnogobrojnih topljivih agonista i adhezivnih proteina. Za razliku od drugih stanica, trombociti nemaju jezgru pa tako ni mogućnost da na različite podražaje odgovore novom sintezom proteina, iako postoje dokazi za mali ostatni sintetski potencijal nasljeđen iz megakariocitne mRNA. Da bi se uspješno mogli prilagoditi svim situacijama trombociti moraju imati velik broj unaprijed sintetiziranih molekula pomoću kojih reagiraju na vanjske podražaje (Brass i sur., 2011.).

Odgovor trombocita na stimulaciju trombinom posredovana je proteazom aktiviranim receptorima (engl. *protease activated receptors*, PARs) vezanih uz G protein. Postoje četiri receptora u ovoj obitelji (PAR1, PAR2, PAR3 i PAR4) od kojih se PAR1, PAR3 i PAR4 aktiviraju trombinom. PAR1 i PAR4 su izloženi na humanim, a PAR 3 i PAR4 na štakorskim trombocitima. Aktivacija trombinom započinje hidrolitičkim cijepanjem N-terminalnog dijela receptora čime se eksponira novi N-terminalni dio koji tada djeluje kao ligand (Vu i sur. 1991.). Unutar nekoliko sekundi od stimulacije trombocita trombinom dolazi do višestrukog porasta unutarstanične koncentracije kalcijevih iona, što dalje posreduje aktivaciju fosfolipaze A2 i Rho proteina dovodeći do reorganizacije citoskeleta i degranulacije. Također, trombin inhibira aktivnost adenilil ciklaze a time i inhibirajuće djelovanje cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) (Kim i sur., 2000.; Li i sur., 2010.).

Na površini humanih i štakorskih trombocita postoje četiri različita kolagenska receptora. Dva koja se direktno vežu na kolagen su  $\alpha\text{IIb}\beta\text{I}$  i GP VI, dok se  $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$  i GP Iba vežu na kolagen indirektno preko vWf. Najvažniji od ovih receptora je GP VI koji svoju signalizaciju ostvaruje preko ITAM puta. Signalizacija preko GP VI receptora dovodi do fosforilacije FcR $\gamma$  lanca što dalje ima za posljedicu porast unutarstanične koncentracije kalcijevih iona direktnim utokom preko plazmatske membrane i oslobađenjem iz endoplazmatskog retikuluma. Smatra se da je interakcija trombocita sa kolagenom posredovana GP VI receptorima važna u uvjetima srednjih i visokih sila protoka krvi kakve vladaju u arterijama. U uvjetima vrlo visokih sila protoka krvi, kao što je to slučaj u arteriolama i patološki suženim žilama, trombociti ovise o brzom međudjelovanju GP Ib-V-IX receptora sa vWF koji se nalazi imobiliziran na kolagenu. Ova veza je reverzibilna i

nestalna, te biva lako prekinuta ukoliko se intracelularna signalizacija ne pojača uključenjem GP VI receptora i otpuštanjem drugih solubilnih agonista agregacije, primjerice ADP-a, trombina ili tromboksana A<sub>2</sub> (Stalker i sur., 2012.).

U usporedbi s trombinom, adrenalin je slabi agonist agregacije. Njegovo djelovanje na trombocite je posredovano preko  $\alpha_2$  adrenergičkih receptora. Oni započinju aktivaciju preko G<sub>i</sub> obitelji uz G protein vezanih receptora. U ljudi i štakora adrenalin nije sam sposoban izazvati agregaciju, ali može pojačati signalizaciju započetu drugim agonistima i to inhibirajući stvaranje cAMP-a (Motulsky i sur., 1982.).

Purinergički receptori se dijele na adenzinske P<sub>1</sub> i nukleotidne P<sub>2</sub> receptore, gdje nadalje razlučujemo dvije glavne podskupine: receptore vezane uz ionske kanale (P<sub>X2</sub>) i uz G protein vezane receptore (P<sub>2Y</sub>) koji djeluju preko G<sub>i</sub> i G<sub>q</sub> signalnih putova. Važnost aktivacije ADP-om preko ovih receptora otkrivena je proučavanjem bolesnika sa deficijencijom skladištenja ADP-a, defektima degranulacije, oštećenjima na samim P<sub>2Y</sub> receptorima, te velike antiagregacijske učinkovitosti lijekova koji direktno antagoniziraju ove receptore, kao što su tienopiridini. Tek razlučivanjem P<sub>2</sub> receptora na tri glavne podgrupe (P<sub>2Y1</sub>, P<sub>2Y12</sub> i P<sub>2X1</sub>) i proučavanjem njihove interakcije došlo se do detaljnijeg uvida u fiziološke učinke ADP-a na trombocite. Međudjelovanje signalnih puteva niže od P<sub>2Y1</sub> i P<sub>2Y12</sub> receptora je zanimljivo stoga što otkriva mehanizam aktivacije  $\alpha$ IIb $\beta$ III integrinskih receptora svim fiziološkim agonistima. ADP je uskladišten u delta granulama i otpušta se po aktivaciji trombocita. Također, mogu ga otpuštati oštećene stanice na mjestu vaskularne ozljede, a služi kao autokrini i parakrini stimulator aktivacije. Proagregacijsko djelovanje svih drugih agonista do neke mjere ovisi o signalizaciji započetoj ADP-om. On potiče proizvodnju tromboksana A<sub>2</sub>, fosforilaciju proteina, podiže unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona, dovodi do promjene oblika trombocita i inhibira stvaranje cAMP-a (Michelson i sur., 2013.).

TP receptori su također vezani uz G protein i njihova aktivacija tromboksanom A<sub>2</sub> uzrokuje preko G<sub>q</sub> i G<sub>12/13</sub> signalnih putova aktivaciju fosfolipaze A<sub>2</sub> i fosfolipaze C. To za posljedicu ima promjenu oblika trombocita, agregaciju, sekreciju granula, hidrolizu fosfoinozitida, fosforilaciju proteina i podizanje unutarstanične koncentracije Ca<sup>++</sup>. Tromboksan A<sub>2</sub> tada može difundirati preko plazmatske membrane i aktivirati druge

trombocite. Kao što je to slučaj s otpuštanjem ADP-a, i otpuštanje tromboksana A<sub>2</sub> djeluje autokrinom amplifikacijom na inicijalni poticaj i pomaže u regrutiranju novih trombocita. Ovaj proces je ograničen kratkim poluvremenom života čime se njegovo snažno proagregacijsko djelovanje ograničava na mjesto ozljede (Bye i sur., 2016.).

### 2.2.3. *Inhibicija trombocita*

Trombociti cirkuliraju pasivno unutar vaskularnog sustava obloženog endotelom koji normalno otpušta medijatore odgovorne za održavanje njihove neaktivne forme. Bez stalnog odašiljanja ovih inhibitornih signala od strane zdravog endotela trombociti bi se ubrzo aktivirali čak i bez prisutnosti aktivirajućih agenasa (Bye i sur., 2016.). Inhibitornih medijatora ima malo, ali oni inaktiviraju ključne korake u mehanizmu signalizacije aktivacije trombocita. Najvažniji su dušični oksid i prostaglandini. Dušični oksid (NO) se sintetizira iz L-arginina posredovanjem NO sintetaze (NOS). Postoje tri izoforme ovog enzima: endotelna, inducibilna i neuronska. NO lučen iz endotelnih stanica i iz samih trombocita inhibira njihovu adheziju na žid žile, kao i međusobnu agregaciju aktivacijom topljive gvanilil ciklaze. Niske koncentracije u kojima se proizvodi te vrlo kratko poluvrijeme života čine ga neobično složenim za istraživanje (Cozzi i sur., 2014.). Prostaglandini se vežu za IP receptore preko kojih aktiviraju adenilil ciklazu na produkciju cAMP-a. Oba ova mehanizma dovode do pada unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup>, jednog od ključnih koraka u aktivaciji trombocita (Chen i sur., 2005.).

### 2.2.4. *Aktivacija trombocita*

Kako će započeti proces koagulacije ovisi o tome u kojem se dijelu cirkulacije pokreće. U venskom sustavu zbog malih sila protoka koje omogućuju nakupljanje koagulacijskih faktora i lokalnu proizvodnju trombina može doći do stvaranja ugruška i bez doprinosa trombocita. Zbog toga u venskom ugrušku predominantnu staničnu komponentu predstavljaju eritrociti. U arterijskoj cirkulaciji visoki protok stalnim otplavlivanjem sastavnica koagulacijskog sustava smanjuje brzinu nastanka fibrina, stoga je ovdje nužno da trombociti

stvore fizičku barijeru i osiguraju površinu na kojoj će se stvoriti dovoljna količina fibrina za uspješnu hemostazu (Bye i sur., 2016.).

Stvaranje trombocitnog čepa u primarnoj hemostazi možemo shvatiti i kao model s tri etape koje su precizno regulirane složenim mehanizmom unutarstanične signalizacije.

Inicijacija je prva faza koja započinje kada trombociti dođu u dodir s ekstracelularnom tvari, tj. kolagenom ili vWF. Tada se stvara pokrov od jednog sloja trombocita koji su zaduženi za adheziju i aktivaciju drugih trombocita (Stalker i sur., 2012.).

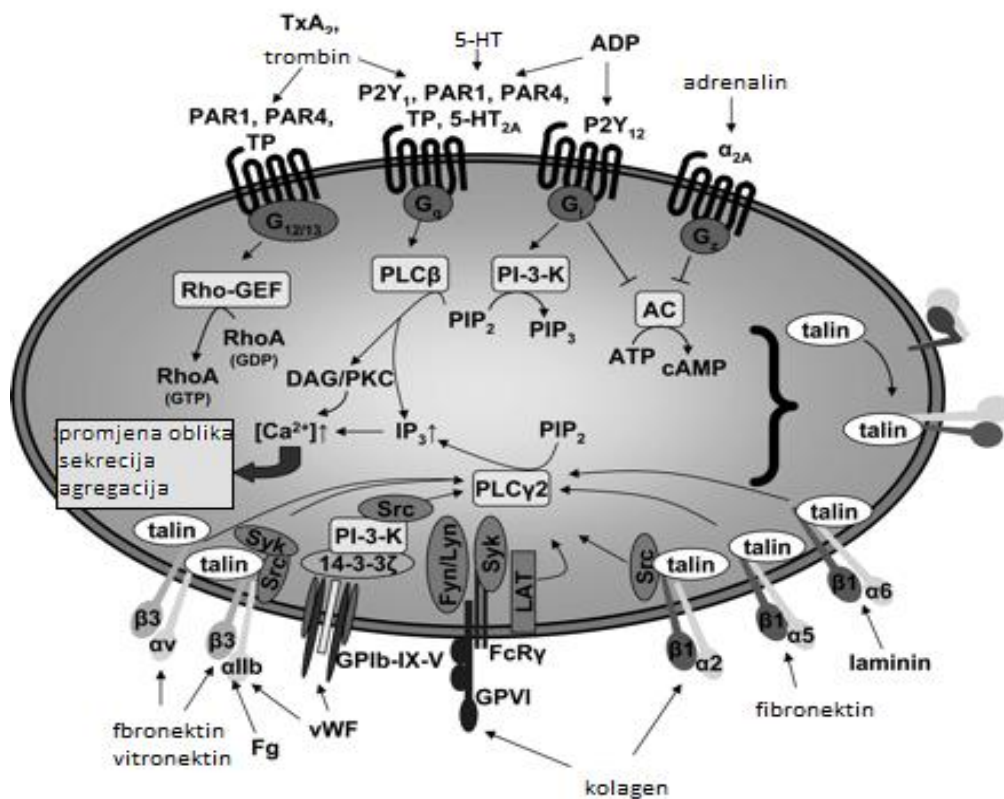
Ekstenzijom smatramo proces tijekom kojeg susjedni trombociti adheriraju na prvi sloj i postanu aktivni. Trombin, ADP i tromboksan A<sub>2</sub> imaju važnu ulogu u ovoj etapi aktivirajući okolne trombocite preko membranskih receptora koji su vezani uz G protein. Posljedična unutarstanična signalizacija aktivira integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ III na površini trombocita omogućujući tako koheziju između trombocita.

Stabilizacija označava kasnija zbivanja koja pomažu konsolidaciji trombocitnog ugruška i sprječavaju preuranjenu disagregaciju pojačavajući signalizaciju unutar trombocita. S vremenom se trombociti inkorporirani u ugrušak privlače sve bliže jedan drugom što omogućava razvoj o kontaktu ovisne signalizacije i stvara okružje u kojemu se mogu u dovoljnoj koncentraciji akumulirati sve solubilne komponente potrebne za funkcionalnu hemostazu (Brass i sur., 2003.).

Novija istaživanja sugeriraju da je ovakav model ipak suviše pojednostavljen da bi mogao objasniti sva zbivanja tijekom stvaranja trombocitnog ugruška, a dokazi govore u prilog postojanja prostorne i vremenske heterogenosti unutar rastućeg ugruška (Brass i sur., 2011.). To bi značilo da u svakom trenutku nakon ozljede krvne žile na mjestu same lezije postoje potpuno aktivirani kao i minimalno aktivirani trombociti.

U normalnim uvjetima trombociti cirkuliraju neaktivni u okružju omeđenom endotelnim stanicama. Po nastanku vaskularne ozljede, trombociti se aktiviraju u dodiru s lokalno izloženim kolagenom, lokalno generiranim trombinom, TXA<sub>2</sub> i ADP-om koji su izlučeni iz delta granula ili oslobođeni iz oštećenih stanica endotela. vWF služi kao pomoćna

molekula i u normalnom stanju se može naći u plazmi, u stijenci krvne žile i u  $\alpha$ -granulama. Dodatni vWF/kolagen kompleksi se stvaraju kada fibrile kolagena dođu u kontakt s plazmom. Cirkulirajući eritrociti olakšavaju adheziju trombocita na kolagen gurajući ih bliže zidu žile, omogućavajući GP Iba receptorima na površini trombocita da se spoje s vWF. Nakon njihovog spajanja, daljnji pokretači događaja uključuju receptore za kolagen (GP VI) i vWF (GP Iba), trombin (PAR1 i PAR4), ADP (P2Y12 i P2Y1) i TXA2 (TP) (Slika 1) (Stalker i sur., 2012.).



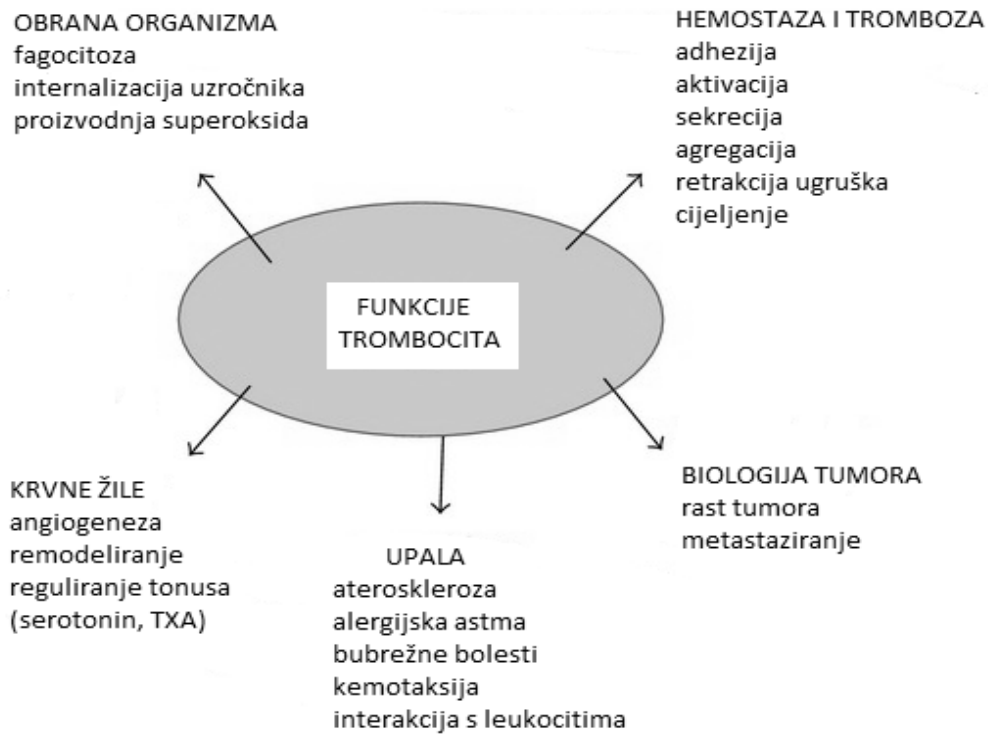
Slika 1. Prikaz aktivacije trombocita preko različitih receptora i pripadajućih im unutarstaničnih signalnih putova (modificirano iz: Varga-Szabo i sur., 2008.).

Signalizacija u trombocitima započinje aktivacijom receptora na njihovoj površini agonistima kao što su kolagen, trombin, ADP, TXA2 i adrenalin. S iznimkom kolagena, svi ovi agonisti djeluju preko receptora koji su vezani na obitelj G proteina (eng. *G protein coupled receptors*, GPCRs), koja se sastoji od Gs, Gi, Gq i G12/13 članova. Osobina GCPR-a jest da snažno vežu svoje ligande i potom aktiviraju različite G proteine tako pojačavajući signal. Agonistom uzrokovana agregacija trombocita započinje aktivacijom jedne od fosfolipaza C (PLC).

Hidrolizirajući membranski fosfatidilinozitol-4,5-difosfat, PLC producira drugi glasnik, inozitol-1,4,5-trifosfat, koji je potreban za porast razine kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) u citosolu. Ovo dovodi do aktivacije integrina koji sadrži o  $\text{Ca}^{2+}$  ovisan faktor izmjene (CalDAG-GEF), sklopku (Rap1), adaptor (RIAM) i proteine koji su u direktnoj interakciji sa kindlinom i talinom (Shattil i sur., 2010.). Koja će se forma PLC-a aktivirati ovisi o agonistu, tako kolagen aktivira  $\text{PLC}\gamma$ , dok trombin, ADP i TXA2 aktiviraju  $\text{PLC}\beta$  preko Gq proteina (Slika 1). Porast razine  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi potaknut od većine agonista ključan je za aktivaciju trombocita. U neaktivnim stanicama koncentracija slobodnog citoplazmatskog  $\text{Ca}^{2+}$  se održava na razini 0,1  $\mu\text{M}$  ograničavanjem utoka preko citoplazmatske membrane i neprestanim ispumpavanjem u gusti tubularni sustav. U aktiviranim trombocitima koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  poraste i do 10 puta utokom iz gustog tubularnog sistema i utokom preko membrane koji se aktivira pri niskoj razini  $\text{Ca}^{2+}$  u tubularnom sistemu, što predstavlja ključan događaj za aktivaciju trombocita. (Varga-Szabo i sur., 2011.). Vezanje suprotnih krajeva fibrinogena, fibrina ili fibronektina na  $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$  receptore konačno međusobno povezuje trombocite.

#### *2.2.5. Druge fiziološke funkcije trombocita*

Da trombociti imaju važnu ulogu u hemostazi znamo još od Bizzozzerovog otkrića. Novija istraživanja govore da se njihova funkcija proteže i daleko izvan ovog primarnog područja. Tako, otkriveno je da su aktivno uključeni u razna fiziološka zbivanja, primjerice u upalne procese, u borbu protiv mikrobioloških uzročnika bolesti, angiogenezu, remodeliranje i regulaciju tonusa krvnih žila, cijeljenje, rast i metastaziranje tumora (Ghoshal i sur., 2014.; Golebiewska i sur., 2015.) (Slika 2).



Slika 2. Uključenost trombocita u različita fiziološka zbivanja (modificirano iz Ghoshal i sur., 2014.).

### 2.3. Kaskadni model koagulacije

Koagulacijski sustav složeni je splet međusobno zavisnih mehanizama u kojima sudjeluju proteini plazme, stanični krvni elementi i stijenke krvnih žila. Njegova je zadaća održavanje krvi tekućom u normalnim uvjetima, sprječavanje iskrvarenja nakon ozljede krvne žile i pravodobno uklanjanje nastalog ugruška.

U fiziološkim uvjetima ovi precizno kontrolirani mehanizmi kontinuirano održavaju ravnotežu između prokoagulantnih i antikoagulantnih čimbenika.

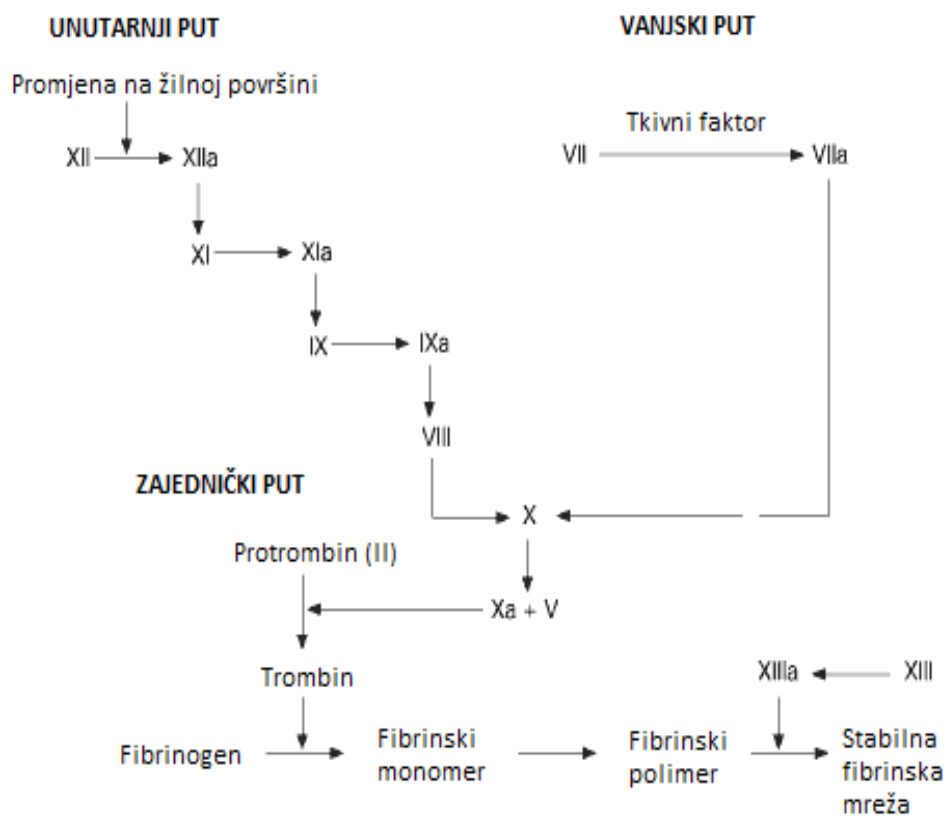
Klasični kaskadni model koagulacije predložili su 1964. godine Davie, Ratnoff i Macfarlan. Prema ovom konceptu, koagulacija se odvija sekvencijalnom proteolitičkom aktivacijom faktora zgrušavanja koji se nalaze u plazmi u obliku proenzima. Jednom aktivirani, oni aktiviraju sljedećeg u nizu kroz dva odvojena puta: vanjski (ekstrinzički) i unutarnji (intrinzički), koji konačno konvergiraju u zajednički put nakon aktivacije faktora X (fX).

U vanjskom putu zgrušavanja tkivni faktor (TF) aktivira faktor VII (fVII), a njihov kompleks (TF/fVIIa) je odgovoran za aktivaciju faktora X i proizvodnju male količine trombina (Slika 3).

U unutarnjem putu faktor XII (fXII) biva aktiviran dodiranjem s negativno nabijenom površinom te tada aktivira faktor XI (fXI), koji potom aktivira faktor IX (fIX). Faktor IXa u prisutnosti faktora VIII (fVIII), faktora V (fV) i kalcija aktivira fX, što rezultira stvaranjem velike količine trombina, koji naposljetku pretvara fibrinogen u fibrin (Davie i sur., 1964.).

Kaskadni model baziran na proteinima plazme doveo je do boljeg razumijevanja enzimatskih procesa zgrušavanja *in vitro* i razvoja laboratorijskih testova, međutim nije mogao objasniti sve pojave opažene *in vivo*. Tako, primjerice, nije mogao objasniti zašto manjak fXII ne uzrokuje krvarenje iako znatno produljuje vrijednosti testova unutarnjeg puta, zašto manjak fVII uzrokuje krvarenje u prisutnosti očuvanog unutarnjeg puta ili zašto se aktivacijom fX preko vanjskog puta ne može kompenzirati manjak fVIII u hemofiliji A ili fIX u hemofiliji B.





Slika 3: Kaskadni model prikazuje sekvencijalnu aktivaciju faktora koagulacije kroz unutarnji i vanjski put, a nakon aktivacije fX oni konvergiraju u zajednički put (modificirano iz: Smith i sur., 2009.).

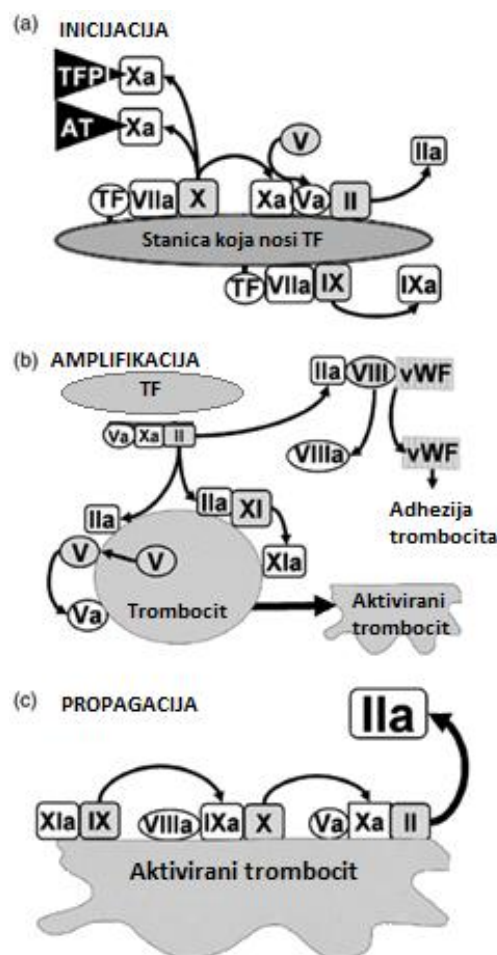
## 2.4. Stanični model koagulacije

Napretkom tehnologije i uvođenjem metoda koje mogu pratiti razvoj ugruška u stvarnom vremenu, došlo je do revizije starih shvaćanja i razvoja integriranog staničnog modela koagulacije koji ne prihvaća postojanje dvaju odvojenih putova zgrušavanja već dokazuje da su svi faktori u međusobnoj interakciji, te da je doprinos staničnih elemenata nezaobilazan.

Mann je 1992. godine prvi predstavio ono što danas smatramo temeljem staničnog modela koagulacije. Po njemu, unutarnji put nije nužan za zgrušavanje jer postoje brojne prije neopisane interakcije između vanjskog i unutarnjeg puta (Mann i sur., 1992.). Model pretpostavlja da je za stvaranje koagulacijskog kompleksa nužna fosfolipidna površina na kojoj se odvija proces zgrušavanja. Smatra se da se najvažnija takva prokoagulantna površina nalazi na aktiviranim trombocitima, koji mijenjajući svoj oblik eksponiraju na površini anionske fosfolipide. Neke druge stanice (monociti, stanice glatkih mišića, endotelne stanice) također mogu djelovati kao prokoagulantna površina u određenim uvjetima (Furie i sur., 2005.). Mannov model kasnije je detaljnije razradio i u današnjem obliku objavio Hoffaman sa suradnicima 2001. godine. On razlučuje tri različite faze: inicijaciju, amplifikaciju i propagaciju.

Faza inicijacije (Slika 4, a) započinje kada krv dođe u kontakt s integralnim membranskim proteinom, tkivnim faktorom kojeg sintetiziraju i na svojoj površini izlažu brojne stanice (Tanaka i sur., 2005.). Krv i TF su u normalnim uvjetima gotovo u potpunosti odijeljeni endotelnom membranom, iako se mala količina cirkulirajućeg TF-a može naći i u plazmi. Funkcija ovog plazmatskog TF-a nije sasvim razjašnjena, a neki istraživači drže da zapravo cirkulira njegov neaktivan oblik (Morrissey i sur., 2012.). Nakon ozljede zida krvne žile dolazi do izlaganja stanica adventicije i glatkog mišića, a time i obilja TF-a koji se odmah veže sa fVIIa i započinje fazu inicijacije koagulacije. Faktor VII je o vitaminu K ovisan protein koji se sintetizira u jetri, ima najkraće poluvrijeme života od svih prokoagulantnih faktora, a ujedno je i jedini koji u plazmi cirkulira u neaktivnom i aktivnom obliku. Faktor VII može biti aktiviran faktorima fIXa, fXa, fXIIa, trombinom, plazminom ili fVII-aktivirajućom proteazom. Pretpostavlja se da fVIIa, cirkulirajući u krvi, provodi nadzor nad cjelovitošću cirkulacijskog sustava, neprestano tražeći eventualno izloženi TF, tj. mjesto ozljede zida

krvne žile (Morrissey i sur., 1996.). Smatra se da je kompleks TF/fVIIa jedini fiziološki aktivator koagulacije *in vivo* (Smith i sur., 2009.). On, nadalje, aktivira fIX u fIXa i fX u fXa. Aktivirani fX zatim stvara malu količinu trombina. Nastali TF/fVIIa/fXa kompleks je kontroliran inhibitorom puta tkivnog faktora (eng. *tissue factor pathway inhibitor*, TFPI). Antitrombin (AT) je serinski inhibitor proteaza koji vrlo brzo neutralizira fXa i trombin. Količina ovako formiranog fXa i trombina u fazi inicijacije nedovoljna je za svrsishodnu hemostazu, ali je dovoljna za pojačavanje daljnje vlastite proizvodnje aktivirajući fV i fVIII. Stvaranje većih količina trombina potrebnih za hemostazu ovisno je o funkciji kompleksa tenaze (fVIIIa/fIXa) u fazi propagacije. Ovi procesi precizno su kontrolirani (TFPI, AT) sa svrhom sprječavanja stvaranja obilja trombina pri svakoj, čak i minimalnoj ekspoziciji TF-a, pa se prokoagulantno djelovanje nastavlja samo ako je došlo do izlaganja dovoljne količine TF-a da nadvlada inhibitorno djelovanje TFPI i AT-a.



