

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Vlado N. Antić

**Procena angiogenih i anti-inflamatornih efekata
ekstrakorporealne terapije zvučnim udarnim
talasima na animalnom modelu ishemije kožnih
režnjeva**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Vlado N. Antonić

**Evaluation of Angiogenic and Anti-inflammatory
Effects of Ekstracorporeal Shockwave Therapy in
Animal Model of Ischemic Skin Flaps**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

Dr. Biljana Božić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Dr. Aleksander Stojadinovic, profesor, Uniformed Services University of Health Sciences,
Betezda, Merilend, SAD

Članovi komisije:

Akademik Dr. Miodrag Čolić, profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije,
Univerzitet odbrane u Beogradu i redovni član SANU

Dr. Marijan Novaković, profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije,
Univerzitet odbrane u Beogradu i načelnik Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Moja avantura u svet nauke i svet uopšte, počela je uz ogromnu podršku, pomoć i razumevanje moje porodice, mojih roditelja i sestara, Gordane i Bojane, koji su mi u trenutcima dvoumljenja, posustajanja i sumnji bili najveća podrška i moj veliki oslonac. Oni samo mogu da naslute koliko su mi pomogli, koliko sam im zahvalan i koliko ih volim.

Na životnom putu ponekad upoznamo osobe u čijim je karakterima duboko usađen duh izuzetnost... i one sa strašću idu kroz svet nauke, strašću koja ne utihne, ni proticanjem vremena, i ne utihne bez obzira na sve prepreke sa kojima se sretnu. Ovim bih želeo da se zahvalim tim dragim osobama, koje sam imao čast da sretnem, da ih upoznam, sa njima saradjujem i da imam privilegiju da ih nazovem prijateljima.

Veliko hvala Prof. Dr. Biljani Božić na njenim predavanjima i savetima, kako na osnovnim tako i na doktorskim studijama. Posebno joj se zahvaljujem na strpljenju koje je imala tokom vođenja mog dokorskog projekta i trudu koji je uložila da se on uspešno završi.

Zahvljujem se i Prof. Dr. Alexanderu Stojadinovicu na ukazaaj šansi da se pridružim njegovom timu istraživača, njegovoj podršci tokom naše saradnje, na svemu što je učinio da bi se premostile sve prepreke na našem zajedničkom putu i moj dosadašnji rad uobličio u doktorsku disertaciju. Dr Stojadinović me je svojim primerom naučio šta to znači vojnička disciplina i istrajnost. Hvala Vam na nesebičnom prijateljstvu.

Zahvaljujem se Akademiku Prof. Dr. Miodragu Čoliću na njegovoj podršci, na gostoprimstvu u njegovoj laboratoriji, gde sam proveo divnih godinu dana i gde sam pod njegovim mentorstvom radio i učio o imunologiji.

Veliko hvala dugujem i Prof. Dr. Anthony J. Bauer koji me je primio ne samo u njegovu laboratoriju tokom našeg zajedničkog rada, već i u njegovu porodicu sa kojom sam proveo nekoliko divnih meseci i sa kojim sam saradjivao tokom izrade većeg dela predstavljenih rezultata.

Hvala i mom prijatelju, Prof. Dr. Spomenku Mihajloviću na bezbroj vrednih saveta, na šansi da još tokom osnovnih studija budem deo izuzetno interesantnog istraživanja vezanog za biomagnetizam, njegovoj stalnoj podršci, na vremenu provedenom u dugim razgovorima i posebno mu se zahvaljujem na rečima ohrabrenja upućenim mojim roditeljima kada je to i njima i meni bilo najpotrebnije.

Marina, hvala ti na svemu lepom što si sa sobom unela u moj život.

Hvala Vam.

Sažetak

Skoro 30 godina terapija zvučnim udarnim talasima (engl. Extracorporeal Shock Wave Therapy, ESWT) je u upotrebi u kliničkoj praksi kao efikasan tretman za razbijanje kamena u urinarnom traktu. Ova tehnologija je kasnije razvijena i kao efikasan neinvazivan tretman za različite indikacije u ortopediji i traumatologiji uključujući i komplikovane rane koje ne zarastaju. Udarni zvučni talasi su tranzijentni, kratkotrajni akustički pulsevi sa visokim pikom pritiska, koji se dostiže u veoma kratkom vremenu, mereno nanosekunadama (jedan bilioniti deo sekunde). Udarni zvučni talasi koji se koriste u medicini se generišu putem tri tipa generatora i fizičkih rešenja: elektrohidraulički, piezoelektrični i elektromagnetni čiji je krajnji cilj da prenese fizičku energiju do ciljnog tkiva.

Odloženo zarastanje, ili rane koje ne zarastaju predstavljaju veliki teret za svakog pacijenta, značajno umanjujući njegov kvalitet života. Velika briga o pacijentu i rani je neophodna u ovim slučajevima i ovo je veliki problem za društvo u smislu smanjene produktivnosti ljudi kao i smislu velikih finansijskih izdataka za zdravstvo. Sa druge strane, teške povrede kao one koje se viđaju u oružanim sukobima i saobraćajnim nesrećama predstavljaju glavni uzrok smrti u mlađoj adultnoj populaciji. Tehnološki napredak, i napredak u dostupnim terapeutima, koji dovodi do inicijalnog povećanja preživljavanja pacijenata nije praćen razvojem lekova koji su usmereni protiv moguće prateće sistemske inflamacije, koja često progresira do sindroma sistemskog inflamatornog odgovora i sindroma propadanja organskih sistema koji mogu dovesti i do smrtnog ishoda. Zbog svega prethodno pomenutog, finansijski pristupačni, neinvazivni i efikasni tretmani su neophodni da bi se postiglo ubrzavanje i potpuno zarastanje problematičnih rana kao i redukovala cena lečenja. Zbog toga je neophodno utvrditi potencijalnu primenljivost ESWT u relevantnim animalnim modelima i kod pacijenata, i ispitati i razjasniti biološke mehanizme ove terapije.

Nekoliko eksperimentalnih i kliničkih studija je pokazalo efikasnost ESWT za ubrzavanje oporavka ostećenog tkiva i regeneraciju različitih rana. Međutim, biološki

mehanizmi kojima se ovi procesi ubrzavaju su ostali neobjašnjeni. U ovom radu, su ispitani efekti ESWT na molekularnom, ćelijskom i sistemskom nivou kako bi proširili i produbili znanja o mehanizmu delovanja ove terapije što je glavni cilj ove disertacije. Jedan od ciljeva je bio i da se utvrdi značaj vremena aplikacije tretmana i da se ispita efekat ESWT na neoangiogenezu i sprečavanje procesa nekroze tkiva kao posledice ishemije. Zbog opšteprihvaćenog mišljenja o opasnosti primene ESWT na abdomen i izbegavanja njene primene za različite indikacije u oblasti abdomena, pokušali smo da utvrdimo da li je primena ESWT bezbedna i upotrebljiva u ovoj regiji kako bi se proširila lista indikacija primene ove terapije. Procenjuvan je imunomodulatorni efekat ESWT u modelu inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanog teškom traumom (engl. Tissue Bone Matrix model, TBX) kao i potencijalnu kliničku vrednost ESWT u supresiji inflamacije i postoperativnog ileusa izazvanog hirurškom manipulacijom crevima.

U ovom radu pokazani su pozitivni efekti ESWT u sva tri animalna modela, modelu ishemičnih režnjeva kože, TBX modelu i modelu postoperativnog ileusa. Rezultati su potvrdili povećanje perfuzije, supresiju formiranja edema, kao i angiogeni potencijal ESWT u modelu ishemije kožnih režnjeva. Dodatno je pokazano da ovi efekti nisu ograničeni samo na tkivo pod direktnim uticajem udarnog zvučnog talasa već da se efekti mogu uočiti i na udaljenim tkivima i ćelijama kao i na sistemskom nivou. Mi smo uspešno razvili i opisali TBX model i koristeći ga pokazali da ESWT utiče na inflamaciju i nakon velike traume. Pretretman sa ESWT ima značajne protektivne efekte protiv veoma nepovoljnih efekata teške traume modulacijom inflamacije i u oštećenom tkivu kao i na sistemskom nivou. Zbog nepredvidljivosti vremena traume, mi smo se okrenuli modelu koji je klinički mnogo praktičniji zbog precizno definisanog vremena hirurške intervencije, modelu postoperativnog ileusa. U ovom modelu, pokazani su protektivni efekti primene ESWT kao pretretmana, kao i pozitivni efekti na očuvanje gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanog hirurškim manipulisanjem gastrointestinalnim traktom i supresiju inflamatornog odgovora i to na molekularnom (promena u ekspresiji nekoliko gena i proteina), ćelijskom (smanjena infiltracija aktiviranih leukocita) i sistemskom nivou (kroz modulisanje serumskim nivoima pro i antiinflamatornih citokina i hemokina).

ESWT je obećavajuća, relativno nova i neinvazivna terapija čija klinička upotreba konstanto raste poslednjih nekoliko decenija. Ona pokreće sopstvene mehanizme za borbu protiv povreda i sprečava negativne efekte posledične inflamacije putem modulacije imunskog odgovora, pospešivanja procesa neoangiogeneze kao i brzine sazrevanja novoformiranih krvnih sudova. Dalja izučavanja su neophodna da bi se u potpunosti razumeo mehanizam delovanja i njena primenljivost sa posebnim osvrtom na primenljivost na gastrointestinalni trakt.

Ključne reči: Extracorporeal Shockwave Therapy, ESWT, anti-inflamatorni efekti, kožni reznjevi, angiogeneza, inflamacija, sistemska inflamacija, gastrointestinalni dismotilitet, postoperativni ileus,

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neuroimunobiologija

UDK broj: 616.8:616-097(043.3)

Abstract

For almost 30 years, extracorporeal shock wave therapy (ESWT) has been implemented clinically and has proven to be an effective treatment for urinary stones. This technology has also emerged as an efficacious non-invasive treatment modality for several orthopedic and traumatic indications including problematic soft tissue wounds. Shock waves are produced as transient short-term acoustic pulses with high peak pressure and a very rapid rise to peak pressure on the order of magnitude of nanoseconds (one billionth of a second). Shock waves for use in medicine can be generated using different physical principles - electro-hydraulic, piezoelectric and electromagnetic – with the goal of delivering physical energy to target tissue of interest in order to create a desired biological effect.

Delayed/non-healing or chronic wounds constitute a burden for each patient affected, significantly impairing quality of life (QOL). Intensive multi-modality wound care is required, and this places an enormous burden on society in terms of lost productivity and healthcare costs. Severe traumatic wounds seen in civilian and combat related injuries are a major cause of death amongst the younger population. Technological and therapeutic advances that lead to improved initial survival of patients with life-threatening injuries were unparalleled in therapeutics development to fight concomitant systemic inflammation that accompanies these injuries. This systemic inflammatory response to wounding often leads to development of a well-known syndrome - systemic inflammatory response syndrome (SIRS) - and can progress to multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and death. Because of all of the aforementioned, cost-effective, non-invasive, and efficacious treatments are imperative to achieve both (accelerated and complete) healing of problematic wounds and reduce treatment-related costs to the human and the healthcare system. Therefore, the potential of therapeutic shock wave application in relevant animal models and patients has to be determined in addition to the elucidation of the biological mechanisms involved.

Several experimental and clinical studies have demonstrated efficacy of extracorporeal shock wave therapy in terms of accelerating tissue repair and regenerating various types of wounds. However, the biological mechanism(s) by which this treatment modality exerts its therapeutic effects remains unclear. We herein present the evaluation of molecular, cellular and systemic effects of ESWT in order to broaden our understanding of these mechanisms, the main goal of this thesis. We also aimed to determine the importance of the timing of application of shock waves, and to evaluate the neo-angiogenic potential of ESWT and its efficacy in preventing tissue necrosis after ischemic injury. Due to the mainstream reluctance to apply ESWT to the abdomen, for fear of barotrauma, we aimed to investigate the safety and feasibility of ESWT application to the gastrointestinal tract and to extend the list of potential indications for this promising therapeutic modality. Specifically, we investigated the immunomodulatory effects of ESWT in a model of severe peripheral tissue trauma (TBX model) and the potential clinical value of ESWT in suppressing inflammation and limiting post-operative ileus caused by surgical manipulation of the abdominal contents.

We have demonstrated the positive biological effects of ESWT in models of ischemic skin flaps, peripheral tissue trauma-induced inflammation and post-operative ileus. Our results confirm shock wave-associated increases in ischemic tissue perfusion, suppression of soft tissue edema formation, and the angiogenic potential of ESWT. In addition, we have shown that these effects are not limited to the tissue directly treated with shockwaves, but remote tissue and systemic effects were also documented. We have successfully developed a novel TBX model and used it to test if shock waves can modulate the inflammatory response. Shock wave pre-conditioning has significant protective effects against the debilitating effects of severe trauma, through modulation of inflammation in damaged tissue as well as through reduction of systemic inflammatory response. Due to the unpredictable nature of severe wounding we turned our attention to a well-described model of post-operative ileus due to the ability to precisely control the nature and the timing of injury. We have clearly shown the protective and positive effects of ESWT pre-conditioning in terms of the preservation of gastrointestinal motility despite surgical manipulation and suppression of the inflammatory response to surgery on a molecular, cellular and systemic level.

ESWT is a promising non-invasive therapeutic modality whose clinical application has steadily increased over the years. Shock waves trigger the body's own mechanisms to promote tissue repair and regeneration whilst preventing the negative effects of both local and systemic inflammation through its immunomodulatory and neoangiogenic capacity and its capacity to affect maturation of newly formed blood vessels. More mechanistic and clinical trials are needed to fully understand its mechanisms and its applicability to gastrointestinal disorders.

Key words: Extracorporeal Shockwave Therapy, ESWT, anti-inflammatory effects, skin flap, angiogenesis, inflammation, systemic inflammation, gastrointestinal dysmotility, postoperative ileus,

Naučna oblast: Biology

Uža naučna oblast: Neuroimmunobiology

UDK number: 616.8:616-097(043.3)

Sadržaj

Sažetak	1
Abstract	4
1. Uvod	9
1.1. Udarni zvučni talasi i njihove fizičke karakteristike (kompresija, tenzija, kavitacioni efekat i principi generisanja).....	9
1.2. Relevantnost vantelesne terapije udarnim zvučnim talasima za lečenje rana	17
1.3. ESWT minimizira nekrozu tkiva putem stimulisanja angiogeneze.....	25
1.4. Novi model inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanog traumom perifernih tkiva	27
1.5. TLR4 i terapijska ESWT modulacija inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanih traumom perifernih tkiva.....	30
1.6. ESWT modifikuje imunski odgovor i ima protektivni efekat protiv postoperativnog ileusa u mišijem modelu	33
2. Ciljevi rada	41
3. Materijal i metode	42
3.1. Model ishemije kožnih reznjeva.....	42
3.2. Transgeni model miša VEGF-R2-luc mice [FVB/N-Tg(VEGF-R2-luc)Xen]48	
3.3. Dizajn i evaluacija modela inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanog traumom.....	49
3.4. TLR4 i terapijska ESWT modulacija inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanih traumom perifernih tkiva.....	54
3.5. Model postoperativnog ileusa.....	56
3.6. Statistička obrada rezultata.....	58
4. Rezultati	60
4.1. Model epigastričnih reznjeva kože	60

4.2.	Model transgenih VEGF-R2/luc miševa	67
4.3.	Model traumom izazvane inflamacije i gastrointestinalnog stazisa	68
4.4.	Genetička modifikacija imunskog odgovora na povredu kroz TLR4/MyD88 put	74
4.5.	Model postoperativnog ileusa izazvanog hirurškom manipulacijom tankim crevom	82
5.	Diskusija:	90
5.1.	ESWT ima protektivne efekte u modelu ishemije kožnih reznjeva nezavisno od vremena aplikacije	90
5.2.	Konstrukcija modela gastrointestinalnog stazisa i inflamacije izazvanih traumom perifernih tkiva	95
5.3.	Genetičko i terapeutsko modifikovanje imunskim odgovorom na traumu sprečava pojavu gastrointestinalnog stazisa u odgovoru na implantirani TBX.....	100
5.4.	ESWT modifikuje imunski odgovor i ima protektivni efekat protiv postoperativnog ileusa u mišijem modelu	105
6.	Zaključak	110
7.	Literatura	111
8.	Dodatak	135

1. Uvod

1.1. Udarni zvučni talasi i njihove fizičke karakteristike (kompresija, tenzija, kavitacioni efekat i principi generisanja)

Udarni zvučni talasi se pojavljuju u velikom broju formi i u različitim medijumima. Verovatno najpoznatiji primer udarnog talasa jeste grmljavina nakon pojave munja, aplauz tokom pozorišne predstave i drugi. Udarni zvučni talasi se takođe povezuju sa zemljotresima i vulkanskim erupcijama. Uopšteno govoreći, udarni zvučni talasi su rezultat iznenadnog oslobađanja hemijske, električne, nuklearne ili mehaničke energije u kratkom vremenskom intervalu. Udarni zvučni talasi koji se koriste u medicinske svrhe se definišu kao tranzijentne promene pritiska koje se prostiru brzo u trodimenzionalnom prostoru ili kao oštri, uzani talasni frontovi kroz koje se dešava iznenadna promena pritiska.

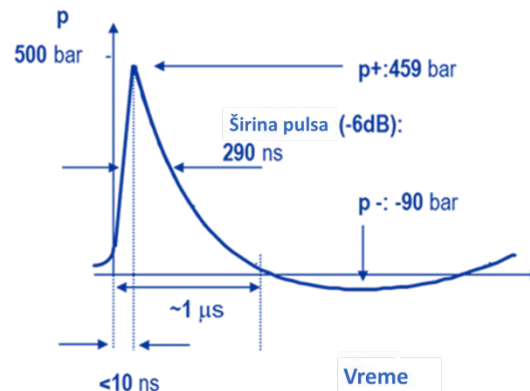
Prve indikacije da udarni zvučni talasi mogu imati efekat na žive organizme datira još od drugog svetskog rata, kada su otkriveni razlozi smrti mornara na podmornicama nakon podvodnih borbi. Eksplozije koje su se dešavale u okolini podmornice iako nisu oštetile same podmornice, imale su negativne efekte na mornare. Nakon autopsija postradalih, kao i nakon ispitivanja na preživelim, utvrđena su velika oštećenja tkiva, naročito pluća. Ove povrede pripisane su zvučnim talasima koji su prolazili kroz zidove podmornice, koji iako nisu imali efekat na samu podmornicu, jesu imali strašne posledice po ljude u njoj. Nakon toga, razmišljanja o efektu udarnih zvučnih talasa na ljude u podmornicama, rezultovala su rastom svesti o udarnim zvučnim talasima u medicinskim krugovima, kao i ozbiljnog razmatranja o uticaju udarnih zvučnih talasa na biološke sisteme.