Slika 4. Stanični model prikazuje koagulaciju kao troetapni proces u kojem razlučujemo faze inicijacije, amplifikacije i propagacije (modificirano iz: Smith i sur., 2009.).

Faza amplifikacije (Slika 4, b): Trombin stvoren u fazi inicijacije difundira u okolinu i aktivira okolne trombocite koji tada mijenjaju oblik, otpuštaju sadržaj svojih granula i izlažu membranske receptore. Trombin na površini aktiviranih trombocita pretvara fXI u fXIa i fV u fVa. Također, otpušta fVIII iz vWF/fVIII kompleksa i aktivira ga u fVIIIa (Hoffman 2003.). Trombociti koji su kemotaksijom dozvani u ozlijeđeno područje tijekom faze amplifikacije osiguravaju dovoljno veliku prokoagulantnu fosfolipidnu površinu na kojoj se dalje odvija faza propagacije.

U fazi propagacije (Slika 4, c) faktor IX dolazi u kontakt s fVIII na aktiviranom trombocitu i veže se s njim u fVIIIa/fIXa, a oni zajedno s kalcijem čine kompleks tenaze. Kompleks tenaze odgovoran je za aktiviranje najvećeg dijela fX u fXa, u daleko većoj mjeri nego što to čini TF/VIIa kompleks. Faktor Xa dalje s faktorom Va i kalcijem čini protrombinski kompleks koji uzrokuje snažno ubrzanje pretvorbe protrombina u trombin kakva je potrebna za formiranje stabilnog ugruška. Velike količine novonastalog trombina pretvaraju topljivi fibrinogen u netopljivi fibrin, te aktiviraju faktor XIII uzrokujući unakrsno vezanje nastalih fibrinskih niti, čime se dodatno dobiva na čvrstoći ugruška. Također, trombin djeluje kao aktivator trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (eng. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*, TAFI).

Jednom kada je stvoren stabilan ugrušak na mjestu ozljede krvne žile, koagulacija se počinje prigušivati. Zdrav i neaktiviran endotel u blizini mjesta ozljede i nastalog ugruška djeluje antiagregacijski lučeći razne medijatore. Proces zgrušavanja reguliraju a time i ograničavaju nekontrolirano širenje ugruška, inhibitori AT, TFPI, protein C i protein S (Sallah 1997.). AT inhibira trombin nepovratno ga vežući u trombin-antitrombin kompleks. Isto tako AT inhibira i druge aktivirane faktore zgrušavanja (osim faktora VIIa). Protein C i protein S inaktiviraju faktore Va i VIIIa, gdje protein S djeluje kao kofaktor proteinu C koji je proteolitička komponenta kompleksa (Esmon i sur., 1987.). Koagulacija *in vivo* započinje vezanjem TF-a i fVIIa, a ovaj kompleks dalje aktivira fX i fIX. Kada se proizvede dovoljno fXa, TF/fVIIa/fXa kompleks biva vrlo brzo inhibiran od strane TFPI (Baugh i sur., 1998.). Faktor Xa i trombin koji difundiraju dalje od mjesta zgrušavanja nemaju potencijal bilo gdje drugdje započeti stvaranje veće količine trombina jer su inhibirani antikoagulantima koje u normalnim prilikama luči zdravi endotel, TFPI i AT. Isto tako, trombin se može vezati i na trombomodulin, što dovodi do gubitka najvećeg dijela njegovog prokoagulantnog djelovanja.

## 2.5. Fibrinoliza

Fibrinolitički sustav je jednako kompleksan kao i sustav zgrušavanja, a svakako je i jednako važan u održavanju homeostaze. Ovaj precizno reguliran enzimatski mehanizam sprječava prekomjerno nakupljanje fibrina i omogućava uklanjanje tromba nakon cijeljenja zida krvne žile sa ciljem ponovne uspostave nesmetanog protoka krvi (Chapin i sur., 2014.).

Fibrinogen je topljivi protein koji se sastoji od tri polipeptidna lanca, a u netopljivi fibrin se pretvara djelovanjem trombina. Faktor VIII tada pojedinačne molekule fibrina unakrsno povezuje u čvrstu fibrinsku mrežu koja zajedno sa trombocitima i crvenim krvnim zrcima čini osnovnu strukturu ugruška. Mnogi faktori, kao što su koncentracija  $\text{Ca}^{++}$ , pH, broj i funkcija trombocita, broj i promjer molekula fibrina, utječu na arhitekturu i stabilnost krvnog ugruška (Wolberg i sur., 2007.). Nestabilni ugrušci sa manje gradivnih elemenata su podložniji fibrinolizi, dok su čvrsti ugrušci otporniji i mogu promovirati protrombotsku sklonost organizma.

Koagulacijski i fibrinolitički sustav međusobno su ovisni i regulirani nizom kofaktora i inhibitora. Plazmin je najvažniji fibrinolizin, a nastaje iz plazminogena djelovanjem serinskih proteaza tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) ili urokinaze (uPA). tPA se sintetizira i otpušta iz endotelnih stanica, a uPA iz monocita, makrofaga i urinarnog epitela. Oba aktivatora imaju kratko poluvrijeme života od 4-8 minuta zbog prisustva visoke koncentracije specifičnih inhibitora, kao što je inhibitor aktivatora plazminogena 1 (eng. *plasminogen-activator inhibitor*, PAI-1). uPA ima niži afinitet za plazminogen, ne treba fibrin kao kofaktor i u normalnim okolnostima djeluje samo u ekstravaskularnom okolišu. Oba se aktivatora, tPA i uPA, uklanjaju preko jetre nakon stvaranja kompleksa sa lipoproteinima. Plazmin također djeluje pozitivnom povratnom spregom na svoje aktivatore pojačavajući tako svoj učinak (Cesarman-Maus i sur., 2005.)

Inhibitori plazminogena su važni stoga što sprječavaju nereguliranu aktivnost plazmina i njegovih aktivatora. Cirkulirajući plazmin i plazminogen se inaktiviraju djelovanjem inhibitora serinskih proteaza, serpina. Serpini stvaraju kovalentne veze sa svojim ciljnim enzimima koji se tada odstranjuju iz cirkulacije. Tri su serpina najvažnija u fibrinolizi: inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1), inhibitor aktivatora plazminogena 2 (PAI-2) i

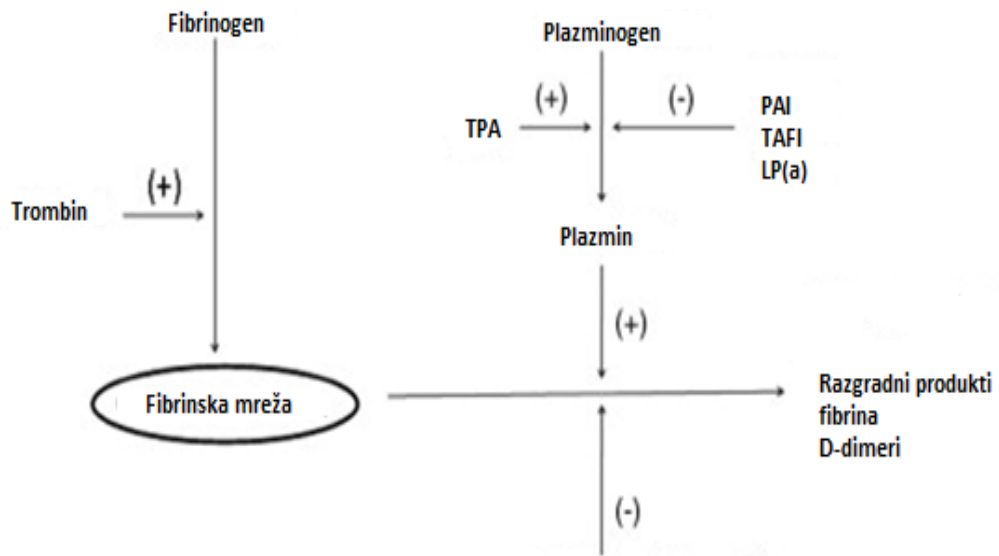
$\alpha$ 2-antiplazmin. Inhibitor fibrinolize aktiviran trombinom (TAFI) smanjuje broj mjesta na fibrinskim vlaknima dostupnih za vezanje plazminogena čime usporava stvaranje plazmina i sudjeluje u stabilizaciji ugruška (Schneider i sur., 2004.).

Sam proces fibrinolize se odvija, pa tako i regulira, na površini fibrinskih vlakana i na površini stanica. tPA vezan na fibrinska vlana ima 500 puta veću moć aktiviranja plazminogena u usporedbi s tPA koji cirkulira u plazmi. Slično, plazmin nakon vezanja za fibrin bude zaštićen od inhibicije  $\alpha$ 2-antiplazminom. Fibrin i fibrinogen pojačavaju pretvorbu plazminogena u plazmin i time ubrzavaju svoju degradaciju (Chapin i sur., 2014.).

Dok se plazmatski tPA, uPA i plazmin kontinuirano otklanjaju iz cirkulacije djelovanjem svojih topljivih inhibitora, oni koji su vezani na površinu stanica ili uz sami ugrušak, nesmetano nastavljaju svoju fibrinolitičku aktivnost.

Prirođeni ili stečeni poremećaji regulacije fibrinolize mogu dovesti do razvoja hiper- ili hipofibrinolitičkog stanja. Hiperfibrinoliza dovodi do pojačanog krvarenja, a primjer je diseminirana intravaskularna koagulacija kada sistamski upalni odgovor uzrokuje nesvrshodnu povećanu potrošnju fibrina u mikrotrombima. Takvo stanje dovodi do nedostatka fibrinogena i pojačane tendencije krvarenju. Hipofibrinoliza rezultira nedovoljnom razgradnjom ugruška i posljedičnom sklonosti razvoja sustavne tromboze. Primjer ovakvog stanja jest antifosfolipidni sindrom gdje postoje autoantitijela protiv komponenti fibrinolitičkog sustava sa posljedično nastalom trombofilijom (Hunt i sur., 2014.).

Razgradni produkti fibrina (eng. *fibrin degradation products*, FDP) nastaju djelovanjem plazmina na tromb, kada se otpuštaju spojevi kao što su fibrinopeptid B i dimeri. Direktno mjerenje aktivnosti fibrinolitičkog sustava je gotovo nemoguće, tako da nam preostaje oslanjanje na indirektno metode kao što su mjerenje koncentracije D-dimera ili globalne testove fibrinolize, npr. vrijeme razgradnje ugruška (eng. *clot lysis time*, CLT) ili tromboelastometriju (Hunt i sur., 2014.).



Slika 5. Shematski prikaz procesa fibrinolize prikazuje regulaciju razgradnje fibrinske mreže aktivacijom plazminogena u plazmin (modificirano iz Gorog i sur., 2010.).

## 2.6. Antiagregacijska terapija

Djelotvorna antitrombocitna terapija smanjuje mortalitet i pojavnost ishemijskih događaja u širokom spektru vaskularne patologije (Antithrombotic trialist collaboration, 2002.). Antiagregacijsko djelovanje usmjereno je na inhibiciju primarne hemostaze, tj. aktivacije i agregacije trombocita koji uzrokuju kritično suženje arterije u području disrupcije postojećeg aterosklerotskog plaka. Inhibicija trombocita se može postići bilo blokiranjem enzima koji pospješuju stvaranje agonista agregacije, blokiranjem membranskih receptora ili djelovanjem na intracelularne trombocitne signalne puteve.

Zlatni standard su lijekovi koji djeluju interferirajući između agonista i njihovih membranskih receptora, a to su acetilsalicilna kiselina te inhibitori P2Y<sub>12</sub> receptora (klopidogrel, tiklopidin, prasugrel, tikagrelol).

Acetilsalicilna kiselina (ASK) je najstariji antiagregacijski lijek, sintetiziran još u 19. stoljeću. Njegov antitrombocitni učinak primjećen je sredinom 60-ih godina prošlog stoljeća, a molekularni mehanizam otkriven je 1970. godina. Nakon oralnog unosa apsorbira se u gornjim dijelovima gastrointestinalnog trakta, a vršnu koncentraciju u krvi postiže već za 30 minuta. Najveći dio antitrombocitnog učinka ostvaruje već u cirkulacijskom sustavu vene vratariče, prije negoli bude razgrađen u jetri (Patrono i sur., 2001.). Ireverzibilni je inhibitor ciklooksigenaze COX-1, za koju je relativno selektivan u niskim dozama. COX-1 ima zadatak katalizirati pretvorbu arahidonske kiseline oslobođene iz membranskih fosfolipida prilikom aktivacije trombocita u prostaglandin H<sub>2</sub>. Tako se sprječava i transformacija prostaglandina H<sub>2</sub> u tromboksan A<sub>2</sub> koji je direktni agonist TP receptora vezanih na G<sub>12/13</sub> i G<sub>q</sub> signalne putove. Normalno se stvaranje tromboksana A<sub>2</sub> događa kao odgovor na aktivaciju trombocita pokrenutu različitim agonistima, kao što su trombin ili kolagen, kroz mnogobrojne amplifikacijske mehanizme koji imaju za cilj agregaciju krvnih pločica, spazam i proliferaciju glatkih mišićnih stanica krvnih žila (Kobayashi i sur., 2004.). Djelovanje acetilsalicilne kiseline na COX-1 je nepovratno i traje 7-10 dana kod ljudi, a 4-5 dana kod štakora. Razlog tome je što se agregacija trombocita oporavlja tek priljevom novih neinhibiranih stanica iz koštane srži budući da trombociti nemaju jezgru pa tako niti sposobnost sinteze novih proteina čime bi se regenerirala funkcija inhibiranih enzima (Awrty i sur., 2000.).



Klopidogrel je predstavnik tienopiridinske skupine lijekova druge generacije. Nakon peroralne primjene apsorbira se preko mukoze crijeva u obliku prolijeka koji većim dijelom bude inaktiviran u cirkulaciji djelovanjem esteraza. Samo se 15% apsorbiranog prolijeka dalje transformira u biološki aktivni oblik djelovanjem citokroma P450 u jetri. Svoj maksimalni utjecaj na trombocite postiže 1-2 sata po primjeni i tada ireverzibilno inaktivira mjesto vezanja agonista ADP-a na P2Y<sub>12</sub> receptorima koji su vezani na G<sub>q</sub> signalni put, vežući se na njihov cisteinski ostatak. Djelovanje klopidogrela na agregaciju traje koliko i životni vijek trombocita, odnosno do pojave novih trombocita u cirkulaciji (Quinn i sur., 1997.).

Inhibitori fosfodiesteraze III (dipiridamol, cilostazol) ostvaruju svoj antiagregacijski učinak suprimirajući hidrolizu cGMP-a i cAMP-a, povećavajući njihove intracelularne vrijednosti (Whilte i sur., 2003.). cGMP se dobiva preko sGC koja se aktivira dušičnim oksidom, a cAMP preko sAC, koja se aktivira prostaciklinom. Jedan od kritičnih događaja za aktivaciju trombocita, bilo topljivim agonistima koji djeluju signalizacijom preko s G proteinom vezanih receptora (ADP, tromboksan A<sub>2</sub>, trombin, serotonin) ili nakon ekspozicije adhezivnim proteinima (kolagen, vWF), jest smanjenje intracelularne koncentracije cAMP-a i cGMP-a. Analogno, intervencije kojima se podiže koncentracija cAMPa i cGMP-a djeluju inhibitory na sve mehanizme aktivacije (Zhenyu i sur., 2010.). Tako, interferirajući sa svim aktivirajućim signalnim putovima (G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>13</sub>) blokiraju mobilizaciju kalcija, reorganizaciju citoskeleta i degranulaciju (Geng 2012.). Inhibitori PDE III se uzimaju peroralno, ali nedostatak im je da su samostalno slabo učinkoviti, pa se obično kombiniraju s acetilsalicilnom kiselinom i klopidogrelom. Zanimljivo je da cilostazol ne povećava rizik od krvarenja.

Otkriće glikoproteinskih receptora IIb-IIIa kao i njihove funkcije u aktivaciji i agregaciji trombocita dovela je pokušaja sintetiziranja njihovih direktnih inhibitora. Naime, primjećeno je da se za te receptore veže fibrinogen međusobno agregirajući trombocite, te da je upravo taj korak ključan za primarnu hemostazu neovisno o tome kojim je putem ili agonistom aktivacija trombocita potaknuta. Kako još uvijek nije sintetiziran peroralni pripravak koji bi bio siguran za bolesnike, danas se u rutinskoj kliničkoj primjeni koriste intravenski lijekovi abciximab, tirofiban i eptifibatid. Upravo zbog inhibiranja konačnog zajedničkog puta primarne hemostaze, inhibitori GP IIb-IIIa receptora predstavljaju

najsnažniju, ali time i skupinu lijekova s najvećim brojem komplikacija vezanih uz krvarenje (Michelson i sur., 2013.).

Osnovni problemi vezani uz primjenu klasičnih peroralnih antiagregacijskih lijekova su otpornost na terapiju i povećana sklonost krvarenju (Kolandaivelu i sur., 2011.). Otpornost na terapiju objašnjava se individualnom biološkom varijabilnošću u odgovoru na pojedine lijekove (Ben-Dor i sur., 2009.; Kasotakis i sur., 2009.; Garabedian i sur., 2013.), a dovodi do povećane incidencije razvoja ishemijskih događaja (Bollati i sur., 2011.). U tom slučaju se pribjegava kombiniranju lijekova različitih mehanizama djelovanja, kako bi se njihovim sinergističkim djelovanjem postigao odgovarajući učinak (engl. *dual antiaggregation therapy*, DAT) (Bhatt i sur., 2007.; Hallas i sur., 2006.). Zadovoljavajući antiagregacijski učinak lijekova dovodi, s druge strane, do povećanog rizika od pojave krvarenja. Taj rizik je veći kod kombinirane nego kod monoterapije. Ireverzibilna blokada trombocita ovim lijekovima nerijetko uzrokuje problem u kliničkoj praksi u smislu krvarenja (Gresele i sur., 2011.; Daniel i sur., 2002.).

## 2.7. Impendancijska agregometrija

Ispitivanje funkcije trombocita započelo je ubrzo nakon što su oni definirani kao zasebne cirkulirajuće stanice s važnom ulogom u hemostazi i trombozi. Unatoč ranim opažanjima, istraživačima su tijekom većeg dijela 20. stoljeća na raspolaganju bili malobrojni i razmjerno nepouzdati testovi, kao što su ručno brojenje trombocita, inspekcija perifernog razmaza ili određivanje vremena krvarenja.

Mogućnost ispitivanja trombocita u laboratorijskim uvjetima znatno je unaprijeđena 1962. godine uvođenjem optičke agregometrije, takozvane Bornove metode, iz uzorka trombocitima bogate plazme (eng. *platelet rich plasma*, PRP), koja se i dalje smatra zlatnim standardom (Born 1962.).

Jedan od najvećih problema prilikom ispitivanja funkcije trombocita predstavlja njihova izrazita osjetljivost na svaki mehanički ili kemijski podražaj i posljedična podložnost neželjenoj aktivaciji prilikom rukovanja uzorkom. Cardinal i Flower su 1980. godine opisali električnu impendancijsku metodu agregometrije iz uzorka pune krvi (eng. *whole blood aggregometry*, WBA), čiji se koncept temelji na činjenici da trombociti po aktivaciji prijanjaju na elektrode uzrokujući među njima porast impendancije koji se može mjeriti. Velika je prednost ove metode što se funkcija trombocita procijenjuje u uzorku pune krvi gdje nema potrebe za posebnom pripremom uzorka (npr. centrifugiranja), što znači manju mogućnost neželjene aktivacije i preuranjenog iscrpljivanja trombocita. Također, trombociti se ispituju u okružju sličnijem onom fiziološkom, gdje im je omogućena interakcija sa eritrocitima, leukocitima i fibrinogenom (Cardinal i sur., 1980.).

Na tim temeljima proizveden je 2005. godine Multiplate® analyser uređaj, čiji je detaljan opis metode ubrzo i objavljen (Toth 2006.). Korišten je u brojnim istraživanjima trombocita, kako humanih tako i mnogih životinjskih vrsta, uključivo štakora (Defontis i sur., 2013.; Kirkeby i sur., 2008.; Dobaczewski i sur., 2008.).

Prilikom agregacije u fiziološkim uvjetima, više aktivatora djeluje istovremeno sinergistički na različite receptore trombocita (Jackson i sur., 2007.). Jedna od prednosti u ovom istraživanju primijenjene metode jest da se agonisti mogu koristiti zasebno kako bi se detektirali specifični mehanizmi aktivacije. Za *in vitro* testiranje obično se koriste pojedinačno adenozin difosfat, arahidonska kiselina, prostaglandin E1, kolagen ili trombin.

ADP je važan fiziološki agonist kojeg otpuštaju trombociti i eritrociti, a djeluje preko P2Y12 i P2Y1 receptora. Njegovo djelovanje je oslabljeno u prisutnosti inhibitora P2Y12 receptora pa se koristi za ispitivanje djelovanja klopidozola (Packham i sur., 2002.).

Arahidonska kiselina se enzimatskom reakcijom COX sustava pretvara u tromboksan A2 koji tada djeluje preko svojih specifičnih TP receptora na površini trombocita uzrokujući agregaciju. Aktivacija trombocita ovim putem je onemogućena ili oslabljena u prisutnosti COX inhibitora pa se AA koristi kao agonist za ispitivanje djelovanja aspirina na trombocite.

Prostaglandin E1 je inhibitor agregacije trombocita i koristi se u kombinaciji s agonistom AA za ispitivanje funkcije cilostazola na agregaciju trombocita (Satoh i sur., 2012.).

Kolagen je fiziološki agonist koji ima važnu ulogu u adheziji trombocita na subendotelni matriks vežući se za glikoprotein VI i IaIIa integrinske receptore što dovodi do oslobađanja arahidonske kiseline i tromboksana A2 i koristi se za ispitivanje opće, nespecifične agregabilnosti trombocita.

Uređaj (Slika 6) ima pet kanala za istovremeno određivanje aktivnosti trombocita, u koje se postavljaju posudice namijenjene za jednokratna mjerenja. Posudice sadrže dva para bakrenih elektroda obloženih srebrom i teflonski elektromagnet koji miješa uzorak levitirajući u magnetskom polju brzinom od 800 rotacija po minuti. Dva para elektroda služe jedan drugome kao kontrola, a odstupanje za više od 20% u izmjerenim vrijednostima između njih govori da je dobiveni rezultat nepouzdan, uz preporuku ponavljanja istoga. Trombociti se, agitirani stalnim levitiranjem elektromagneta i ciljano stimulirani određenim agonistom, aktiviraju i lijepe na parove elektroda što povećava električnu impedanciju između njih.



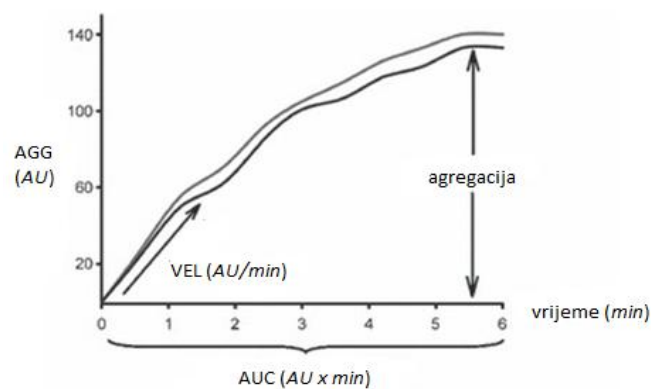
Slika 6. Multiplate analyser uređaj za mjerenje impedancijske agregometrije (ustupljeno ljubaznošću tvrtke Dynabyte Medical, Njemačka).

Taj porast impedancije se kontinuirano mjeri kroz 6 minuta i prikazuje grafički na ekranu (Slika 7). Vrijednosti koje se računaju iz dobivene krivulje su:

(1) maksimalna postignuta visina agregacije (eng. *aggregation*, **AGG**), koja je određena najvećom promjenom električne impedancije između elektroda, a izražava se u arbitrarnim agregacijskim jedinicama (eng. *aggregation units* - AU),

(2) maksimalna brzina agregacije (eng. *velocity*, **VEL**), koja je određena najvećim nagibom krivulje, a mjeri se u agregacijskim jedinicama po minuti (AU/min), i

(3) površina ispod krivulje (eng. *area under curve*, **AUC**), koja je određena visinom krivulje i njezinim nagibom, a izražava se kao jedinica (eng. *unit* - U,  $1U = AU \times \text{min}$ ) i općenito se smatra najpouzdanijim pokazateljem opće agregabilnosti trombocita.



Slika 7: Tipičan izgled krivulje agregometrije koja prikazuje agregaciju kroz 6 minuta (modificirano iz: Pape i sur., 2010.).

## 2.8. Rotacijska tromboelastometrija

Hemostaza zahtijeva zajedničko djelovanje aktiviranih trombocita pri formiranju inicijalnog trombotičnog ugruška i koagulacijske kaskade kojom se proces dalje propagira rezultirajući stvaranjem stabilnog krvnog ugruška. Tradicionalno, sposobnost krvi da koagulira procijenjujemo konvencionalnim laboratorijskim testovima kao što su broj i funkcija trombocita, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV), protrombinsko vrijeme (PV), trombinsko vrijeme, koncentracija fibrinogena i njegovih razgradnih produkata, D-dimera. Nažalost, ove metode nam pružaju samo mogućnost izoliranog testiranja pojedinih dijelova koagulacijskog sustava i u konačnici ne daju uvid u zajedničko djelovanje svih sastavnica sustava zgrušavanja (Thakur i sur., 2012.).

Klasičnu tromboelastografiju za određivanje elasticiteta krvnog ugruška i globalnu procjenu kinetike i kvalitete njegovog nastajanja, razvio je Hellmut Hartert kako bi prevladao ograničenost do tada dostupnih pojedinačnih laboratorijskih testova (Hartert i sur., 1948.).

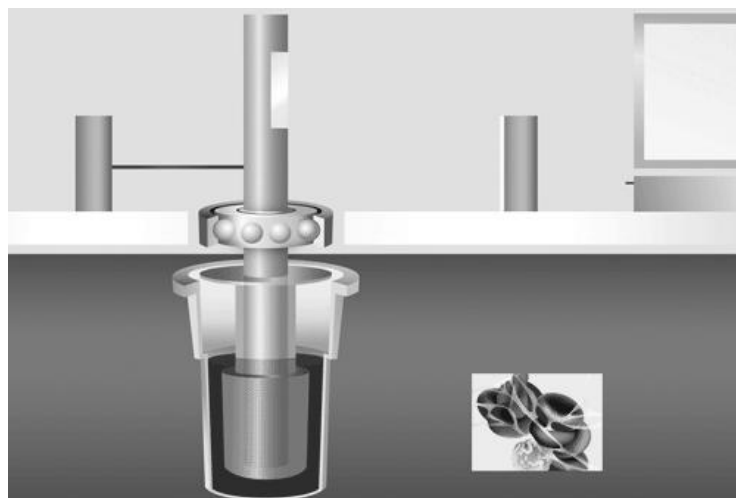
Metodu rotacijske tromboelastometrije, temeljenu na načelima tromboelastografije, predstavio je Franz 2009. godine (Franz i sur., 2009.). Od tada se uspješno koristi u istraživanjima elasticiteta krvnog ugruška provedenih na štakorima (Wohlauer i sur., 2011.; Siller-Matula i sur., 2008.; Kol i sur., 2010.) i mnogim drugim životinjama te u kliničkoj praksi s ljudima.



Slika 8. ROTEM tromboelastometrijski uređaj za mjerenje viskoelastičnih svojstava krvnog ugruška (ustupljeno ljubaznošću tvrtke Tem International GmbH, Njemačka).

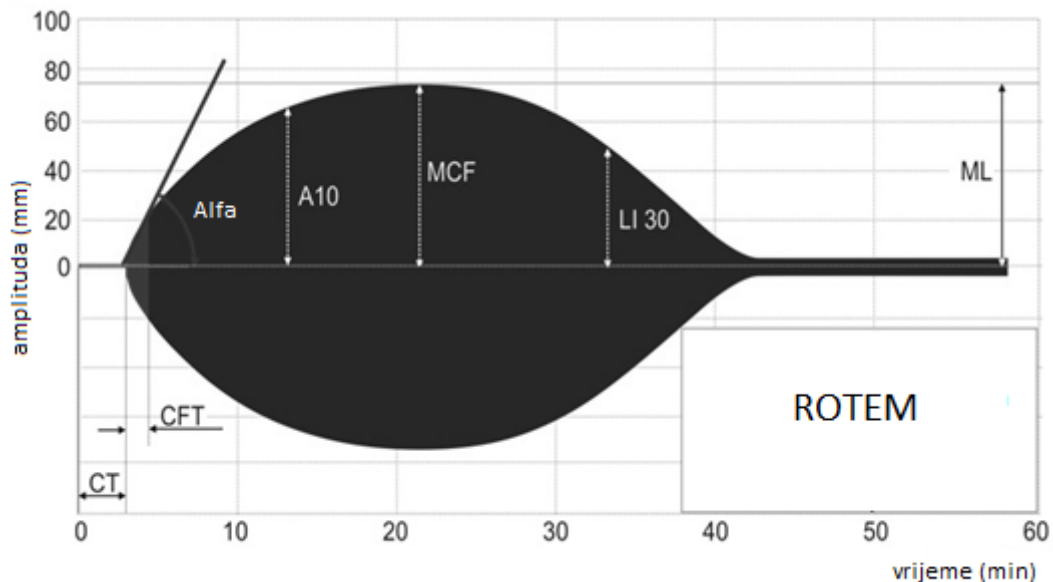
Viskoelastična svojstva krvnog ugruška prikazuju se kontinuiranim grafičkim ispisom na monitoru koji prati stvaranje i razgradnju ugruška kroz 60 minuta.