U 70-im godinama prošlog veka, ova visoka energija produkovana od strane udarnih (zvučnih, akustičkih) talasa je iskorišćena i postala je poznata pod nazivom vantelesna terapija udarnim zvučnim talasima (engl. Extracorporeal Shockwave Therapy, ESWT). U početku ova terapija se koristila za razbijanje kamena u bubrezima i pljuvačnim žlezdama i bila poznata pod imenom litotripsija. Ubrzo nakon uvođenja u

medicinsku praksu, kao jedne od opcija za ove indikacije, kao neinvazivna, efikasna i jednostavna za primenu, brzo je postala prihvaćena i danas predstavlja standard u mnogim bolnicama (Rigatti, Montorsi *i sar.* 1989). Polovinom 80-ih, primećeni su „neželjeni efekti“ ESWT i pojavile su se prve publikacije koje su pokazivale ubrzano zarastanje preloma kod pacijenata koji su tretirani sa ESWT. Tako se lista indikacija u kojima je ESWT efikasna proširila i na nekoliko ortopedskih indikacija. Upotreba ESWT je evoluirala od destruktivne (razaranje kamena u bubregu) do stimulišuće terapije.

1.1.1. Fizičke karakteristike udarnih zvučnih talasa

Udarni zvučni talasi su definisani kao zvučni pulsevi. Tipični udarni zvučni talasi se odlikuju kratkim (red veličine nekoliko nanosekundi) vremenom dostizanja pika pritiska (100MPa ili 1000 atmosfera). Nakon dostizanja pika, sledi nešto sporije vraćanje na početnu vrednost, a zatim se ovo opadanje nastavlja i prelazi u negativnu vrednost. Ova negativna vrednost pritiska je jedno od glavnih obeležja udarnih talasa i obično iznosi približno 10% od maksimalne vrednosti pritiska i potencijalno može da izazove kavitacioni efekat (Grafik 1.1.).



Grafik 1.1. Šematski prikaz promene pritiska u funkciji vremena jednog udarnog talasa.

Udarni zvučni talasi generišu sile velikog intenziteta koje deluju na interfazi između dva medijuma različite gustine i zatezne sile koje stvaraju kavitacioni efekat. Ove dve sile su poznate iz primene ove terapije u urologiji za razbijanje kamena u bubregu. U urologiji, merenje dezintegrativne moći određuje se po sledećoj jednačini:

$$V = e \times E \times n$$

Pri čemu je V- zapremina tela koje treba dezintegrirati, cilja; e- specifični kapacitet za dezintegraciju određenog materijala; E- ukupna energija pulsa; n- broj pulseva.

Ova jednačina koliko god da je značajna i moćna u urologiji, nije dovoljno osjetljiva za objašnjavanje ortopedskih materijala i/ili za primenu u mekim tkivima gde cilj nije razbijanje materijala, odnosno tkiva, već pokretanje bioloških procesa na nivou ćelije i tkiva. Mi još potpuno ne razumemo način na koji udarni zvučni talasi ispoljavaju svoje lekovito dejstvo, a da bismo te efekte mogli da izučavamo, neophodno je i njih što detaljnije i preciznije definisati. Moramo razmatrati i imati u vidu kako ukupnu energiju talasa, tako i raspodelu pritiska, ukupnu energiju u regionu tkiva, gustinu energetskega fluksa, količinu energije koja je absorbovana.

Ukupna energija udarnih talasa definisana je jednačinom:

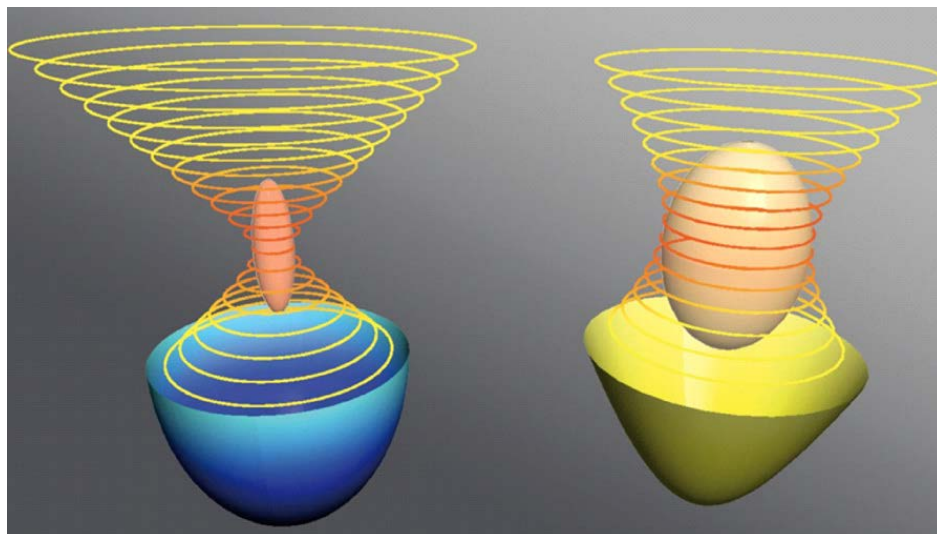
$$E=[A-\rho c]\int p^2(t)dt$$

A-površina talasnog fronta; ρ - gustina medijuma; c- brzina prostiranja talasa; t- vreme; ukupna energija udarnih zvučnih talasa izražava se u mJ.

Kao što smo pomenuli, najčešći parametar za opisivanje udarnih zvučnih talasa je Gustina Fluksa Energije (engl. Energy Flux Density, EFD) i predstavlja količinu energije po jedinici površine i izračunava se tako što se energija iz gore navedene formule podeli sa površinom.

$$EFD= [E-A]= [1-\rho c]\int p^2(t)dt \quad \text{Merna jedinica EFD je mj/mm}^2$$

Ova formula je bitna za dalje razmatranje jer opisuje ponašanje energije koja se prenosi u datom prostoru i određenim medijumima. Direktno je proporcionalna količini energije, a obrnuto proporcionalna površini fokusa (F2). U suštini, ista količina energije koncentrisana u mali prostor (F2) daće veći EFD nego kada se ista energija primeni na fokalnu tačku velike površine (Slika 1.1.).



Slika 1.1. Elektrohidraulično generisani vantelesni udarni zvučni talasi nakon odbijanja o elipsoidni (plavo) i parabolični reflektor (žuto) sa rezultujućim fokusnim zonama. Rezultujuće polje sa najvećim intenzitetom je oblika cigarete u slučaju fokusiranih, i jajastog oblika u slučaju blago fokusiranih reflektora, pri čemu je EDF niži kod drugih, omogućavajući tretman veće površine sa umanjnim brojem impulsa koji je neophodan da se pokrije cela zona od interesa.

S obzirom da udarni zvučni talasi prolazeći kroz materijal izazivaju povećanje i smanjenje gustine usled tenzionih sila, osobine materijala (u slučaju bioloških aplikacija, strukture tkiva) su od važnosti za propagaciju talasa. Osobine materijala se opisuju **akustičnom impedancom**. Kroz tkiva koja imaju sličnu akustičku impedancu, udarni zvučni talasi se prostiru bez značajnih gubitaka energije na absorpciju i refleksiju, dok na prelazima iz materijala veće akustične impedance na materijal niže, na primer pluća, oni se značajnim delom reflektuju pod uglom od 180° . Ovaj fenomen rezultuje pojavom velikih tenzionih sila, koje mogu da izazovu kavitacioni efekat. U tabeli 1.1. (preuzeto iz Principles of shock wave therapy, Ogden, J.A, 2001.(Ogden, Toth-Kischkat *i sar.* 2001)) prikazana je akustička impedanca različitih tkiva (Ogden, Toth-Kischkat *i sar.* 2001) a na tabeli 1.2. procenat reflektovane i prenete energije (preuzeto iz Extracorporeal Shock Wave Therapy: Theory and Equipment (McClure 2003)).

Tabela 1.1 Akustična impedanca različitih tkiva i gvožđa

Tkivo	Brzina zvuka (m/s)		Specifična gustina (g/cm ³)	Akustična impedanca (kg/s*m ²)*10 ⁻⁶	
	Min	Max		Min	Max
Pluća	650	1160	0.4	0.260	0.464
Masno tkivo	1476		0.928	1370	
Vazduh	330	343	0.0013	0.000429	0.000446
Voda	1429		0.998	1489	
Bubrezi	1570	1630	1.06	1.633	
Mišić	1545	1630	1.06	1.638	1.728
Kosna srž	1700		0.97	1.649	
Kost	2700	4100	1.8	4.860	7.380
Kamen u bubregu	4000	6000	1.9-2.4	7.600	14.400
Gvožđe	5100	5800	7.9	40.290	45.280

Tabela 1.2. Procentualni odnos reflektovane i transmitovane energije kroz različita tkiva i gvožđe

Materijal	Reflektovano (%)	Transmitovano (%)
Pluća	49-28	51-72
Masno tkivo	0.2	99.8
Vazduh	99.1	0.9
Voda	0	100
Bubrezi	0.2	99.8
Mišić	0.2-0.6	99.8-99.4
Kosna srž	0.3	99.7
Kost	28-44	72-56
Kamen ububregu	45-66	55-34
Gvožđe	86-88	14-12

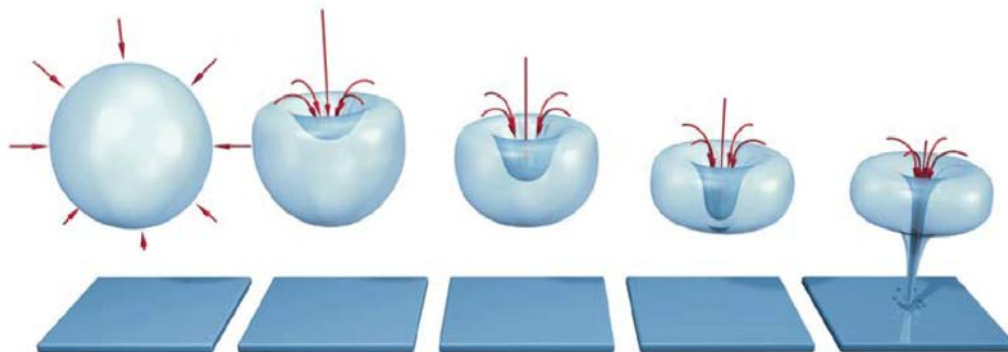
Napredovanje tehnologije u poslednjih nekoliko decenija omogućilo je proizvođačima aparature za generisanje udarnih zvučnih talasa ne samo mogućnost da manipulišu energijom koju talasi nose već i frekvencijom kojom se talasi generišu, a samim tim i frekvencijom kojom se deluje na ciljno tkivo. Udarni zvučni talasi se mogu primenjivati u širokom spektru frekvencija. Ova odlika, sa jedne strane omogućava

potencijalno širok spektar primene, a sa druge strane otežava izučavanje bioloških efekata ove terapije na živim sistemima zbog različitih karakteristika tretmana.

1.1.2. Kompresija, tenzija i kavitacioni efekat

Prolazak udarnih zvučnih talasa kroz tkivo ima dva efekta. Pri prolasku kroz tkivo dolazi do generisanja mehaničkih sila u samom tkivu i to je primarni efekat, a indirektni, sekundarni efekat, se može javiti usled generisanja kavitacionih balona.

Tokom prolaska kroz tkivo, inicijalno se javljaju kompresione sile (mehanički efekat). Kada talas prolazi kroz tkivo, pritisak talasa prelazi u negativnu vrednost (vidi grafik 1.1.) pa na tkivo deluju sile istezanja i kao posledica toga tkivo se širi. Kada tenzione sile akustičkog talasa imaju veću dinamiku od dinamičkih kapaciteta vode, dolazi do stvaranja kavitacionih balona. Dijametar balona varira, on se povećava i smanjuje. Baloni imaju različit poluživot, neki se zadržavaju samo jedan, a neki se zadržavaju do nekoliko pulseva. Tokom faze rasta balona, ogromna količina energije se na njima nakuplja i ta nakupljena energija se oslobađa prilikom raspršavanja balona. Ovo rezultuje u imploziji, pri čemu se formiraju snažni mikro mlazevi vode koji imaju razarajući potencijal (slika 1.2.). Ovaj efekat je mehanički veoma pogodan, na primer u slučaju litotripsije kada dolazi do pucanja kamena u bubregu.

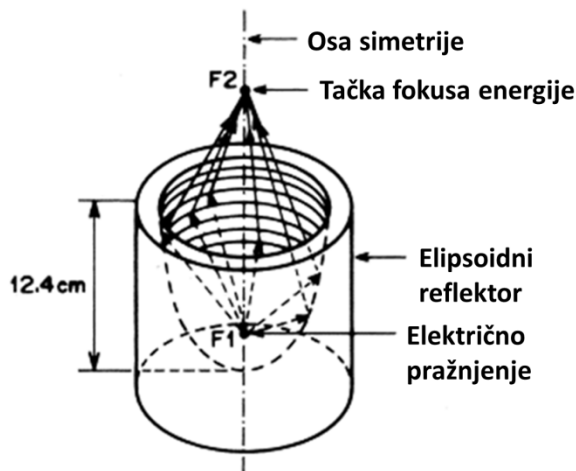


Slika 1.2. Formiranje kavitacionih balona i formiranje mikro mlazeva preuzeto iz (<http://eswt.net/wp-content/uploads/2011/10/cavitation.gif>)

1.1.3. Generisanje udarnih zvučnih talasa i tipovi generatora

Postoje tri tipa generatora udarnih zvučnih talasa: elektromagnetni, elektrohidraulični i piezoelektrčni generatori. Ova tri načina generisanja udarnih zvučnih talasa predstavljaju tri tehnička pogleda na udarne talase i predmet su diskusije u literaturi (Slika1.3.).

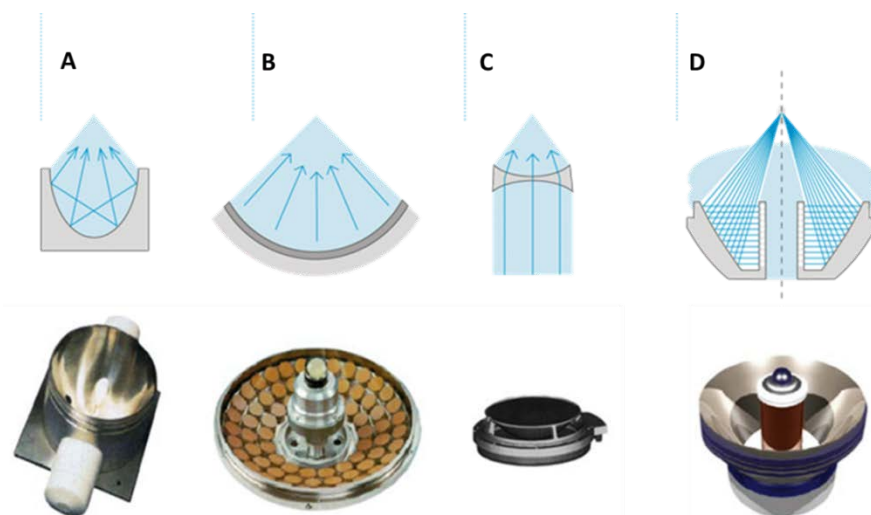
Elektro-hidraulični generatori koriste elektrode uronjene u vodu. Princip rada ovih generatora veoma je sličan principu rada svećica u motorima na tečno gorivo. Vrh elektrode (F1) je prva fokalna tačka, tačka iz koje potiču udarni talasi. On je uronjen u vodom ispunjeni reflektor. Na vrh elektrode dovodi se veliki električni napon koji tokom pražnjenja generiše balon plazme i gasa. Ovaj balon se širi kroz vodu a širenje izaziva pojavu zvučnog talasa. Tokom implozije ovog balona, dolazi do reverznog pulsa i time je generisan udarni talas. Voda služi kao provodni medijum i kao atenuator nadzvučnih talasa na brzinu zvuka. Na ovoj brzini, front udarnih talasa se odvaja od plazma balona i kao takav putuje kroz vodu. Oblik generisanih talasa je u ovom trenutku skoro koncentrična sfera. Putujući kroz vod, front talasa dospeva do elipsoidnog reflektora talasa, koji može varirati po obliku, dijameru i materijalu od koga je napravljen i od njega se odbija u željenom pravcu, sa odgovarajućim talasnim karakteristikama i fokusom na terapeutsku metu (F2- druga fokalna tačka) (Grafik1.2.).



Grafik 1.2. Šematski prikaz fokusiranja udarnih zvučnih talasa u elektrohidrauličnom generatoru. F1 vrh elektrode gde se dešava električno pražnjenje. F2 fokus odbijenih talasa (terapeutska meta). F2 može biti promenjena u zavisnosti od oblika i materijala elipsoidnog reflektora.

Elektromagnetni generatori koriste električnu energiju za generisanje udarnih zvučnih talasa ali na principijelno drugačiji način. Oni umesto elektrode imaju električni kalem koji generiše snažno elektromagnetno polje kada kroz njega prolazi struja. Pulsevi električne energije visoke snage se propuštaju kroz kalem generišući pulseve, snažnog, varirajućeg magnetnog polja. Ovo sa svoje strane izaziva visoku struju na metalnoj membrani koja stoji nasuprot kalema i izaziva stvaranje jakog magnetnog polja obrnutog polariteta u njoj. Ovo dovodi do odbojnih sila između kalema i gumene membrane, i posledično pomera gumenu membranu koja tada pritiska vodu generišući udarne talase. U ovim generatorima postoje sočiva, koja fokusiraju talase na određenu terapijsku metu. Neki proizvođači koriste i cilindrične kaleme za generisanje udarnih zvučnih talasa, ali je metod principijelno isti.