Uređaj (Slika 8) ima 4 kanala za istovremena mjerenja. Na pojedini kanal se magnetski fiksira jednokratna posudica u koju se prethodno stavi ispitivani uzorak pune krvi, rekalificiran i pomiješan sa odabranim pokretačem koagulacije. Po sredini posudice, udaljen 1 mm od njezinih zidova, postavljen je termoregulirani klipčić učvršćen na kontinuirano oscilirajuću vertikalnu osovinu. Osovina je učvršćena na ležajevima koji osiguravaju kretanje klipčića amplitudom od  $4.75^\circ$  po vertikalnoj osi, frekvencijom od 12 rotacija po minuti. Optički sistem mjeri pokrete vertikalne osovine i na nju pričvršćenog klipčića. Metoda tromboelastometrije temelji se na činjenici da pokretanje osovine, dakle i klipčića uronjenog u ispitivani uzorak krvi, nije ograničeno sve dok je krv u tekućem stanju. Suprotno, kada dolazi do stvaranja ugruška koji prijanja na površinu klipčića sve se više ograničava amplituda oscilacije vertikalne osovine (Slika 9).



Slika 9. Formiranje ugruška u posudici smanjuje amplitudu oscilacija klipčića (ustupljeno ljubaznošću tvrtke Tem International GmbH, Njemačka)

Smanjivanje amplitude oscilacije vertikalne osi koje je posljedica stvaranja krvnog ugruška prikazuje se grafički na monitoru kroz vrijeme od 60 minuta, u obliku tipične tromboelastometrijske krivulje.



Slika 10. Prikaz krivulje i parametara dobivenih tromboelastometrijom (ustupljeno ljubaznošću tvrtke Tem International GmbH, Njemačka).

Slijedi definicija parametara rotacijske tromboelastometrije koji se računaju i numerički prikazuju iz dobivene krivulje (Slika 10):

(1) Vrijeme zgrušavanja (engl. *clotting time*, CT) izražava se u sekundama, a na tromboelastogramu predstavlja vrijeme koje je potrebno da ugrušak dosegne čvrstoću koja odgovara amplitudi širine 2 mm. On ovisi o aktivnosti koagulacijskih faktora i eventualnoj prisutnosti heparina. Skraćeno CT vrijeme nam govori za hiperkoagulabilno, a produženo za hipokoagulabilno stanje.

(2) Vrijeme do stvaranja stabilnog ugruška (eng. *clot formation time*, CFT) je vrijeme potrebno da tromboelastogram dosegne amplitudu širine 20 mm. CFT parametar se izražava u



sekundama, a koristan je za procjenu brzine stvaranja krvnog ugruška. Ovisi o aktivnosti koagulacijskih faktora, funkciji i broju trombocita, te fibrinogenu.

(3) Alfa kut (eng. *alpha angle*) nam također govori o kinetici stvaranja ugruška, a izražava se u stupnjevima. Definiran je kao kut između nulte ravnine i tangente koja prolazi kroz krivulju u točki gdje je ona dosegla širinu od 20 mm. Slično kao i CFT, pokazatelj je brzine stvaranja ugruška, a ovisi o istim parametrima.

(4) Maksimalna čvrstoća ugruška (eng. *maximum clot firmness*, MCF) najvažniji je parametar dobiven ovom metodom, a izražava se u milimetrima. Na krivulji tromboelastograma predstavlja najveći postignuti odmak od nulte linije u vremenu od 60 minuta. Govori o mehaničkoj čvrstoći nastalog ugruška i ovisi ponajviše o broju i funkciji trombocita, koncentraciji i sposobnosti polimerizacije fibrina te aktivnosti faktora XIII.

(5) Indeks trombolize (eng. *lysis index at 30 min*, LI 30) parametar je koji nam govori o procesu razgradnje ugruška i predstavlja stupanj smanjenja čvrstoće ugruška nakon 30 minuta, a izražava se u postocima. Predstavlja postotak izgubljene čvrstoće ugruška u odnosu na najvišu postignutu MCF vrijednost nakon 30 minuta. Daje vrijedne informacije o aktivnosti fibrinolitičkih enzima, inhibitora fibrinolize i faktora XIII.

(6) Indeks maksimalne trombolize (eng. *maximal lysis*, ML) se izražava u postocima i prikazuje maksimalnu trombolizu kao omjer amplitude ugruška u fazi najmanje čvrstoće te maksimalno ostvarene vrijednosti čvrstoće ugruška.

Ova metoda omogućava da se sam proces koagulacije potakne odvojeno preko vanjskog ili unutarnjeg puta pomoću različitih agonista:

EXTEM test za aktiviranje vanjskog puta zgrušavanja nakon rekalcifikacije koristi tkivni faktor. Inicijalna produkcija trombina ovisna je o aktivnosti faktora uključenih u vanjski put zgrušavanja (VII, X, V, II). Daljnji razvoj ugruška ovisi o doprinosu trombocita, procesu polimerizacije fibrina, aktivnosti fXIII te fibrinolizi. Nedostatak mu je slaba osjetljivost na učinak antiagregacijskih i antikoagulacijskih lijekova.

INTEM test kao aktivator unutarnjeg puta zgrušavanja nakon rekalcifikacije koristi elagičnu kiselinu. Početak stvaranja ugruška ovisi o koagulacijskim faktorima XII, XI, IX, VIII, X, V, II i fibrinogenu. Maksimalna čvrstoća nastalog ugruška rezultat je funkcije trombocita te fibrinogena. Ograničenje u praksi mu je slaba osjetljivost na poremećaje funkcije trombocita bilo kojeg uzroka, uključivo antiagregacijske terapije.

FIBTEM test je zapravo modifikacija EXTEM testa. Proces koagulacije aktivira se nakon rekalcifikacije preko vanjskog puta zgrušavanja, a ispitivanom uzorku se istovremeno dodaje citohalazin D. On ima svrhu inhibiranja aktivacije i promjene oblika trombocita, a time i ekspresije i aktivacije GP IIb/IIIa receptora. Čvrstoća ugruška ovdje ovisi samo o koncentraciji i sposobnosti polimerizacije fibrina, bez doprinosa trombocita.

## 2.9. BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 otkriven je u želučanom soku i ubrzo je potvrđeno da ima važnu funkciju u zaštiti sluznice tog organa kao i u antiulkusnoj protekciji cijelog gastrointestinalnog trakta.

Kemijskom analizom je utvrđeno da se aktivna komponenta molekularne težine 1419 sastoji od niza 15 aminokiselina (Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val), te da je lako topljiva u vodi i fiziološkoj otopini. Inkubacija u želučanom soku i vodi ne dovodi do razgradnje molekule niti nakon 24 sata, što govori u prilog njezine izuzetne stabilnosti koja omogućava dugotrajno korisno djelovanje (Sikiric i sur., 1993.).

U dosadašnjim ispitivanjima na različitim životinjskim modelima apliciran je uvijek peptid čistoće 99% bez posebnog nosača. Nije bilo moguće utvrditi letalnu dozu 1, niti su dokazane bilo kakve nuspojave prilikom administracije visokih doza. U brojnim pokusima opetovano je pokazivao djelotvornost čak i pri vrlo niskim (nanogramskim i mikrogramskim) dozama. Također, njegov pozitivan učinak bilo je moguće ostvariti nakon intraperitonealne, intragastrične, intravenske, topičke ili lokalne primjene.

Pentadekapeptid BPC 157 u provedenim pokusima nije pokazao značajno djelovanje na različite organske sustave i vrijednosti izmjerenih parametara kojima pratimo njihovu funkciju, primjerice krvni tlak, srčanu frekvenciju, temperaturu, diurezu ili koagulabilnost, u uvjetima bez otklona od homeostaze. S druge strane, u stanjima kada postoji poremećaj homeostaze, apliciranje BPC-a 157 ispitivanim životinjama dovodi do značajnog oporavka i normalizacije ispitivanih parametara (Sikiric i sur., 2014.; Sikiric i sur., 1993.; Sikiric i sur., 1999a.; Sikiric i sur., 1994.; Sikiric i sur., 1996a.; Jelovac i sur., 1998.; Turkovic i sur., 2004.). Predložena je teorija da pentadekapeptid BPC 157 svoju ulogu u održavanju homeostaze u organizmu ostvaruje kao jedan od medijatora Robertove citoprotekcije (Sikiric i sur., 2010.).

Provedena istraživanja na eksperimentalnim životinjskim modelima su dokazala da BPC 157 djeluje protektivno na mnoge organske sustave sprječavajući ili smanjujući nepovoljna djelovanja izazvana različitim mehanizmima.

Tako, pokusi provedeni u svrhu ispitivanja djelovanja ovog peptida na razvoj želučanih lezija štakora (Sikiric i sur., 1994.) i pilića (Grabarevic i sur., 1997.) pokazali su da BPC 157 ima vrlo snažnu sposobnost gastroprotekcije (Sikiric i sur., 1994.; Sikiric i sur., 1996a.; Sandor i sur., 1997.; Sikiric i sur., 1996b.), dok u modelu izazivanja upale debelog crijeva ima zaštitni učinak na sluznicu kolona (Veljaca i sur., 1994.) gdje smanjuje eksudaciju posrednika upale (leukotrijena B4, tromboksana B2 te mijeloperoksidaze) (Seiwerth i sur., 1997.; Veljaca i sur., 1995.). U modelu kratkog crijeva, životinje tretirane BPC-om 157 pokazivale su na histološkom preparatu očuvanje dubine kripti, visine crijevnih resica kao i održanje debljine muskularnog sloja crijeva, što je konačno dovelo i do kliničkog oporavka funkcije gastrointestinalnog trakta (Sever i sur., 2009.).

U eksperimentalnim modelima oštećenja jetre paracetamolom i diklofenakom, ispitivani peptid BPC 157 je učinkovito reducirao oštećenje jetrenog parenhima (Ilic i sur., 2011.; Ilic i sur., 2010.), dok je u modelima akutnog i kroničnog oštećenja jetre i želučane sluznice uzrokovanog etanolom djelovao protektivno i ubrzavao njihov oporavak (Boban-Blagaic i sur., 2006.).

BPC 157 pokazuje i antioksidativna svojstva, te djeluje neuroprotektivno uspješno smanjujući stupanj nastalih moždanih oštećenja izazvanih nepovoljnim djelovanjem slobodnih radikala u modelima toksičnosti diklofenakom i paracetamolom (Ilic i sur., 2011.; Ilic i sur., 2010.). Također, pozitivno utječe i na poremećaje funkcije dopaminskog i serotoniniskog sustava u mozgu (Sikiric i sur., 1999b.; Jelovac i sur., 1999a.; Tohyama i sur., 2004.).

Da BPC-a 157 ima povoljno djelovanje u održavanju homeostaze kardiovaskularnog sustava dokazano je u nekoliko pokusa (Sikiric i sur., 1997a.; Lovric- Bencic i sur., 2004.; Balenovic i sur., 2009.; Barisic i sur., 2013.; Tohyama i sur., 2004.).

Za ispitivanje antiaritmičkog učinka BPC-a 157 korišten je model kalijem uzrokovanih poremećaja srčanog ritma. Dokazano je da profilaktička i terapijska primjena BPC-a 157 nakon aplikacije visoke doze otopine kalijevog klorida, kao i nakon izazivanja hipokalijemije primjenom visokih doza diuretika dovodi do sprječavanja pojave ili do skraćivanja vremena

trajanja specifičnih elektrokardiografskih promjena i aritmija izazvanih hiper- odnosno hipokalijemijom (Barisic i sur., 2013.).

Ispitujući djelovanje BPC-a 157 na toksičnost metildigoksina pokazalo se da se ovako izazvane aritmije mogu spriječiti i reducirati. Naime, primjenjen profilaktički ili terapijski, BPC 157 smanjuje broj ventrikularnih ekstrasistola, značajno produžuje vrijeme do pojave te reducira vrijeme trajanja ventrikularne fibrilacije i potpunog AV bloka (Balenovic i sur., 2009.).

Na modelu globalnog ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja miokarda zamoraca pokazao je svoje antiaritmčko djelovanje značajno smanjujući učestalost nastanka i trajanja ventrikularne fibrilacije i AV bloka, te produžujući trajanje stabilnog sinusnog ritma nakon nastanka reperfuzijske ozljede (Bosnjak i sur., 1994.).

Osim protektivnog i terapijskog učinka na pojavu aritmija BPC 157 ima povoljno djelovanje na poremećaje u vrijednostima arterijskog tlaka. Iako nije pokazao utjecaj na izmjerene bazalne vrijednosti u normalnih životinja, svoje je djelovanje očitovao u oporavku hipertenzije nakon primjene N-nitro-L-arginin metil-estera (L-NAME), hipotenzije nakon primjene L-arginina (Sikiric i sur., 1997a.), te hipotenzije izazvane hipovolemijom (Sikiric i sur., 1993.). Također, dokazan je terapijski učinak na oštećenja plućne vaskulature i desne strane srca uzrokovane plućnom hipertenzijom nakon primjene L-NAME ili pak uzrokovane plućnom hiperemijom nakon primjene L-arginina (Grabarevic i sur., 1997.).

Da bi ispitao eventualni utjecaj BPC-a 157 na veličinu ishemijske ozljede miokarda štakora uzrokovane izoprenalinom, Barišić je dizajnirao studiju koja je promatrala dinamiku porasta troponina T, pojavu standardnih ishemijskih pokazatelja na EKG-u kao i promjene na histološkom preparatu. Životinje tretirane BPC-om 157 imale su statistički značajno niže vrijednosti troponina T, manje otklona u EKG-u i manje histoloških promjena koje govore za ishemijsku ozljedu srčanog mišića (Barisic i sur., 2009.).

Na životinjskom modelu doksirubicinom uzrokovanog zatajenja srca primjena BPC-a 157 je dovela do značajnog pada vrijednosti big-endotelina 1 koji je određivan kao pokazatelj stupnja srčane insuficijencije. Nadalje, BPC 157 je doveo do jasnog povlačenja kliničkih

znakova srčane dekompenzacije kao što su tahikardija, hipotenzija ili tahipneja, za razliku od blokatora angiotenzinskih i kalcijevih receptora kojima su bile tretirane druge grupe životinja (Lovric-Bencic i sur., 2004.).

Pentadekapeptid BPC 157 ima dokazano specifično djelovanje i na koagulacijski sustav. U istraživanju koje su proveli Hrelec i suradnici pentadekapeptid BPC 157 je bio djelotvoran u prevenciji nastanka okluzivnog tromba i razgradnji već stvorenog ugruška nakon formiranja termino-terminalne anastomoze nakon transekcije abdominalne aorte. U tom ispitivanju BPC 157 je apliciran lokalno odmah po kreiranju anastomoze, te intraperitonealno nakon 24 sata. Zahvaljujući inhibicijskom djelovanju peptida na razvoj ugruška i ubrzanju trombolizi, tretirane su životinje nakon 24 sata pokazivale bolju aktivnost zadnjih udova sa mišićnom snagom komparabilnom onoj prije zahvata na aorti, u usporedbi s netretiranim štakorima (Hrelec i sur., 2009.).

S druge strane, rezultati istraživanja koje je provela Stupnišek pokazuju da nakon amputacije repa životinje tretirane acetylaslicilnom kiselinom, heparinom i varfarinom imaju skraćeno vrijeme krvarenja, iskrvare manji volumen krvi, te da imaju manju učestalost nastanka trombocitopenije ako im se intraperitonealno ili intravenski aplicira BPC 157. U istom istraživanju je dokazano da peptid nema utjecaja na druge parametre koje uobičajeno koristimo kada želimo procjeniti funkciju pojedinih sastavnica sustava zgrušavanja, a to su aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV), protrombinsko vrijeme (PV), koncentraciju fibrinogena, anti Xa aktivnost ili hematokrit (Stupnišek i sur., 2012.) Ista grupa autora je ispitala i utjecaj BPC-a 157 na djelovanje L-NAME i L-arginina u sličnom modelu. Kod normalnih štakora L-NAME je smanjivao vrijeme krvarenja, a L-arginin ga je produžavao. Životinje tretirane BPC-om 157 pokazivale su značajno skraćivanje vremena krvarenja i smanjivanje iskrvarenog volumena krvi kod L-argininske skupine i dodatno skraćivanje spomenutih parametara kod L-NAME skupine u usporedbi s netretiranim štakorima (Stupnišek i sur., 2015.).

Mehanizmi preko kojih pentadekapeptid BPC 157 ostvaruje svoje organoprotektivno djelovanje nisu do kraja razjašnjeni. Ispitivanja su pokazala da postoji složeno međudjelovanje s dopaminergičkim, adrenergičkim i serotoninским sustavima (Sikiric i sur., 1997c.; Tohyama i sur., 2004.). Smatra se da povoljni učinak na cijeljenje barem djelomice

ostvaruje pojačanom ekspresijom erg-1 gena i nab-2 proteina što ima za posljedicu poticanje lučenja citokina i faktora rasta, a time i ubrzano stvaranje kolagena (Tkalcevic i sur., 2007.).

Također, moguće je da su neki od njegovih blagotvornih učinaka posredovani međudjelovanjem sa sustavom dušičnog oksida. Naime, u mnogim je pokusima dokazano da BPC 157 modulira sustav dušičnog oksida potičući njegovu sintezu. Taj učinak ostvaruje prvenstveno uspješno se suprotstavljajući blokadi NOS primjenom L-NAME, i to mehanizmom koji nadilazi agonistički utjecaj L-arginina. Također, uspješno antagonizira nepovoljno djelovanje L-arginina. (Grabarevic i sur., 1997.; Sikiric i sur., 1997a.; Boban-Bлагаic i sur., 2006.; Lovric-Bencic i sur., 2004.; Klicek i sur., 2008.; Cesarec i sur., 2013.; Balenovic i sur., 2009.; Barisic i sur., 2013.; Sikiric i sur., 2014.).

### 3. MATERIJALI I METODE

Prije početka istraživanja dobivena je suglasnost Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1. Životinje

Istraživanje je obuhvatilo 60 mužjaka Wistar bijelih štakora težine 200-250 g iz uzgoja Zavoda za farmakologiju Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su držane u uobičajenim metalnim kavezima, po četiri jedinke u svakom, uz neograničenu aktivnost. Bile su izložene 12-satnim naizmjeničnim periodima svjetla i tame, te standardnim kontroliranim laboratorijskim klimatskim uvjetima koji su održavali temperaturu od 22-24°C i vlažnost od 30-60%. Pristup vodi i peletiranoj hrani bio je *ad libitum*.

#### 3.2. Lijekovi

Tijekom istraživanja korišteni su:

##### Antiagregacijski lijekovi

1. acetilsalicilna kiselina (pripravak Andol, tbl. od 100 mg, proizvođač Pliva, Hrvatska),
2. klopidogrel (pripravak Zyllt, tbl. od 75 mg, proizvođač Krka, Hrvatska),
3. cilostazol (pripravak Pletal, tbl. od 50 mg, proizvođač Otsuka Pharmaceutical Ltd., VB).

**BPC 157** (GEPPPGKPADDAGLV, molekularne težine 1419.53552 g/mol, proizvođač Diagen, Slovenija).

**ODQ** (1H-[1,2,4] oksadiazol [4,3-a] kvinoksalin-1-1, Janssen, Belgija).

##### Anestetici

1. ketamin (pripravak Ketanest, 25 mg/ml, proizvođač Parke Davis GmbH, Njemačka),
2. diazepam (pripravak Normabel, 10 mg/ml, proizvođač Belupo, Hrvatska).



### **3.3. Uređaji i pripadajući reagensi**

#### *3.3.1 Agregacija trombocita*

Agregacija trombocita određivana je metodom impendancijske agregometrije na Multiplate® analyzer uređaju (Dynabyte Medical, Njemačka).

Reagensi korišteni za aktivaciju agregacije trombocita su:

1. adenzin-difosfat (ADP test, Dynabyte Medical, Njemačka),
2. arahidonska kiselina (ASPI test, Dynabyte Medical, Njemačka),
3. prostaglandin E1 (Prostaglandin E1 test, Dynabyte Medical, Njemačka),
4. kolagen (COL test, Dynabyte Medical, Njemačka).

#### *3.3.2. Viskoelastična svojstva krvnog ugruška*

Viskoelastična svojstva krvnog ugruška određivana su metodom rotacijske tromboelastometrije na ROTEM® delta uređaju (Tem International GmbH, Njemačka).

Za rekalcifikaciju uzorka krvi korišten je CaCl<sub>2</sub> (starTEM, TEM International GmbH, Njemačka).

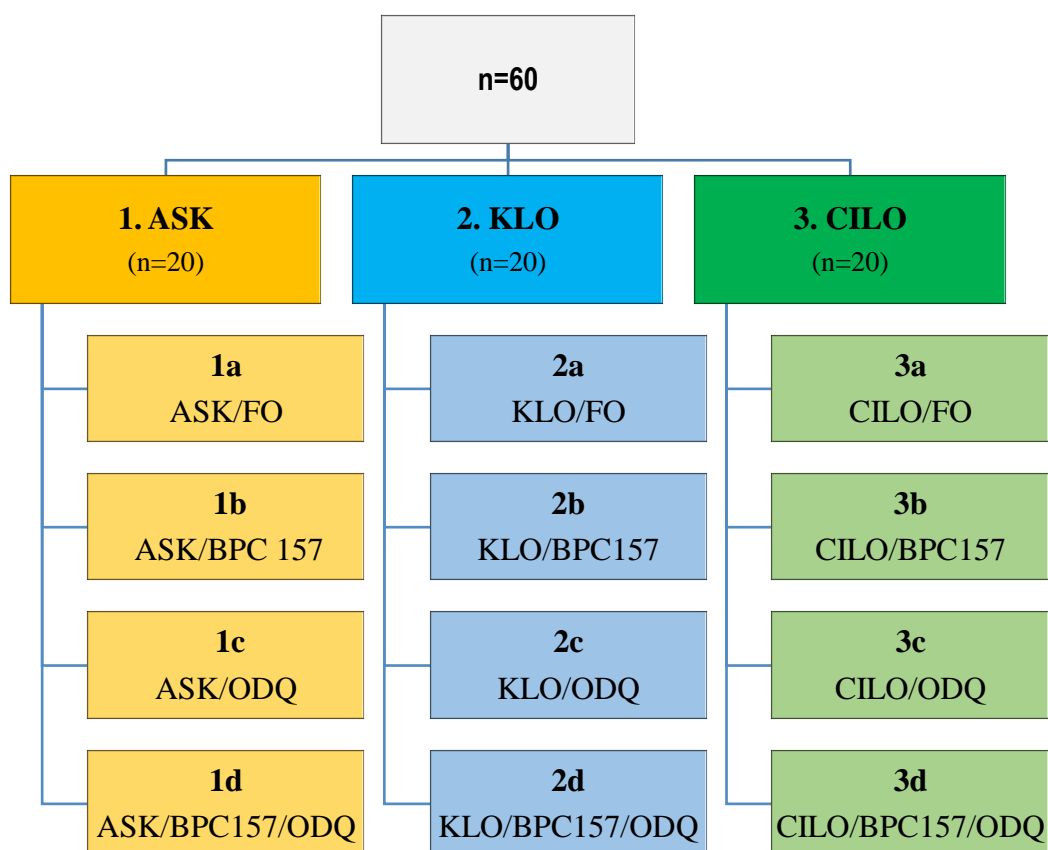
Reagensi korišteni za pokretanje sustava zgrušavanja su:

1. tkivni faktor (EXTEM, TEM International GmbH, Njemačka),
2. elagična kiselina (INTEM, TEM International GmbH, Njemačka),
3. citohalazin D (FIBTEM, TEM International GmbH, Njemačka).

### 3.4. Skupine i protokol primjene lijekova

Nakon vaganja životinje (n = 60) su nasumično podjeljene u 3 skupine od po 20 jedinki ovisno o tome koji će antiagregacijski lijek primati, pa je tako skupina 1 primala aspirin (ASK), skupina 2 klopidogetrel (KLO), a skupina 3 cilostazol (CILO).

Svaka je skupina nadalje nasumično podijeljena u 4 podskupine od po 5 životinja, od kojih je podskupina **a** bila kontrolna i primala je fiziološku otopinu, podskupina **b** je primala BPC 157, podskupina **c** je primala ODQ, podskupina **d** je primala BPC 157 i ODQ (Slika 11).



Slika 11. Podjela životinja na skupine i podskupine

Antiagregacijski lijekovi (aspirin, klopidogrel, cilostazol) za skupine 1, 2 i 3 aplicirani su nakon otapanja u fiziološkoj otopini, u dozi od 10 mg/kg, u volumenu od 1 ml, kroz tri uzastopna dana, intragastrički pomoću sonde.

Fiziološka otopina (FO) za kontrolne podskupine **a** aplicirana je u količini od 1 ml, kroz tri uzastopna dana, neposredno po primjeni antiagregacijskog lijeka, intragastrički pomoću sonde.

BPC 157 je apliciran podskupinama **b** i **d** nakon otapanja u fiziološkoj otopini, u dozi od 10 µg/kg, u volumenu od 1 ml, kroz tri uzastopna dana, neposredno po primjeni antiagregacijskog lijeka, intragastrički pomoću sonde.

ODQ je apliciran podskupinama **c** i **d** u dozi od 10 mg/kg, u volumenu od 2 ml, jednokratno, treći dan terapije antiagregacijskim lijekovima, 30 minuta prije žrtvovanja, intraperitonealno pomoću igle od 28 G.

### 3.5. Uzorkovanje krvi

Žrtvovanje je izvršeno 3. dan tretmana antiagregacijskim lijekovima, tri sata po aplikaciji zadnje doze lijeka, a 30 minuta po aplikaciji ODQ-a za **c** i **d** podskupine.

Anestetici ketamin u dozi od 20 mg/kg i diazepam u dozi od 5 mg/kg primijenjeni su intraperitonealno iglom od 28G. Po postizanju adekvatne dubine anestezije, pristupilo se medijalnim rezom u medijastinum životinje i tada se, direktnom punkcijom iglom od 20 G kroz desni atrij, iz donje šuplje vene uzorkovalo:

1. za agregometrijska mjerenja: 2,6 ml krvi u hirudinske epruvete (konačna koncentracija hirudina 25 µg/ml, proizvođač S-Monovete Sarsted), te
2. za rotacijsku tromboelastometriju: 1,8 ml krvi u citratne epruvete (konačni omjer 3,8 % citrata i krvi 1:9, proizvođač Vacuette GBO).

Epruvete su 5 puta lagano okrenute radi optimalnog miješanja krvi i antikoagulansa, a nakon toga odložene na ravnu površinu, na sobnoj temperaturi. Mjerenja su izvršena 30 minuta nakon uzorkovanja.

## 3.6. Mjerenja

### 3.6.1. Impendancijska agregometrija

Princip impedancijske agregometrije detaljnije je obrađen u 1. poglavlju, a ovdje se opisuje sam postupak s uzorkom krvi (Slika 12).

Iz uzorka pune krvi svake životinje ( $n = 60$ ) skupina 1 (ASK), 2 (KLO) i 3 (CILO) izvršeni su testovi procjene agregacije trombocita s 4 različita aktivatora.

Za svaki pojedini test je 300  $\mu$ l krvi iz hirudinske epruvete razrijeđeno s 300  $\mu$ l 0.9% NaCl u za to od proizvođača uređaja predviđenim posudicama. Slijedila je inkubacija na 37°C u trajanju od 180 s, nakon koje su u tako pripremljena četiri uzorka dodavani specifični aktivatori agregacije:

1. u prvi uzorak ADP (20  $\mu$ l, konačne koncentracije 3,25  $\mu$ M),
2. u drugi arahidonska kiselina (20  $\mu$ l, konačne koncentracije 0,25 mM),
3. u treći arahidonska kiselina (20  $\mu$ l, konačne koncentracije 0,25 mM)  
i PGE 1 (20  $\mu$ l, konačne koncentracije 30 nM),
4. u četvrti kolagen (20  $\mu$ l, konačne koncentracije 1,6  $\mu$ g/ml).

Nakon 6 minuta mjerenja zabilježeni su površina ispod krivulje agregacije (AUC), najveća visina (AGG) i brzina (VEL) agregacije.

### 3.6.2. Rotacijska tromboelastometrija

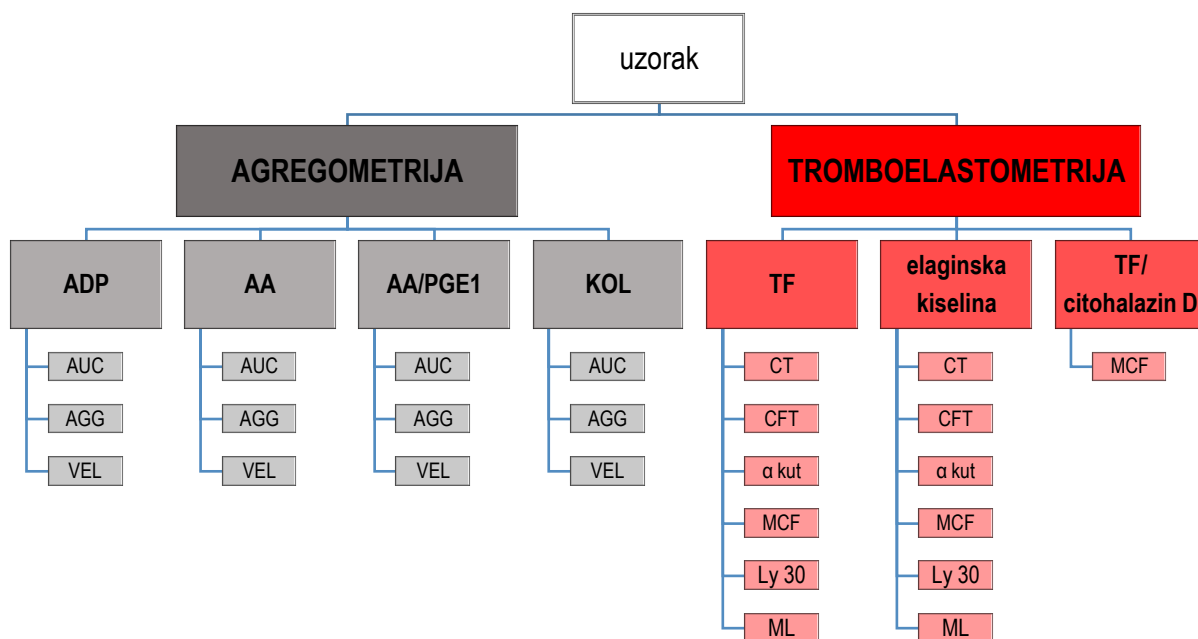
Princip tromboelastometrije detaljnije je obrađen u 1. poglavlju dok se ovdje opisuje sam postupak s uzorkom krvi (Slika 12).

Iz uzorka pune krvi svake životinje ( $n = 40$ ) grupa 2 (KLO) i 3 (CILO) izvršeni su testovi procjene viskoelastičnih svojstva ugruška nastalog preko vanjskog, zatim preko unutarnjeg puta zgrušavanja, te ugruška nastalog bez doprinosa trombocita.

Za svaki pojedini test je 300  $\mu$ l krvi iz citratne epruvete prebačeno u za to od proizvođača uređaja predviđene posudice. Krv se najprije rekalificirala s 20  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (konačne koncentracije 0,2 mol/L) kako bi se poništilo djelovanje 3,8% citrata iz epruvete, a zatim su se u nju dodavali specifični aktivatori zgrušavanja:

1. u prvi uzorak tkivni faktor (20  $\mu$ l),
2. u drugi elagična kiselina (20  $\mu$ l),
3. u treći tkivni faktor i citohalazin D (20 $\mu$ l + 20 $\mu$ l).

Nakon 60 minuta mjerenja zabilježene su CT, CFT, ALFA kut, MCF, LI30, ML vrijednosti.



Slika 12. Shematski prikaz izvršenih mjerenja iz uzorka krvi svake od životinja.

### 3.7. Statistička obrada

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Kolmogorov-Smirnovljev testom analizirana je raspodjela kvantitativnih podataka te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Usporedbe između kvantitativnih vrijednosti analizirane su Kruskal-Wallisovim testom, uz post hoc analizu Mann-Whitney U testom s Bonferronijevom korekcijom kod ispitivanja razine razlika između pojedinih podskupina. Sve značajne razlike grafički su prikazane *Box i Whisker plotovima*. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima.

U analizi se koristila statistička podrška StatsDirect statistical software (<http://www.statsdirect.com>. England: StatsDirect Ltd. 2013) verzija 3.0.171.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati agregometrijskih mjerenja

Ispitivane su razlike u vrijednostima opće agregabilnosti (AUC), maksimalne postignute visine agregacije (AGG) te brzine agregacije trombocita (VEL) među podskupinama nakon aktivacije s ADP-om, arahidonskom kiselinom (AA), arahidonskom kiselinom u kombinaciji s PGE1 (AA-PGE1) i kolagenom (KOL).

Dobivene AUC vrijednosti izražene su u jedinicama U (eng. *unit*, 1U= AU\*min), AGG vrijednosti izražene su u arbitrarnim agregacijskim jedinicama AU (eng. *aggregation unit*), a VEL vrijednosti u AU/min, te su prikazane u tablicama kao minimalna i maksimalna vrijednost, 25. i 75. centila te medijan.

Post hock testiranjem Mann-Whitney testom s Boniferonijevom korekcijom određivani su pojedinačni odnosi među podskupinama, te su one koje su pokazale značajnu različitost ( $P < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale prikazane u tablicama.

Da bismo utvrdili utjecaj BPC-a 157 na mjerene AUC, AGG, VEL vrijednosti uspoređivali smo podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157).

Za ispitivanje utjecaja inhibitora sGC-e ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivali smo podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ).

Parovi **a** i **b**, te **b** i **d** unutar skupina koji su pokazali značajnu međusobnu različitost podebljani su i istaknuti crvenom bojom u tablicama.

Tablica 1. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|         | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|---------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|         |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| ADP AUC | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 52,00 | 61,00 | 54,50   | 57,00   | 60,50 |
|         | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 47,00 | 80,00 | 55,50   | 66,00   | 77,50 |
|         | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 54,00 | 67,00 | 55,25   | 62,00   | 66,50 |
|         | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 55,00 | 71,00 | 56,50   | 65,50   | 70,75 |
|         | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 27,00 | 59,00 | 32,00   | 39,00   | 52,00 |
|         | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 54,00 | 79,00 | 56,00   | 61,00   | 70,00 |
|         | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 15,00 | 36,00 | 15,50   | 24,00   | 31,50 |
|         | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 43,00 | 72,00 | 49,00   | 56,00   | 68,50 |
|         | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 64,00 | 71,00 | 65,00   | 66,00   | 70,50 |
|         | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 60,00 | 77,00 | 64,00   | 72,00   | 75,50 |
|         | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 48,00 | 69,00 | 49,50   | 52,00   | 61,50 |
|         | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 58,00 | 75,00 | 60,50   | 63,00   | 72,50 |

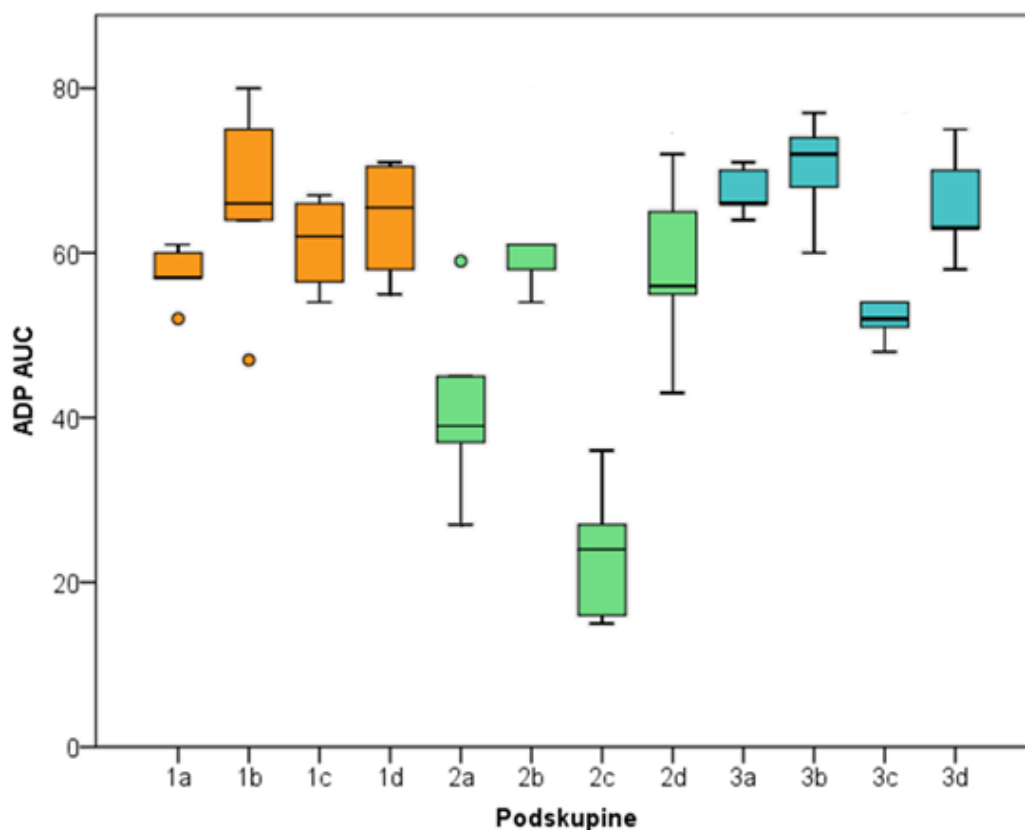
**Kruskal-Wallis test**

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| Vrijednost               | 36,887              |
| Korigirana vrijednost Ht | 36,9445             |
| Df                       | 13                  |
| Razina značajnosti       | <i>P</i> = 0,000423 |

Tablica 2. Post hoc testiranje značajnosti razlika između podskupina obzirom na AUC vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine,  
a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu           |
|--------------------------|---|----------------|---|
|                          |   |                | <i>P</i> < 0,05                                   |
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 25,2           | (2c) (3a) (3b) (3d)                               |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 46,1           | (2a) (2c) (3c)                                    |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 35,3           | (2a) (2c)   |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 42,0           | (2a) (2c) (3c)                                    |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 11,6           | (1b) (1c) (1d) ( <b>2b</b> ) (2d) (3a) (3b) (3d)  |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 35,5           | ( <b>2a</b> ) (2c) (3b)                           |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 3,3            | (1a) (1b) (1c) (1d) (2b) (2d) (3a) (3b) (3c) (3d) |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 31,0           | (2a) (2c) (3a) (3b)                               |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 50,3           | (1a) (2a) (2c) (2d) (3c)                          |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 54,1           | (1a) (2a) (2b) (2c) (2d) (3c)                     |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 22,1           | (1b) (1d) (2c) (3a) (3b) (3d)                     |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 44,2           | (1a) (2a) (2c) (3c)                               |





Slika 13. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AUC vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u AUC vrijednostima nakon aktivacije trombocita ADP-om između ispitivanih podskupina prikazane su u Tablici 1 i 2, te na Slici 13. Značajno veće vrijednosti pronađene su u podskupini **2b** (KLO/BPC 157) u odnosu na podskupinu **2a** (KLO/FO) ( $P = 0,028$ ), što govori za oporavak opće agregacije kod klopidogrelom tretiranih životinja nakon primjene BPC-a 157.

Tablica 3. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

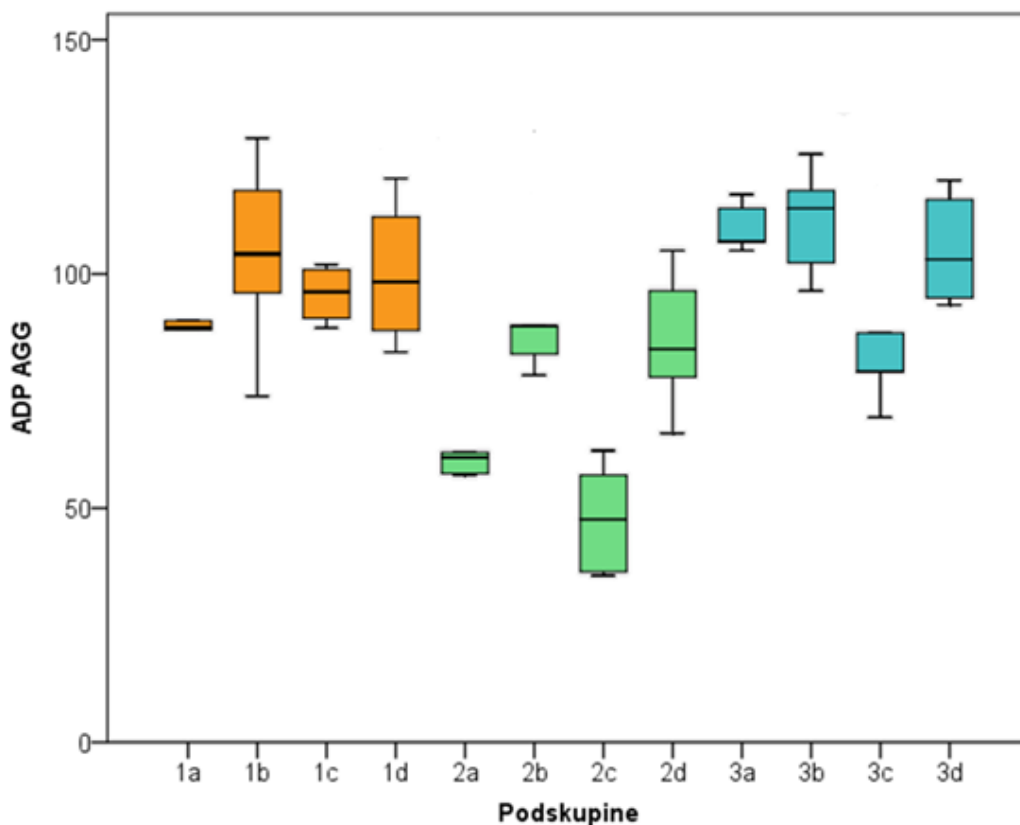
|         | Podskupine               | N | Min    | Max    | Centile |         |        |
|---------|--------------------------|---|--------|--------|---------|---------|--------|
|         |                          |   |        |        | 25.     | Medijan | 75.    |
| ADP AGG | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 82,10  | 98,30  | 85,10   | 88,50   | 94,15  |
|         | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 73,90  | 129,00 | 84,95   | 104,30  | 123,40 |
|         | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 88,50  | 102,00 | 89,53   | 96,20   | 101,45 |
|         | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 83,30  | 120,40 | 85,63   | 98,30   | 116,30 |
|         | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 57,00  | 84,80  | 57,20   | 60,80   | 73,35  |
|         | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 78,40  | 115,50 | 80,65   | 88,90   | 102,20 |
|         | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 35,60  | 62,30  | 36,00   | 47,60   | 59,65  |
|         | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 66,00  | 105,00 | 72,00   | 84,00   | 100,70 |
|         | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 105,00 | 117,00 | 105,95  | 106,90  | 115,50 |
|         | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 96,40  | 125,60 | 99,40   | 114,00  | 121,70 |
|         | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 69,40  | 117,10 | 74,25   | 79,10   | 102,25 |
|         | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 93,40  | 120,00 | 94,15   | 103,10  | 117,95 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| Vrijednost               | 40,5413             |
| Korigirana vrijednost Ht | 40,551              |
| Df                       | 13                  |
| Razina značajnosti       | <i>P</i> = 0,000113 |

Tablica 4. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AGG vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br><i>P</i> < 0,05 |
|--------------------------|---|----------------|--|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 27,9           | (2a) (2c) (3a) (3b) (3d)                                   |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 45,7           | (2a) (2c) (2d) (3c)  |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 36,8           | (2a) (2c)  |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 41,6           | (2a) (2c)  |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 9,5            | (1a) (1b) (1c) (1d) ( <b>2b</b> ) (2d) (3a) (3b) (3d)      |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 29,6           | ( <b>2a</b> ) (2c) (3a) (3b) (3d)                          |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 3,9            | (1a) (1b) (1c) (1d) (2b) (2d) (3a) (3b) (3c) (3d)          |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 26,8           | (1b) (2a) (2c) (3a) (3b) (3d)                              |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 54,8           | (1a) (2a) (2b) (2c) (2d) (3c)                              |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 53,9           | (1a) (2a) (2b) (2c) (2d) (3c)                              |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 25,4           | (1b) (2c) (3a) (3b) (3d)                                   |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 48,2           | (1a) (2a) (2b) (2c) (2d) (3c)                              |



Slika 14. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AGG vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ).

Tablice 3 i 4 te Slika 14 prikazuju razlike u AGG vrijednostima nakon aktivacije ADP-om između ispitivanih podskupina. Podskupina **2b** (KLO/BPC 157) imala je značajno veće izmjerene AGG vrijednosti u odnosu na podskupinu **2a** (KLO/FO) ( $P = 0,028$ ), a to ukazuje na povećanje maksimalno dosegnute visine agregacije nakon primjene BPC-a 157 kod životinja tretiranih klopidogrelom.

Tablica 5. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

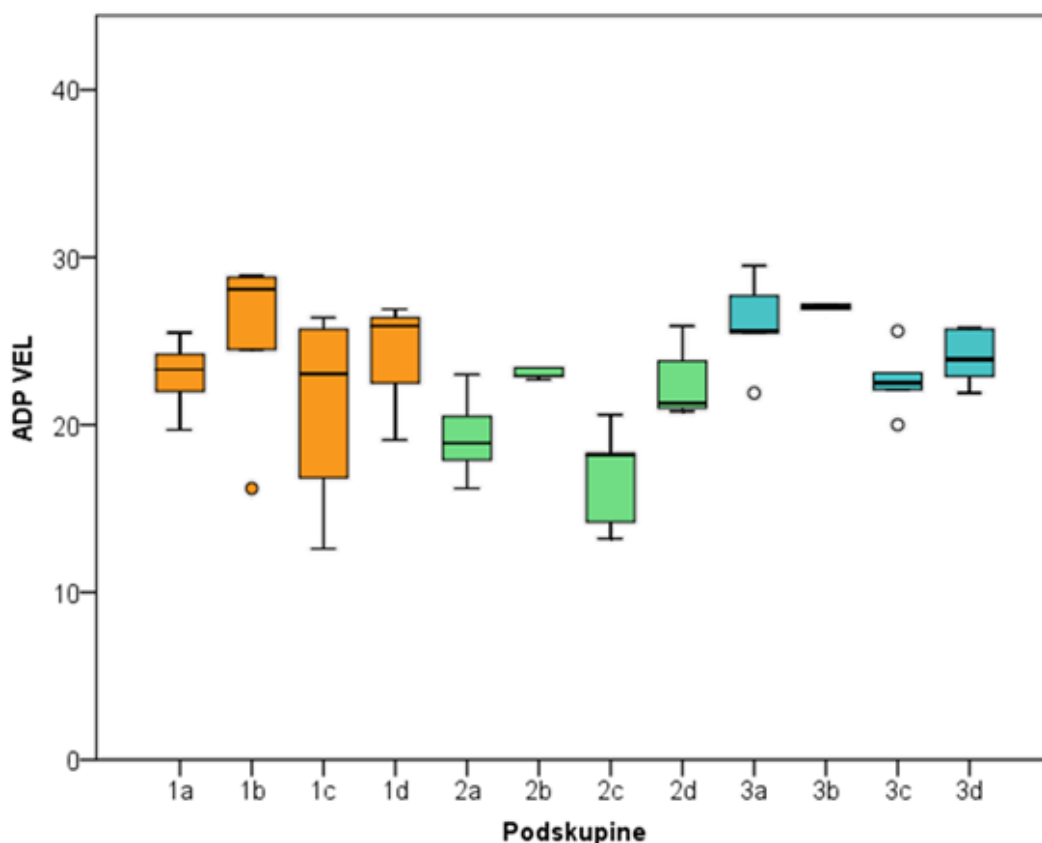
|         | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|---------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|         |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| ADP VEL | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 19,70 | 25,50 | 20,85   | 23,30   | 24,85 |
|         | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 16,20 | 28,90 | 20,35   | 28,10   | 28,85 |
|         | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 12,60 | 26,40 | 14,73   | 23,05   | 26,05 |
|         | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 19,10 | 26,90 | 20,80   | 25,90   | 26,65 |
|         | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 16,20 | 23,00 | 17,05   | 18,90   | 21,75 |
|         | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 22,70 | 27,00 | 22,80   | 22,90   | 25,20 |
|         | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 13,20 | 20,60 | 13,70   | 18,20   | 19,45 |
|         | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 20,80 | 25,90 | 20,90   | 21,30   | 24,85 |
|         | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 21,90 | 29,50 | 23,70   | 25,60   | 28,60 |
|         | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 25,80 | 31,20 | 26,35   | 27,00   | 29,20 |
|         | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 20,00 | 25,60 | 21,05   | 22,50   | 24,35 |
|         | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 21,90 | 25,80 | 22,40   | 23,90   | 25,75 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 37,1902        |
| Korigirana vrijednost Ht | 37,2028        |
| Df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000385$ |

Tablica 6. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na VEL vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$ |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 30,1           | (2c) (3b)   |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 46,9           | (2a) (2c) (2d) (3c)                                   |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 27,8           | (2c) (3a) (3b)  |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 41,4           | (2a) (2c)   |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 13,3           | (1b) (1d) ( <b>2b</b> ) (3a) (3b) (3d)                |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 35,9           | ( <b>2a</b> ) (2c) (3b)                               |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 7,1            | (1a) (1b) (1c) (1d) (2b) (2d) (3a) (3b) (3c) (3d)     |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 27,9           | (1b) (2c) (3a) (3b)                                   |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 47,1           | (1c) (2a) (2c) (2d) (3c)                              |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 56,9           | (1a) (1c) (2a) (2b) (2c) (2d) (3c) (3d)               |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 28,5           | (1b) (2c) (3a)  |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 36,6           | (2a) (2c)   |



Slika 15. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita ADP-om: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AVEL vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u ispitivanim VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina prikazane su u Tablici 5 i 6 te na Slici 15. Značajno veće vrijednosti pronađene su u podskupini **2b** (KLO/BPC 157) u odnosu na podskupinu **2a** (KLO/FO) ( $P = 0,047$ ), što kod ovih podskupina ukazuje na povećanje brzine agregacije nakon aplikacije BPC-a 157.

Tablica 7. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

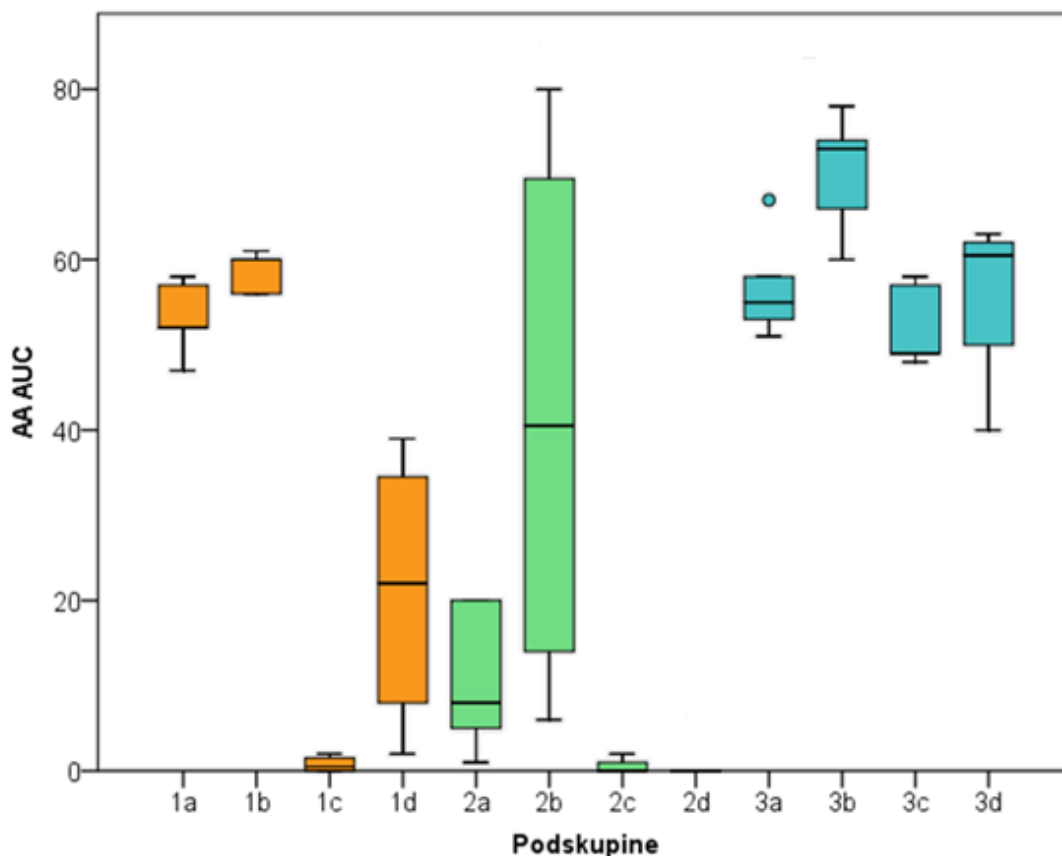
|        | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|--------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|        |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| AA AUC | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 47,00 | 58,00 | 49,50   | 52,00   | 57,50 |
|        | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 56,00 | 61,00 | 56,00   | 60,00   | 60,50 |
|        | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 0,00  | 2,00  | 0,00    | 0,50    | 1,75  |
|        | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 2,00  | 39,00 | 5,00    | 22,00   | 36,75 |
|        | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 1,00  | 20,00 | 3,00    | 8,00    | 20,00 |
|        | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 4 | 6,00  | 80,00 | 10,00   | 40,50   | 74,75 |
|        | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 0,00  | 2,00  | 0,00    | 0,00    | 1,50  |
|        | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 0,00  | 6,00  | 0,00    | 0,00    | 3,00  |
|        | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 51,00 | 67,00 | 52,00   | 55,00   | 62,50 |
|        | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 60,00 | 78,00 | 63,00   | 73,00   | 76,00 |
|        | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 48,00 | 58,00 | 48,50   | 49,00   | 57,50 |
|        | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 4 | 40,00 | 63,00 | 45,00   | 60,50   | 62,50 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 52,6674        |
| Korigirana vrijednost Ht | 52,8938        |
| Df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000001$ |

Tablica 8. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AUC vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita s AA.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$    |
|--------------------------|---|----------------|--|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 35,7           | <b>(1b)</b> (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) (3b) (3d)           |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 49,3           | <b>(1a)</b> (1c) <b>(1d)</b> (2a) (2c) (2d) (3b) (3c)    |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 8,8            | (1a) (1b) (1d) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                  |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 20,8           | (1a) <b>(1b)</b> (1c) (2b) (2c) (2d) (3a) (3b) (3c) (3d) |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 17,8           | (1a) (1b) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                       |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 4 | 39,0           | (1c) (1d) (2a) (2c) <b>(2d)</b> (3b)                     |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 8,0            | (1a) (1b) (1d) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                  |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 7,5            | (1a) (1b) (1d) <b>(2b)</b> (3a) (3b) (3c) (3d)           |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 41,9           | (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) <b>(3b)</b>                     |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 61,5           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) <b>(3a)</b> (3c) |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 34,7           | (1b) (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) (3b) (3d)                  |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 4 | 49,8           | (1a) (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) (3c)                       |



Slika 16. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AUC vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Tablice 7 i 8 te Slika 16 prikazuju razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije s AA. Kad su se promatrali međudodnosi između parova **a** i **b**, podskupina **3b** (CILO/BPC 157) je imala značajno veće vrijednosti u odnosu na podskupinu **3a** (CILO/FO) ( $P = 0,028$ ), što govori za oporavak opće agregabilnosti nakon primjene BPC-a 157 kod životinja tretiranih cilostazolom. Podskupina **1d** (ASK/BPC 157/ODQ) je imala značajno manje vrijednosti u odnosu na **1b** (ASK/BPC 157) ( $P = 0,014$ ), a podskupina **2d** (KLO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **2b** (KLO/BPC 157) ( $P = 0,015$ ), ukazujući na negativan utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 kod životinja tretiranih aspirinom i klopidogetrelom na ispitivani parametar.

Tablica 9. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|        | Podskupine               | N | Min   | Max    | Centile |         |        |
|--------|--------------------------|---|-------|--------|---------|---------|--------|
|        |                          |   |       |        | 25.     | Medijan | 75.    |
| AA AGG | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 76,50 | 85,50  | 77,45   | 81,00   | 84,75  |
|        | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 85,50 | 104,60 | 88,90   | 93,80   | 100,10 |
|        | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 0,00  | 6,40   | 0,85    | 4,70    | 6,30   |
|        | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 9,40  | 70,90  | 18,50   | 57,05   | 70,25  |
|        | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 9,40  | 55,90  | 12,60   | 25,90   | 51,00  |
|        | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 4 | 24,00 | 109,00 | 31,60   | 67,15   | 101,73 |
|        | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 2,30  | 19,50  | 2,85    | 4,90    | 18,40  |
|        | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 0,00  | 37,90  | 0,40    | 2,60    | 21,75  |
|        | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 79,50 | 102,00 | 81,55   | 83,60   | 93,75  |
|        | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 92,60 | 115,50 | 98,80   | 110,60  | 115,30 |
|        | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 71,30 | 84,00  | 71,45   | 81,40   | 83,80  |
|        | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 4 | 73,90 | 96,40  | 76,90   | 89,85   | 95,75  |

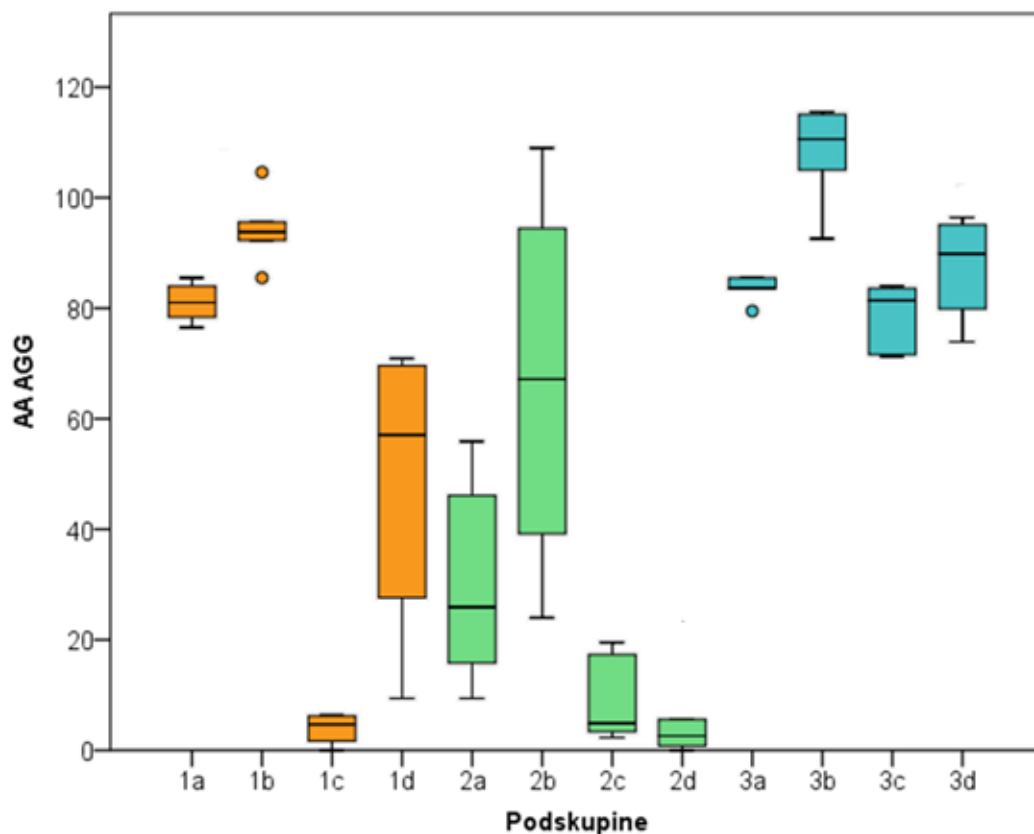
**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 53,3919        |
| Korigirana vrijednost Ht | 53,4131        |
| df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000001$ |

Tablica 10. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AGG vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita s AA.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$               |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 37,1           | (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) (3b)                                       |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 54,6           | (1c) ( <b>1d</b> ) (2a) (2b) (2c) (2d) (3c)                         |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 7,3            | (1a) (1b) (1d) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                             |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 20,4           | (1a) ( <b>1b</b> ) (1c) (2b) (2d) (3a) (3b) (3c) (3d)               |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 17,7           | (1a) (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                                       |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 4 | 33,8           | (1b) (1c) (1d) (2c) ( <b>2d</b> ) (3b) (3d)                         |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 9,9            | (1a) (1b) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                                  |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 7,5            | (1a) (1b) (1d) ( <b>2b</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)                    |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 44,2           | (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )                              |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 62,1           | (1a) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3a</b> ) (3c) ( <b>3d</b> ) |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 35,0           | (1b) (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) (3b)                                  |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 4 | 47,9           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )                         |





Slika 17. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AGG vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u AGG vrijednostima nakon aktivacije s AA između ispitivanih podskupina prikazane su u Tablici 9 i 10 te na Slici 17. Zabilježene su značajno veće vrijednosti u podskupini **3b** (CILO/BPC 157) u odnosu na podskupinu **3a** (CILO/FO) ( $P = 0,016$ ) iz čega zaključujemo da je došlo do povećanja maksimalno postignute agregacije kod aspirinske i cilostazolske skupine po aplikaciji BPC-a 157. Podskupina **1d** (ASK/BPC 157/ODQ) je imala značajno manje vrijednosti u odnosu na **1b** (ASK/BPC 157) ( $P = 0,014$ ), podskupina **2d** (KLO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **2b** (KLO/BPC 157) ( $P = 0,027$ ), a podskupina **3d** (CILO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **3b** (CILO/BPC 157) ( $P = 0,047$ ), dakle ODQ je smanjivao djelovanje BPC-a 157 na ispitivani parametar u sve tri podskupine.