Piezoelektrični generatori koriste se principom piezoelektričnog efekta kristala za generisanje udarnih zvučnih talasa. Piezoelektrični efekat je pojava da se piezo kristali šire i skupljaju sa protokom električne energije. Na kristale postavljene u sferu terapijske glave, veliki broj kristala (obično više od hiljadu) se simultano širi i skuplja pod uticajem električne energije koja se na njih doprema pulsativno. Ovo širenje i skupljanje kristala dovodi do kompresovanja i dekompresovanja vode i generisanja talasa. Geometrijski raspored kristala po unutrašnjoj sferi terapijske glave izaziva samofokusiranje talasa prema centru. Ovo dovodi do visoke fokusiranosti talasa kao i do velike EFD u fokalnoj zoni.



Slika 1.3. Primeri generatora udarnih zvučnih talasa: A. Elektrohidraulični, B. piezoelektrični, C. elektromagnetski sa ravnim kalemom i D. elektromagnetski sa cilindričnim kalemom.

1.2. Relevantnost vantelesne terapije udarnim zvučnim talasima za lečenje rana

Incidenca hroničnih rana nastavlja da se penje i predstavlja veliki teret ne samo za pacijente i njihov kvalitet života već i za celokupno zdravlje s obzirom na velike sume novca koje se koriste za brigu o ovim pacijentima (Ferreira, Tuma *i sar.* 2006). Hronične rane su definisane kao rane koje nisu uspele da prođu kroz sve stupnjeve zarastanja i popravke tkiva, da bi se povratio anatomske i funkcionalne integritet u periodu od tri meseca (Werdin, Tenenhaus *i sar.* 2008). U većini slučajeva, etiologija ovih rana je višestruka i uključuje lokalne, (venske ili arterijske insuficijencije, infekcije ili lokalni pritisak) i sistemske (npr. diabetes, nutritivni status pacijenata itd.).

Pristup lečenju hroničnih rana je do sada bio veoma ograničen i sa gledišta dostupnih opcija, ali isto tako i sa gledišta efikasnosti datih tretmana. Klinički standardna praksa uključuje pripremu rane hirurškim i nehirurškim (npr. enzimski ili korišćenjem larvi) debridmentom (Schultz, Barillo *i sar.* 2004; Stephen-Haynes i Thompson 2007; Ramundo i Gray 2008; Smith 2008), primenom specijalnih zavoja (Stojadinovic, Carlson *i sar.* 2008), omogućavanjem optimalne vlažnosti rane (Harding, Morris *i sar.* 2002; Schultz, Barillo *i sar.* 2004; Brett 2006; Okan, Woo *i sar.* 2007). Obe, i farmakološka i hirurška intervencija za cilj imaju da obezbede adekvatan dotok i oticanje krvi, i konačno, oslobađanje rane pritiska ne bi li se izbegla nekroza tkiva kao posledica dugotrajnog izlaganja tkiva neadekvatnom pritisku (Schultz, Sibbald *i sar.* 2003; Muhs, Gagne *i sar.* 2006). Dodatno, mnoge terapije su dizajnirane specijalno za hronične rane i primenjuju se kao dodatak standardnim terapijama. U ove dodatne specijalne vidove terapije spada terapija hiperbaričnim kiseonikom (engl. Hyperbaric Oxygen Therapy- HBTO) i ultrazvučna terapija (Johnson 2003; Beltz, Christaras *i sar.* 2008; Thackham, McElwain *i sar.* 2008; Ubbink, Westerbos *i sar.* 2008; Vig 2008). Nekoliko eksperimentalnih terapija je trenutno u procesu kliničke evaluacije, i one koriste gensku terapiju, aplikaciju rekombinantnih faktora rasta, tkivni inženjering (veštačka koža i različite matrice od kolagena sa i bez živih ćelija) i terapija stem ćelijama (Harding, Morris *i sar.* 2002; Cha i

Falanga 2007; Eming, Krieg *i sar.* 2007). Bitno je na ovom mestu istaći da su ove terapije fokusirane na samo jedan od velikog broja faktora iz kompleksnog procesa zarastanja, i dok bi u određenoj populaciji pacijenata mogle da imaju potencijalno veliku efikasnost, ta populacija pacijenata bi bila mala. Bez obzira na napredak u pogledu terapija, nije se napravio veliki iskorak u smeru olakšavanja tegoba pacijenata, njihove svakodnevne aktivnosti su i dalje kompromitovane i potreba za ponovnim tretmanima predstavlja veliki novčani i ljudski izdatak za zdravstvo. Zbog toga je potraga za alternativnim, efikasnim, terapijskim rešenjima za pospešivanje procesa zarastanja rana aktuelna tema u medicinskim i srodnim naukama, kako bi se situacija pacijenata popravila, i kako bi se smanjili troškovi zdravstva.

1.2.1. Potencijalni mehanizam delovanja ESWT na tkiva

Zarastanje tkiva je veoma kompleksna, dobro koordinisana kaskada međusobno zavisnih procesa koji se javljaju kako na ćelijskom tako i na molekularnom nivou (Schultz, Sibbald *i sar.* 2003; Falanga 2005). Kao što smo istakli, u početku, inflamacija je poželjan proces koji za cilj ima ograničenje oštećenja tkiva, čišćenje patogena, i stvaranje mikrosredine tokom koje se oslobađaju faktori i aktiviraju ćelije čija je uloga da nastave kaskadu procesa zarastanja. Konačni ishod fiziološkog procesa zarastanja jeste vraćanje tkiva u skoro normalni integritet i funkcionalnost. Rane, naročito kod starih i pacijenata sa komorbiditetima kao što su dijabetes, ateroskleroza, venska ili arterijska insuficijencija, smanjena pokretljivost, visok holesterol, gojaznost, prisustvo infekcija može da produži vremenski period za postizanje konačnog zalečenja ili nepotpuno da se eliminišu tokom proces zarastanja. Hronična inflamacija, koja je uzročnik oštećenja tkiva koje bi trebalo da zaraste, je samo jedan od mehanizama koji onemogućava da se proces zarastanja tkiva okonča. Poznato je da je u procesu zarastanja tkiva jedan od ključnih procesa formiranje novih krvnih sudova. Takođe je pokazana jasna korelacija između odloženog zarastanja rana i supresije angiogeneze (Sadoun i Reed 2003; Reed i Edelberg 2004). U kompromitovanim tkivima (npr. hipoksija ili ishemija) pokazano je da ESWT lokalno povećava prokrvljenost tkiva (Oi, Fukumoto *i sar.* 2008; Yan, Zeng *i sar.* 2008) merenu pomoću laserskog Doppler sistema (Yan, Zeng *i sar.* 2008; Kuo, Wang *i sar.*

2009; Wang, Kuo *i sar.* 2009) u modelima nekroze tkiva izazvane ishemijom (Huemer, Meirer *i sar.* 2005; Meirer, Kamelger *i sar.* 2005; Meirer, Brunner *i sar.* 2007).

Za azot monoksid (NO), mali ubikvitarni molekul sa velikim brojem bioloških funkcija (Moncada, Palmer *i sar.* 1991), se pretpostavlja da ima glavnu ulogu u povećanju perfuzije tkiva nakon ESWT tretmana i barem delimično u ograničavanju inflamacije. Činjenica je da se nivo NO povećava i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima nakon ESWT, što je u saglasnosti i sa kliničkim istraživanjima koja su pokazala povećanje perfuzije. Povećanje neenzimske (Gotte, Amelio *i sar.* 2002) i enzimске (povećanjem ekspresije NO sintaze (Mariotto, Cavalieri *i sar.* 2005; Yan, Zeng *i sar.* 2008; Kuo, Wang *i sar.* 2009)) produkcije NO se smatra jednim od mogućih mehanizama kojima se objašnjava rano, trenutno, i kasno povećanje perfuzije ishemičnog tkiva. NO je takođe veoma bitan u modulaciji i/ili posredovanju angiogeneze. Zbog toga je, rano, NO-zavisno povećanje, u perfuziji tkiva komplementarno sa neovaskularizacijom (urastanjem *de novo* formiranih krvnih sudova) u ishemičnu zonu tkiva. Ova pretpostavka je potkrepljena dokazima o akutnom, povećanju ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), najpotentnijeg pokretača angiogeneze, nakon primene ESWT (Ma, Zeng *i sar.* 2007; Oi, Fukumoto *i sar.* 2008; Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008; Yan, Zeng *i sar.* 2008; Kuo, Wang *i sar.* 2009; Mittermayr, Hartinger *i sar.* 2011). Nishida i saradnici (2004) su pokazali da ESWT indukuje povećanje ekspresije receptora za VEGF, VEGF-R2, koji se smatra primarnim medijatorom signala angiogeneze (Nishida, Shimokawa *i sar.* 2004). Kvantitativne imunohistohemjske analize tkiva su pokazale povećanu gustinu krvnih sudova u ESWT tretiranim grupama u poređenju sa grupama koje nakon ishemije nisu bile tretirane (Nishida, Shimokawa *i sar.* 2004; Oi, Fukumoto *i sar.* 2008; Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008; Yan, Zeng *i sar.* 2008). Veoma interesantna studija u kojoj sam učestvovao je ispitivala uticaje ESWT na angiogenezu, ali smo isto tako ispitivali i uticaj udarnih zvučnih talasa na formiranje limfnih sudova (Brañes, Contreras *i sar.* 2012). Pokazali smo da ESWT povećava neovaskularizaciju tkiva (*de novo* formiranje krvnih sudova) i neolimfogenezu (*de novo* formiranje limfnih sudova) kod pacijenata sa tendinopatijom mišića rotatora u ramenu. Sveobuhvatnim sagledavanjem prethodno prikazanih literaturnih podataka dobija se

moćnost da se hipotetiše o potencijalnim sistemskim efektima ESWT i što će i biti jedan od ciljeva eksperimenata predstavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji.

Iako su fizičke sile koje udarni zvučni talasi prenose na tkivo nesumnjivi uzročnik uočenih efekata na biološke sisteme, oni su takođe odgovorni i za pokretanje različitih bioloških procesa, naročito angiogenezu. Endoluminalne sile izazvane primenom fizičkih sila indukuju drastične promene u citoskeletu endotelnih ćelija (Davies, Zilberberg *i sar.* 2003) indukujući aktivnost azot oksid sintaze (engl. Nitric Oxide Synthase, NOS) i time stimulišu angiogenezu (Corson, James *i sar.* 1996; Fleming, Bauersachs *i sar.* 1998). Wang i saradnici (2004) su pokazali na *in vivo* modelu da Ras-zavisna produkcija superoksida koja sledi nakon primene ESWT, reguliše fosforilaciju ERK (engl. extracellular-signal-regulated kinase) i posledično transaktivaciju HIF-1 α (engl. Hypoxia-inducible factor 1 alpha - HIF-1 α) (Wang, Wang *i sar.* 2004). Ovi intracelularni događaji zatim pokreću ekspresiju VEGF-A, koji sa svoje strane stimuliše angiogenezu. U modelu izografta kože koji su korišćeni za ispitivanje uticaja ESWT na široki spektar gena uključenih u proces angiogeneze, pokazano je značajno povećanje ekspresije proangiogenetskih gena, ELR⁺-CXC hemokina (engl. ELR-positive CXC chemokines, CXC-familija citokina sa dva N terminalna citokina razdvojena jednom aminokiselinom, CXCL1, CXCL2, CXCL5), CC- hemokina (engl. CC chemokine, familija proteina sa dva spojena cisteina blizu N terminusa, CCL2, CCL3, CCL4) i citokina Interleukin-1 β (engl. Interleukin- IL), IL-6 i G-CSF (engl. Granulocyte colony-stimulating factor), VEGF A, HIF-1 α i nekoliko matriksnih metaloproteinaza (engl. Matrix Metalloproteinases- MMP) MMP3, MMP9, MMP13 (Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008).

Tokom zarastanja rana, PECAM-1 (engl. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, CD31) na leukocitima i endotelnim ćelijama ima ključnu ulogu u transendotelnoj migraciji ka mestu inflamacije, migraciji endotelnih ćelija i formiranju novih krvnih sudova (DeLisser, Christofidou-Solomidou *i sar.* 1997). Interesantno je da je pokazano da je aktivacija PECAM-1 snažno indukovana mehaničkim stresom sugerišući njegovu ulogu u mehanotransdukciji (Fujiwara 2006). U odgovoru na ESWT, značajno povećanje ekspresije gena za PECAM-1 je pokazano i potvrđeno na histološkim preparatima kao i Western blot analizi tkivnih proteina u studiji koja je bila urađena na

mišijem modelu dijabetesa (kompromitovanog zarastanja rana) i *wild-type* životinjama („normalno“ zarastanje) (Zins, Amare *i sar.* 2010). U istoj studiji, analizirana je dinamika ekspresije 84 gena relevantna za proces angiogeneze i pokazano je da je ESWT tretman pokrenuo, i kontinuirano održavao povećanu ekspresiju 25-30 gena koji su bili atenuirani ili potpuno isključeni u miševima sa diabetesom ali i u normalnim, *wild-type* miševima.

Tokom procesa regeneracije rane, dešava se mnoštvo ćelijskih i molekularnih događaja koji su međusobno zavisni. Na primer, regrutovanje progenitorskih ćelija je indukovano faktorima rasta i hemokinima kao što je VEGF (Lee, Wolf *i sar.* 2000; Grunewald, Avraham *i sar.* 2006). Akutna ishemija izaziva prekomernu ekspresiju hemotaktičkih faktora dok se hronična ishemija tkiva karakteriše smanjenom sposobnošću tkiva da privuče endotelne progenitorske ćelije (eng. Endothelial Progenitor Cells, EPC) zbog umanjene produkcije hemoatraktanata. Na modelima hronične i akutne ishemije na pacovima, pokazano je da ESWT povećava ekspresiju SD-1 iRNK (engl. messenger Ribonucleic Acid, mRNA) i da je to funkcionalno povezano sa poboljšanim homingom prethodno ubrizganih EPC kako u ishemično tako i u ESWT tretirano tkivo koje nije bilo izloženo ishemiji (Aicher, Heeschen *i sar.* 2006). Dodatno, ESWT je pokazala dozno-zavisan efekat na ekspresiju iRNK za VEGF u *in vitro* eksperimentima sa mononuklearnim ćelijama poreklom iz kosne srži (Yip, Chang *i sar.* 2008). ESWT je dalje stimulisala diferencijaciju ovih ćelija u endotelni fenotip (VEGF⁺ i CD31⁺) (Yip, Chang *i sar.* 2008).

ESWT povećava proliferaciju ćelija u tkivima na lokalnom nivou (Wang 2003; Chao, Tsuang *i sar.* 2008; Hofmann, Ritz *i sar.* 2008; Kuo, Wang *i sar.* 2009; Kuo, Wang *i sar.* 2009), stimulacijom metabolizma i reorganizacije proteina ekstracelularnog matriksa (Chao, Tsuang *i sar.* 2008; Carcamo, Aliaga *i sar.* 2012), smanjenjem apoptoze tkivnih ćelija (Aicher, Heeschen *i sar.* 2006; Kuo, Wang *i sar.* 2009), smanjenjem infiltracije i posledičnog oštećenja tkiva od strane leukocita (Wang, Wang *i sar.* 2004; Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008; Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009). Ovo je obećavajući modalitet za primenu na ljudima i zahteva istraživanje kako na životinjama i u *in vitro* modelima, tako i u kliničkim studijama. Zbog toga su neophodna dalja istraživanja,

posebno u cilju ispitivanja efekata ESWT na inflamaciju, kao i potencijalnih sistemskih efekata na organizam.

1.2.2. Anti-Inflamatorni efekti ekstrakorporealne terapije udarnim zvučnim talasima

Kada govorimo o inflamaciji, neophodno je da razlikujemo dva veoma različita tipa inflamacije: akutnu inflamaciju (zaštitni odgovor tela na povredu koji služi kao prva linija odbrane organizma i ima korisne efekte) i hroničnu inflamaciju (štetan, nekontrolisani inflamatorni odgovor). Krajnji cilj akutne inflamacije je da neutrališe/uništi patogene, stvori fizičku barijeru u cilju sprečavanja daljeg širenja inflamacije, da dostavi na odgovarajuće mesto sve faktore neophodne za uspešan nastavak oporavka i da alarmira organizam domaćina o ozledi.

Postoje dve glavne komponente u inflamatornom odgovoru, prva je odgovor vaskularnog sistema, koji uključuje sve promene na vaskularnim endotelnim ćelijama i u krvnim sudovima u inflamiranom tkivu. Drugi je ćelijski odgovor koji pretstavlja promene u ćelijama koje su odgovorne za iniciranje, propagaciju i rezoluciju inflamacije. Zbog velikog potencijalno štetnog efekta koji imaju komponente inflamatornog odgovora, ograničavanje i prekid ovog procesa je aktivan proces koji je fino regulisan različitim molekulima. U slučaju nemogućnosti da se inflamacija zaustavi u određenom periodu vremena, javlja se hronična inflamacija, prouzrokujući prateća oštećenja zdravog tkiva i ćelija.

1.2.3. Efekti ESWT na komponente inflamatorne kaskade i inflamatornog odgovora

U ovom delu, fokusiraćemo se na istraživanja koja su delom imala za cilj da objasne anti-inflamatorne efekte ESWT. Ove studije su izvođene *in vitro* i *in vivo* na različitim animalnim modelima, na primer modelu ishemije u kožnim režnjevima, animalni model ishemije mišića, model izogenih graftova kože, kao i kompleksniji model alografta i opekotine.

Vaskularni sistem: Brojne studije su pokazale da je neposredno nakon ESWT pa sve do nekoliko dana posle tretmana prisutno vidno povećanje perfuzije tretiranog tkiva

kao i nivo oksigenisanosti tkiva. U modelu reznjeva kože, slučajne površine, (u ovom modelu reznjeva kože, umesto striktno predodređene veličine reznjeva koriste se anatomska mesta kao odrednice granica što je značajno zbog razlika u površini tela životinja i daje precizniji odnos površine reznja i ukupne površine tela i pored malih varijacija u površini reznja kada se porede dve eksperimentalne životinje) (Yan, Zeng *i sar.* 2008), pa čak i na modelu reznjeva kože u životinja koje imaju komorbiditete (Kuo, Wang *i sar.* 2009) (npr. dijabetes izazvan hemijskim tretmanom) prisutno je značajno povećanje perfuzije tkiva i smanjeno formiranje edema posle primene ESWT.