Tablica 11. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

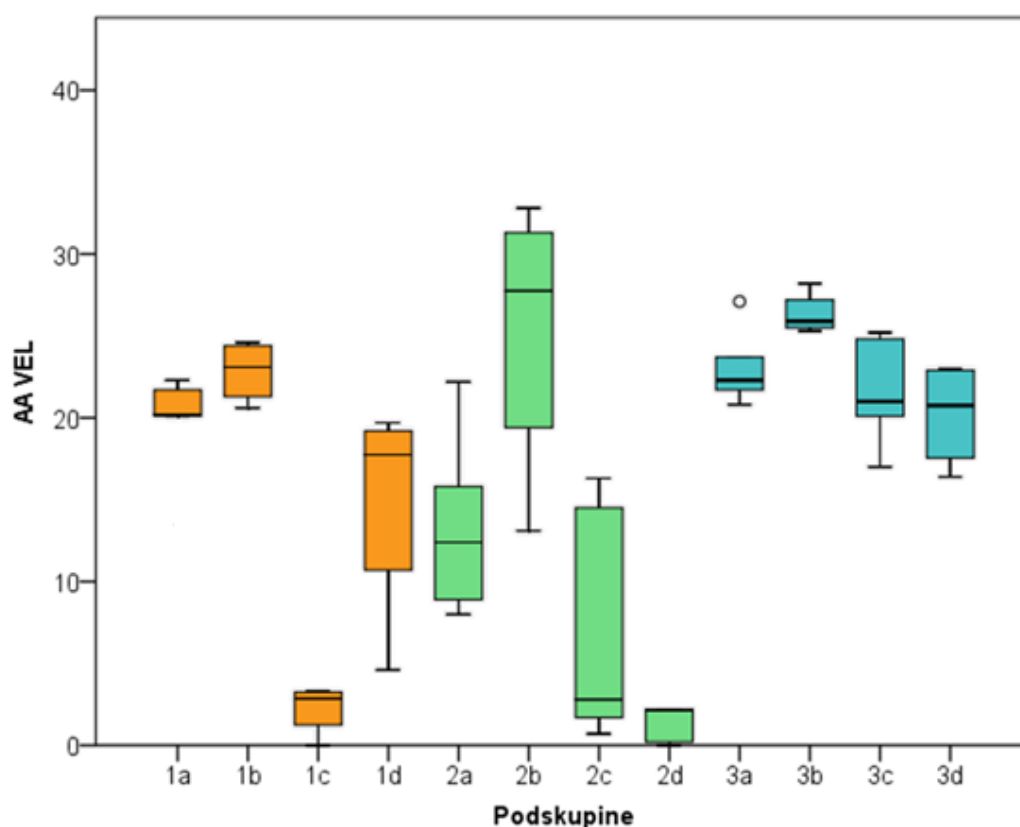
|        | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|--------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|        |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| AA VEL | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 13,90 | 22,30 | 17,00   | 20,20   | 22,00 |
|        | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 20,60 | 24,60 | 20,95   | 23,10   | 24,50 |
|        | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 0,00  | 3,30  | 0,63    | 2,85    | 3,28  |
|        | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 4,60  | 19,70 | 7,65    | 17,75   | 19,45 |
|        | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 8,00  | 22,20 | 8,45    | 12,40   | 19,00 |
|        | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 4 | 13,10 | 32,80 | 16,25   | 27,75   | 32,05 |
|        | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 0,70  | 16,30 | 1,20    | 2,80    | 15,40 |
|        | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 0,00  | 19,60 | 0,10    | 2,10    | 10,90 |
|        | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 20,80 | 27,10 | 21,25   | 22,30   | 25,40 |
|        | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 25,30 | 28,20 | 25,40   | 25,90   | 27,70 |
|        | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 17,00 | 25,20 | 18,55   | 21,00   | 25,00 |
|        | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 4 | 16,40 | 23,00 | 16,98   | 20,75   | 22,95 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 46,1504        |
| Korigirana vrijednost Ht | 46,1562        |
| df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000013$ |

Tablica 12. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na VEL vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita s AA.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$               |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 33,5           | (1c) (2b) (2c) (2d) (3b)  |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 45,4           | (1c) ( <b>1d</b> ) (2a) (2c) (2d) (3b)                              |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 7,6            | (1a) (1b) (1d) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                             |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 22,4           | ( <b>1b</b> ) (1c) (2b) (3a) (3b) (3c)                              |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 20,8           | (3a) (3b) (3c)  |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 4 | 51,5           | (1a) (1c) (1d) (2c) ( <b>2d</b> )                                   |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 11,2           | (1a) (1b) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                                  |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 9,3            | (1a) (1b) ( <b>2b</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)                         |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 47,0           | (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )                              |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 60,1           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) ( <b>3a</b> ) (3c) ( <b>3d</b> ) |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 40,1           | (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) (3b)                                       |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 4 | 35,4           | (1c) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )  |



Slika 18. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene VEL vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Značajno veće VEL vrijednosti nakon aktivacije s AA zabilježene su u podskupini **3b** (CILO/BPC 157) u odnosu na **3a** (CILO/FO) ( $P = 0,047$ ), ukazujući na oporavak brzine agregacije kod cilostazolske grupe nakon aplikacije BPC-a 157. Značajno manje vrijednosti nađene su u podskupinama **1d** (ASK/BPC 157/ODQ) u odnosu na **1b** (ASK/BPC 157) ( $P = 0,014$ ), **2d** (KLO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **2b** (KLO/BPC 157) ( $P = 0,027$ ), te **3d** (CILO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **3b** (CILO/BPC 157) ( $P = 0,014$ ), što znači da ODQ negativno utječe na djelovanje BPC-a 157 na ispitivani parametar u sve tri skupine životinja (Tablica 11 i 12, Slika 18).

Tablica 13. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

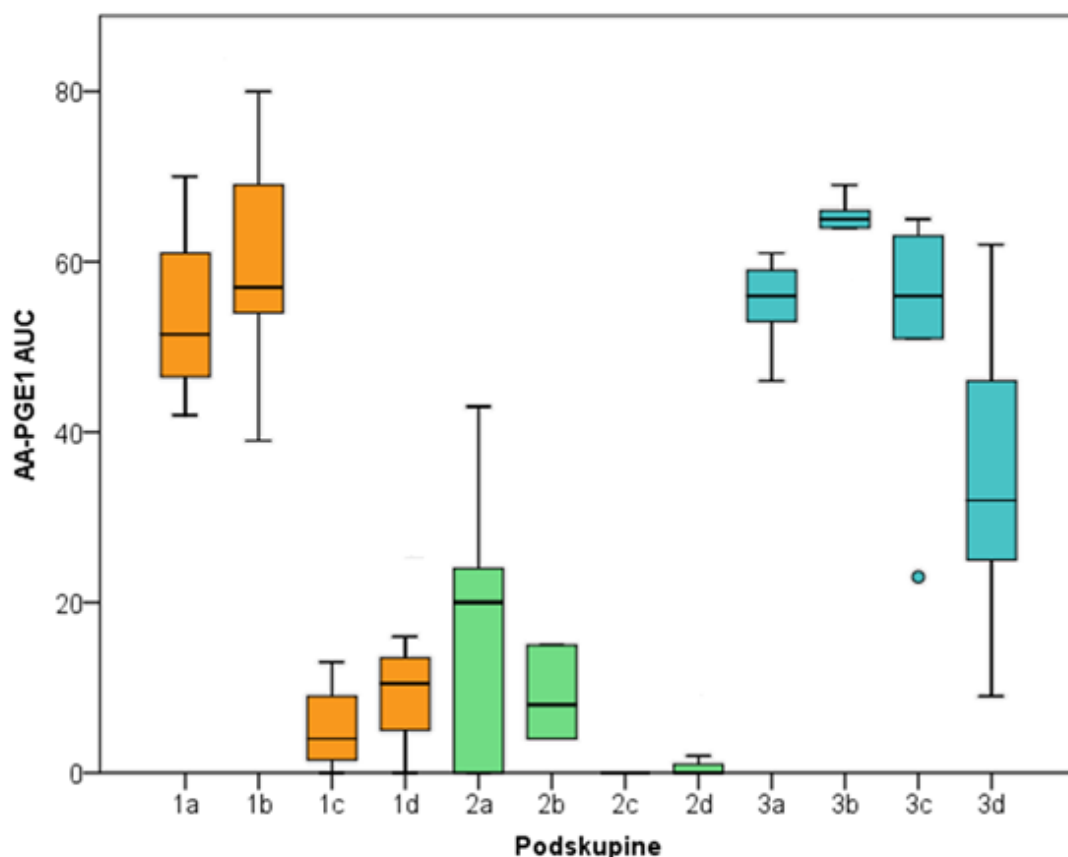
|             | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|-------------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|             |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| AA-PGE1 AUC | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 4 | 42,00 | 70,00 | 44,25   | 51,50   | 65,50 |
|             | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 39,00 | 80,00 | 46,50   | 57,00   | 74,50 |
|             | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 0,00  | 13,00 | 0,75    | 4,00    | 11,00 |
|             | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 0,00  | 16,00 | 2,50    | 10,50   | 14,75 |
|             | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 0,00  | 43,00 | 0,00    | 20,00   | 33,50 |
|             | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 4,00  | 52,00 | 4,00    | 8,00    | 33,50 |
|             | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 0,00  | 0,00  | 0,00    | 0,00    | 0,00  |
|             | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 0,00  | 2,00  | 0,00    | 0,00    | 1,50  |
|             | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 46,00 | 61,00 | 49,50   | 56,00   | 60,00 |
|             | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 57,00 | 69,00 | 60,50   | 65,00   | 67,50 |
|             | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 23,00 | 65,00 | 37,00   | 56,00   | 64,00 |
|             | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 9,00  | 62,00 | 17,00   | 32,00   | 54,00 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 51,7066        |
| Korigirana vrijednost Ht | 52,0335        |
| Df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000001$ |

Tablica 14. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AUC vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina obdrušeni su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$     |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 4 | 42,8           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)                             |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 48,8           | (1c) ( <b>1d</b> ) (2a) (2b) (2c) (2d) (3d)               |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 15,6           | (1a) (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                             |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 18,6           | (1a) ( <b>1b</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)                    |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 20,0           | (1a) (1b) (2c) (3a) (3b) (3c) (3d)                        |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 22,9           | (1a) (1b) (2c) ( <b>2d</b> ) (3a) (3b) (3c)               |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 6,5            | (1a) (1b) (2a) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                   |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 9,3            | (1a) (1b) ( <b>2b</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)               |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 43,3           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )               |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 55,3           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3a</b> ) ( <b>3d</b> ) |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 43,1           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) (3b)                        |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 33,1           | (1b) (1c) (1d) (2a) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )               |



Slika 19. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AUC vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Tablice 13 i 14 te Slika 19 prikazuju razlike u AUC vrijednostima nakon aktivacije s AA-PGE1 između ispitivanih podskupina. Podskupina **3b** (CILO/BPC 157) imala je značajno veće vrijednosti u odnosu na podskupinu **3a** ( $P = 0,028$ ), sugerirajući tako porast opće agregacije u cilostazolskoj skupini nakon aplikacije BPC-a 157. Podskupina **1d** (ASK/BPC 157/ODQ) imala je značajno manje vrijednosti u odnosu na podskupinu **1b** (ASK/BPC 157) ( $P = 0,014$ ), podskupina **2d** (KLO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **2b** (KLO/BPC 157) ( $P = 0,008$ ), te podskupina **3d** (CILO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **3b** (CILO/BPC 157) ( $P = 0,016$ ), što opet govori za negativan utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 u sve tri skupine.

Tablica 15. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

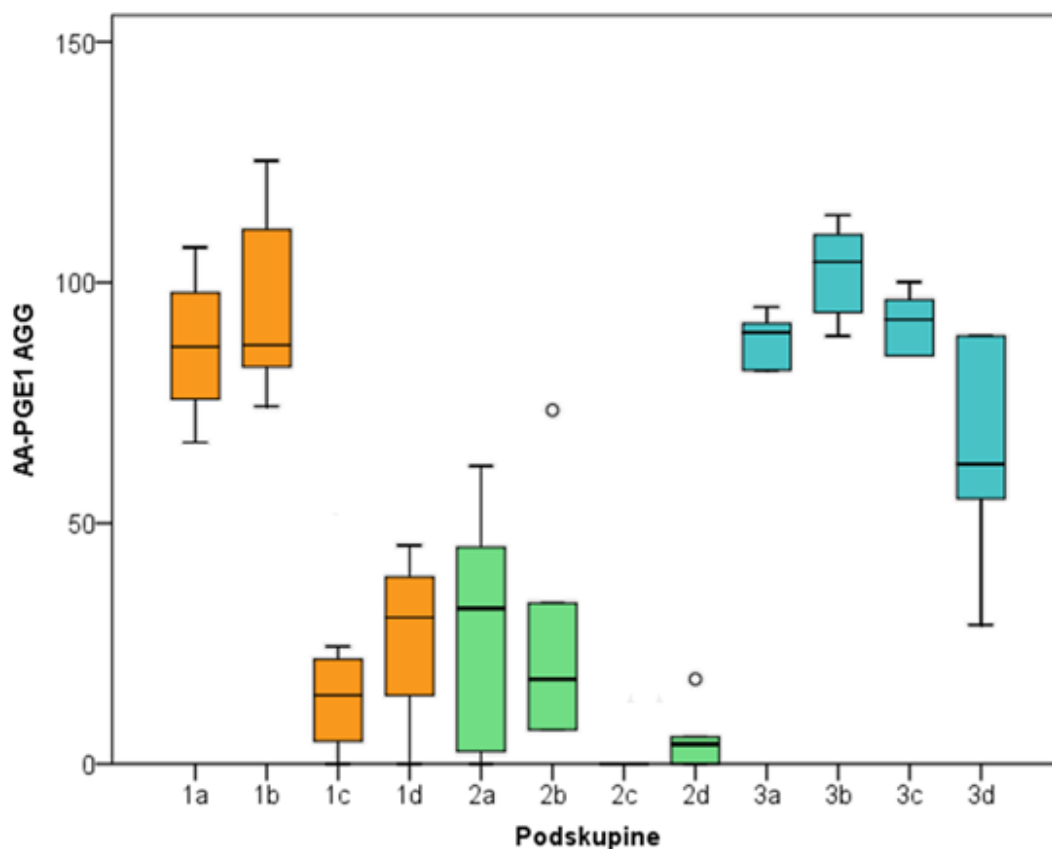
|             | Podskupine               | N | Min   | Max    | Centile |         |        |
|-------------|--------------------------|---|-------|--------|---------|---------|--------|
|             |                          |   |       |        | 25.     | Medijan | 75.    |
| AA-PGE1 AGG | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 4 | 66,80 | 107,30 | 71,30   | 86,65   | 102,60 |
|             | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 74,30 | 125,30 | 78,40   | 87,00   | 118,15 |
|             | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 0,00  | 24,40  | 2,35    | 14,25   | 23,08  |
|             | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 0,00  | 45,40  | 7,13    | 30,40   | 42,13  |
|             | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 0,00  | 61,90  | 1,30    | 32,30   | 53,45  |
|             | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 7,10  | 73,50  | 7,10    | 17,60   | 53,45  |
|             | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 0,00  | 1,90   | 0,00    | 0,00    | 0,95   |
|             | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 0,00  | 17,60  | 0,00    | 4,10    | 11,60  |
|             | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 81,80 | 94,90  | 81,80   | 89,60   | 93,20  |
|             | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 88,90 | 114,00 | 91,35   | 104,30  | 111,95 |
|             | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 36,00 | 100,10 | 60,40   | 92,30   | 98,25  |
|             | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 28,90 | 88,90  | 42,00   | 62,30   | 88,90  |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                                  |
|--------------------------|----------------------------------|
| Vrijednost               | 52,2964                          |
| Korigirana vrijednost Ht | 52,4387                          |
| Df                       | 13                               |
| Razina značajnosti       | <b><math>P = 0,000001</math></b> |

Tablica 16. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AGG vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$ |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 4 | 43,4           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)                         |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 48,2           | (1c) ( <b>1d</b> ) (2a) (2b) (2c) (2d) (3d)           |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 15,0           | (1a) (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                         |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 19,4           | (1a) ( <b>1b</b> ) (2c) (3a) (3b) (3c) (3d)           |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 19,3           | (1a) (1b) (2c) (3a) (3b) (3c) (3d)                    |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 20,9           | (1a) (1b) (2c) (3a) (3b) (3c) (3d)                    |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 6,0            | (1a) (1b) (1d) (2a) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)          |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 10,5           | (1a) (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                         |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 43,4           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)                         |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 55,6           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3d</b> )           |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 44,2           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)                         |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 34,4           | (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )      |



Slika 20. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AGG vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina prikazane su u Tablici 15 i 16 te na Slici 20. Značajno manje vrijednosti nađene su usporedbom podskupine **1d** (ASK/BPC 157/ODQ) u odnosu na **1b** (ASK/BPC 157) ( $P = 0,014$ ) te **3d** (CILO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **3b** (CILO/BPC 157) ( $P = 0,015$ ), sugerirajući negativan utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 na maksimalno postignutu visinu agregacije kod aspirinske i cilostazolske skupine.

Tablica 17. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|             | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|-------------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|             |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| AA-PGE1 VEL | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 4 | 13,90 | 23,10 | 15,48   | 20,85   | 22,70 |
|             | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 20,50 | 27,20 | 21,30   | 23,80   | 26,00 |
|             | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 0,00  | 7,70  | 0,63    | 4,00    | 7,15  |
|             | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 0,00  | 14,00 | 2,15    | 10,05   | 13,38 |
|             | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 0,00  | 24,40 | 1,20    | 9,70    | 20,10 |
|             | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 4,90  | 18,90 | 4,90    | 6,00    | 18,60 |
|             | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 0,00  | 1,80  | 0,00    | 0,00    | 0,90  |
|             | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 0,00  | 11,30 | 0,00    | 3,70    | 8,10  |
|             | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 12,60 | 23,00 | 16,55   | 21,00   | 22,65 |
|             | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 23,20 | 29,00 | 24,20   | 25,80   | 27,90 |
|             | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 8,30  | 26,20 | 16,10   | 23,90   | 26,15 |
|             | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 10,30 | 25,40 | 12,70   | 17,50   | 24,80 |

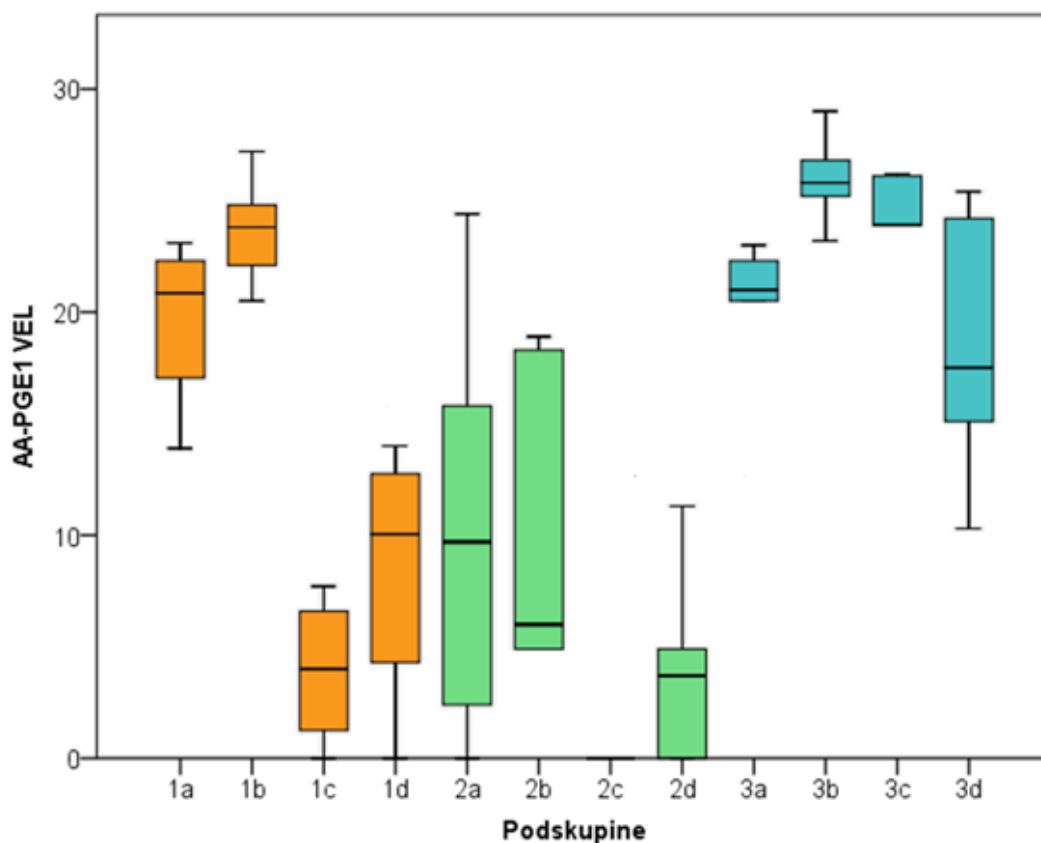
**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 47,8778        |
| Korigirana vrijednost Ht | 48,0051        |
| Df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000007$ |

Tablica 18. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na VEL vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$          |
|--------------------------|---|----------------|--|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 4 | 36,5           | (1c) (1d) (2c) (2d) (3b)                                       |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 47,7           | (1c) ( <b>1d</b> ) (2a) (2b) (2c) (2d)                         |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 13,3           | (1a) (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                                  |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 19,9           | (1a) ( <b>1b</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)                         |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 24,0           | (1b) (2c) (3b) (3c)  |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 23,0           | (2c) (3a) (3b) (3c) (3d)                                       |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 6,0            | (2a) (2b) (3a) (3b) (3c) (3d)                                  |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 12,4           | (1a) (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                                  |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 37,5           | (1c) (1d) (2b) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )                         |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 55,6           | (1a) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) ( <b>3a</b> ) ( <b>3d</b> ) |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 46,4           | (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)                                  |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 37,8           | (1c) (1d) (2b) (2c) (2d) ( <b>3b</b> )                         |





Slika 21. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s AA-PGE1: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene VEL vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije s AA-PGE1 prikazane su u Tablici 17 i 18 te na Slici 21. Značajno veće vrijednosti pronađene su u podskupini **3b** (CILO/BPC 157) u odnosu na podskupinu **3a** (CILO/FO) ( $P = 0,009$ ), što govori za povećanje brzine agregacije kod cilostazolske skupine. Usporedbom su nađene značajno manje vrijednosti u podskupini **1d** (ASK/BPC 157/ODQ) u odnosu na **1b** (ASK/BPC 157) ( $P = 0,014$ ), te u podskupini **3d** (CILO/BPC 157/ODQ) u odnosu na **3b** (CILO/BPC 157) ( $P = 0,047$ ), što ukazuje na negativan utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 na ovaj parametar kod aspirinom i cilostazolom tretiranih životinja.

Tablica 19. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita s kolagenom.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

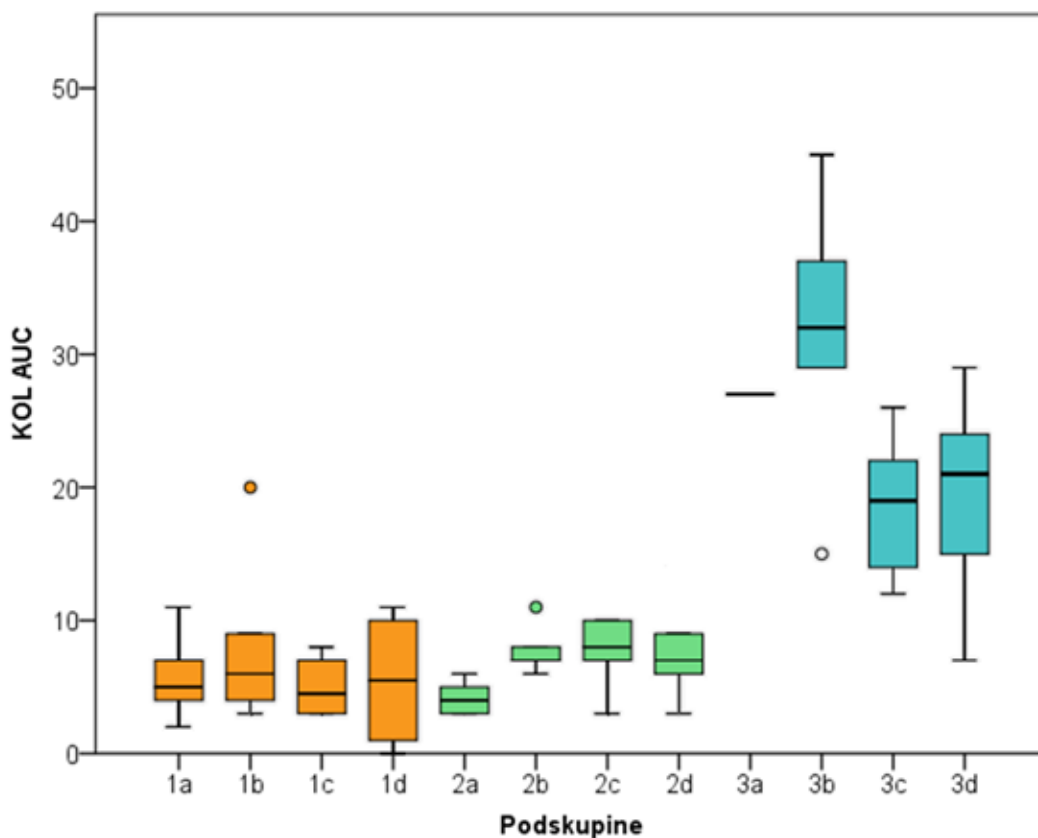
|         | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|---------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|         |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| KOL AUC | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 2,00  | 11,00 | 3,00    | 5,00    | 9,00  |
|         | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 3,00  | 20,00 | 3,50    | 6,00    | 14,50 |
|         | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 3,00  | 8,00  | 3,00    | 4,50    | 7,50  |
|         | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 0,00  | 11,00 | 0,50    | 5,50    | 10,50 |
|         | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 3,00  | 6,00  | 3,00    | 4,00    | 5,50  |
|         | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 6,00  | 11,00 | 6,50    | 7,00    | 9,50  |
|         | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 3,00  | 10,00 | 5,00    | 8,00    | 10,00 |
|         | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 3,00  | 9,00  | 4,50    | 7,00    | 9,00  |
|         | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 12,00 | 37,00 | 19,50   | 27,00   | 32,00 |
|         | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 15,00 | 45,00 | 22,00   | 32,00   | 41,00 |
|         | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 12,00 | 26,00 | 13,00   | 19,00   | 24,00 |
|         | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 7,00  | 29,00 | 11,00   | 21,00   | 26,50 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 44,0928        |
| Korigirana vrijednost Ht | 44,2518        |
| Df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000028$ |

Tablica 20. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AUC vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$ |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 18,2           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 24,0           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 15,1           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 18,6           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 11,7           | <b>(2b)</b> (3a) (3b) (3c) (3d)                       |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 26,4           | <b>(2a)</b> (3a) (3b) (3c) (3d)                       |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 26,0           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 22,7           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 55,0           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 58,5           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 48,5           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 46,9           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |



Slika 22. Razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AUC vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Tablice 19 i 20 te Slika 22 prikazuju razlike u AUC vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije kolagenom. Podskupina **2b** (KLO/BPC 157) imala je značajno veće AUC vrijednosti u odnosu na podskupinu **2a** (KLO/FO) ( $P = 0,011$ ). To ukazuje na oporavak opće agregacije nakon aplikacije BPC-a 157 životinjama tretiranim klopidogrelom.

Tablica 21. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

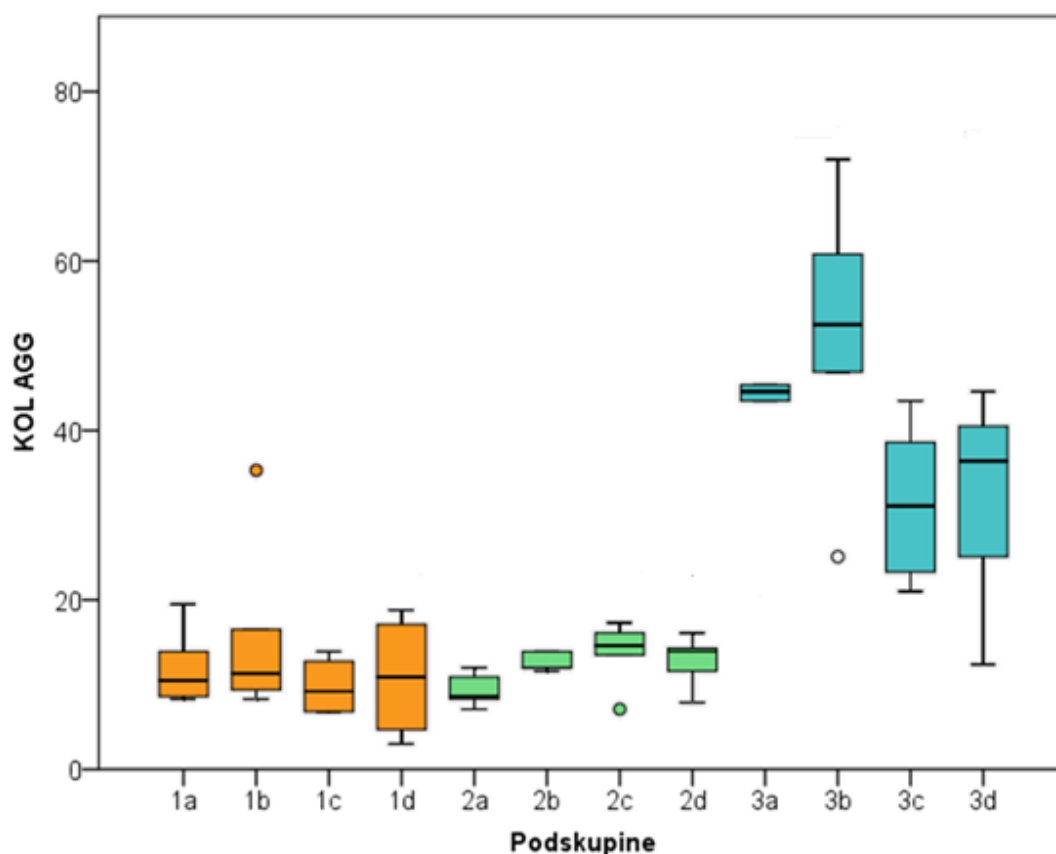
|         | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|---------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|         |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| KOL AGG | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 8,30  | 19,50 | 8,45    | 10,50   | 16,70 |
|         | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 8,30  | 35,30 | 8,85    | 11,30   | 25,90 |
|         | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 6,80  | 13,90 | 6,80    | 9,20    | 13,33 |
|         | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 3,00  | 18,80 | 3,85    | 10,90   | 17,95 |
|         | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 7,10  | 12,00 | 7,70    | 8,60    | 11,45 |
|         | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 11,60 | 19,90 | 11,80   | 12,00   | 16,90 |
|         | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 7,10  | 17,30 | 10,30   | 14,60   | 16,70 |
|         | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 7,90  | 16,10 | 9,75    | 13,90   | 15,20 |
|         | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 21,40 | 61,10 | 32,45   | 44,60   | 53,25 |
|         | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 25,10 | 72,00 | 36,00   | 52,50   | 66,40 |
|         | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 21,00 | 43,50 | 22,15   | 31,10   | 41,05 |
|         | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 12,40 | 44,60 | 18,75   | 36,40   | 42,55 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| Vrijednost               | 43,5839             |
| Korigirana vrijednost Ht | 43,6149             |
| Df                       | 13                  |
| Razina značajnosti       | <b>P = 0,000036</b> |

Tablica 22. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na AGG vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu |
|--------------------------|---|----------------|---|
|                          |   |                | <b>P &lt; 0,05</b>                      |
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 20,2           | (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 24,8           | (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 13,1           | (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 18,1           | (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 12,4           | <b>(2b)</b> (3a) (3b) (3c) (3d)         |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 25,5           | <b>(2a)</b> (3a) (3b) (3c) (3d)         |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 26,1           | (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 23,2           | (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 55,4           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 58,5           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 48,5           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 46,4           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d) |



Slika 23. Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene AGG vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u AGG vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije trombocita kolagenom prikazane su u Tablici 21 i 22 te na Slici 23. Značajno veće vrijednosti pronađene su u podskupini **2b** (KLO/BPC 157) u odnosu na podskupinu **2a** (KLO/FO) ( $P = 0,026$ ), što govori za povećanje maksimalne postignute visine agregacije nakon aplikacije BPC-a 157 kod skupine životinja koje su primale klopidogrel.

Tablica 23. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom.  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

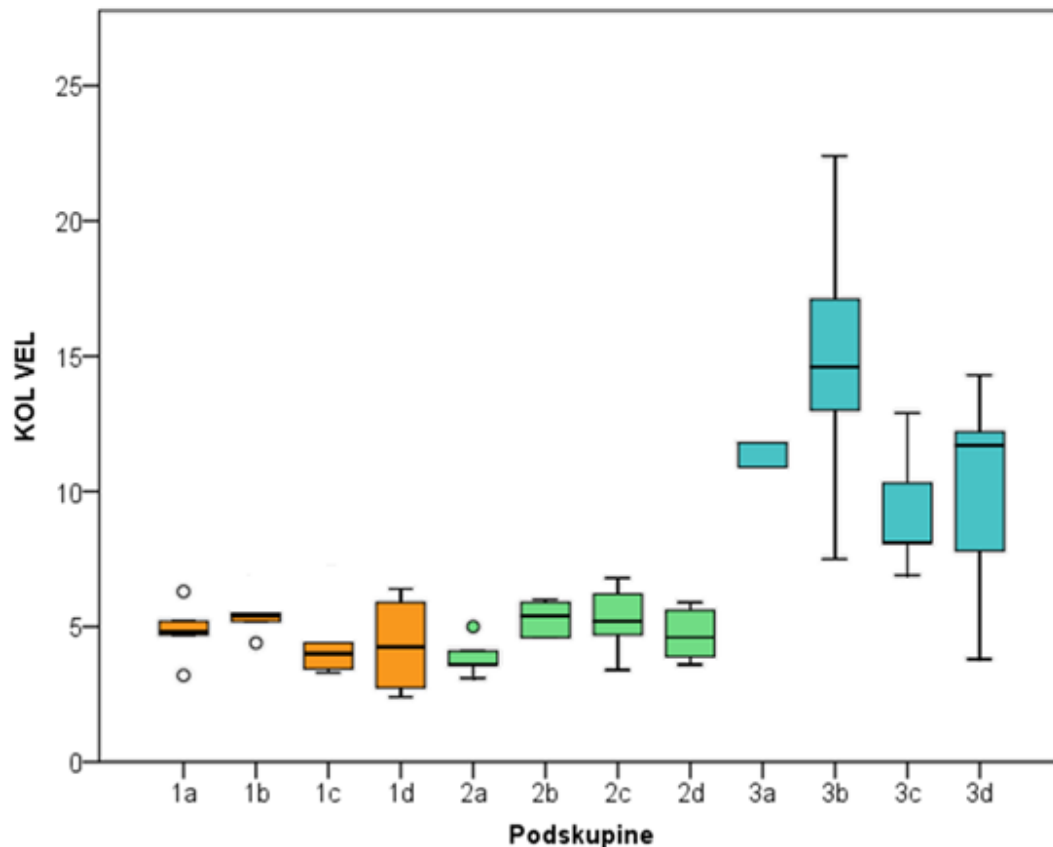
|         | Podskupine               | N | Min  | Max   | Centile |         |       |
|---------|--------------------------|---|------|-------|---------|---------|-------|
|         |                          |   |      |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| KOL VEL | <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 3,20 | 6,30  | 3,95    | 4,80    | 5,75  |
|         | <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 4,40 | 12,90 | 4,80    | 5,40    | 9,20  |
|         | <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 3,30 | 4,40  | 3,38    | 4,00    | 4,40  |
|         | <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 2,40 | 6,40  | 2,58    | 4,25    | 6,15  |
|         | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 3,10 | 5,00  | 3,35    | 3,60    | 4,55  |
|         | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 4,60 | 6,00  | 4,60    | 5,40    | 5,95  |
|         | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 3,40 | 6,80  | 4,05    | 5,20    | 6,50  |
|         | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 3,60 | 5,90  | 3,75    | 4,60    | 5,75  |
|         | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 5,20 | 15,30 | 8,05    | 11,80   | 13,55 |
|         | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 7,50 | 22,40 | 10,25   | 14,60   | 19,75 |
|         | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 6,90 | 12,90 | 7,50    | 8,10    | 11,60 |
|         | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 3,80 | 14,30 | 5,80    | 11,70   | 13,25 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 39,4992        |
| Korigirana vrijednost Ht | 39,5481        |
| Df                       | 13             |
| Razina značajnosti       | $P = 0,000163$ |

Tablica 24. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na VEL vrijednosti nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom.  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine,  
a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$ |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>1a</b> (ASK/FO)       | 5 | 22,6           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>1b</b> (ASK/BPC)      | 5 | 32,2           | (1c) (2a) (3a) (3b) (3c)                              |
| <b>1c</b> (ASK/ODQ)      | 4 | 10,9           | (1b) (3a) (3b) (3c) (3d)                              |
| <b>1d</b> (ASK/BPC/ODQ)  | 4 | 18,9           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 11,1           | (1b) ( <b>2b</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)                |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 28,0           | ( <b>2a</b> ) (3a) (3b) (3c) (3d)                     |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 26,9           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 21,7           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 49,8           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 58,5           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 49,9           | (1a) (1b) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)               |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 45,4           | (1a) (1c) (1d) (2a) (2b) (2c) (2d)                    |



Slika 24. Razlike u VEL vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije agregacije trombocita kolagenom: *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene VEL vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **1** (ASK), **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Značajno veće vrijednosti VEL parametara između ispitivanih podskupina nakon aktivacije kolagenom zabilježene su u podskupini **2b** (KLO/BPC 157) u odnosu na **2a** (KLO/FO) ( $P = 0,027$ ) (Tablica 23 i 24, Slika 24), što nam govori za povećanje brzine agregacije nakon aplikacije BPC-a 157 kod životinja tretiranih klopidogetlom.

## 4.2. Rezultati tromboelastometrijskih mjerenja

Ispitivane su razlike među podskupinama u vremenu do početka zgrušavanja (CT), vremenu do postizanja amplitude od 20 mm (CFT), kinetici stvaranja ugruška (ALFA kut), maksimalnoj postignutoj amplitudi ugruška (MCF), stupnju razgradnje ugruška nakon 30 minuta (LI 30) i maksimalnoj razgradnji ugruška (ML) nakon 60 minuta mjerenja po aktivaciji vanjskog puta sustava koagulacije tkivnim faktorom, unutarnjeg puta elagičnom kiselinom, te razlike u maksimalnoj postignutoj amplitudi izoliranog fibrinskog ugruška (MCF) nakon aktivacije sustava zgrušavanja bez doprinosa trombocita kombinacijom tkivnog faktora i inhibitora trombocita citohalazinom D.

Vrijednosti CT i CFT prikazane su u sekundama, ALFA kut u stupnjevima, MCF milimetrima, a LI 30 i ML u postocima.

Dobivene vrijednosti su prikazane u tablicama kao minimalna i maksimalna vrijednost, 25. i 75. centila te medijan.

Post hock testiranjem Mann-Whitney testom s Boniferonijevom korekcijom određivani su pojedinačni odnosi među podskupinama, te su one koje su pokazale značajnu različitost ( $P < 0,05$ ) u odnosu na sve ostale prikazane u tablicama.

Da bismo utvrdili utjecaj BPC-a 157 na mjerene vrijednosti, uspoređivali smo podskupine **a** i **b** unutar skupina **2** i **3** (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157).

Za ispitivanje utjecaja inhibitora sGC-e, ODQ-a, na djelovanje BPC-a 157 uspoređivali smo podskupine **b** i **d** unutar skupina **2** i **3** (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ).

Parovi **a** i **b**, te **b** i **d** koji su pokazali značajnu međusobnu različitost podebljani su i istaknuti crvenom bojom u tablicama.



Tablica 25. Razlike u CT vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM). (prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|          | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|----------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|          |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| EXTEM CT | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 37,00 | 56,00 | 38,00   | 47,00   | 55,00 |
|          | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 34,00 | 51,00 | 34,50   | 35,00   | 49,50 |
|          | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 37,00 | 46,00 | 37,50   | 45,00   | 46,00 |
|          | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 30,00 | 43,00 | 34,50   | 40,00   | 43,00 |
|          | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 39,00 | 71,00 | 40,00   | 52,00   | 68,50 |
|          | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 32,00 | 47,00 | 35,50   | 39,00   | 47,00 |
|          | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 39,00 | 55,00 | 39,00   | 51,00   | 54,50 |
|          | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 39,00 | 47,00 | 39,00   | 41,00   | 46,00 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 8,6314         |
| Korigirana vrijednost Ht | 8,6989         |
| Df                       | 9              |
| Razina značajnosti       | $P = 0,465520$ |

Tablica 25 prikazuje razlike u ispitivanim vrijednostima EXTEM CT između ispitivanih podskupina. Nisu zabilježene značajne razlike u brzini početka zgrušavanja (CT) nakon aktivacije TF-om preko vanjskog puta između ispitivanih podskupina.

Tablica 26. Razlike u CFT vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM). (prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|           | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|-----------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|           |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| EXTEM CFT | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 22,00 | 32,00 | 24,00   | 27,00   | 29,50 |
|           | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 25,00 | 29,00 | 25,50   | 26,00   | 28,50 |
|           | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 25,00 | 40,00 | 25,50   | 28,00   | 39,50 |
|           | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 26,00 | 30,00 | 26,00   | 27,00   | 30,00 |
|           | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 29,00 | 45,00 | 29,00   | 30,00   | 38,00 |
|           | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 33,00 | 40,00 | 34,00   | 36,00   | 39,00 |
|           | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 33,00 | 48,00 | 35,00   | 43,00   | 47,50 |
|           | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 29,00 | 40,00 | 29,50   | 31,00   | 36,50 |

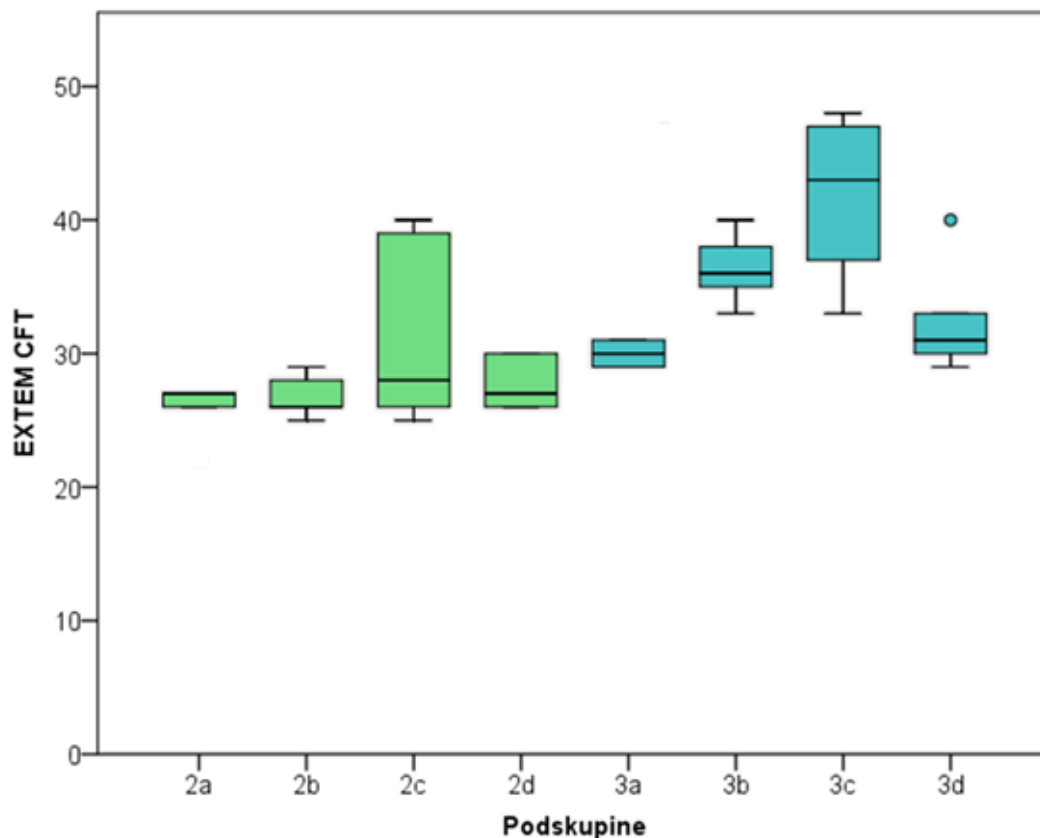
**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 26,6855        |
| Korigirana vrijednost Ht | 26,8238        |
| Df                       | 9              |
| Razina značajnosti       | $P = 0,001496$ |

Tablica 27. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na CFT vrijednosti nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM).

(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$ |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 11,3           | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 9,4            | (3a) (3b) (3c) (3d)                                   |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 21,4           | (3b) (3c)   |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 13,6           | (3b) (3c) (3d)  |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 25,7           | (2a) (2b) (3c)  |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 35,9           | (2a) (2b) (2c) (2d)                                   |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 41,3           | (2a) (2b) (2c) (2d) (3a) (3d)                         |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 27,5           | (2a) (2b) (2d) (3c)                                   |



Slika 25. Razlike u CFT vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM): *Box i Whisker plot*. Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene CFT vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u ispitivanim vrijednostima EXTEM CFT između ispitivanih podskupina prikazane su u Tablici 26 i 27 te na Slici 25. Nisu nađene značajne razlike između ispitivanih parova podskupina **a** i **b**, kao ni **b** i **d** u vremenu do postizanja amplitude od 20 mm (CFT) nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja.

Tablica 28. Razlike u ALFA vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

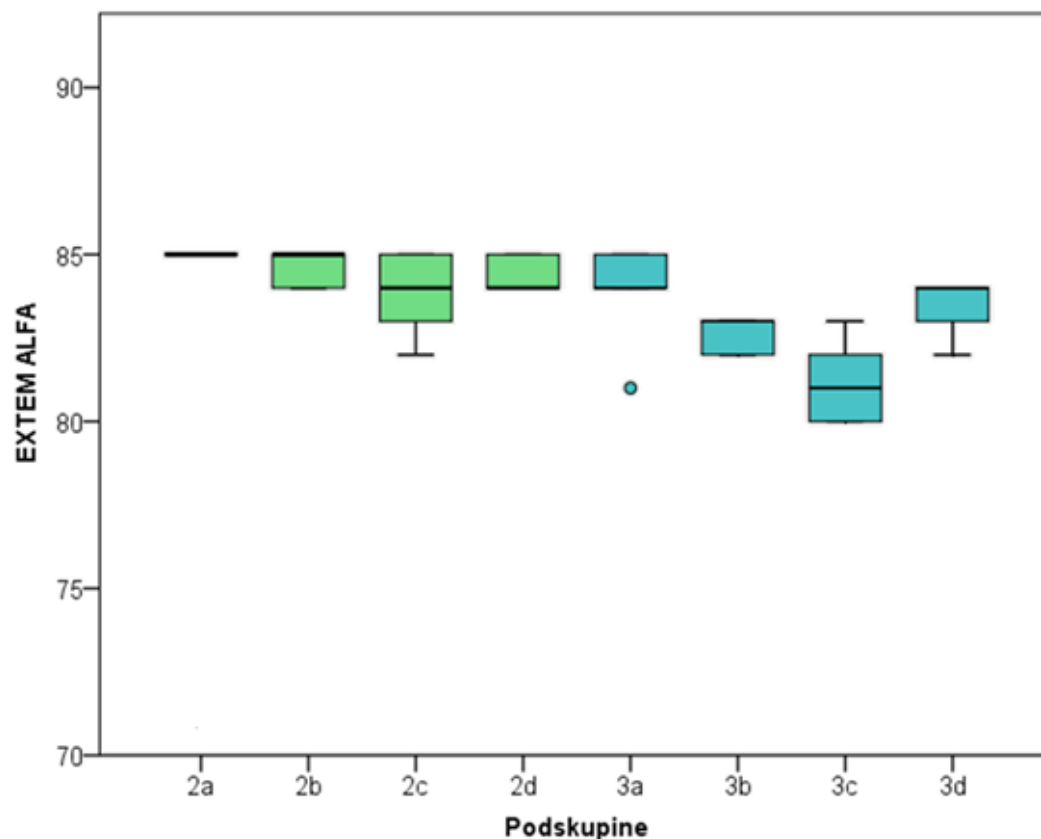
|            | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|------------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|            |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| EXTEM ALFA | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 71,00 | 86,00 | 78,00   | 85,00   | 85,50 |
|            | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 84,00 | 85,00 | 84,00   | 85,00   | 85,00 |
|            | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 82,00 | 85,00 | 82,50   | 84,00   | 85,00 |
|            | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 84,00 | 85,00 | 84,00   | 84,00   | 85,00 |
|            | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 81,00 | 85,00 | 82,50   | 84,00   | 85,00 |
|            | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 82,00 | 83,00 | 82,00   | 83,00   | 83,00 |
|            | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 80,00 | 83,00 | 80,00   | 81,00   | 82,50 |
|            | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 82,00 | 84,00 | 82,50   | 84,00   | 84,00 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 21,7138        |
| Korigirana vrijednost Ht | 22,8538        |
| Df                       | 9              |
| Razina značajnosti       | $P = 0,006533$ |

Tablica 29. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na ALFA vrijednosti nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM).  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br>$P < 0,05$ |
|--------------------------|---|----------------|---|
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 34,7           | (3b) (3c)   |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 36,3           | (3b) (3c)   |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 27,5           | (3c)  |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 33,7           | (3b) (3c)   |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 28,9           | (3c)  |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 13,8           | (2a) (2b) (2d)  |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 7,1            | (2a) (2b) (2c) (2d) (3d)                              |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 22,3           | (3c)  |



Slika 26. Razlike u ALFA vrijednostima između ispitivanih skupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM): *Box i Whisker plot*. Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene ALFA vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u EXTEM ALFA vrijednostima između ispitivanih podskupina prikazane su u Tablici 28 i 29 te na Slici 26. Nisu nađene značajne razlike među ispitivanim **b** i **a**, te **d** i **b** parovima podskupina u kinetici formiranja ugruška (ALFA kut) nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja.

Tablica 30. Razlike u MCF vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

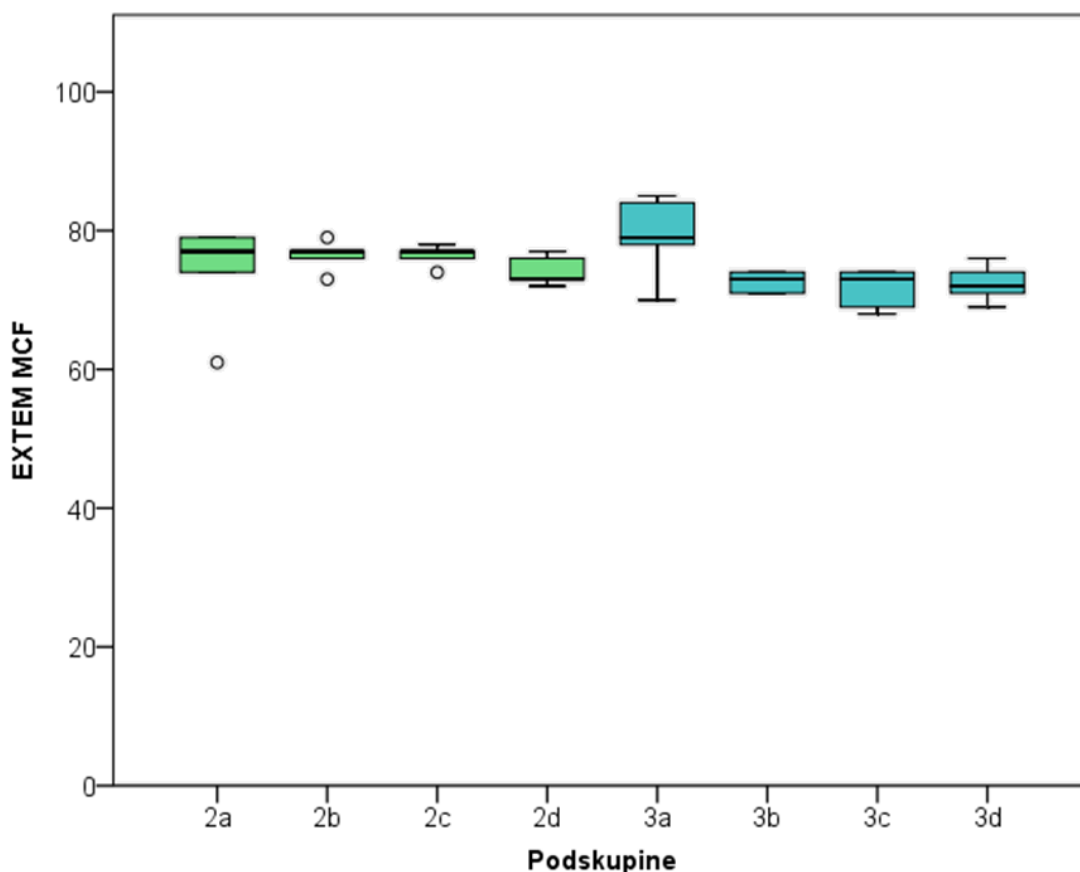
|           | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|-----------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|           |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| EXTEM MCF | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 61,00 | 79,00 | 67,50   | 77,00   | 79,00 |
|           | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 73,00 | 79,00 | 74,50   | 77,00   | 78,00 |
|           | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 74,00 | 78,00 | 75,00   | 77,00   | 77,50 |
|           | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 72,00 | 77,00 | 72,50   | 73,00   | 76,50 |
|           | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 70,00 | 85,00 | 74,00   | 79,00   | 84,50 |
|           | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 71,00 | 74,00 | 71,00   | 73,00   | 74,00 |
|           | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 68,00 | 74,00 | 68,50   | 73,00   | 74,00 |
|           | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 69,00 | 76,00 | 70,00   | 72,00   | 75,00 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| Vrijednost               | 19,1942             |
| Korigirana vrijednost Ht | 19,4604             |
| Df                       | 9                   |
| Razina značajnosti       | <i>P</i> = 0,021551 |

Tablica 31. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na MCF vrijednosti nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM).  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu |
|--------------------------|---|----------------|---|
|                          |   |                | <i>P</i> < 0,05                         |
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 30,2           | (3c)                                    |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 33,0           | (2c) (3c) (3d)                          |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 33,9           | (2b) (3c) (3d)                          |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 22,4           |   |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 37,3           | (3c) (3d)                               |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 16,5           | (2b) (2c)                               |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 14,3           | (2a) (2b) (2c) (3a)                     |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 15,9           | (2b) (2c) (3a)                          |



Slika 27. Razlike u MCF vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom (EXTEM): *Box i Whisker plot*. Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene MCF vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Tablice 30 i 31 te Slika 27 prikazuju razlike u EXTEM MCF vrijednostima između ispitivanih podskupina. Nije bilo značajnih razlika u maksimalnoj postignutoj amplitudi (MCF) nakon aktivacije vanjskog puta TF-om između parova **b** i **a**, te **d** i **b** obzirom na ispitivane podskupine.