Jedan od mehanizama kojim ESWT iskazuje svoje efekte na krvni i limfni sistem je putem povećanja koncentracije NO. NO je mali, svuda prisutan molekul, čije je oslobađanje iz endotelnih ćelija jedan od mogućih mehanizama kratkotrajnih efekata ESWT na perfuziju. Efekti na perfuziju su opisani i u modelu ishemije mišića *m.cremaster* u pacova. Kada su poredili grupe koje su imale pre-ishemijski ESWT tretman sa mišićem koji je imao samo ishemiju izazvanu perfuzijom, Krokowicz i saradnici (2008.) su uočili da je došlo do smanjenja u kotrljanju i adheziji leukocita za endotelne ćelije krvnih sudova, kao i smanjenje ekspresije adhezivnih molekula koji su uključeni u ovaj proces ELAM-1 (engl. Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1), ICAM-1 (engl. Intercellular Adhesion Molecule 1) kao i VCAM-1 (engl. Vascular cell adhesion protein 1). Isti autori su utvrdili da dolazi i do povećanja brzine kretanja eritrocita kroz ispitivane krvne sudove nakon tretmana i pokazali da je ESWT povezana sa povećanjem brzine kretanja eritrocita u arteriolama do 40% u poređenju sa brzinom kod netretiranih životinja (Krokowicz, Klimczak *i sar.* 2012). Kada su primenili ESWT nakon ishemije, utvrdili su da je došlo do povećanja dijametra funkcionalnih kapilara za 21%, povećanja u dijametru arteriola za 33% i brzine kretanja eritrocitra kroz arteriole drugog i trećeg reda od 65% u poređenju sa netretiranim ishemičnim kontrolama.

Ćelijski efekti: Nekoliko studija (Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008; Radu, Kiefer *i sar.* 2011) je pokazalo efekte ESWT na infiltraciju tkiva inflamatornim ćelijama, uključujući smanjenje broja polimorfonukleara i makrofaga (Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009), povećanje infiltracije fibroblasta (Kuo, Wang *i sar.* 2009), njihove proliferacije (Berta, Fazzari *i sar.* 2009), povećano regrutovanje mezenhimalnih stem ćelija (Chen, Wurtz *i sar.* 2004) i progenitora endotelnih ćelija (Aicher, Heeschen *i sar.* 2006).

Opisane promene na različite ćelijske tipove su verovatno kombinovani efekat ESWT na receptore na vaskularnim endotelnim ćelijama (Krokowicz, Klimczak *i sar.* 2012) i promena u ekspresiji hemokina i citokina u ciljnom tkivu (Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008).

Alotransplantacija, procedura u kojoj se vrši hirurška transplantacija organa i tkiva između različitih individua iste vrste (sojevi pacova Lewis su služili kao donori zadnje noge i Brown-Norway pacovi su bili recipijenti), je veoma komplikovan proces u kome je jedan od velikih problema odbacivanje tkiva usled intenzivnog imunskog odgovora. Nakon primene ESWT, alografti su imali duži životni vek za čitav dan. Iako ESWT nije uspela da dostigne rezultate imunosupresivnih lekova, uspela je da pomeri granicu za statistički značajan jedan dan. Autori su razvili poseban sistem ocenjivanja preživljavanja tkiva makroskopski i mikroskopski. Kao što je i za očekivati, oba sistema su dala istovetne rezultate u korist anti-inflamatornih efekata ESWT koji su se ogledali u broju infiltriranih ćelija, i tipu ćelija koje su naselile tkivo.

U modelu teških opekotina (BALB/c miševi), rane koje se odlikuju visokim stepenom inflamacije efekte ESWT su ispitali Davis i saradnici (2008). Oni su analizirali ekspresiju gena za hemokine, pro-inflamatorne citokine, matriksne metaloproteinaze u marginama rane životinja tretiranih sa ESWT i netretiranih kontrola. Oni su utvrdili da ESWT ispoljava značajan anti-inflamatorni efekat kroz modifikovanje mikrosredine u samoj rani i tkivu koje je okružuje a koje je u stanju povoljnom za zarastanje.

U modelu izogenih reznjeva kože (Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008) kao i alotransplantacije zadnje noge (Radu, Kiefer *i sar.* 2011) pokazana je supresija proinflamatornih gena koja je onda dovedena u vezu sa makroskopskim rezultatima i boljim preživljavanjem samih graftova i oporavku nakon terapije. U izograftima, pozitivan efekat ESWT u tretiranoj grupi životinja se ogleda u povećanoj ekspresiji hemokina (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL3, CCL4), citokina (IL-1 β , IL-6, G-CSF, VEGF-A), MMP (MMP3, MMP9, MMP13) i faktora poreklom iz makrofaga (MIP-1a - CCL3, MIP-1b - CCL4, MMP-13).

Azot oksid je jedan od ključnih molekula uključenih u inflamaciju i angiogenezu. Mnogi autori su povezali primetno povećanje u broju krvnih sudova sa povećanjem

sinteze i količine oslobođenog NO. Sa druge strane postoje i autori koji sugerišu da je NO i nivo NO u tkivima u tesnoj vezi sa patologijama koje su posledica nekontrolisane inflamacije. Kako bilo, *in vitro*, studije na dve različite ćelijske linije, su pokazale da je ESWT mogla da bude protivteža ovim procesima i da vrati nivo NO na normalne fiziološke vrednosti putem promena u ekspresiji gena za eNOSi posledičnim smanjenjem aktivacije i drugih NF-κB-zavisnih inflamatornih gena (Tugcu, Bas *i sar.* 2008). Značajno je istaći da ESWT smanjuje nivo NF-κB i pre i nakon njegove aktivacije. Ovi podaci produbljuju naše znanje o potencijalnom anti-inflamatornom mehanizmu ESWT koji je već viđen i zabeležen u kliničkim istraživanjima. *In vivo*, pre-ishemijski ESWT tretman izaziva povećanu ekspresiju iNOS, CXCL-5 i CCL-2 dok ESWT primenjen nakon ishemije smanjuje ekspresiju iNOS (Krokowicz, Klimczak *i sar.* 2012).

Postoje i podaci nekih autora koji ukazuju i na sistemske efekte ESWT. Kuo i saradnici (2009) su pokazali da nivo H₂O₂ u cirkulaciji značajno opada nakon primene ESWT, sugerišući na potencijalne sistemske efekte ESWT na cirkulišuće ćelije. Pretretman tkiva sa ESWT ima protektivne efekte u modelu ishemija i modelu reperfuzija. Ovi efekti se ogledaju u smanjenju ekspresije brojnih proinflamatornih proteina, što se u velikom broju slučajeva ispostavilo kao korisno za proces zarastanja.

1.3. ESWT minimizira nekrozu tkiva putem stimulisanja angiogeneze

Nekroza tkiva koja se pojavljuje kao posledica ishemije je ozbiljan klinički problem. Brojni terapeutski pristupi ovom problemu postoje ne bi li se poboljšala stopa preživljavanja ugroženih reznjeva. Sa razvojem tehnologije i tehnike, naročito u polju molekularne biologije i medicine, veliki broj terapeutika postoji na tržištu. Oni variraju od agenasa primenjenih topikalno, kao što su fibrin, solubilni medijatori, modulatori i faktori rasta (npr. rekombinantni humani VEGF) (Michlits, Mittermayr *i sar.* 2007; Mittermayr, Morton *i sar.* 2008), anti-ishemijski farmakološki agensi (nitroglicerina, trolamine salicilat i nifedipin) (Davis, Wachholz *i sar.* 1999), preko sistemski primenjivih terapeutika kao što su hiperbarični kiseonik (Zhang, Chang *i sar.* 2008), kortikosteroidi

(Korompilias, Chen *i sar.* 1996), trombolitici (Shalom, Friedman *i sar.* 2008), sakupljači slobodnih radikala (engl. quencher of free radicals) (Knight 1994), vazoaktivne supstance, agonisti Na⁺ kanala, nikorandil, prostaciklin i drugi modifikatori prostanoida (Knight, Kawabata *i sar.* 1991; Qi, Hiura *i sar.* 2006). Bitno je istaći da ni za jedan farmakološki tretman, u dostupnoj literaturi, ne postoje uniformni pozitivni rezultati ni konzistentna efikasnost. Angiogeneza je od krucijalnog značaja za preživljavanje kako reznjeva kože tako i za preživljavanje graftova kože. Zato ne iznenađuje činjenica da su savremeni terapeutici fokusirani upravo na ovaj proces. Trenutno se ispituje genska terapija adenovirusima koji nose gene za humani TGF-β, VEGF i angiopoietin-1 (Huemer, Shafighi *i sar.* 2004; Gurunluoglu, Meirer *i sar.* 2005; Benest, Salmon *i sar.* 2006; Giacca 2007; Korpisalo, Karvinen *i sar.* 2008), povećanje FGF-2 kroz inkapsulirane genetski modifikovane mioblaste (Rinsch, Quinodoz *i sar.* 2001) i transplantacijom endotelnih progenitorskih ćelija izolovanih iz pupčane vrpce i transfektovanih sa VEGF zarad povećanja njegove ekspresije (Ikeda, Fukuda *i sar.* 2004). Za sve ove terapije je zajedničko da su izuzetno skupe, teško su primenljive i veoma rizične zbog prirode samog tretmana i iz tih razloga nisu rasprostranjene u lečenju rana i naročito distalnih delova reznjeva kože u rekonstruktivnoj hirurgiji.

Da bi bila uspešna, i klinički primenljiva, terapija mora da zadovolji nekoliko uslova. Mora da bude: 1. efikasna, 2. neinvazivna, 3. da ima minimalni odnos rizika i koristi, 3. da je lako primenjiva, 4. da je finansijski isplativa. Na žalost, mnoge terapije ne zadovoljavaju ove kriterijume i stoga postoji konstantna potreba da se terapije menjaju, osavremenjuju i otkrivaju potencijalno novi terapeutski agensi za rešenje ovog problema. U poslednjih nekoliko decenija, došlo je do razvoja nekoliko terapija koje koriste fizičke sile (električne, magnetne sile, kompresione sile) kako bi ubrzale proces zarastanja rana i regeneracije, izvukle tkivo iz začaranog kruga inflamacije i tkivnog oštećenja, i ubrzale proces stvaranja novih krvnih sudova. Oni stimulišu kritične komponente procesa zarastanja kroz ćelijske i biohemijske signale kumulativno vodeći ka ubrzanom opravku tkiva. Ove terapije dobijaju na značaju i postaju sve prihvatljivije kao važni dodatak lečenja kompleksnih rana. Jedna takva terapija je i terapija vantelesnim udarnim zvučnim talasima. U ovim eksperimentima, želeli smo da utvrdimo efikasnost udarnih zvučnih

talasa u animalnom modelu ishemije reznjeva kože i pokušamo da produbimo razumevanje mehanizama kojima ova terapija ispoljava svoje blagotvorne efekte.

U seriji eksperimenata u ovom radu, smo ispitivali uticaje ESWT na preživljavanje reznjeva kože sa hirurški izazvanom ishemijom u pacova, utvrdimo njene efekte na perfuziju tkiva, količinu formirane serome i angiogenezu. Takođe, smo pokušali da u pilot eksperimentu proverimo hipotezu iz dostupne literature o potencijalnom sistemskom efektu ESWT na organizam, i utvrdimo koji je pravi momenat da se ESWT primeni.

1.4. Novi model inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanog traumom perifernih tkiva

Trauma je najčešći uzrok smrti u populaciji mladih osoba starosti od 1 do 45 godina u SAD i glavni uzrok prerane smrti širom sveta. Na godišnjem nivou, skoro 40 miliona ljudi pretrpi traumatsku povredu sa preko 150000 smrtnih slučajeva u SAD pri tome na saobraćajne nesreće ode najveći procenat. Kada se pri tome doda broj povreda u ratovima, godišnje oko 117 biliona dolara se potroši na negu ovih bolesnika. Neophodnost boljeg razumevanja procesa inflamacije i patofizioloških procesa koji se dešavaju tokom traume se ogleda u broju žrtava i finansijskih sredstava koja se troše za njihovo lečenje (CDC Injury Factbook, 2006). U savremenom dobu, ne samo da se broj slučajeva povećao, već i kompleksnost povreda kao i veličina same povrede. Ova situacija je naročito uočljiva u vojsci i oružanim sukobima, gde je razvoj ne samo oružja već i protektivne opreme doprineo da povrede budu teže, obuhvataju veću površinu tela, a s druge strane vojnici preživljavaju zbog toga što ih oprema štiti. Oko 80% od ukupnog broja svih ranjavanja u vojsci, su vojnici koji imaju rane na jednom ili više ekstremiteta. Eksplozije koje imaju visoku energiju izazivaju masivne rane, koje obuhvataju kožu, mišiće, kost i nerve, koje su veoma često kontaminirane infektivnim agensima i delićima zemlje, metala ili u nekim slučajevima radioaktivnim materijalom a prisutna je i velika količina mrtvog tkiva. Kao što je gore navedeno, brojni tretmani se primenjuju, taj broj je naročito veliki u kratkom vremenskom periodu nakon ranjavanja, period tokom kojeg se

povređeni transportuju u bolnice je značajno skraćen, i uopšte čitava logistika nege povređenih doprinosi boljem preživljavanju. Međutim, ovaj napredak u inicijalnom zbrinjavanju samo je povećao broj ljudi koji imaju posledične patofiziološke probleme kao što su sistemski inflamatorni odgovor, gastorintestinalni ileus, vazodilatacija, povećana permeabilnost mikrovaskularnih sudova, sekvestracija fluida, generalna hipoksiju tkiva, preterana aktivacija kaskade zgrušavanja kao i vaskulare promena koje dovode do otkazivanja udaljenjih organa.

Trauma pokreće čitavu kaskadu akutnih metaboličkih, endokrinih i imunskih odgovora, uključujući regrutovanje tromobocita, koagulacionih faktora, neutrofila i T ćelija na mesto povrede. Ovi procesi su kontrolisani i modifikovani putem cirkulišućih sistemskih proinflamatornih citokina. Posmatrano iz teleološke perspektive, konačni ishod pacijenata je određen našom mogućnosti da postignemo balans između pro- i anti-inflamatornog odgovora domaćina. Kada se disekvilibrijum pojavi, rezultujući preteranom produkcijom proinflamatornih citokina, javlja se sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (engl. Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), koji može da dovede do disfunkcije različitih organa i disfunkcionalnosti više organa istovremeno (engl. Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) koji ima stopu smrtnosti od oko jedne trećine od svih teško povređenih pacijenata. Sistemski inflamatorni odgovor može da rezultuje i u neodgovarajućem kompenzatornom antiinflamatornom odgovoru (engl. Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome, CARS) koji je povezan sa uvećanim rizikom za infekciju (imunosupresija povezana sa CARS) (Keel i Trentz 2005).

Citokinski posredovana disregulacija inflamatornog odgovora na teške traume je dobro prepoznata komponenta SIRS i MODS. Nema sumnje da gastrointestinalni trakt (GIT) igra odlučujuću ulogu u patofiziologiji tela pri odgovoru na traumu (Marshall, Christou *i sar.* 1993). Čini se da je gastorintestinalni trakt posebno osetljiv, i dolazi do nefunkcionalne aktivnosti, uključujući zastoj želudca i teškog gastrointestinalnog ileusa. Klinički dokaz ovoga je nemogućnost teško povređenih pacijenata da jedu čvrstu hranu što sa svoje strane dovodi do limitiranja dostupnih vitalnih nutrijenata. Prestanak motiliteta creva dovodi do razmnožavanja bakterija, njihove prenaseljenosti i prenamnoženosti u samom GIT. Bakterije konsekvntno razaraju mukozne barijere u

zidu GIT translociraju se iz GIT i dovode do sistemske infekcije. Ova sistemska infekcija povećava inflamatorni odgovor organizma, sistemski proinflamatorni signali se proizvode u još većem stepenu i samim tim dalje smanjuju motilitet GIT i konsekvatno povećavaju disfunkcionalnost ostalih organa. U ekstremnim slučajevima, ova pozitivna povratna sprega dovodi do smrti povređenih pacijenata (Deitch 1990). U današnjoj literaturi, mehanizmi koji dovode do disfunkcionalnosti GIT posle teških povreda ostaju nepoznati. Mehanističke studije, koje su dale uvid u kaskadu sistemskih, ćelijskih i molekularnih događaja su sprovedene na modelima sistemske hemoragije kombinovane sa laparotomskim operacijama. Treba istaći da su posledični molekularni događaji nakon ovih procedura kao i funkcionalnost samog GIT objašnjavani kao posledica odgovora na povredu tkiva usled reperfuzije ishemičnog tkiva (ishemija koja se javlja kao posledica nedovoljne prokrvljenosti tkiva i posledično smanjenje tkivnog volumena, nakon naglog upliva fluida dovodi do oštećenja ćelija i citoarhitektonike tkiva). Kratkoročne studije su kombinovale sistemske hemoragije sa prelomom femura, u ovim studijama nakon oporavka od eksperimentalne procedure bila je prisutna obavezna upotreba analgetika. Analgetici sami po sebi imaju uticaja na GIT i njegovu funkcionalnost, što sa svoje strane uvodi nepoznate faktore u objašnjavanje mehanističkih podataka. Na žalost, obavezna upotreba analgetika u ovom modelu uvodi i čitav repertoar farmakoloških efekata koje analgetici imaju na imunski sistem i kao što je pomenuto na GIT. Pored farmakoloških efekata, još jedan problem se javlja u modelima koji se koriste u ove svrhe, a to je nemogućnost da se standardizuje sama povreda. Sama povreda izaziva bol koji se posledično javlja i koji je veoma teško izolovati radi mehanističkog analiziranja GIT (Tsukamoto i Pape 2009). Dalje, teško je izolovati i analizirati ulogu biomarkera u samoj rani, i fluidu iz rane, za koje je pokazana jasna korelacija u razvoju SIRS i MODS. Trenutno ne postoji pouzdan model za izučavanje mehanizama koji dovode do disfunkcionalnosti GIT izazvane traumom perifernih tkiva i koji ima mogućnost finog podešavanja ekstenzivnosti rane i velike reproducibilnosti.