Tablica 32. Razlike u CT vrijednostim između ispitivanih podskupina nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

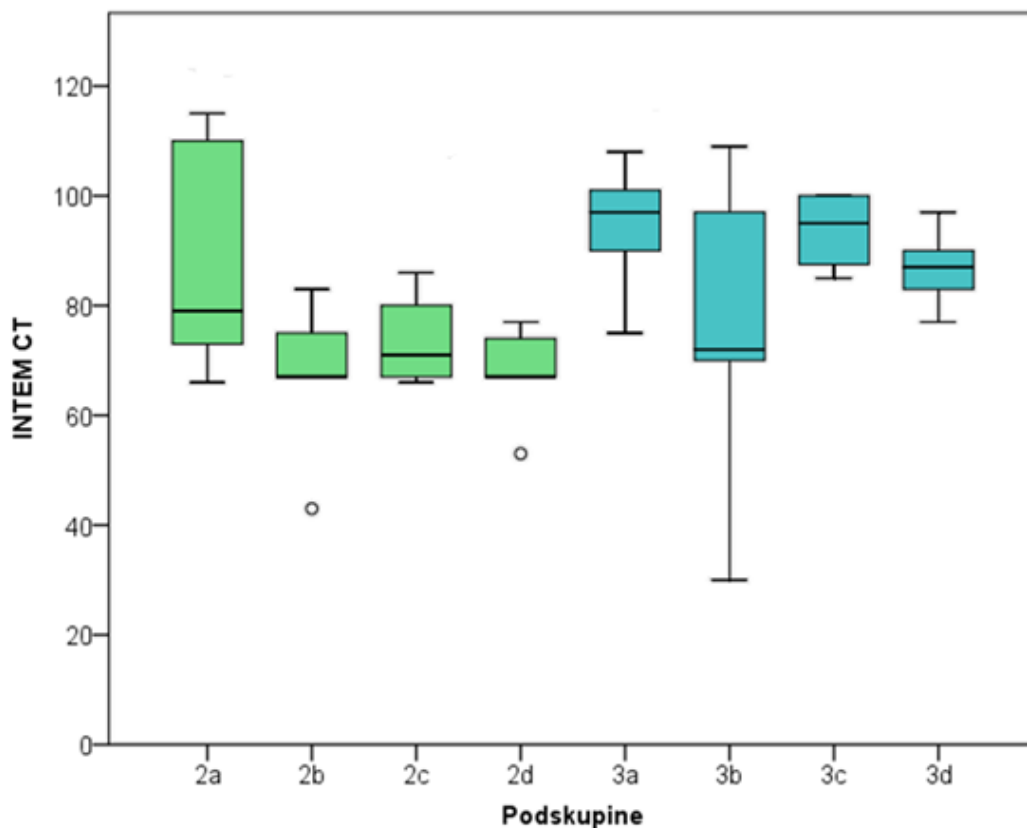
|          | Podskupine               | N | Min   | Max    | Centile |         |        |
|----------|--------------------------|---|-------|--------|---------|---------|--------|
|          |                          |   |       |        | 25.     | Medijan | 75.    |
| INTEM CT | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 66,00 | 115,00 | 69,50   | 79,00   | 112,50 |
|          | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 43,00 | 83,00  | 55,00   | 67,00   | 79,00  |
|          | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 4 | 66,00 | 86,00  | 66,50   | 71,00   | 83,00  |
|          | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 53,00 | 77,00  | 60,00   | 67,00   | 75,50  |
|          | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 75,00 | 108,00 | 82,50   | 97,00   | 104,50 |
|          | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 30,00 | 109,00 | 50,00   | 72,00   | 103,00 |
|          | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 4 | 85,00 | 100,00 | 86,25   | 95,00   | 100,00 |
|          | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 77,00 | 97,00  | 80,00   | 87,00   | 93,50  |

| Kruskal-Wallis test      |                  |
|--------------------------|------------------|
| Vrijednost               | 16,8331          |
| Korigirana vrijednost Ht | 16,8779          |
| Df                       | 9                |
| Razina značajnosti       | <i>P</i> = 0,049 |

Tablica 33. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na CT vrijednosti nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM).  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br><i>P</i> < 0,05 |
|--------------------------|---|----------------|--|
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 26,6           |  |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 12,2           | (3a) (3c) (3d)   |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 4 | 14,8           | (3a) (3c)  |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 11,4           | (3a) (3c) (3d)   |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 33,1           | (2b) (2c) (2d)   |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 20,9           |  |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 4 | 32,9           | (2b) (2c) (2d)   |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 27,9           | (2b) (2d)  |





Slika 28. Razlike u CT vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM): *Box i Whisker plot*. Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene CT vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Tablica 32 i 33 te Slika 28 prikazuju razlike u INTEM CT vrijednostima između ispitivanih podskupina. Nije bilo značajnih razlika u brzini početka zgrušavanja (CT) nakon aktivacije unutarnjeg puta elagičnom kiselinom između parova podskupina **b** i **a**, te **d** i **b**.

Tablica 34. Razlike u CFT vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|           | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|-----------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|           |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| INTEM CFT | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 22,00 | 39,00 | 22,50   | 33,00   | 38,00 |
|           | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 19,00 | 38,00 | 19,50   | 23,00   | 32,50 |
|           | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 4 | 20,00 | 23,00 | 20,25   | 21,00   | 22,50 |
|           | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 19,00 | 50,00 | 20,00   | 26,00   | 40,50 |
|           | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 21,00 | 57,00 | 21,50   | 23,00   | 40,50 |
|           | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 24,00 | 61,00 | 24,50   | 26,00   | 44,50 |
|           | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 4 | 27,00 | 33,00 | 27,00   | 28,00   | 32,00 |
|           | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 22,00 | 28,00 | 22,50   | 25,00   | 26,50 |

**Kruskal-Wallis test**

Vrijednost 13,0981

Korigirana vrijednost Ht 13,1647

Df 9

Razina značajnosti  $P = 0,155293$

Tablica 34 prikazuje razlike u INTEM CFT vrijednostima između ispitivanih podskupina. Nisu zabilježene značajne razlike između ispitivanih parova podskupina **b** i **a**, te **d** i **b** u vremenu do postizanja amplitude od 20 mm (CFT) nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja.

Tablica 35. Razlike u ALFA vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|            | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|------------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|            |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| INTEM ALFA | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 83,00 | 86,00 | 83,50   | 84,00   | 86,00 |
|            | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 84,00 | 86,00 | 84,50   | 86,00   | 86,00 |
|            | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 4 | 86,00 | 86,00 | 86,00   | 86,00   | 86,00 |
|            | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 81,00 | 86,00 | 83,00   | 85,00   | 86,00 |
|            | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 78,00 | 86,00 | 82,00   | 86,00   | 86,00 |
|            | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 81,00 | 85,00 | 82,50   | 85,00   | 85,00 |
|            | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 4 | 84,00 | 85,00 | 84,00   | 84,00   | 84,75 |
|            | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 84,00 | 86,00 | 84,50   | 85,00   | 85,50 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 13,5175        |
| Korigirana vrijednost Ht | 14,8924        |
| Df                       | 9              |
| Razina značajnosti       | $P = 0,093935$ |

Tablica 35 prikazuje razlike u ispitivanim INTEM ALFA vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije elagičnom kiselinom. Nisu zabilježene značajne razlike između ispitivanih parova podskupina **b** i **a**, te **d** i **b** u kinetici stvaranja ugruška (ALFA kut) po unutarnjem putu.

Tablica 36. Razlike u MCF vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije unutaršnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

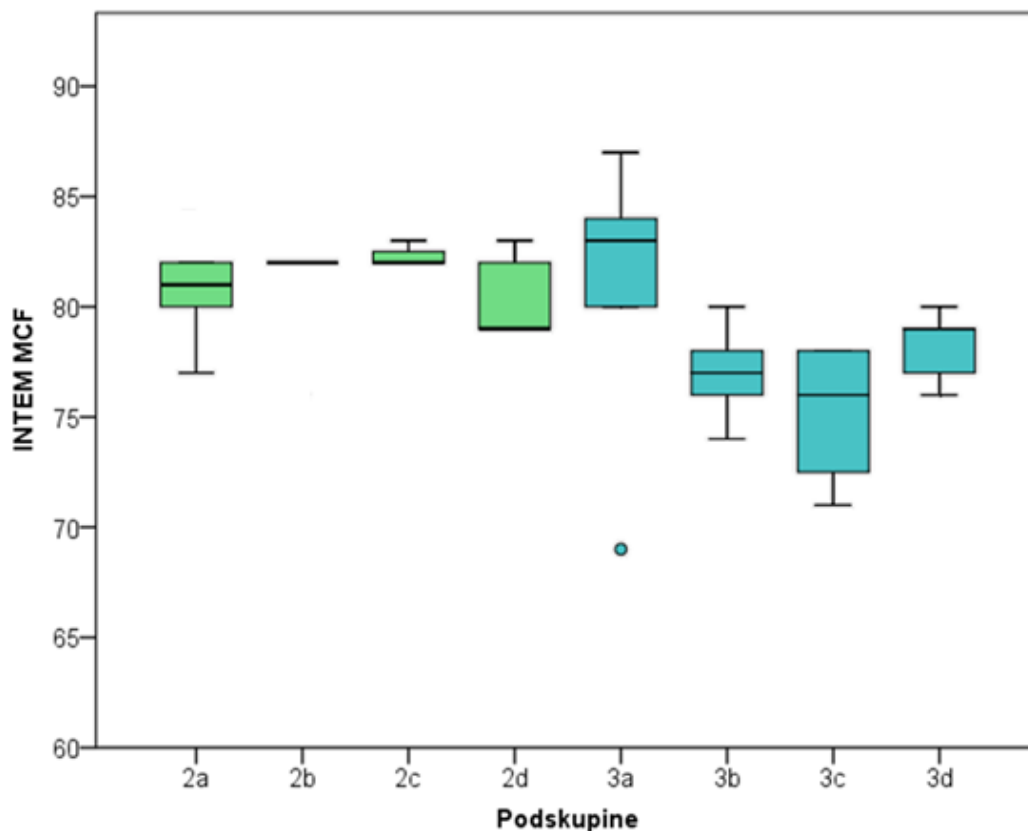
|           | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|-----------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|           |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| INTEM MCF | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 77,00 | 82,00 | 78,50   | 81,00   | 82,00 |
|           | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 76,00 | 82,00 | 79,00   | 82,00   | 82,00 |
|           | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 4 | 82,00 | 83,00 | 82,00   | 82,00   | 82,75 |
|           | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 65,00 | 83,00 | 72,00   | 79,00   | 82,50 |
|           | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 69,00 | 87,00 | 74,50   | 83,00   | 85,50 |
|           | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 74,00 | 80,00 | 75,00   | 77,00   | 79,00 |
|           | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 4 | 71,00 | 78,00 | 71,75   | 76,00   | 78,00 |
|           | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 76,00 | 80,00 | 76,50   | 79,00   | 79,50 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| Vrijednost               | 17,8205             |
| Korigirana vrijednost Ht | 18,1553             |
| Df                       | 9                   |
| Razina značajnosti       | <i>P</i> = 0,033414 |

Tablica 37. Post hoc testiranje značajnosti pojedinih razlika između podskupina obzirom na MCF vrijednosti nakon aktivacije unutaršnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM).  
(za svaku podskupinu prikazane su sve značajno različite podskupine, a ispitivani **a** i **b**, te **b** i **d** parovi unutar skupina otisnuti su crvenom bojom)

| Podskupina               | n | Prosječan rang | Značajna razlika u odnosu na podskupinu<br><i>P</i> < 0,05 |
|--------------------------|---|----------------|--|
| <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 28,2           | (3c)   |
| <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 30,7           | (3b) (3c)  |
| <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 4 | 37,8           | (3b) (3c) (3d)   |
| <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 24,8           |  |
| <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 32,5           |  |
| <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 14,3           | (2b) (2c)  |
| <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 4 | 10,6           | (2a) (2b) (2c)   |
| <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 18,6           | (2c)   |



Slika 29. Razlike u MCF vrijednostima između podskupina nakon aktivacije unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom (INTEM): *Box i Whisker plot*.

Za ispitivanje utjecaja BPC-a 157 na mjerene MCF vrijednosti uspoređivane su podskupine **a** i **b** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos kontrolne podskupine i one koja je primala BPC 157). Za ispitivanje utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC-a 157 uspoređivane su podskupine **b** i **d** unutar skupina **2** (KLO) i **3** (CILO) (odnos podskupine koja je primala BPC 157 i one koja je primala BPC 157 uz ODQ)

Razlike u ispitivanim vrijednostima INTEM MCF između podskupina prikazane su u Tablici 36 i 37 te na Slici 29. Nije bilo značajnih razlika u maksimalno dosegnutoj amplitudi (MCF) ugruška nakon aktivacije unutarnjeg puta između parova podskupina **b** i **a**, te **d** i **b**.

Tablica 38. Razlike u MCF vrijednostima između ispitivanih podskupina nakon aktivacije vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom uz inaktivaciju trombocita citohalazinom D (FIBTEM).  
(prikazane kao min i max vrijednost, medijan, 25. i 75. centila)

|            | Podskupine               | N | Min   | Max   | Centile |         |       |
|------------|--------------------------|---|-------|-------|---------|---------|-------|
|            |                          |   |       |       | 25.     | Medijan | 75.   |
| FIBTEM MCF | <b>2a</b> (KLO/FO)       | 5 | 8,00  | 18,00 | 8,00    | 17,00   | 18,00 |
|            | <b>2b</b> (KLO/BPC)      | 5 | 15,00 | 24,00 | 15,00   | 16,00   | 21,00 |
|            | <b>2c</b> (KLO/ODQ)      | 5 | 11,00 | 16,00 | 11,00   | 15,00   | 16,00 |
|            | <b>2d</b> (KLO/BPC/ODQ)  | 5 | 8,00  | 17,00 | 9,50    | 15,00   | 16,75 |
|            | <b>3a</b> (CILO/FO)      | 5 | 18,00 | 33,00 | 19,00   | 26,50   | 32,50 |
|            | <b>3b</b> (CILO/BPC)     | 5 | 12,00 | 19,00 | 12,25   | 13,00   | 17,50 |
|            | <b>3c</b> (CILO/ODQ)     | 5 | 15,00 | 18,00 | 15,00   | 16,50   | 18,00 |
|            | <b>3d</b> (CILO/BPC/ODQ) | 5 | 16,00 | 28,00 | 16,00   | 21,00   | 28,00 |

**Kruskal-Wallis test**

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| Vrijednost               | 12,5455        |
| Korigirana vrijednost Ht | 12,6464        |
| Df                       | 9              |
| Razina značajnosti       | $P = 0,179268$ |

Tablica 38 prikazuje razlike u FIBTEM MFC vrijednostima između ispitivanih podskupina. Nisu zabilježene značajne razlike u maksimalno dosegnutoj amplitudi (MCF) izoliranog fibrinskog ugruška između ispitivanih parova podskupina **b** i **a**, te **d** i **b** nakon aktivacije koagulacije bez doprinosa trombocita.

Tablica 39. Zbirna tablica svih statistički značajno različitih **b** i **a** parova unutar grupa **1**, **2** i **3** dobivenih agregometrijskih mjerenjima nakon aktivacije s ADP, AA, AA-PGE1 i kolagenom za procjenu djelovanja BPC 157

|         |        | ADP      |          |          | AA       |          |          | AA/PGE1  |          |          | KOL      |          |          |
|---------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|         |        | AUC      | AGG      | VEL      | AUC      | AGG      | VEL      | AUC      | AGG      | VEL      | AUC      | AGG      | VEL      |
| 1. ASK  | b vs a |          |          |          | 1b vs 1a |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 2. KLO  | b vs a | 2b vs 2a | 2b vs 2a | 2b vs 2a |          |          | 2b vs 2a |          |          |          | 2b vs 2a | 2b vs 2a | 2b vs 2a |
| 3. CILO | b vs a |          |          |          | 3b vs 3a | 3b vs 3a | 3b vs 3a | 3b vs 3a | 3b vs 3a | 3b vs 3a |          |          |          |

Tablica 40. Zbirna tablica svih statistički značajno različitih **d** i **b** parova unutar grupa **1**, **2** i **3** dobivenih agregometrijskim mjerenjima nakon aktivacije s ADP, AA, AA-PGE1 i kolagenom za procjenu utjecaja ODQ-a na djelovanje BPC 157

|         |        | ADP |     |     | AA       |          |          | AA/PGE1  |          |          | KOL |     |     |
|---------|--------|-----|-----|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|-----|
|         |        | AUC | AGG | VEL | AUC      | AGG      | VEL      | AUC      | AGG      | VEL      | AUC | AGG | VEL |
| 1. ASK  | d vs b |     |     |     | 1d vs 1b | 1d vs 1b | 1d vs 1b | 1d vs 1b | 1d vs 1b | 1d vs 1b |     |     |     |
| 2. KLO  | d vs b |     |     |     | 2d vs 2b | 2d vs 2b | 2d vs 2b | 2d vs 2b |          |          |     |     |     |
| 3. CILO | d vs b |     |     |     |          | 3d vs 3b | 3d vs 3b | 3d vs 3b | 3d vs 3b | 3d vs 3b |     |     |     |



## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da BPC 157 oporavlja inhibiranu agregabilnost trombocita te da nema utjecaj na viskoelastična svojstva krvnog ugruška u štakora tretiranih aspirinom, klopidogrelom i cilostazolom.

Temeljem rezultata dobivenih u istraživanju Hrelec i suradnika iz 2009. godine dokazano je da BPC 157 sprječava nastanak okluzivnog tromba i ubrzava razgradnju već postojećeg ugruška nakon formiranja termino-terminalne anastomoze abdominalne aorte u štakora. S druge strane, prema podacima objavljenim od Stupnisek i suradnika iz 2012. godine, BPC 157 smanjuje vrijeme krvarenja u štakora tretiranih aspirinom, heparinom i varfarinom, smanjuje pojavnost trombocitopenije nakon amputacije repa životinje, ali nema utjecaja na druge laboratorijske parametre koje uobičajeno koristimo za procjenu koagulacijskog sustava (protrombinsko vrijeme, aktivirano protrombinsko vrijeme, fibrinogen, anti Xa). Također, nema utjecaja na vrijeme krvarenja u životinja netretiranih antikoagulancijama i aspirinom. Iako su oba navedena istraživanja dokazala utjecaj BPC-a 157 na koagulacijski sustav u eksperimentima provedenim *in vivo*, Stupnisek nije dobila statistički značajnu razliku, osim smanjene incidencije trombocitopenije, u vrijednostima laboratorijskih parametara koagulacije.

Ovi zanimljivi i naizgled kontradiktorni rezultati prirodno su nametnuli potrebu za određivanjem djelovanja BPC 157 na agregaciju trombocita i viskoelastična svojstva krvnog ugruška s ciljem utvrđivanja djeluje li BPC 157 proagregacijski ili antiagregacijski na trombocite, te ostvaruje li svoj fibrinolitički utjecaj modulirajući djelovanje endotela ili pak ima i direktno djelovanje na krvne sastavnice koagulacijskog sustava.

Da bismo dobili odgovor na ova pitanja koristili smo dvije *ex vivo in vitro* metode, impendancijsku agregometriju i rotacijsku tromboelastometriju, čime je isključen eventualni utjecaj endotela na provedena mjerenja.

Laboratorijske metode korištene u prijašnjim istraživanjima, kao što su aPTV i PV (Stupnisek i sur., 2012.), vrijednosti koagulacijskih parametara određuju iz plazme, dakle odvojeno od staničnih elemenata. Metode odabrane za ovaj pokus koriste uzorak pune krvi, što znači da priprema ne zahtijeva centrifugiranje niti bilo kakvu drugu manipulaciju uzorkom

te na taj način smanjuju mogućnost lažne ekscitacije ili iscrpljivanja elemenata koagulacijskog sustava. Nadalje, sva mjerenja se odvijaju u uvjetima sličnijim onim fiziološkim, s nesmetanom mogućnošću interakcije trombocita, eritrocita, leukocita s faktorima koagulacije, što daje realnije rezultate posebno obzirom na danas prihvaćenu teoriju staničnog modela koagulacije (Smith i sur., 2009.).

Analizom neobjavljenih rezultata prijašnjih internih pokusa u našem laboratoriju, provedenih radi određivanja referentnih vrijednosti za agregometrijska i tromboelastometrijska mjerenja, nismo uspjeli dokazati bilo kakvo djelovanje BPC-a 157 na agregabilnost trombocita ili viskoelastična svojstva krvnog ugruška u zdravih, netretiranih štakora.

Temeljem rezultata brojnih dosadašnjih istraživanja gdje je BPC 157 uvijek ponovno pokazivao blagotvorno djelovanje u uvjetima poremećene ravnoteže brojnih sustava, ali bez utjecaja kada tog odmaka nema, odlučili smo ispitati njegovo djelovanje u uvjetima agregacije inhibirane antitromboticima.

Inhibicija trombocita se može postići djelovanjem prije razine receptora trombocita, zatim blokiranjem funkcije samih membranskih receptora ili djelovanjem na intracelularne trombocitne signalne puteve. Za ovaj pokus odabrali smo antiagregacijske lijekove koji su svaki predstavnik jedne skupine: aspirin (inhibitor stvaranja aktivnog agonista TXA2 koji utjecaj na inhibiciju ostvaruje prije razine receptora), klopidogrel (direktni blokator P2Y12 receptora, inhibicija na razini receptora) i cilostazol (inhibitor PDE III s inhibicijom na razini unutarstaničnih signalnih puteva).

Da bismo ispitali utjecaj BPC-a 157 na inhibiranost agregacije kod životinja tretiranih različitim antitromboticima (aspirin inhibira agregaciju po aktivaciji s AA, klopidogrel s ADP-om, cilostazol s AA/PGE1) te eventualnu uključenost različitih signalnih puteva unutar trombocita, za aktivaciju agregacije koristili smo četiri agonista različitih mehanizma djelovanja: ADP (direktni topljivi agonist P2Y12 i P2Y1 receptora koji su vezani uz Gi i Gq signalne putove), arahidonsku kiselinu (pospješuje stvaranje TXA2, topljivog agonista TP receptora koji su vezani uz G12/13 i Gq signalne putove), kombinaciju arahidonske kiseline i PGE1 (direktni agonist IP receptora vezanih uz Gs signalni put), te kolagen (direktni adhezivni agonist GP VI receptora vezanih uz ITAM signalni put) (Li i sur., 2010.).

Radi pokušaja diferencijacije eventualno različitog djelovanja BPC 157 na različite putove koagulacije, viskoelastična svojstva krvnog ugruška su se mjerila metodom rotacijske tromboelastometrije po aktivaciji vanjskog puta zgrušavanja tkivnim faktorom, unutarnjeg puta zgrušavanja elagičnom kiselinom, te bez doprinosa trombocita nakon djelovanja citohalazina D (Franz i sur., 2008.).

Dodatno, želeći ispitati eventualnu uključenost NO sustava u djelovanje BPC 157, koristili smo selektivni inhibitor sGC, ODQ.

Vrijednosti dobivene pokusima analizirali smo uspoređujući vrijednosti između podskupina **a** i **b** (da bismo odredili utjecaj BPC 157 na ispitivani parametar) (Tablica 39) te vrijednosti između podskupina **b** i **d** (da bismo odredili utjecaj ODQ-a na djelovanje BPC 157) (Tablica 40) unutar svake skupine zasebno.

Analizom dobivenih rezultata nismo uspjeli potvrditi našu hipotezu. Usporedbom rezultata navedenih parova podskupina **a** i **b**, te **b** i **d** BPC 157 je uvijek oporavljao inhibiranu agregaciju, sa statističkom značajnošću kod životinja tretiranih aspirinom nakon aktivacije arahidonskom kiselinom po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC). Kod životinja tretiranih klopidogetrom utvrdili smo da BPC 157 uzrokuje statistički značajan oporavak inhibirane agregacije nakon aktivacije ADP-om po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC), maksimalnoj postignutoj visini agregacije (AGG) i brzini agregacije (VEL), a nakon aktivacije arahidonskom kiselinom i kolagenom po brzini agregacije (VEL). U skupini životinja tretiranih cilostazolom BPC 157 je uzrokovao oporavak agregacije nakon aktivacije arahidonskom kiselinom po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC), maksimalnoj postignutoj visini agregacije (AGG) i brzini agregacije (VEL), a isti su parametri oporavljeni i nakon aktivacije kombinacijom AA/PGE1 (Tablica 39). Na temelju ovakve disperzije rezultata ne možemo zaključiti da BPC 157 djeluje specifično na agregabilnost trombocita djelujući preko određenog receptora, agonista ili signalnog puta, već je on svoj utjecaj ostvarivao nespecifično, u životinja tretiranih svim antiagregacijskim lijekovima i po aktivaciji svim agonistima.

ODQ je smanjivao utjecaj BPC-a 157 na oporavak agregacije, sa statističkom značajnošću kod aspirinske skupine nakon aktivacije s arahidonskom kiselinom i

kombinacijom AA/PGE1 po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC), maksimalnoj postignutoj visini agregacije (AGG) i brzini agregacije (VEL). Kod životinja tretiranih klopidogetrelom ODQ je isti učinak pokazao nakon aktivacije arahidonskom kiselinom po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC), maksimalnoj postignutoj visini agregacije (AGG) i brzini agregacije (VEL), nakon aktivacije s AA/PGE1 po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC). U skupini životinja tretiranih cilostazolom ODQ je smanjio učinak BPC-a 157 na oporavak agregacije nakon aktivacije arahidonskom kiselinom po maksimalnoj postignutoj visini agregacije (AGG) i brzini agregacije (VEL), a nakon aktivacije s AA/PGE1 po vrijednostima općeg pokazatelja agregabilnosti (AUC), maksimalnoj postignutoj visini agregacije (AGG) i brzini agregacije (VEL) (Tablica 40). Temeljem prijašnjih istraživanja (Li i sur., 2010.) očekivali smo da će ODQ u dozi od 10 mg/kg zbog svog inhibitornog djelovanja na sGC i time smanjivanja stvaranja cGMP-a, povećati agregabilnost trombocita u svim podskupinama **c** (antiagregacijski lijek + ODQ) (Soni i sur., 2011.). Međutim, u našem pokusu on je dovodio do smanjivanja vrijednosti svih parametara u agregometrijskim mjerenjima. Moguće je da je ovakav ishod mjerenja posljedica nekog općeg nepovoljnog djelovanja ODQ-a na štakore u našem modelu koji smo primjetili kod svih životinja po intraperitonealnoj aplikaciji ODQ-a, a koje se onda odrazilo i na djelovanje BPC-a 157 u kombinaciji s njim u podskupinama **d** (BPC 157 + ODQ). Naime, sve bi se životinje ubrzo po aplikaciji ODQ-a doimale lošijeg općeg stanja (vrlo mirne/letargične, brzog i plićeg disanja, uz prisutnu krv u mokraći, pojačanog krvarenja prilikom pristupa u medijastinum).

Rezultati dobiveni tromboelastometrijom krvnog ugruška govore da BPC 157 nema statistički važnog utjecaja niti na jedan od parametara (CT, CFT, ALFA kut, MCF, LI30, ML) nakon 60 minuta mjerenja, dakle u vremenskom rasponu koji smo ovom metodom bili u prilici istražiti. Mogući razlog za ovakav ishod istraživanja utjecaja BPC-a 157 na viskoelastična svojstva krvnog ugruška možemo naći u činjenici da je sama metoda slabo osjetljiva na djelovanje antitrombocitnih lijekova. S druge strane, moguće je da se ubrzana fibrinoliza koju smo očekivali dokazati kod životinja tretiranih BPC-om 157 događa izvan vremena koje smo mi mogli ispitati (izvan intervala od 60 minuta od početka zgrušavanja), ali i da je razgradnja krvnog ugruška koju je opisala Hrelec zapravo rezultat pojačane fibrinolitičke funkcije endotela, a ne samih krvnih sastavnica koagulacijskog sustava.

Svaki od tri odabrana antiagregacijska lijeka započinje svoje inhibicijsko djelovanje drugačijim putem, ali ono što svi imaju zajedničko jest utjecaj na NO/cGMP/cAMP osovinu, tj. svi u konačnici dovode do povećanja koncentracije cGMP-a i cAMP-a. Naime, aspirin i klopido-rel pojačavaju sintezu NO djelujući direktno na NOS III (Chakraborty i sur., 2003.; O' Kane i sur., 2009.; Arrebola i sur., 2004.), a cilostazol inhibirajući fosfodiesterazu III podiže koncentraciju cAMP-a (Geng i sur., 2012.).

Fiziološki utjecaj koji na trombocite ima dušični oksid proizveden u endotelnim stanicama dobro je poznat i većina autora drži da djeluje inhibitory na agregaciju (Gkaliagkousi i sur., 2007.). Iako su Radomski i suradnici još 1990. godine dokazali da L-arginin u trombocitima aktiviranim kolagenom dovodi do povećane proizvodnje NO koji stimulira sGC i uzrokuje porast koncentracije cGMP-a, fiziološka funkcija ovog, u trombocitima proizvedenog, dušičnog oksida jest još uvijek predmet istraživanja, ali i kontroverzi. Naime, neki istraživači opovrgavaju da se NO uopće proizvodi unutar trombocita, neki smatraju da se proizvodi, ali da zbog male količine koja se proizvede nema značajnog utjecaja na agregaciju, a malobrojna grupa autora čak zastupa tezu da u niskim koncentracijama djeluje proagregatorno, dok u velikim količinama djeluje inhibitory (Naseem i sur., 2008.; Ozuyaman i sur., 2005.; Marjanovic i sur., 2005.). Ipak, većina autora koji istražuju ova zbivanja drži da se trombocitni NO proizvodi nakon aktivacije eNOS i iNOS, u količinama daleko manjim nego u endotelnim stanicama te da ima važnu fiziološku ulogu djelujući autokrino i prkrino na autoregulaciju aktivacije i agregacije (Bye i sur., 2016.). Istraživanja signalnih putova unutar trombocita dokazala su da NO preko sGC/cGMP/cAMP osovine inhibira mobilizaciju  $Ca^{2+}$  koji je odgovoran za reorganizaciju citoskeleta i egzocitozu granula po aktivaciji bilo solubilnim agonistom ili kontaktnom aktivacijom preko kolagenskih receptora (Stalker i sur., 2012.).

Trombociti nemaju važnu ulogu samo u hemostazi već je njihova uključenost dokazana i u svim etapama procesa cijeljenja: stvaranju krvnog ugruška, upalnom odgovoru, angiogenezi i remodeliranju tkiva. Odmah nakon što se stvori stabilan ugrušak i zaustavi krvarenje, započinje proces reparacije tkiva. Bliska dvosmjerna veza koagulacijskog i imunološkog sustava potrebna je za restoraciju normalnog tkiva nakon ozljede. Smatra se da trombociti, stabilno adherirani uz međustanični matriks eksponiran prilikom ozljede, fizički sprječavaju da imune stanice potrebne za proces cijeljenja budu strujom krvi otplavljene s mjesta ozljede, pa one tako uhvaćene postaju dio krvnog ugruška, što im omogućava ciljano

lokalno djelovanje. S druge strane,  $\alpha$ -granule su uključene u regulaciju procesa cijeljenja ekspresijom adhezivnih receptora koji olakšavaju interakciju endotelnih stanica i leukocita, ali i sekrecijom kemokina, npr. P-selektina koji se premješta na membranu trombocita i tada sudjeluje u daljnjoj regrutaciji cirkulirajućih monocita, limfocita i neutrofila (Zarbock i sur., 2007.). Trauma je najizravniji način na koji u tkivo mogu dospjeti bakterije i drugi patogeni. Uloga trombocita u borbi protiv mikroorganizama pretpostavljena je indirektno iz primjera njihova adheriranja na mjesta bakterijskih lezija kao kod endokarditisa (Thompson i sur., 1982.). Da njihovi citokini imaju direktno mikrobiološko djelovanje, kao i da oni sami imaju sposobnost internalizacije patogena, dokazano je 2002. godine (Tang i sur., 2002.; Youssefian i sur., 2002.). Precizan mehanizam regulacije antimikrobnog odgovora trombocita nije u potpunosti istražen, ali svakako uključuje njihovu aktivaciju i sekreciju granula (Yeaman i sur., 2014.).