Glavni cilj ovog seta eksperimenata u ovom istraživanju je bio da se razvije i opiše animalni model koji bi prevazišao manjkavosti trenutno dostupnih modela i koji bi oponašao molekularne i funkcionalne mehanizme koji izazivaju stazu u GIT kao

posledicu teške traume, kako bismo ga kasnije uspešno koristili za testiranje efekata ESWT na sistemskom nivou.

1.5. TLR4 i terapijska ESWT modulacija inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanih traumom perifernih tkiva

Širom sveta, trauma je najčešći uzrok smrti kod dece i mladih. Danak koji trauma uzima u ljudstvu, medicini i finansijski je ogroman. Svega nekoliko terapeutskih opcija postoji za izučavanje patofizioloških procesa koji se dešavaju u telu povređenih neophodnim i potrebnim ne bi li se pronašla uspešnija terapija za lečenje pacijenata. Povrede koje se dešavaju među civilima kao posledica sve većeg broja motornih vozila i posledično učestalijih saobraćajnih nesreća, i posledica terorističkih napada i ranjavanja u ratom zahvaćenim područjima. U poslednje vreme, napredak u medicini, tehnologiji i tehnici je doveo do uspešnijeg inicijalnog tretmana što utiče na povećanje broja preživelih u poređenju sa brojem preživelih sa istim povredama u prošlosti. Međutim, ovaj napredak u inicijalnom tretmanu nije praćen poboljšanjem tretmana u prvim nekoliko dana nakon traume, i uprkos povećanju preživljavanja same traume, dogodio se porast u broju žrtava koje razvijaju SIRS, vazodilataciju, povećanje permeabiliteta krvnih sudova, sekvestracije fluid, generalne hipoksije tkiva, aktivacije kaskade zgrušavanja koji onda dovode do oštećenja udaljenih organa i MODS. Poznato je da morbiditet i mortalite preživelih sa velikom akutnom traumom je povezan sa aktivacijom molekularne signalne kaskade inflamacije (Kaczorowski, Mollen *i sar.* 2008; Mollen, Levy *i sar.* 2008; Seok, Warren *i sar.* 2013). Kao što smo prethodno opisali, traumatska povreda pokreće izuzetno kompleksnu kaskadu uključujući akutni metabolički, endokrini i imunski odgovor koji obuhvata regrutovanje trombocita, faktora koagulacije, neutrofila, monocita, T ćelija, koji su modulirani sa oslobađanjem ogromne količine sistemskih regulatornih proinflamatornih citokina. Krajnji ishod za pacijenta je određen njegovom sposobnošću da održi u delikatnoj ravnoteži, balans između pro- i anti- inflamatornog odgovora.

U poslednje vreme, velika pažnja je posvećena multicentaričnim, komparativnim studijama koje su istakle nedostatke mišijih modela traume, opekotina i sepse (Seok, Warren *i sar.* 2013). Kao primer, navodi se da pacijenti sa opekotinama procentualno imaju veće opekotine (površina opekotine/ukupna površina tela) u poređenju sa animalnim modelima (Woodcock i Woosley 2008) ističući da zbog toga neki, klinički relevantni sistemi ostanu nepokrenuti u ovim modelima. Paralela se može povući i sa animalnim modelima traume perifernih tkiva, koji uključuju prelom, ortopedsku povredu kombinovanu sa nagnječenjem ili laparaskopskom intervencijom sa manipulacijom gastrointestinalnog sistema (Tsukamoto i Pape 2009). Može se spekulirati i da klinički relevantna trauma, sa gledišta posttraumatskih komplikacija, obično ima veća oštećenja tkiva u poređenju sa većinom animalnih modela. Mišiji model inflamacije izazvane oštećenjem perifernih tkiva (engl. Tissue-Bone Matrix, TBX model) koji je precizno kontrolisan i koji ima visoki stepen reproducibilnosti, koji rekapitulira mnoge važne klinički uočljive fenomene i koji može značajno da doprinese upotrebom genetike i genetske manipulacije koja je dobro opisana i u širokoj upotrebi kod miša kao vrste za animalne modele (Tsukamoto, Antonic *i sar.* 2011). Bitno je ponovo istaći, da naš model ne zahteva obaveznu upotrebu lekova protiv bola koji imaju funkcionalnih efekata na imunski sistem, pluća ili GIT.

Dokazano je da aktivacija Toll-like receptor (TLR)/MyD88 i TLR4/TRIF puteva ima važnu ulogu u modelima opekotine (Krzyzaniak, Cheadle *i sar.* 2011), sepse, sistemske hemoragije, i povreda srčanog mišića, jetre, pluća usled reperfuzije ishemičnog tkiva (Kaczorowski, Mollen *i sar.* 2008; Buchholz, Chanthaphavong *i sar.* 2009; Kaczorowski, Nakao *i sar.* 2009; Kaczorowski, Tsung *i sar.* 2009; Buchholz i Bauer 2010; Buchholz, Billiar *i sar.* 2010). TLR služe kao receptori za prepoznavanje molekularnih obrazaca (Pattern Recognition Receptors, PRRs), koji su eksprimirani na hematopoetskim ćelijama, uključujući makrofage, monocite, neutrofile, dendritske ćelije i T limfocite (Kabelitz 2007; Kaczorowski, Tsung *i sar.* 2009; Prince, Whyte *i sar.* 2011). Interesantno je da su TLR eksprimirani i na ostalim ćelijama, kao što su endotelne ćelije, epitelne, glatko mišićne ćelije i neuroni. Ovi receptori prepoznaju konzervirane molekulske obrasce mikroorganizama (engl. Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) i endogene opasne molekulske obrasce (engl. Danger-Associated Molecular

Patterns, DAMPs) koje zajedno čini ogroman broj lipida, ugljenih hidrata, proteina i nukleinskih kiselina. Naime, i u kliničkim i u eksperimentalnim istraživanjima, je pokazan veliki broj sličnosti između sepse i traume (Murphy, Paterson *i sar.* 2004; Kaczorowski, Mollen *i sar.* 2008). Danas se u proučavanju sepse intenzivno proučava farmakološka blokada i/ili modulacija TLR kao potencijalna terapijska meta.

Kao što je ranije istaknuto, ESWT je relativno nova terapija koja je uspešno primenjena ne samo kod litotripsije već i na mekim tkivima. Pokazana je njena efikasnost u ortopedске svrhe (Wang, Qin *i sar.* 2008), zarastanju rana (Ottomann, Hartmann *i sar.* 2010), kod opekotina (Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009; Ottomann, Stojadinovic *i sar.* 2012), povrede krvnih sudova (ateroskleroza i ishemija) (Yan, Zeng *i sar.* 2008; Mittermayr, Hartinger *i sar.* 2011). Na lokalnom nivou, pokazano je da ESWT moduliše NO, eNOS i iNOS kao jedan od mehanizama kojim ova terapija ostvaruje svoje efekte na neoangiogenezu (Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008; Zins, Amare *i sar.* 2010), kao i na neolimfoangiogenezu (Kubo, Li *i sar.* 2010) i da pokreće veliki broj puteva imunskog sistema (Mittermayr, Antonic *i sar.* 2012). Međutim, mali je broj podataka o efektima ove terapije na sistemske nivoe, naročito u serumu i eksudatu iz rane, različitih pro- i anti-inflamatornih medijatora. Ranije je istaknuto da ESWT tretman jedan sat nakon nastanka opekotine smanjuje hemokinsku ekspresiju, suprimira proinflamatorne citokine, smanjuje proteolitičku degradaciju ekstraćelijskog matriksa na marginama opekotine, i značajno umanjuje infiltraciju neutrofila i makrofaga u ranu (Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009).

Krakovitz i saradnici su pokazali da ESWT povećava protok krvi kroz male krvne sudove kao i da pretretman putem ESWT suprimira ekspresiju adhezivnih molekula ELAM-1 i ICAM-1 odgovornih za regrutovanje neutrofila na mesto ishemije. Sve navedeno implicira da bi ESWT mogla da bude potencijalna terapija koja ubrzava normalne fiziološke procese popravke tkiva u rani.

Glavni cilj ovih eksperimenata je bio da se utvrdi potencijalna uloga TLR4/MyD88 puta u pokušaju da se moduliše odgovor na oštećenje tkiva, kao i da se utvrdi da li ESWT moduliše odgovor organizma i ima efekte na gastrointestinalni motilitet.

1.6. ESWT modifikuje imunski odgovor i ima protektivni efekat protiv postoperativnog ileusa u mišijem modelu

Postoperativni ileus (POI) je jatrogeno oboljenje koje se često javlja, ako ne i obavezno, nakon abdominalne hirurgije. POI je 1990. godine definisan i klasifikovan od strane Livingstona i saradnika kao funkcionalna inhibicija propulsivne aktivnosti creva, nezavisno od patofiziološkog mehanizma koji ga uzrokuje i podelili su ga na POI (nekomplikovani ileus koji se javlja nakon hirurgije i koji se spontano reši u roku od 2-3 dana) i paralitički POI, stanje koje traje duže od tri dana (Livingston i Passaro 1990) zbog pretpostavke da postoje dva mehanizma odgovorna za razvoj jednog ili drugog postoperativnog ileusa. Međutim, da bi odredili trajanje ileusa, naučnici i lekari su se služili različitim parametrima, kao što su zvuci koje creva generišu, gasovima i pokretima creva. Gasovi i zvuci su kontroverzni zato što su neprecizni, npr. zvuk mogu da prave i tanko i debelo crevo. Tako da je merenje pokreta creva za sada najprecizniji način za izučavanje ileusa (Holte i Kehlet 2000). Uprkos tome što je relativno benigno oboljenje, njegova pojava je praćena povećanjem morbiditeta pacijenata kao i velikim izdacima za negu pacijenata i hospitalizaciju. Statistička istraživanja koja su se bavila ispitivanjem troškova zbog POI su pokazala da su godišnji izdaci zbog ove skoro obavezne komplikacije abdominalnih hirurških intervencija ali i intervencija na drugim delovima tela, preko 1.4 milijarde dolara u SAD (Goldstein 2007).

Normalan motilitet creva je rezultat kompleksne interakcije između enteričkog nervnog sistema, centralnog nervnog sistema, hormona i lokalnih faktora koji mogu da utiču na aktivnost glatke muskulature. Motilitet creva je zavisian od aktivnosti migratornog motornog kompleksa (engl. Migratory Motor Complex, MMC) koji je odgovoran za cirkularne, koordinisane kontrakcije glatke muskulature u zidu creva koja za cilj ima potiskivanje hrane duž crevnog trakta. MMC počinje od stomaka svakih 5 do 10 minuta tokom perioda između dva obroka i odgovoran je za osećaj grčenja tokom gladovanja. Svaki ciklus traje približno 1 minut. Za detaljan opis MMC u fiziološkim i patofiziološkim stanjima pogledati revijalni pregled Deloosea i saradnika (Deloose,

Janssen *i sar.* 2012). Ukratko, postoje četiri faze u svakom MMC. U prvoj fazi dolazi do oscilacija u membranskom potencijalu mišićne ćelije bez kontrakcije. Druga faza obuhvata početak pravih mišićnih kontrakcija koje dostižu maksimum u trećoj fazi. Nakon nje nastupa četvrta faza u kojoj mišić miruje (Sarna 1985).

Do danas je predloženo nekoliko uzročnika postoperativnog ileusa (POI) koji uključuju simpatičke reflekse, inhibitorne humoralne signale, oslobađanje noradrenalina iz zida creva, anestezija i inflamacija (Bueno, Ferre *i sar.* 1978; Livingston i Passaro 1990). Uvođenje laporaskopskih tehnika u hirurgiju, minimalno invazivne tehnike je dovelo do značajnog skraćanja perioda POI. Ovaj podatak sam po sebi sugerira da je hirurška manipulacija GITom *per se*, kao i smanjenje postoperativnih lekova protiv bolova, imalo značajnu ulogu u izazivanju POI (Dubois, Icard *i sar.* 1990; Garcia-Caballero i Vara-Thorbeck 1993; Ludwig, Frantzides *i sar.* 1993; Schippers, Ottinger *i sar.* 1993; Bohm, Milsom *i sar.* 1995). Dizajniranje animalnih modela za proučavanje ovog problema je dovelo do boljeg razumevanja POI i pokazano je da su tri glavna puta koja dovode do postoperativnog ileusa kao posledica hirurškog manipulisanja GIT-om. Ovi putevi nisu nezavisni, i njihov sinergistički efekat na GIT izaziva POI. Važnost ovih puteva varira tokom vremena kao i njihovo preklapanje i interakcije su moguće.

Prvi put je neurogenog porekla i uključuje aferentne i eferentne puteve od kičmene moždine. Eksperimenti sa oštećenjima kičmene moždine pokazali su da splenična u poređenju sa vagalnom inervacijom ima značajniju ulogu (Plourde, Wong *i sar.* 1993; Zittel, Reddy *i sar.* 1994; Zittel, Rothenhofer *i sar.* 1994; Zittel, Lloyd *i sar.* 1998), ali i da adrenergički hipotalamički i pontini-medularni inhibitorni putevi postaju aktivirani što je procenjivano aktivacijom c-fos ekspresije (Barquist, Bonaz *i sar.* 1996) nakon hirurške intervencije. Vagalni putevi su takođe uključeni POI izazvan hirurškom intervencijom (Boeckxstaens, Hirsch *i sar.* 1999). Na primer, incizija kože i laporatomija kratkoročno inhibira motilitet kroz aktivaciju adrenergičkih puteva. Za ovaj put se pretpostavlja da je deo spinalnih refleksa koji je prekinut podelom spleničnih neurona ili resekcijom dorzalnih korenova kičmene moždine (Holzer, Lippe *i sar.* 1992; Boeckxstaens, Hirsch *i sar.* 1999). Sa druge strane, snažniji stimulus, kao što je manipulisanje crevima pokreće drugi put, sa višim pragom pokretanja, supraspinalni put. Snažan stimulus pokreće specifične hipotalamičke puteve i *nucleus tractus solitarii*,

paraventricularno jedro i supraoptički nukleus hipotalamusa (Barquist, Bonaz *i sar.* 1996; Bonaz i Tache 1997). Kortikotropni oslobađajući hormon (engl. Corticotropin Releasing Hormon, CRH) je jedan od glavnih medijatora (Bonaz i Tache 1997; Luckey, Livingston *i sar.* 2003). Pored adrenergičkog inhibitornog puta, uključen je i vagalni inhibitorni put (Barquist, Bonaz *i sar.* 1996; Bonaz i Tache 1997) čiji su medijatori NO i VIP (engl. Vasoactive intestinal peptide) (Bonaz i Tache 1997; De Winter, Robberecht *i sar.* 1998). Morfijum, kao i drugi agonisti μ -opioidnih receptora dati preoperativno produžavaju trajanje postoperativnog stazisa GIT, dok tretman agonistima κ -opioidnih receptora obnavlja motilitet narušen operacijom verovatno kroz perifernu akciju na nevagalne nociceptorne aferentne puteve (Gue, Alvinerie *i sar.* 1989). Nespecifični antagonist opioidnih receptora, naksolon, dalje produžava trajanje POI što kombinovano sa prethodno pomenutim sugerše da aktivacija κ -opioidnih receptora na spleničkim aferentnim neuronima smanjuje visceralnu nociocepciju i inhibitorne reflekse umanjujući na taj način POI. Sve prethodno pomenute studije koje su ispitivale neuronalne mehanizme su rađene kratko nakon same hirurške intervencije, iako su verovatno uspele da objasne ranu blokadu motiliteta, ne mogu da objasne dugoročne efekte, u trajanju od nekoliko dana (Livingston i Passaro 1990; Holte i Kehlet 2000). Već smo pomenuli da farmakološki agensi, kao što su agonisti opioidnih receptora igraju ulogu u razvoju POI, što ukazuje na drugi uzrok GIT stazisa. Opioidi se univerzalno koriste kao analgetici nakon abdominalne hirurgije. Modulatorna uloga na razvoj POI različitih farmakoloških agenasa kroz aktivaciju ili blokiranje κ -, μ - i δ - opioidnih receptora je pokazana u velikom broju *in vivo* studija (Bueno, Fioramonti *i sar.* 1978; Livingston i Passaro 1990; Zittel, Reddy *i sar.* 1994; Zittel, Rothenhofer *i sar.* 1994; Bohm, Milsom *i sar.* 1995; Zittel, Lloyd *i sar.* 1998). Treći mehanizam koji igra značajnu ulogu u izazivanju POI i dismotiliteta GIT je inflamatorni put. Ovaj put je od značaja za dalje utvrđivanje ćelijskih i molekularnih efekata ESWT i njemu ćemo posvetiti posebnu pažnju.

Dugoročni efekti hirurške intervencije na GIT mogu se samo delimično pripisati neurološkim razlozima ili farmakološkim agensima. Mišićni sloj zida tankog creva, *tunica muscularis*, čine dva sloja: sloj mišića čija se vlakna pružaju duž lumena creva (spoljašnji sloj, longitudinalni sloj, *stratum longitudinale*) i unutrašnji sloj mišića čija se mišićna vlakna pružaju poprečno u odnosu na lumen creva (unutrašnji sloj, cirkularni

mišić, *stratum circulare*). Između ova dva sloja se nalazi mienterični nervni pleksus odgovoran za peristaltiku creva. Pored neurona, u mišićnom sloju zida GIT nalazi se ekstenzivna mreža rezidentnih leukocita (Faussone-Pellegrini, Pantalone *i sar.* 1990; Mikkelsen 1995; Bauer 1996). Među njima dominiraju makrofagi koji imaju značajnu ulogu u pokretanju inflamatornog odgovora nakon aktivacije, lučenjem prostaglandina, citokina, NO, reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, engl. Reactive Oxygen Species) i defenzina (Kagan, Ganz *i sar.* 1994; Cicalese, Lee *i sar.* 1996; Cicalese, Rastellini *i sar.* 1996). Ove studije su pokazale da ovi rezidentni makrofagi postaju aktivirani, oni proizvode i oslobađaju NO (azot monoksid) i prostaglandine (iNOS i COX-2 su aktivirane) (Kalff, Schraut *i sar.* 2000; Schwarz, Kalff *i sar.* 2001). Hirurška manipulacija GIT izaziva i produkciju velikog broja proinflamatornih citokina uključujući TNF- α (engl. Tumor Necrosis Factor- α), IL-1 β , IL-6 i MCP-1. Ovi citokini sa svoje strane izazivaju povećanu ekspresiju adhezivnih molekula (npr. ICAM-1) na endotelnim ćelijama krvnih sudova u *tunica muscularis* (Kalff, Carlos *i sar.* 1999). Ovaj inflamatorni odgovor na molekularnom nivou postaje odgovor na ćelijskom nivou regrutovanjem cirkulišućih leukocita, monocita i neutrofila u *tunica muscularis* i potpomažu sekreciju NO, citokina, ROS i proteaza (Kalff, Carlos *i sar.* 1999). Važna uloga aktivnih supstanci kao što je NO ili prostaglandina je bila potvrđena korišćenjem farmakološke i genske blokade (Kalff, Schraut *i sar.* 2000; Schwarz, Kalff *i sar.* 2001). Monoklonska tela specifična za ICAM-1 i β_2 -integrine su uspela da blokiraju regrutovanje leukocita nakon manipulacije tankim crevom, a sprečavanje ovog procesa ima direktne pozitivne efekte na izazivanje POI (Kalff, Schraut *i sar.* 1998).

Manipulisanje intestinalnim traktom sprečava tranzit kroz tanko crevo ali i motilitet debelog creva, ilustrujući da su još neki mehanizmi, udaljeni od mesta direktno izloženog pritisku uključeni u ovaj proces (de Jonge, van den Wijngaard *i sar.* 2003). Jedno objašnjenje je da postoji interakcija između inflamatornog odgovora i neuronalne aktivnosti, koje aktivira inhibitorne puteve. Kada je praćen rad creva i ekskrecija fecesa, pokazano je da manipulacijom indukovana infiltracija imunskih ćelija u *tunica muscularis* dovodi do inhibiranja pražnjenja creva kroz aktivaciju inhibitornih adrenergičkih neurona. Blokada ovog puta pretretmanom sa heksametionijumom ili guanitidinom je dovela do boljitka u motilitetu GIT. Pokazano je takođe da ekspresija c-

fos izostaje kada se blokiraju ICAM-1 molekuli primenom specifičnih monoklonskih antitela (de Jonge, van den Wijngaard *i sar.* 2003). Međutim, neophodno je istaći da postoji veliki broj medijatora inflamacije koji mogu da utiču na neuronske puteve. Za primer ćemo uzeti prostaglandine, čija se sekrecija povećava nakon aktivacije COX-2 (Schwarz, Kalff *i sar.* 2001). Studija koja je bila dizajnirana da objasni da li su COX-2 generisani prostaglandini iz zida creva odgovorni za aktivaciju neurona tokom POI, merenjem c-fos ekspresije pokazala je da prostaglandini senzibilizuju primarne aferentne neurone u kičmenoj moždini (Kreiss, Birder *i sar.* 2003). Eksperimenti sa knock-out COX-2 životinjama su pokazali smanjenje infiltracije neutrofila u *tunica muscularis* kao i otpornost životinja na POI izazvan hirurškom manipulacijom. Isti eksperimenti su pokazali povećanje nivoa E2 prostaglandina u peritonealnoj duplji i potvrđeni su upotrebom blokatora COX-2. Pored aktivacije fagocita, manipulisanje GITom dovodi i do aktivacije mastocita. U miševima ova procedura dovodi do značajnog povećanja proteaze i mast ćelija (markera degranulacije mastocita u peritonealnu duplju) što je izazvalo odlaganje pražnjenja creva. Ukoliko se primeni ketotefin, farmakološki agens koji stabilizuje mastocite, štetni efekti manipulacije GIT-om nestaju (de Jonge, van den Wijngaard *i sar.* 2003). U genetski modifikovanim (knock-out) W/W^v miševima koji se odlikuju nedostatkom mastocita (Kitamura, Go *i sar.* 1978), manipulacija gastrointestinalnim traktom nije imala značajne negativne efekte. Neželjeni efekti hirurške manipulacije crevima su bili restaurirani nakon transplantacije mastocita u W/W^v miševima. Ovi podaci jasno govore u prilog ključnoj ulozi koju mastociti imaju u izazivanju POI. Kada jednom postanu aktivirani, oni sekretuju potentne, preformirane proinflamatorne medijatore kao što su TNF- α , histamin i proteaze, sintetišu prostaglandine i nekoliko citokina (Galli, Gordon *i sar.* 1991; Wershil 1995). Ovi medijatori sa svoje strane dovode do povećanja ekspresije adhezionih molekula putem sekrecije histamina, što dovodi do regrutovanja leukocita (Kubes i Kanwar 1994; Wershil, Furuta *i sar.* 1996). Veza između mastocita i rezidentnih makrofaga u generisanju signala koji dovode do infiltracije inflamatornih ćelija u zid creva ostaje da se utvrdi. Neki podaci pokazuju da lokalni molekularni i ćelijski inflamatorni događaji mogu biti pokrenuti tako što supstance iz seruma aktiviraju leukocite. Oni kasnije dođu u *tunica muscularis* i izazivaju prekid mišićnih kontrakcija (Schwarz, Beer-Stolz *i sar.*

2002). Iako još uvek hipotetički, citokini poreklom iz *tunica muscularis* mogu da utiču na neuronsku funkciju neurona u zidu creva (Collins, Hurst *i sar.* 1992). To bi onda značilo da citokini poreklom iz rezidentnih makrofaga mogu da dovedu do poremećaja u enteričkoj neuromuskulatornoj transmisiji (Collins, Hurst *i sar.* 1992; Galeazzi, Haapala *i sar.* 2000). Eliminacija *egr-1* gena (*egr-1*^{-/-} knockout životinje, himerične *egr-1*^{-/-} i *WTegr-1*^{+/+}) odgovornog za kontrolu ekspresije skoro 300 proinflamatornih gena je značajno umanjila zastoj u gastrointestinalnom tranzitu nakon manipulacije GITom. Isti eksperimenti su identifikovali leukocite kao nosioce ovog procesa (himerične *egr-1*^{-/-} životinje sa transplantiranim *egr-1*^{+/+} leukocitima) (Schmidt, Stoffels *i sar.* 2008). Isti autori su pokazali da je *egr-1* odgovoran za indukciju čitavog repertoara inflamatornih molekula, gena i proteina u *tunica muscularis* i u serumu uključujući NO, prostanoide, monocitni hemotaktički protein MCP-1 (engl. Monocyte Chemoattractant Protein-1); inflamatorni protein makrofaga, MIP-1 α (engl. Macrophage Inflammatory Protein-1alpha); IL-6; IL-1; granulocitnih kolonija stimulišući faktor G-CSF (engl. Granulocyte Colony-Stimulating Factor).

Kao što je prethodno pomenuto, imunski sistem je evoluirao tako da dva procesa, koji rade nasuprot jedan drugom kontolišu inflamaciju, pro- i anti- inflamatorni procesi. Interleukin10 (IL-10) je jedan od nosioca antiinflamatornog procesa u mnogim tkivima (Murray 2006). Značajna uloga IL-10 u razvoju POI je već dobro poznata (Stoffels, Schmidt *i sar.* 2009). On reguliše ekspresiju velikog broja gena putem JAK/STAT puta supresijom Ik kinaze, čija supresija dovodi do smanjene moći vezivanja za DNA nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B, engl. Nuclear Factor-kappa B) (Schottelius, Mayo *i sar.* 1999). Kao ilustraciju uzećemo TNF- α za čiju inhibicija ekspresije je odgovoran IL-10 (Kontoyiannis, Kotlyarov *i sar.* 2001). On takođe suprimira aktivnost makrofaga, čija je uloga u razvoju POI dobro opisana (Moore, O'Garra *i sar.* 1993; Rennick i Fort 2000). Nakon manipulacije, IL-10 je lokalizovan u makrofagama i monocitima u *tunica muscularis* (Stoffels, Schmidt *i sar.* 2009). U eksperimentima sa genetički modifikovanim IL-10^{-/-} životinjama, pokazano je značajno uvećanje inflamatornog odgovora na nivou ekspresije gena, serumskih nivoa citokina i hemokina, očuvanje kontraktilnosti cirkularnog mišića, *stratum circulare* i normalnog motiliteta creva (Stoffels, Schmidt *i sar.* 2009). Terapeutski potencijal IL-10 potvrđen je primenom

egzogenog IL-10 što je značajno ublažilo negativne efekte manipulacije GITom (Kobbe, Schmidt *i sar.* 2009).

Do danas, jedinstveni tretman ili profilaktički primenjeni tretman nije identifikovan. Delimični razlog za to je i multimodalna priroda uzroka pojave ileusa. Različiti pristupi ovom problemu su rezultovali u mnogostрукim terapijama koje su imale manje ili više uspeha u sprečavanju POI sa ciljem da se pronađe prava ili kombinacija više terapijskih modaliteta u cilju očuvanja motiliteta creva. Nazogastralna intubacija je dugo godina bila glavna terapija. Međutim, kliničke studije su pokazale da ona ne skraćuje vreme provedeno u bolnici, kao ni vreme do prve oralno unete hrane a sa povećanjem rizika za infekcije, groznicu, pneumoniju i atelektazis (delimičan prestanak rada pluća) (Sagar, Kruegener *i sar.* 1992; Cheatham, Chapman *i sar.* 1995; Vermeulen, Storm-Versloot *i sar.* 2006). Električna stimulacija direktno primenjena na zid creva je pokušana ne bi li se električna aktivnost u GIT regulisala i vratila u normalu ali bez uspeha (Richter i Kelly 1986). Neki autori su sugerisali da bi rano davanje hrane bilo od koristi za uspostavljanje normalnog motiliteta creva. Međutim ovaj pristup je dao različite, često suprotne rezultate u lečenju POI (Schwenk, Bohm *i sar.* 1998; Stewart, Woods *i sar.* 1998; Han-Geurts, Hop *i sar.* 2007; Dag, Colak *i sar.* 2011; Zaghiyan, Felder *i sar.* 2013). Neki autori su pokušali sa žvakanjem žvaka nakon operacije, kao „sham“ hranjenje da bi se stimulisali refleksi i posledično pokrenuo GIT, ali ne postoji dovoljan broj studija sa jasno definisanim režimom žvakanja da bi se napravili generalni zaključci o uspešnosti ove terapije (Fitzgerald i Ahmed 2009; Noble, Harris *i sar.* 2009).

ESWT je prethodno bila uspešno korišćena za modulaciju inflamatornog odgovora, angiogeneze i pokretanje formiranja limfnih sudova. U prethodno opisanim eksperimentima smo pokazali da pozitivni efekti ESWT na GIT zavise od vremena primene. Pretretman životinja sa 600 impulsa, frekvencijom od 4Hz i EDF od 0.03mJ/mm^2 ima protektivne efekte na GIT i sprečava stazis izazvan implantacijom TBX. TBX model je dizajniran da bismo utvrdili efekte traume na sistemsku inflamaciju. Ovaj model je relevantan iz dva razloga. Ovaj model oponaša kliničku sliku prisutnu kod pacijenata koji idu na abdominalnu hirurgiju kod kojih se javlja ileus kao odgovor na mehanički stimulus tokom manipulacije intestinalnim traktom. Vreme operacije je jasno definisano i kontrolisano tako da je relativno lako primeniti ESWT pre hirurške

intervencije. U ovim eksperimentima, ćemo pokušati da utvrdimo mehanizam kojim ESWT ispoljava svoje efekte na GIT. Procenićemo ekspresiju nekoliko gena relevantnih za proces inflamacije, serumske nivoe sedam citokina i hemokina kao i kontraktilnost cirkularnog mišića u životinjama koje su bile pretretirane i „sham“ tretiranim životinjama. Kao dodatak, pratićemo i dinamiku promene ekspresije gena u *tunica muscularis* i proteina u serumu u neoperisanim životinjama neposredno po tretmanu, 3 sata, 24 sata i 48 sati nakon tretmana.

2. Ciljevi rada

1. Utvrditi efekte ESWT na ćelijskom i molekularnom nivou u animalnom modelu ishemije kožnih režnjeva:
 - Utvrditi da li ESWT pospešuje preživljavanje ishemičnih kožnih režnjeva i optimalno vreme primene.
 - Utvrditi da li ESWT ima efekte samo lokalno ili i na tkivo koje nije bilo direktno izloženo ESWT.
 - Utvrditi efekte ESWT na proces angiogeneze.
2. Utvrditi da li ESWT ima sistemske efekte u transgenom VEGF-R2-luc modelu [FVB/N-Tg(VEGF-R2-luc)Xen] miševima.
3. Utvrditi da li ESWT može da moduliše sistemski inflamatorni odgovor na traumu:
 - Dizajnirati model traume koji omogućava evaluaciju sistemskog inflamatornog odgovora bez upotrebe analgetika, koji omogućava izučavanje ćelijskih i molekularnih događaja koji pokreću sistemski inflamatorni odgovor i njegov uticaj na GIT
 - Utvrditi da li je bezbedno primeniti ESWT na abdomen
 - Utvrditi da li ESWT može da moduliše inflamaciju izazvanu traumom i spreči njen negativan efekat na GIT i mehanizme delovanja
4. Utvrditi efekte ESWT na klinički relevantnom modelu inflamacije izazvanog hirurškom manipulacijom GIT i mehanizam protektivnog delovanja ESWT.

3. Materijal i metode

3.1. Model ishemije kožnih reznjeva

Četrdeset adultnih mužijaka Sprague-Dawley pacova težine između 350 – 450 grama su korišćeni u ovim eksperimentima. Eksperimenti su bili odobreni od strane Etičkog komiteta Ludwig Boltzmann, Institut za eksperimentalnu i kliničku traumatologiju, Beč Austrija, a u skladu sa kriterijumima važećim u vreme izvođenja eksperimenata i u skladu sa međunarodnim preporukama za brigu o životinjama. Sve životinje su bile individualno držane u kavezima, pri sobnoj temperaturi $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sa $50 \pm 10\%$ vlažnosti vazduha i na dnevno-noćnom režimu od 12 sati svetla i 12 sati mraka. Životinje su imale pristup hrani i vodi *ad libitum*.

3.1.1. Hirurška procedura kreiranja kožnih reznjeva

U ovim eksperimentima, mi smo koristili modifikovani model nekroze epigastričnog kožnog reznja usled ishemije, originalno opisanog od strane Finset-a i saradnika (Reichenberger, Germann *i sar.* 2009) i modifikovanog 1997. godine (Kuo, Wang *i sar.* 2009). U ovom modelu, veličina reznja je prilagođena individualnim veličinama životinja tako što su granice reznja bile približno 8 x 8cm (koristili smo se anatomskim granicama na telu svake životinje). Kada se jedna neurovaskularna petlja prisutna u kožnom reznju podveže i ukoliko kožni reznj ostane netretiran, dolazi do ishemije koja reproducibilno izaziva nekrozu od približno 25% površine celog reznja. Bitno je istaći da ovaj model takođe omogućava objektivno izučavanje recipijentnog tkiva i omogućava dodatno ocenjivanje kvaliteta reznja. Hirurška intervencija je bila identična za sve pacove. Tokom svih operacija smo koristili aseptičke tehnike ne bismo li eliminisali infekcije. Sve životinje su uvedene u anesteziju pomoću Isoflurane (2 Vol%) u komorama za celo telo i opšta anestezija je održavana pomoću Ketamina (Ketamine (60 mg/kg, i.p.)) i Ksilazina (Xylazine (16 mg/kg, i.p.)). Zamena fluida je bila pomoću Ringerovog rastvora (1ml/H).

Kada su životinje bile u totalnoj anesteziji, abdomen svake životinje je ošišan i depiliran (sa izuzetkom 24h Pre-Op grupe, vidi dalje). Životinje su postavljene supraspinalno na hirurško postolje sa kontrolisanim grejanjem. Telesna temperatura životinja je merena tokom hirurške intervencije i održavana konstantnom 37 °C. Nakon toga, anatomski delovi tela su korišćeni kao granice za budući epigastrički kožni režanj (npr. Kranialno, ksifoid a kaudalno pubični region i bilateralno granica na prelazu tanke, ventralne kože i deblje dorzalne kože). Svaki režanj je zatim podeljen na jos tri zone radi kompletnije i objektivnije procene stanja reznja, Vitalnu (početak neurovaskularne petlje) Tranzijentnu (prelazni deo od dobrog do nedovoljnog dovoda krvi) i Ishemičnu zonu (zona disekovanih neurona i krvnih sudova). Čitavi abdominalni region je skeniran koristeći laserski Dopler sistem (engl. Laser Doppler Imaging - LDI, Moor LDI™, Moor Instruments Ltd., Devon, UK), koji je služio kao bazna 2-dimenzionalna slika perfusije reznja.

Adipokutani režanj je podignut od glave ka repu i odvojen je od mišićne fascije sve dok ceo režanj nije potpuno izdignut i izolovan, i koji je u tom momentu i dalje imao intaktnu neurovaskulaturu petlju i za koji smo u tom momentu utvrdili da ima dobru perfuziju. Po principu slučajnosti, životinje su randomizirane da im leva odnosno desna neurovaskularna petlja bude podvezana sa absorbujućim 5-0 koncem. Deo krvnih sudova i neurona između dva podveza je zatim isečen da bismo sprečili srastanje krvnih sudova tokom trajanja eksperimenta. Režnjevi u svim grupama su zatim zašiveni na svoje anatomske mesto koristeći neabsorbujući 4-0 konac i praveći isprekidane šavove.