Konačni korak hemostatskog odgovora na svaku ozljedu vodi povratku integriteta zida krvne žile. Ovaj proces uključuje dobro reguliranu proliferaciju i migraciju stanica glatkog mišića, fibroblasta i endotelnih stanica. Trombociti u ovim zbivanjima sudjeluju obiljem svojih kemokina i različitih faktora rasta. Trombocitni faktor rasta (eng. *platelet derived growth factor*, PDGF) posebno sudjeluje u regulaciji proliferacije stanica glatkog mišića i u njihovoj migraciji (Li i sur., 2011.). Sljedeći važan medijator u cijeljenju i remodelaciji jest SDF-1 $\alpha$  koji posreduje mobilizaciju progenitorskih stanica koštane srži, njihov dolazak na mjesto ozljede i diferencijaciju u endotelne progenitorske stanice (Stellos i sur., 2008.). Neki od faktora koji se otpuštaju iz trombocita, kao što su primjerice VEGF i endostatin, imaju ključnu ulogu u revaskularizaciji ozlijeđenog tkiva (Battinelli i sur., 2011.). Trombociti također skladište i otpuštaju regulatore apoptoze ovisne o TNF-u, kao što su CD95, Apo2-L and Apo3-L. Oni osiguravaju ravnotežu između pro- i antiapoptoznih molekula koja je važna za eliminaciju oštećenih stanica s mjesta ozljede i ubrzavanje procesa cijeljenja (Gwanz i sur., 2013.).

Do danas je otkriveno da granule sadrže više od 300 različitih molekula preko kojih trombociti ostvaruju svoj učinak na brojne sustave.  $\alpha$ - granule sadrže adhezivne proteine koji su važni u primarnoj hemostazi (vWF, fibrinogen, fibronektin, vitronektin i trombospondin, dakle većinu molekula preko kojih trombociti ostvaruju svoj učinak na hemostatski sustav), zatim molekule sa angiogenetskim djelovanjem (angiogenin, VEGF), antiangiogenetski aktivne molekule (angistatin, PF4), faktor rasta, proteaze (MMP2, MMP9), faktore tumorskog

nekrotičkog djelovanja ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\beta$ ) i mnoge druge molekule uključene u upalna zbivanja. Delta granule predstavljaju drugi važni sekretorni pretinac i one sadrže uglavnom ADP, ATP, serotonin, kalcij, pirofosfate i polifosfate. Imaju ključnu ulogu u primarnoj hemostazi djelujući kao aktivator stimulirajući P2Y12 receptore ADP-om. Lizosomi u trombocitu su treći odjeljak koji ima sposobnost sekrecije. Oni sadrže hidrolaze i imaju ulogu u fibrinolizi i degradaciji tromba, remodeliranju vaskulature te razgradnji fagocitiranih mikroba.

Redosljed egzocitoze granula govori u prilog teoriji da sekrecija sadržaja trombocitnih granula ima važnu ulogu u kontroli mikrookoliša u uvjetima ozljede tkiva. Iako još uvijek nije sasvim razjašnjeno na koji način je egzocitoza regulirana, iz dosadašnjih istraživanja je jasno da se taj proces ne odvija nasumice (Witeheart i sur., 2011.). Italiano i suradnici su u svom radu iz 2008. godine predložili tezu da trombociti skladište i otpuštaju sadržaj svojih granula na tematski način, npr. promovirajući angiogenezu otpuštanjem VEGF-a u jednim uvjetima, a suprimirajući ju u drugim otpuštanjem antiangiogenetskih molekula iz različitih područja  $\alpha$ -granula. Ova hipoteza tematske sekrecije proizašla je iz opservacije da su pro- i anti-angiogenetske molekule nađene uskladištene u različitim odjeljcima unutar  $\alpha$ -granula. Da granule ostvaruju svoju ulogu lučeći mnoge aktivne supstancije koje imaju suprotan efekt na tematski način vidljivo je i iz radova drugih autora. Heijnen i suradnici su 2015. godine otkrili da pojedine subpopulacije  $\alpha$ -granula različito reagiraju na različite podražaje i otpuštaju aktivne tvari prema potrebama tkiva. Dokazali su i da je sadržaj unutar  $\alpha$ -granula segregiran te da je moguće postići odvojenu sekreciju određenih dijelova granula. Podržavajući ovu tezu, Kamykowski i suradnici su 2011. godine dokazali da je sadržaj granula organiziran u odjeljene skupine, a Ma i suradnici u svom radu iz 2005. godine sugeriraju da se specifične molekule otpuštaju iz odijeljenih dijelova granula kao posljedica aktiviranja trombocita različitim agonistima. Ova hipoteza izazvala je veliko zanimanje predstavivši trombocite kao pametne nosače koji mogu dostaviti svoj sadržaj u kontekstu konkretnih trenutačnih fizioloških potreba.

Razumijevanje uloge sekrecije trombocita u cijeljenju i regeneraciji tkiva dovelo je do razvoja novih modaliteta liječenja koji se koriste ponajviše u traumatologiji. Gelovi od autologne trombocitima bogate plazme (eng. *platelet rich plasma*, PRP) pokazali su se iznimno uspješnima u liječenju brojnih patoloških stanja, primjerice kožnih rana, kroničnih dijabetičkih vrijedova te u regeneraciji ozljeda tetiva, ligamenata i živaca (Nurden i sur., 2008.).

Zanimljivo je ovdje osvrnuti se na sličan utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na proces cijeljenja. Višebrojna istraživanja uvijek iznova dokazuju da on veoma snažno stimulira cijeljenje različitih tkiva, primjerice mišića, živaca i kostiju, te da ostvaruje čitav niz blagotvornih učinaka duž gastrointestinalnog trakta (Sikiric i sur., 1993.; Sikiric i sur., 2010.; Ilic i sur., 2011.; Sikiric i sur., 2006.; Sikiric i sur., 2011.). Pentadekapeptid BPC 157 pospješuje zacjeljivanje ozljeda struktura koje uvriježeno imaju mali potencijal za sanaciju, kao primjerice u modelima cijeljenja mišića (Staresinic i sur., 2006.; Novinscak i sur., 2008.; Pevec i sur., 2010.), opekline kože (Seiwerth i sur., 1997.; Mikus i sur.; 2001., Sikiric i sur., 2003.), kosti (Keremi i sur., 2009.) tetiva (Chang i sur., 2014.; Krivic i sur., 2008.), ligamenata (Cerovecki i sur., 2010.), perifernih živaca (Gjurasin i sur., 2010.), krvnih žila (Hrelec i sur., 2009.) te mozga (Tudor i sur., 2010.). On potiče oporavak funkcije donjeg sfinktera i pilorusa u modelu upale jednjaka (Dobric i sur., 2007.; Petrovic i sur., 2006.), pospješuje zaraštanje intestinalnih anastomoza (Klicek i sur., 2008.) te dovodi do ubrzanog zatvaranja duodenokutanih, gastrokutanih i kolonokutanih fistula (Klicek i sur., 2008.; Cesarec i sur., 2013.).

Iz navedenog možemo zaključiti da se specifično djelovanje BPC 157 i trombocita kao čimbenika koji pametno i ciljano djeluju u uvjetima poremećene homeostaze velikim dijelom preklapa. U svjetlu analize rezultata dobivenih ovim pokusom, a imajući u vidu i sva dosadašnja istraživanja BPC-a 157, smatramo da je moguće da on dio svog učinka ostvaruje modulirajući NO sustav u trombocitima u uvjetima otklona od homeostaze, dovodeći do smanjenja koncentracije cGMP-a i cAMP-a, a time i posljedičnog oporavka o NO ovisne mobilizacije  $Ca^{2+}$  ključne za reorganizaciju citoskeleta i egzocitozu, koji onda dovode do pojačane ekspresije integrinskih receptora (agregacija) i tematske sekrecije granula (hemostaza, upalno i antimikrobno djelovanje, angiogeneza, cijeljenje tkiva).

Uobičajeno je da se kod bolesnika koji primaju antiagregacijsku terapiju planirani operacijski zahvat odgađa 5-7 dana od prestanka uzimanja lijeka kako bi se oporavila funkcija trombocita i izbjeglo pojačano intraoperacijsko krvarenje koje uzrokuje povećanje stope morbiditeta i mortaliteta. Kod bolesnika kojima je nužno učiniti hitan operativni zahvat bez mogućnosti takove odgode, BPC 157 bi svojim povoljnim učinkom na oporavak funkcije trombocita mogao smanjiti rizik od pojačanog krvarenja i razvoja posttransfuzijskih komplikacija.



## 6. ZAKLJUČAK

Ovim pokusom nismo potvrdili hipotezu da BPC 157 smanjuje agregaciju trombocita i uzrokuje ubrzanu razgradnju krvnog ugruška u štakora tretiranih aspirinom, klopidogrelom i cilostazolom.

1. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da BPC 157 utječe na trombocite oporavljajući inhibiranu agregaciju kod:

- a) životinja tretiranih aspirinom po AUC vrijednostima nakon aktivacije arahidonskom kiselinom,
- b) životinja tretiranih klopidogrelom po AUC, AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije ADP-om, po VEL vrijednostima nakon aktivacije arahidonskom kiselinom, te po AUC, AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije kolagenom,
- c) životinja tretiranih cilostazolom po AUC, AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije arahidonskom kiselinom, kao i kombinacijom arahidonske kiseline i prostaglandina E1.

2. Rezultati ovog istraživanja govore da ODQ smanjuje djelovanje BPC-a 157 na oporavak agregacije trombocita kod:

- a) životinja tretiranih aspirinom po AUC, AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije arahidonskom kiselinom, kao i kombinacijom arahidonske kiseline i prostaglandina E1,
- b) životinja tretiranih klopidogrelom po AUC, AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije arahidonskom kiselinom, te po AUC vrijednostima nakon aktivacije kombinacijom arahidonske kiseline i prostaglandina E1,
- c) životinja tretiranih cilostazolom po AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije arahidonskom kiselinom, te po AUC, AGG i VEL vrijednostima nakon aktivacije kombinacijom arahidonske kiseline i prostaglandina E1.

3. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da BPC 157 nema značajan učinak na viskoelastična svojstva krvnog ugruška po CT, CFT, ALFA, MCF, LI 30 niti ML vrijednostima nakon 60 minuta mjerenja.

Iz prezentiranih rezultata zaključujemo da BPC 157 oporavlja agregaciju trombocita inhibiranu djelovanjem aspirina, klopidogrela i cilostazola, te da nema utjecaja na viskoelastična svojstva krvnog ugruška u štakora.

Činjenica da pentadekapeptid BPC 157 povoljno djeluje na poremećaje hemostaze ciljano inducirane antiagregacijskim lijekovima značajna je znanstvena novost koja bi se u budućoj kliničkoj praksi mogla iskoristiti za dobrobit pacijenata u cilju smanjenja rizika od pojačanog krvarenja u bolesnika koji primaju takve lijekove, a podvrgavaju se hitnom operativnom zahvatu.

## 7. CITIRANA LITERATURA

Antithrombotic Trialists Collaboration (2002). Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* 324:71-86.

Arrebola MM, De la Cruz JP, Villalobos MA, Pinacho A, Guerrero A, Sánchez de la Cuesta F (2004). In vitro effects of clopidogrel on the platelet-subendothelium interaction, platelet thromboxane and endothelial prostacyclin production, and nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:74-82.

Awtry EH, Loscalzo J (2000). Aspirin. *Circulation* 101:1206-1218.

Balenovic D, Lovric-Bencic M, Udovicic M, Simonji K, Separovic-Hanzevacki J, Barisic I, Kranjcevic S, Prkacin I, Coric V, Brcic L, Coric M, Brcic I, Borovic S, Radic B, Drmic D, Vrcic H, Seiwerth S, Sikiric P (2009). Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: A relation with NO-system. *Regul Pept* 156:83-89.

Barisic I, Radic R, Sever S, Ilic V, Bilic I, Berkopic M, Udovicic M, Filipovic L, Brcic D, Kolenc M, Lovric-Bencic M, Seiwerth S, Sikiric P (2009). Effect of pentadecapeptide BPC 157 on myocardial infarction in rat induced by isoprenaline hydrochloride. *J Physiol Pharmacol* 60:9-10.

Barisic I, Balenovic D, Klicek R, Radic B, Nikitovic B, Drmic D (2013). Mortal hyperkalemia disturbances in rats are NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. *Reg Pept* 181:50-66.

Baugh RJ, Broze GJ Jr., Krishnaswamy S (1998). Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 273:4378-4386.

Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE (2011). Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* 118:1359-1369.

Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E, Fuchs S (2009). Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy. *Am J Cardiol* 104:227-233.

Berntorp E, Shapiro AD (2012). Modern haemophilia care. *Lancet* 379:1447-1456.

Bhatt DL (2007). Intensifying platelet inhibition: navigating between Scylla and Charybdis. *N Engl J Med* 357:2078-2081.

Bizzozzero J (1982). On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 90:261-262.

- Boban Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Seiwerth S, Sikiric P (2006). The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of NG -nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med Sci Monit* 12:36-45.
- Bollati M, Gaita F, Anselmio M (2011). Antiplatelet combinations for prevention of atherothrombotic events. *Vasc Health Risk Manag* 7:23–30.
- Born GV (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927.
- Bosnjak ZJ, Graf BM, Sikiric P, Stowe DF (1994). Protective effect of newly isolated gastric peptide following hypoxic and reoxygenation injury in the isolated guinea pig heart. *FASEB J* 8:A 12.
- Brass L, Wannemacher K, Ma P (2011). Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemo* 9:66–75.
- Brass LF. Thrombin and platelet activation (2003). *Chest* 124:18-25.
- Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM (2016). Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost* 14:918-930.
- Cardinal DC, Flower RJ (1980). The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Method* 3:135–158.
- Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L, Radic B, Vukoja I, Seiwerth S (2010). Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res* 28:1155-1161.
- Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujić D, Drmic D (2013). Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur J Pharm* 701:203-212.
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 129:307–21.
- Chakraborty K, Khan GA, Banerjee P, Ray U, Sinha AK (2003). Inhibition of human blood platelet aggregation and the stimulation of nitric oxide synthesis by aspirin. *Platelets* 14:421–427.
- Chang CH, Tsai WC, Hsu YH, Pang JH, Lin MS (2014). Pentadecapeptide BPC 157 enhances the growth hormone receptor expression in tendon fibroblasts. *Molecules* 19:19066-19077.
- Chen J, Lopez JA (2005). Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* 12:235-246.
- Chapin JC, Hajjar KA (2014). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev* 29:17-24.

Charles A (2001). A history of blood coagulation. Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, Minnesota.

Cozzi MR, Guglielmini G, Battiston M, Momi S, Lombardi E, Miller EC, De Zanet D, Mazzucato M, Gresele P, De Marco L (2015). Visualization of nitric oxide production by individual platelets during adhesion in flowing blood. *Blood* 125:697-705.

Daniel JL, Ashby B, Pulcinelli F (2002). Platelet signaling: cAMP and cGMP. U: Gresele P, Page C, Fuster V, Vermylen J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. Cambridge: Cambridge University Press, s290–304.

Davie EW, Ratnoff OD (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145:1310-1312.

Defontis M, Cote S, Stirn M, Ledieu D (2013). Optimization of multiplate whole blood platelet aggregometry in the Beagle dog and Wistar rat for ex vivo drug toxicity testing. *Exp Toxicol Pathol* 65:637–644.

Dobaczewski M, Golański J, Kowalski T, Nocuń M, Rózalski M, Kostka B (2008). Can we use adenosine diphosphate (ADP) to study “aspirin resistance”? The Janus faces of ADP-triggered platelet aggregation. *Pharmacol Rep* 60:361-368.

Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB (2007). Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharm Sci* 104:7-18.

Esmon CT, Vigano-D'Angelo S, D'Angelo A (1987). Anticoagulation proteins C and S. *Adv Exp Med Biol* 214:47-54.

Franz RC (2009). ROTEM analysis: significant advance in the field of rotational thrombelastography. *S Afr J Surg* 47:2-6.

Furie B, Furie BC (2005). Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* 115:3355–3362.

Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A (2007). Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res* 101:654-662.

Garabedian T, Alam S (2013). High residual platelet reactivity on clopidogrel: its significance and therapeutic challenges overcoming clopidogrel resistance. *Cardiovasc Diagn Ther* 3:23-37.

Gazzaniga V, Ottini L (2001). The discovery of platelets and their function. *Vesalius* 7:22-26.

Geng DF (2012). Cilostazol-based triple antiplatelet therapy compared to dual antiplatelet therapy in patients with coronary stent implantation: a meta-analysis of 5,821 patients. *Cardiology* 122:148-157.

Ghoshal K, Bhattacharyya M (2014). Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *Scientific World J* 2014:781857.

Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L (2010). Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept* 160:33-41.

Golebiewska EM, Poole AW (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 29:153-62.

Gorog DA (2010). Prognostic value of plasma fibrinolysis activation markers in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 55:2701-2709.

Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S (1997). The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol (Paris)* 91:139-149.

Gresele P, Falcinelli SM (2011). Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 72:634-646.

Hallas J (2006). Use of single and combined antithrombotic therapy and risk of serious upper gastrointestinal bleeding: population based case-control study. *Br Med J* 333:726-732.

Hartert H (1948). Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 26:577-583.

Heijnen H, van der Sluijs P (2015). Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules or not? *J Thromb Haemost* 13:2141-2151.

Hoffman M, Monroe IDM (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85:958-965.

Hoffman M (2003). A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev* 17:1-5.

Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko I, Seiwerth S (2009) Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol* 7:161-165.

Hunt BJ (2014). Bleeding and coagulopathies in critical care. *N Engl J Med* 370:2153.

Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L (2011). Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life sci* 88:535-542.

Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Coric M, Brcic L (2010). High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharma* 61:241-250.

Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 111:1227-3123.

Jackson SP (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109:5087-5095.

Jelovac N, Sikiric P, Rucman R (1998). A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry* 43:511-519.

Kasotakis G, Pipinos II, Lynch TG (2009). Current evidence and clinical implications of aspirin resistance. *J Vasc Surg* 50:1500–1510.

Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B (2011). Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet alpha-granules. *Blood* 118:1370–1373.

Keremi B, Lohinai Z, Komora P, Duhaj S, Borsi K, Jobbagy-Ovari G (2009). Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharm* 60 Suppl 7:115-122.

Kirkeby A, Torup L, Bochsén L, Kjalke M, Abel K, Theilgaard-Monch K, Johansson P, Søren E (2008). High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost* 99: 720–728.

Kim S, Quinton TM, Cattaneo M, Kunapuli SP (2000). Evidence for diverse signal transduction pathways in thrombin receptor activating peptide (SFLLRN) and other agonist-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood* 96:242a–240.

Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I (2008). Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocolocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharma Sci* 108:7-17.

Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T (2004). Roles of thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE deficient mice. *J Clin Invest* 114:784-794.

Kol A, Borjesson DL (2010). Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* 39:405-416.

Kolandaivelu K, Bhatt DL (2011). Antiplatelet therapy in coronary heart disease prevention. *Cardiol Clin* 29:7185.

Krivic A, Majerovic M, Jelic I, Seiwerth S, Sikiric P (2008). Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. *Inflamm Res* 7:205-210.

Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BG, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC (2012). The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep* 1:185-190.

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2341-2349.

Li L, Blumenthal DK., Terry CM, He Y, Carlson M, Cheung AK. (2011). PDGF-induced proliferation in human arterial and venous smooth muscle cells: molecular basis for differential effects of PDGF isoforms. *J Cell Biochem* 112:289–298.

Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki J, Seiwerth S, Rogic D, Kusec V, Aralica G, Konjevoda P, Batelja L, Blagaic AB (2004). Doxorubicinecongestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and pentadecapeptide BPC 157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci* 95:19-26.

Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, Wallace JL (2005). Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci* 102:216–220.

Macfarlane RG (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202:498-499.

Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH (1992). Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol* 29:213–226.

Marjanovic JA, Li Z, Stojanovic A, Du X (2005). Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J Biol Chem* 280:37430-37438.

Michelson AD (2010). Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular diseases. *Nat Drug Disc* 9:154-169.

Michelson AD. *Platelets* (2013). 3th edn., Elsevier, London.

Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N (2001). Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 27:817-827.

Morrissey JH (1996). Plasma factor VIIa: measurement and potential clinical significance. *Haemostasis* 26:66–71.

Morrissey JH, Tajkhorshid E, Sligar SG, Rienstra CM (2012). Tissue factor/factor VIIa complex: role of the membrane surface. *Thromb Res* 129:S8–10.

Motulsky HJ, Insel PA (1982) Dihydroergocryptine binding to alpha-adrenergic receptors of human platelets. A reassessment using the selective radioligands [<sup>3</sup> H] prazosin, [<sup>3</sup> H] yohimbine, and [<sup>3</sup> H] rauwolscine. *Biochem Pharmacol* 31:2591–2597.

Naseem KM (2008). eNOS, iNOS or no NOS, that is the question! *J Thromb Haemost* 6:1373-1375.

Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, Jukic I, Radic B, Pevec D (2008). Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Tod* 38:716-725.



- Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E (2008). Platelets and wound healing. *Front Biosci* 13:3532–3548
- O’Kane P, Xie L, Liu Z, Queen L, Jackson G, Ji Y, Ferro A (2009). Aspirin acetylates nitric oxide synthase type 3 in platelets thereby increasing its activity. *Cardiov Res* 83:123–130.
- Ozüyaman B, Gödecke A, Küsters S, Kirchhoff E, Scharf RE, Schrader J (2005). Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Thromb Haemost* 93:1161-1167.
- Packham MA (1994). Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 72:278-284.
- Pape C, Weber F, Stein P, Zacharowski K(2010). ROTEM and multiplate – a suitable tool for POC? *ISBT Sci Ser* 5:161–168.
- Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M (2011). Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 119:39-63.
- Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB (2006). An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharm Sci* 102:269-277.
- Pevec D, Novinscak T, Brcic L, Sipos K, Jukic I, Staresinic M (2010). Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Mon* 3:81-88.
- Quinn MJ, Fitzgerald DJ (1999). Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 100:1667-1672.
- Roth GJ, Calverley DC (1994). Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood* 83:885-898.
- Satoh K, Fukasawa I, Kanemaru K, Yoda S, Kimura Y, Inoue O, Ohta M, Kinouchi H, Ozaki Y (2012). Platelet aggregometry in the presence of PGE(1) provides a reliable method for cilostazol monitoring. *Thromb Res* 130:616-621.
- Sallah S (1997). Inhibitors to clotting factors. *Ann Hematol* 75:1-7.
- Sandor Z, Vincze A, Jadus MR, Dohoczky C, Erceg D, Szabo S (1997). The protective effect of newly isolated peptide PL-10 in the iodoacetamide colitis model in rats. *Gastroneterology* 112:400-401.
- Schneider M, Nesheim M (2004). A study of the protection of plasmin from antiplasmin inhibition within an intact fibrin clot during the course of clot lysis. *J Biol Chem* 279:13333–13339.
- Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljbanovic D, Coric V, Konjevoda P, Petek M, Rucman R, Turkovic B, Perovic D (1997). BPC 157 effect on healing. *J Physiol* 91:173-178.

- Seiwerth S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M (2014). BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Desig* 20:1121-1125.
- Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D (2009). Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Digest Diseases Sci* 54:2070-2083.
- Shattil SJ (2009). The beta3 integrin cytoplasmic tail: protein scaffold and control freak. *J Thromb Haemost* 7:210–213.
- Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L (2011). Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr pharm Design* 7:1612-1632.
- Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L (2014). Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Design* 20:1126-1135.
- Sikiric P, Jelovac N, Jelovac G, Dodig G, Staresinic M, Anic T, Zoricic I, Perovic D, Aralica G, Buljat G, Prkacin I, Lovric-Bencic M, Separovic J, Seiwerth S, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Ziger T (2001). Anxiolytic effect of BPC 157, a gastric pentadecapeptide: shock probe/burying test and light/dark test. *Acta Pharmacol Sin* 22:225-230.
- Sikiric P, Marovic A, Matoz W (1999b). A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Physiol* 93:505-512.
- Sikiric P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rotkvic I, Jagic V, Mildner B, Duvnjak M, Lang N (1993). A new gastric juice peptide, BPC-an overview of stomach/stress/organoprotection hypothesis and BPC beneficial effects. *J Physiol* 87: 313-327.
- Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z (1997a). The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol* 332:23-33.
- Sikiric P, Mazul B, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Zoricic I, Jurina Lj, Konjevoda P, Hanževački M, Gjurasin M, Separovic J, Ljubanovic D, Artukovic B, Bratulic M, Tisljar M, Miklic P, Sumajstorcic J (1997b). Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. *Dig Dis Sci* 42:661-671.
- Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, Rotkvic I, Jagic V, Duvnjak M, Mise S (1994). The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesion induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 54:63-68.
- Sikiric P (1999a). The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL- 10) *Inflammopharmacology* 7:1-14.

Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B (2010). Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Design* 16:1224-1234.

Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V (1996a). Beneficial effect of novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci* 41:1604–1614.

Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Zoricic I, Jurina Lj, Konjevoda P, Hanzevacki M, Ljubanovic D, Separovic J, Gjurasin M, Bratulic M, Artukovic B, Jelovac N, Buljat G (1996b). Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 41:1518-1526.

Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N (2003). Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. *Burns* 9:323-334.

Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B (2008). Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 100:397-404.

Smith SA (2009). The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care* 19:3–10.

Soni H, Jain M, Mehta AA (2011). Investigation into the mechanism(s) of antithrombotic effects of carbon monoxide releasing molecule-3 (CORM-3). *Thromb Res* 127:551-559.

Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF (2012). Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol* 210:59–85.

Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S (2006). Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 24:1109-1117.

Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T (2008). Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34<sup>+</sup> cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 117:206–215.

Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, Hrelec M, Kolenc D, Radic B (2012). Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb Res* 129:652–659.

Stupnisek M, Kokot A, Drmic D, Hrelec PM, Sever AZ, Kolenc A, Radic B, Suran J, Bojic D, Vcev A, Seiwerth S, Sikiric P (2015). Pentadecapeptide BPC 157 Reduces Bleeding and Thrombocytopenia after Amputation in Rats Treated with Heparin, Warfarin, L-NAME and L-Arginine. *PLOS ONE* | doi:10.1371/journal.pone.012345.

Tanaka KA, Key NS, Levy JH (2009). Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 108:1433–1446.

- Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME (2002). Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 70:6524–6533.
- Thakur M, Ahmed AB (2012). A review of thromboelastography. *Int J Periop Ultras Appl Technol* 1:25-29.
- Thompson J, Meddens MJ, Thorig L, van Furth R (1982). The role of bacterial adherence in the pathogenesis of infective endocarditis. *Infection* 10:196–198.
- Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situm K (2007). Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Euro J Pharm* 570:212-221.
- Tohyama Y, Sikiric P, Diksic M (2004). Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Scien* 76:345-357.
- Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W (2006). Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 96:781-788.
- Tudor M, Jandric I, Marovic A, Gjurasin M, Perovic D, Radic B (2010). Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul Pept* 160:26-32.
- Turkovic B, Sikiric P, Seiwert S, Mise S, Ante T, Petek M (2004). Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology* 126:287-288.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B (2011). STIM and Orai in platelet function. *Cell Calcium* 50:270–278.
- Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterio Throm Vasc Biol* 28:403-412.
- Veljaca M, Lech CA, Pillana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A (1994). BPC 157 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272:417.
- Veljaca M, Lesch CA, Sanchez B, Low J, Guglietta A (1995). Protection of BPC 157 on TNBS induced colitis in rats: Possible mechanisms of action. *Gastroenterology* 108:936-938.
- Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057–1068.
- Wilhite DB, Comerota AJ, Schmieder FA (2003). Managing PAD with multiple platelet inhibitors: the effect of combination therapy on bleeding time. *J Vasc Surg* 38:7103.
- Whiteheart S (2011). Platelet granules: surprise packages. *Blood* 118:1190-1191.

Wohlauer MV, Moore EE, Harr J, Gonzalez E, Fragoso M, Silliman C (2011). A standardized technique for performing thromboelastography in rodents. *Shock* 36:524-526.

Wolberg AS (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev* 21:131–42.

Yeaman MR (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol* 12:426–437.

Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM (2002). Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 99:4021–4029.

Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K (2007). Platelet–neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 21:99–111.

Zhenyu Li, Delaney M, O'Brien KA, Du X (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2341-2349.

## **ŽIVOTOPIS AUTORA**

Sanja Konosić rođena je 19.05.1972. godine u Brežicama, Republika Slovenija.

Od rođenja živi u Samoboru gdje je i završila osnovno obrazovanje. Nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja u MIOC-u "Vladimir Popović" u Zagrebu, upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1998. godine, nakon čega obavlja redoviti pripravnički staž u KBC-u Zagreb. Specijalizaciju anesteziologije, reanimatologije i intenzivne medicine započela je na 2002. na Odjelu za anesteziologiju i intenzivno liječenje kardiokirurških bolesnika KBC-a Zagreb, gdje i danas radi. Specijalistički ispit položila je 2006. godine, a subspecijalistički ispit iz intenzivne medicine 2012. godine. Naslov primarijus stječe 2016. godine.

Koautor je 20 znanstvenih članaka iz područja koagulacije, te aktivni sudionik brojnih domaćih i stranih stručnih i znanstvenih skupova.