3.1.2. ESWT tretman ishemičnih kožnih reznjeva

U ovim eksperimentima smo koristili udarne talase generisane elektrohidrauličnim generatorom (DermaGold 180 Tissue Regeneration Technologies, LLC, Woodstock, USA, proizvedenu u MTS Europe GmbH, Konstanz, Germany). Mi smo koristili nefokusirani parabolični reflektor u terapeutskoj glavi koji reflektuje talase u frontu koji je dijametra reflektora i koji reflektuje talase skoro paralelno u poređenju sa ostalim talasima u cilju mogućnosti tretiranja veće ciljane površine (vidi 1.1.3. Generisanja udarnih zvučnih talasa). Fluks energetske gustine ovako generisanih talasa je

manji nego kod fokusiranih udarnih zvučnih talasa. U našim eksperimentima, EDF– 0.1 mJ/mm², frekvencija – 5 impulsa/sec. Aplicirali smo ukupno 300 impulsa. Kontrole nisu primile udarne talase.

3.1.3. Post-operativna briga, sakupljanje uzoraka i beleženje rezultata

Nakon završene operacije i aplikacije tretmana, životinje su primile analgetike subkutano 0.01 mg/kg telesne mase Buprenorphin. Nakon toga, životinje su posmatrane sve do potpunog oporavka iz anestezije i smeštene pojedinačno u kaveze. Da bismo sprečili autokanibalizam, zubi životinja su skraćeni po predlogu Komorowska-Timek i sar 1999 i već testiranu našoj instituciji (Komorowska-Timek, Newlin *i sar.* 1999; Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009).

Analgetici (Karprofen u dozi od 4 mg/kg telesne mase) su davani subkutano tokom tri dana nakon operacije. Dvadeset četiri časa nakon operacije, 3. i 7. dana, pacovi su ponovo anestezirani. Postavljeni su na ugrejani hirurški sto u supraspinalni položaj i digitalne fotografije režnja su napravljene (zarad planimetrijskog analiziranja). Režnjevi su skenirani pomoću LDI sistema (LDI, Moor Instruments Ltd, Devon, UK).

Sedmog dana nakon operacije, životinje su humano eutanizirane prekomernom dozom Pentobarbitalom i režnjevi su makroskopski analizirani. Biopsije tkiva su napravljene za histološka i imunohistološka bojenja i analize.

3.1.4. Grupe i tretman

Životinje su randomizirane po principu slučajnosti u kontrolnu grupu ili jednu od tri grupe koje su primile tretman:

1. **ESWT Pretretman (24h Pre-Op; n=10):** Nakon totalne anestezije inhalacijom izoflurana, abdomen svake životinje je ošišan i nakon toga depiliran. Granice režnja su obeležene kao što je gore opisano. Nakon toga, udarni zvučni talasi su primenjeni (EDF=0.1 mJ/mm², v=5 impulsa/sec, 300 impulsa ukupno) na lateralnu, Ishemičnu zonu, područje režnja sa disekovanom neurovaskulaturnom petljom, kroz ultrasonički gel koji je nanesen preko tretiranog budućeg dela režnja.

2. **ESWT neposredno posle operacije kreiranja epigastričkog režnja (Post-Op, n=10):** Neposredno nakon zašivanja režnja u originalnu anatomsku poziciju, udarni

zvučni talasi su primenjeni u ishemijsku trećinu reznja (Ishemična zona) kroz ultrasonički gel.

3. ESWT 24 sata posle hirurške intervencije (**24h Post-Op**, n=10): Nakon završene operacije, životinjama je dozvoljeno da se potpuno oporave od anestezije i onda su smeštene pojedinačno u kaveze do sutradan. 24 sata nakon završene operacije, životinje su ponovo anestezirane i udarni zvučni talasi su aplicirani kroz ultrasonički gel u Ishemijskoj zoni koja se do tada već jasno uočavala.

4. Kontrolna grupa (**Kontrola**, n=10): Kontrolne životinje su imale istu proceduru kreiranja ishemičnog reznja sa tom razlikom što nakon operacije nisu primile nikakav tretman. Da bi se poboljšala adhezija reznja za recipijentno tkivo, dodatno su stavljena dva šava za mišićnu fasciju u sredini reznja.

3.1.5. Planimetrija digitalnih fotografija

Celo područje reznja, koje je uključivalo i nekrotično tkivo je precrtano na providnu foliju koja je onda fotografisana. Digitalne slike su onda prenesene na kompjuter i analizirane kvantitativno pomoću LUCIA morfometrijskog softvera (LUCIA morphometric software (version 4.1, Media Cybernetics LP, Silver Spring, MD)).

3.1.6. Preživljavanje reznjeva

Inicijalna površina reznja je određena pomoću anatomskih granica reznja. Granice su predhodno opisane i izračunata vrednost za površinu pre hirurške intervencije je uzeta kao 100%. Promene u površini reznja su praćene tokom čitavog eksperimenta i predstavljene kao procentualna vrednost od preoperativne vrednosti ($P_0=100\%$). Područje reznja koje je bilo crno sa gubitkom dlake, zajedno sa očvršćavanjem i gubitkom elastičnosti kože je označeno kao nekrotično tkivo. Nekrotička zona je predstavljena kao procentualna vrednost od ukupne dimenzije reznja. Vijabilnost reznja je procenjena na dane 1, 3 i 7 nakon hirurške intervencije.

3.1.7. Merenje perfuzije reznjeva

Laserski Dopler sistem (LDI, Moor Instruments Ltd, Devon, UK) je korišćen za merenje perfuzije tkiva. Laser malog intenziteta (2mW, talasne dužine $\lambda=632.8$ nm) je

korišćen za skeniranje tkiva, koje je davalo dvodimenzionalnu sliku perfuzije tkiva. Princip rada ovog sistema je da kada se krvne ćelije kreću kroz tkivo, dolazi do poremećaja u frekvenciji lasera po fizičkom principu poznatom kao Dopplerov efekat. Promene u frekvencijama su predstavljene kao kodirana slika na kojoj su tamna polja sa malom perfuzijom dok su svetla polja reprezentacija tkiva sa visokom stopom perfuzije. Istačićemo da su sva merenja izvedena bez direktnog kontakta aparata i tkiva od interesa, sa razdaljine od 20cm. LDI scan modus je podešen na 10 ms/pixel, a rezolucija 256 x 256 piksela. Perfuzija reznja je dokumentovana kao slika u boji i izražena u jedinicama perfuzije. Perfuzija je zatim izračunata za svaku od tri zone, Vital zonu, Tranzicionu zonu i Ishemijsku zonu. Kao što smo prethodno istakli, abdomen je skeniran pre operacije da bismo sakupili podatke o normalnoj perfuziji tkiva za svaku životinju (baseline). Nakon incizije tkiva i formiranja reznja i jedan sat nakon izazivanja ishemije podvezivanjem neurovaskularne petlje, urađeno je drugo skeniranje tkiva. Sledila su skeniranja na dan 1, 3 i 7 posle operacije.

3.1.8. Makroskopska evaluacija reznjeva

Makroskopska analiza reznjeva urađena je kroz procenu „kliničkih“ znakova kao što su prisustvo otoka (ml), adherentnosti reznja za recipijentno mesto, formiranje edema (gradacija od 0 do 3, pri čemu je 0=nema edema, 3=maksimalni edem). Reznjevi su proksimalno isečeni i tečnost između recipijentnog tkiva i reznja je sakupljena i zapremina je izmerena. Nakon sakupljanja tečnosti, ukoliko je bilo, reznjevi su preparirani od proksimalnog ka distalnom kraju uz procenu adherentnosti za recipijentno tkivo. U slučaju da je rezanj potpuno srastao, ocenjen je sa 3, ukoliko je pripojenost mestimična ocenjen je sa 2, vidni mali delovi sraslog tkiva sa 1, dok je potpuno odsustvo pripojenosti ocenjeno kao 0.

3.1.9. Imunohistohemijska analiza

Izolovani i disekovani kožni reznjevi, granica od vitalne do nekrotične zone su smešteni u 10% neutralni buferski formalin 24-48 sati. Nakon toga, tkivo je dehidratirano tako što je premeštano iz rastvora manje u rastvor veće koncentracije alkohola. Nakon toga, tkivo je pripremljeno u parafinske blokove i sečeno u debljini od 6µm na

rotacionom mikrotomu. Nakon postavljanja na staklene mikroskopske pločice, tkivo smo deparafinisali koristeći ksilen, rehidratirali smo ga u alkoholu i obojili pomoću hematoksilina i eozina za standardnu histološku analizu. Na tkivnim preparatima smo uradili i IHC bojenje vaskularnih endotelijalnih ćelija pomoću antitela za von Willebrandov faktor (von Willebrand Factor (vWF)) da ispitamo gustinu krvnih sudova. Funkcionalne i diferencirane krvne sudove smo obojili antitelima za aktin glatke muskulature (SMA- smooth muscle actin).

Protokol: Tkivni preseći debljine 6 μm su zagrejani 30 minuta na 60 °C i onda deparafinisani u ksilenu. Tkivo je zatim rehidratirano u sledećim koracima: 1. Xylene: 2 x 3 minuta, 2. Ksilen 1:1 with 100% etanol: 3 minuta, 3. 100% etanol: 2 x 3 minuta, 4. 95% ethanol: 3 minuta 5. 70 % etanol: 3 minuta , 6. 50 % etanol: 3 minuta , 7. Ispiranje u tekućoj vodi.

Preseći koji su bili bojeni za vWF su prvo 10 minuta tretirani sa proteinazom K (DAKO, Glostrup, Denmark). Zatim su svi uzorci tretirani sa 1.5 % H_2O_2 u TBS (TRIS-buffered saline) tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi da bismo se rešili endogene peroksidne aktivnosti. Posle ispiranja 10 minuta sa TBS-om, preseći su inkubirani sa 2.5% konjskim serumom (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Nakon toga, preseći su inkubirani sa vWF antitelom (poliklonalno zečije anti humano antitelo, DAKO, Glostrup, Denmark) ili sa primarnim SMA antitelom (monoklonalno mišije anti-humano, Klon 1A4, Sigma Aldrich, St. Louis) na 4 °C i onda isprani sa TBS. ImmPRESS anti-zečije ili anti-mišiji micropolimeri (Vector laboratories, Burlingame, CA) su dodati i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u TBS, tkivo je obojeno koristeći VECTOR NovaRed Substrate Kit (Vector laboratories, Burlingame, CA) tokom 6 minuta. Preseći su zatim obojeni hematoksilinom kao kontrast i dehidratirani preseći su trajno fiksirani sa Roti-Histokit II (Carl Roth, Karlsruhe, Germany).

Analiza tkiva je urađena po principu „blinded study“ tako što su osobe koje su analizirale tkivo bile lišene informacija o uzorcima. Dve osobe su nezavisno radile procenu gustine krvnih sudova u presecima tako što su brojali krvne sudove pozitivne za vWF^+ i SMA^+ u 8-16 polja pri uvećanju od 200 puta kroz tri područja, subepitelno, intra-dermalno i intra-muskularno od tranzijentne do nekrotičke zone. vWF^+ i SMA^+ sudovi su izbrojani i srednja vrednost je izračunata za svaku grupu. Odnos $\text{SMA}^+ / \text{vWF}^+$ je

takođe izračunat za procenu odnosa formiranih funkcionalnih sudova (SMA⁺) i svih endotelnih struktura (vWF⁺).

3.2. Transgeni model miša VEGF-R2-luc mice [FVB/N-Tg(VEGF-R2-luc)Xen]

Transgeni miševi (VEGF-R2-luc mice [FVB/N-Tg(VEGF-R2-luc)Xen], n=5/grupi) su korišćeni za testiranje potencijalnih sistemskih efekata udarnih zvučnih talasa. Mi smo koristili ove miševe da testiramo *in vivo* VEGF-R2 ekspresiju u odgovoru na udarne talase. Ovi miševi nose transgene od 4.5 kb mišiji VEGF-R2 promotorski region koji onda indukuje ekspresiju luciferaze poreklom od svitaca koja služi kao reporterski protein (Zhang, Fang *i sar.* 2004). U našim eksperimentima, miševi nisu imali dodatnih intervencija sem tretmana udarnim zvučnim talasima i to samo na jednom zadnjem udu.

3.2.1. Aplikacija udarnih zvučnih talasa na transgene miševe i *in vivo* merenje fluorescence

Totalna anestezija za sve miševe je indukovana u inhalatoru pomoću isoflurane (2 Vol%) i održavana pomoću ketamine (60 mg/kg, IP) i ksilazina (7.5 mg/kg, IP). Nakon toga, obe zadnje noge su ošišane i depilirane. Miševima je onda ubrizgan luciferin (150mg/kg, IP) i slikani u sistemu za *in vivo* oslikavanje (VivoVision[®] IVIS[®], Xenogen, CA) da bismo dobili intenzitet signala u normalnim fiziološkim uslovima. Udarni zvučni talasi su onda aplicirani (EFD– 0.1 mJ/mm², frekvencija – 5 impulses/sec, ukupno 30 impulsa) kroz kondukcioni ultrasonički gel samo na jednu nogu. Noga koja će primiti tretman je izabrana po principu slučajnosti. Jedan sat nakon tretmana, i na dane 1, 3, i 7 mi smo merili intenzitet signala u IVIS sistemu. Kontrolna grupa je bila podvrgnuta istim procedurama bez primene udarnih zvučnih talasa. Bioluminiscentni signali su onda kvantifikovani pomoću Living Image Software (Xenogen) pomoću *in vivo* luciferazne aktivnosti i izraženi kao broj fotona po sekundi. Aktivnost luciferaze pre primene udarnih zvučnih talasa je bila označena kao 100% i služila je kao baza za dalju analizu.

3.3. Dizajn i evaluacija modela inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanog traumom

Svi eksperimenti su bili odobreni od strane Komiteta za upotrebu i brigu o životinjama i izvedeni u skladu sa njihovim trenutnim regulativama (the Institutional Animal Use and Care Committee of the University of Pittsburgh). U ovim eksperimentima koristili smo mužijake miša (C57BL/6) komercijalno dostupnih (JacksonLaboratories, Bar Harbor, ME), starih 8–10 nedelja i teških 20-30 grama.

3.3.1. Priprema TBX

Zdravi i netretirani miševi su žrtvovani i korišćeni kao izvor za dobijanje TBX (Tissue Bone Matrix). Miševi su anestetizirani, dezinfikovani alkoholom i isprani sterilnim fiziološkim rastvorom, a zatim je incizija napravljena u abdominalnom zidu. GIT je pomeren u stranu i krv je sakupljena iz vene kave. Nakon toga, duge kosti prednjih i zadnjih nogu zajedno sa okružujućim mišićima su izolovane kao i grudni koš (sternum, rebra i međurebarni mišići). Sterilne tehnike smo koristili tokom svih hirurških procedura kao i tokom izolovanja i manipulacija tkivom od interesa. Nakon izolovanja, tkivo smo samleli u automatskom sekaču. Ovako procesovano tkivo je TBX. TBX je pomešan sa 5% mase samog TBX sa mešavinom 10000u/ml penicilina i 10000 Ug/ml streptomicina (Lonza, MD, USA). Tkivo je promešano kako bi se obezbedio potpuni kontakt tkiva i antibiotika. Ovaj korak nam je obezbedio sterilnost TBX koji će biti implantiran u životinje i eliminisanje potencijalne greške usled inflamacije izazvane bakterijama. Ovako pripremljeno tkivo će dalje biti korišćeno u eksperimentima ukoliko nije drugačije istaknuto. Dodatni korak za evaluaciju sterilnosti TBX je bio kultivacija malog dela transplantiranog tkiva (25mg), nakon žrtvovanja životinje, i evaluacija broja bakterija 24h nakon zasejavanja u DMEM. Tokom svih eksperimenata, nismo registrovali kontaminaciju TBX.

3.3.2. Implantacija TBX u životinje primaoce (hirurška intervencija)

Singeni mužijaci starosti 8-10 nedelja (4-6 životinja po grupi) koji su određeni da budu primaoci TBX su izmereni i njihova ukupna telesna masa je zabeležena i kasnije korišćena za računanje mase TBX koji treba da bude implantiran. Primaoci su podeljeni po principu slučajnosti na sledeće grupe (broj pored grupe predstavlja procenat ukupne telesne mase životinje koji odgovara količini implantiranog TBX): Netretirane kontrole; TBX 17.5% sham (ova grupa je anestetizirana, incizionna rana je napravljena i ubrizgana je količina od 5% od telesne težine životinje mešavine penicilina i streptomocina); TBX 5%; TBX 10%; TBX 15%; TBX 17.5%; TBX 20%; TBX 25%.

Dve dodatne grupe su bile formirane, TBX17.5% koja je primila TBX koji je bio tretiran 2 sata sa 90°C tokom 2 sata i grupa koja je primila istu količinu TBX ali koji je bio decelurisan pomoću srednje jake per-oksi-sirćetne kiseline TBX20%. Životinje su žrtvovane 21 sat nakon implantacije pomoću 3% izoflurana i punkturom srca.

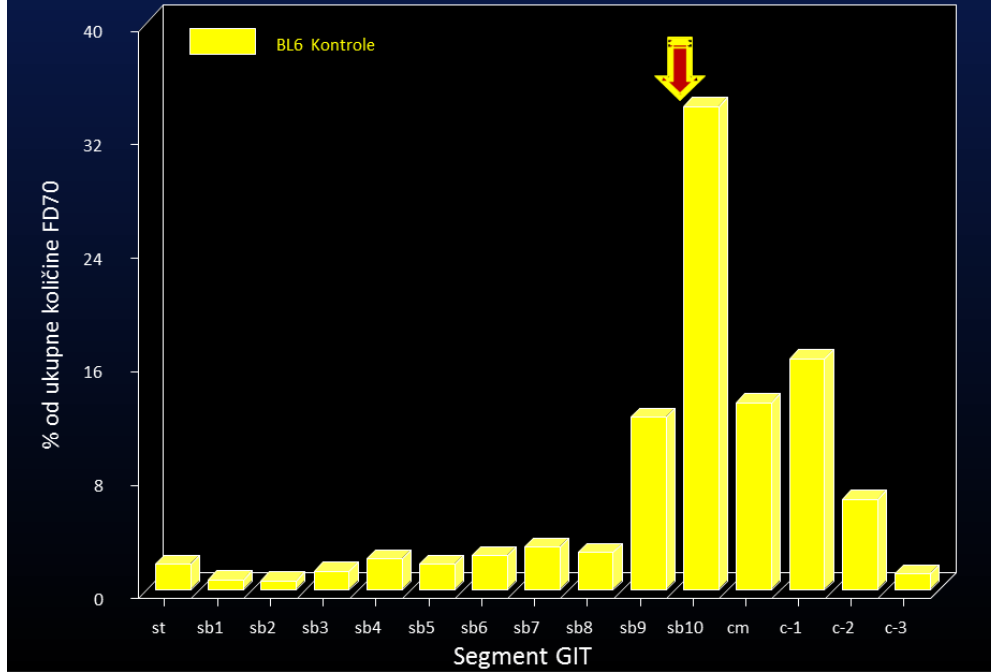
3.3.3. Esej za određivanje gastrointestinalnog tranzita

Miševima je oralno dato 15µl fluorescentno obeleženog dekstrana veličine 300kD (FITC-Dextrane, Sigma Aldrich, SAD). Veličina molekula dekstrana je određena u prethodnim studijama i pokazano je da ne dolazi do njegovog prolaska kroz zidove GIT. 75 minuta nakon administracije dekstrana životinje su anestetizirane izofluranom. Postavljene su da leže ventralnom stranom na dole i kontinuirana anestezija od 2-2.5% v/v izoflurana je dostavljana kroz isparavač FORANE® (Isoflurane) Model 100 Vaporizer (SurgiVet, USA). Nakon sterilizacije alkoholom i ispiranja sterilnim fiziološkim rastvorom, napravljena je incizionna rana kroz kožu i abdominalni zid. GIT je dislociran i 0.8-1.2 ml krvi je sakupljeno špricom kroz venu kavu. Nakon toga, krv je centrifugirana 10min, 10000g, na 4°C. Krvna plazma je sakupljena i podeljena na dva dela ~120µl za dalju analizu. GIT (od želudca do analnog otvora) je izolovan i stavljen u Krebsov rastvor (ohlađen na 4°C) i tu čuvan do dalje analize (~15minuta nakon izolovanja). Zatim je usledilo izolovanje TBX. Odstranjen je šav kojim je zatvorena incizionna rana za implantaciju TBX, i ekscizijama sa obe strane TBX implanta je omogućen pristup tkivu. TBX je sakupljen i postavljen na led. Izolovani TBX je izmeren na elektronskoj analitičkoj vagi i ista težina dejonizovane vode je dodata u tkivo i izmešano je pulsним

vorteksovanjem. Nakon vorteksovanja, smeša je centrifugirana pri brzini od 3000g, 10 min, 4°C. Supernatan je sakupljen, podeljen na tri dela (~200µl) i trenutno smrznut pomoću tečnog azota i čuvan do dalje analize u frižiderima na -80°C.

Spektrofotometrijsko određivanje geometrijskog centra fluorescence: Izolovani deo GIT-a je izvađen iz krebsovog rastvora, višak tečnosti je uklonjen celuloznim papirom i diskovan. Prvo su uklonjene mezentzere a zatim je GIT podeljen na sledeće delove (Kalff, Buchholz *i sar.* 1999): stomak - 1 deo; tanko crevo - 10 delova; cekum- 1 deo, debelo crevo i analni region - 3 dela. Svaki deo ponaosob je longitudinalno diskovan i smešten u 0.8ml dejonizovane vode. Pulsnim vorteksovanjem u ciklusima od 10 sekundi vorteksovanja zatim 1-2 sekundi pauza, smenjujući se tokom 2 minuta oslobođen je fluorescentno obeleženi dekstran. Centrifugiranjem 10min, 10000g je tkivo i sadržaj tkiva na dnu tube, dok je u supernatantu rastvoren fluorescentni dekstran. 200µl supernatanta je izmereno spektrofotometrijski na talasnoj dužini od $\lambda=485\text{nm}$ ekscitacija i $\lambda=495\text{nm}$ detekcija (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices Corp., USA). Sva merenja fluorescence su vršena u duplikatu i prikazivana kao srednja vrednost. Distribucija fluorescentnog signala duž GIT-a je prikazana kroz računanje geometrijskog centra (Miller, Galligan *i sar.* 1981) ($GC = \% \text{ (procenat od ukupne fluorescence u svakom segmentu } \times \text{ broj segmenta)}$) grafik 2.1. i određen je koristeći SoftMax Pro softver (SoftMax Pro, version 3.1.2, Molecular Devices Corp., USA) i Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, USA).

Distribucija FD70 u kontrolnim grupama



Grafik2.1. Histogram distribucija fluorescentnog signala duž GIT u kontrolnim životinjama, prikazan kroz računanje geometrijskog centra (GC = % (procenat od ukupne fluorescence detektovan u svakom segmentu ponaosob))

3.3.4. Određivanje funkcionalnih karakteristika cirkularnog mišića u zidu tankog creva

In vitro aktivnost cirkularnog mišića u zidu tankog creva je određivana kao što je prethodno opisao Eksandari i sar. 1997 (Eksandari, Kalff *i sar.* 1997). Peti segment tankog creva je prepariran tako što je uronjen u Krebs-Ringerov bikarbonatni puffer (KRB) koji je prethodno bio oksigenisan i prikačen pomoću disekcionih igala u Sylgard™ (Midland, MI) disekcioni sud. Krebs-Ringerov bikarbonatni puffer je napravljen od, izraženo u mM: 137.4 Na⁺, 5.9 K⁺, 2.5 Ca²⁺, 1.2 Mg²⁺, 134 Cl⁻, 15.5 HCO₃⁻, 1.2 H₂PO₄⁻, and 11.5 glukoze, zatim je bio gasifikovan sa 97% O₂/3% CO₂ da bi se uspostavio pH od 7.4. Tanko crevo je otvoreno duž mezentera i pomoću tankih pinceta mukoza je uklonjena. Mišićno tkivo je isečeno u trake širine 1-6 mm paralelno sa cirkularnim mišićem, *stratum circulare*, i postavljeno u standardno tkivno kupatilo za

određivanje kontraktilnosti mišića. Tokom čitavog eksperimenta tkivo je oblivano oksigenisanim KRB sa konstantnim protokom i na konstantnoj temperaturi od 37°C. Jedan deo svake mišićne trake je fiksiran dok je drugi kraj prikačen za transducer sile (WPI, Sarasota, FL). Tkivu je dozvoljeno da se uravnoteži i nakon jednog sata je postepeno istegnuto do L_0 (L_0 = dužina pri kojoj se dešavaju maksimalne spontane kontrakcije). Nakon merenja bazne linije u trajanju od 30 minuta, dozno-zavisna kriva je merena tako što su različite koncentracije (0.3 μ M; 1 μ M; 3 μ M; 10 μ M; 30 μ M; 100 μ M i 300 μ M) betanekola-muskarinski agonist- dodavane u intervalima od 10 minuta praćenih sa 10 minuta periodima ispiranja. Kontraktilnost je izračunavana kao integral ispod krive. Odgovori su normalizovani u odnosu na količinu i dužinu tkiva kao i površinu poprečnog preseka tkiva i prikazani kao g/s/mm².

3.3.5. Određivanje koncentracije medijatora inflamacije - MSD elektrohemitiluminiscentni esej

Krv od netretiranih kontrola, TBX17.5% sham i TBX17.5% grupa je sakupljena u vreme žrtvovanja i odmah centrifugirana na 4°C 10 minuta i na 10000g. Serum je zatim sakupljen i čuvan na -80°C do analize. Supernatant iz sveže napravljenog TBXa je sakupljen kao i iz TBX 21h nakon implantacije tako što je TBX pomešan sa istom količinom dejonizovane vode, vorteksiran i centrifugiran an 4°C i 5000rpm. Svi uzorci seruma i fluida iz TBX su analizirani da bi se odredila koncentracija IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12 p70, IL-6, KC/GRO α i TNF- α . Ukratko, svi uzorci su otopljeni na ledu i nakon potpunog otopljanja su filtrirani kroz Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units with Microporous Membrane (d=0.65 μ m)- Millipore (Billerica, MA) u centrifugama na 4°C tokom 5 minuta i na 10000g da bi se oslobodili svih zgrušanih i čvrstih delova.

Uzorci fluida iz TBX su dodatno 10 puta razblaženi zbog visoke koncentracije citokina i hemokina u njima i kao takvi korišćeni u daljoj analizi. Multipleks kit (Mouse Proinflammatory-7 Ultrasensitive Kit (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)) koji je baziran na principu imuno sendvič eseja i umesto hemijske reakcije, za detekciju koristi elektrohemitiluminiscenciju. Sekundarno antitelo ima prikačeni SulfoTag koji, kada kroz ploču prođe električna struja, oslobađaju fotoni koje registruje kamera- Sector Imager SI6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

3.4. TLR4 i terapijska ESWT modulacija inflamacije i gastrointestinalnog dismotiliteta izazvanih traumom perifernih tkiva

Ukratko, zdravi netretirani miševi su žrtvovani i korišćeni kao izvor za dobijanje TBX (Tissue Bone Matrix). C57/BL6 miševi kupljeni od Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, starosti 8-10 nedelja; m=20-30gr kao i TLR4 KO i MyD88 KO miševi koji su napravljeni u našoj laboratoriji. Kao i prethodno opisano, određena količina tkiva, u težini od predodređene procentualne vrednosti od ukupne telesne težine miša primaoca, je smeštena u 400 μ l mešavine 10000u/ml penicilina i 10000 Ug/ml streptomicina (Lonza, MD, USA).

Implantacija TBX u životinje primaoce je urađena po prethodno opisanoj proceduri po sledećim grupama: za **TLR4 KO model**, 1. Kontrola C57/BL6, 2. C57/BL6 12.5% TBX, 3. Kontrola TLR4 KO, 4. TLR4 KO 12.5% TBX. Za **ESWT tretman**, životinje su podeljene u sledeće grupe: ESWT 48h pretretman, ESWT24h pretretman + TBX12.5% 24h, Samo TBX 12.5% 24h, Kontrole.

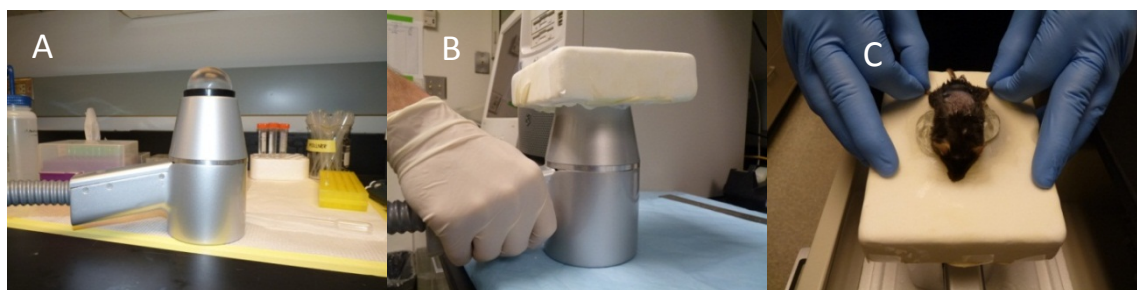
Sterilnost TBX je i u ovim eksperimentima proverena pre implantacije i odmah nakon žrtvovanja tokom izolovanja TBX za određivanje koncentracije citokina. 25mg tkiva je uronjeno u hranjivom medijumu za ćelijske kulture Dulbecco Modified Eagle Medijum (Lonza, USA) na 37°C tokom 24h i ispitan za rast mikroorganizama. Tokom eksperimenata nismo registrovali pojavu infekcije.

Kao dodatak ovim eksperimentima, mi smo pokušali da potvrdimo naše prethodne rezultate i pokažemo da su događaji koji se dešavaju u oštećenom tkivu (koje u sebi još uvek sadrži značajnu količinu živih ćelija) a ne produkti oštećenja (molekuli i delovi molekula) odgovorni za razvoj, prethodno opisane, sistemske inflamacije. Mi smo TBX tkivo u posebnoj grupi životinja podvrgli zamrzavanju (uranjanjem u tečni azot) i odmrzavanju (uranjanjem u vodeno kupatilo na 37°C), naizmenično pet puta.

Sve životinje su eutanazirane na humani način, uspavlivanjem sa 3% Isoflurane, i punkturom srca.

3.4.1. ESWT tretman

DermaGold[®] mašina (Tissue Regenerative Technologies, Woodstock, Georgia, USA, proizvedena u MTS Europe GmbH, Konstanz, Germany) je korišćena i u ovim eksperimentima. Ovaj tip mašine koristi elektro-hidraulični princip za generisanje udarnih zvučnih talasa. Može generisati nekoliko nivoa energije udarnih zvučnih talasa kao i nekoliko različitih frekvencija kojima se talasi generišu. Ukoliko nije drugačije istaknuto, životinje su tretirane sa 600 impulsa, sa frekvencijom od 4Hz i EDF od 0.03mJ/mm². Glava mašine je postavljena da stoji uspravno na postolju, slika 2.1.A.



Slika 2.1. Abdominalna primena ESWT. A. terapeutska glava. B. Improvizovano postolje. C. Položaj životinje tokom tretmana (zarad ilustracije, inhalator je uklonjen)

Improvizovano postolje, napravljeno od stiropora je postavljeno na terapeutsku glavu tako da je membrana slobodna. Posebna pažnja je obraćena da sve bude dobro prekriveno ultrazvučnim gelom koji služi kao provodnik od membrane do tkiva kao i potpuno prijanjanje lateksne rukavice (podaci o nepromenjenosti oblika i energije talasa pri ovakvom tretmanu su dostupni od TRT LLC.) slika 2.1.B. Miševi su anestetizirani inhalacijom izoflurana i anestezija od 2.5 %v/v izoflurana je dostavljena kroz isparavač FORANE[®] (Isoflurane) Model 100 Vaporizer (SurgiVet, USA) tokom celog tretmana. Pre tretmana, životinjama je odstranjena dlaka električnim brijačem. Nakon šišanja, životinje su postavljene na platformu (Slika 2.1.C), dodirujući membranu terapeutske glave samo abdomenom. Posebnu pažnju smo posvetili pozicioniranju životinja na terapeutskoj platformi tako da pluća i grudni koš životinje nikada ne budu pod direktnim uticajem udarnih zvučnih talasa, da bismo sprečili potencijalne povrede pluća i glave uzrokovane kavitacijom.

3.5. Model postoperativnog ileusa

Animalni model postoperativnog ileusa je prvo opisan od strane Kalff i saradnika 1998 (Kalff, Schraut *i sar.* 1998). Ovaj model sastoji se od manipulisanja tankim crevom u eksperimentalnim životinjama da bi se oponašala prava operativna procedura GIT u ljudima. Ona reproducibilno izaziva inflamatorni odgovor, lokalno na nivou GIT kao i sistemski odgovor, praćen promenom nivoa citokina i hemokina u serumu.

3.5.1. Procedura za hirurško manipulisanje tankim crevom

Životinje su anestezirane inhalacijom izoflurana. Postavljene su da leže ventralnom stranom na dole i kontinuirana anestezija od 2-2.5%v/v izoflurana je dostavljana kroz isparavač FORANE® (Isoflurane) Model 100 Vaporizer (SurgiVet, USA). Abdomen životinja je sterilisan alkoholom i ispiran sterilnim fiziološkim rastvorom. Longitudinalno je napravljena incizija kroz kožu i abdominalni zid. Sterilna gaza je natopljena fiziološkim rastvorom i postavljena duž incizije. Pamučni štapići za uzimanje brisa su nakvašeni sterilnim fiziološkim rastvorom i korišćeni su za manipulisanje intestinalnim traktom. Tanko crevo i cekum životinje su izmešteni iz abdominalne duplje na gazu. Tako postavljeno, tanko crevo je nežno pritiskano uzdužno od želudca do cekuma. Tokom manipulacije tankim crevom, pazili smo da ne povredimo krvne sudove u mezenteriji (slika 2.2.).



Slika 2.2. Model postoperativnog ileusa i inflamacije izazvanih hirurškom intervencijom. Slika prikazuje manipulaciju tankim crevom pomoću dva štapića obložena paučnom vatom kojim se oponaša hirurška intervencija na ljudima.

Životinje su po principu slučajnosti podeljene u jednu od narednih grupa:

1. Kontrole,
2. ESWT_{imm}- životinje koje su žrtvovane odmah nakon tretmana,
3. ESWT_{3h}- one koje su žrtvovane 3 sata nakon tretmana,
4. ESWT_{24h}- životinje žrtvovane 24 sata nakon tretmana,
5. ESWT_{48h}- životinje žrtvovane 48 sati nakon tretmana,
6. ESWT_{24h}+SM_{24h} životinje koje su primile tretman 24 sata pre operacije i žrtvovane 24 sata nakon operacije,
7. SM_{24h}- životinje koje su žrtvovane 24 sata nakon operacije i nisu imale nikakav dodatni tretman.

3.5.2. Kvantitativni RT-PCR

Ekspresija pro i antiinflamatornih gena je određena koristeći kvantitativni Real Time-PCR. *Tunica muscularis* je izolovana kao što je prethodno opisano u predodređenim vremenskim intervalima nakon terapije ili hirurške intervencije i trenutno smrznuta u tečnom azotu. Ukupna količina RNK je izolovana koristeći RNeasy Mini Kit (Qiagen, MO, SAD) i tretirana DNazom I da bi se uklonili svi tragovi DNK. Kvalitet i kvantitet RNK izolovanih iz svih uzoraka *tunica muscularis* proveren je da bismo osigurali optimalne uslove za qRT-PCR reakciju. Količina RNK je merena pomoću Nanodrop Spectrophotometer a kvalitet RNK je proveravan gel elektroforezom koristeći Agilent 2100 Bioanalyzer prema uputstvima proizvođača i uzorci sa RIN<7 i A_{230/260}<1.5 su isključeni iz dalje analize. qRT-PCR je urađen koristeći TaqMan[®] RNA-to-Ct[™] 1-Step Kit (Applied Biosystems, SAD) sa ukupnom količinom RNK od 100ng sa tri tehnička ponovka pri svakoj reakciji. Primeri za qRT-PCR i za IL-6, IL-10, CCL2, VEGFa, EGR1, GAPDH su kupljeni od Applied Biosystems. Ukratko, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system je podešen na 1: 48.0 °C, 15:00min, 2:95.0 °C, 10:00min, 40ciklusa 95.0 °C-0:15s i 60.0 °C-1:00mini sve reakcije su izvođene u ukupnoj zapremini od 20µl. Analiza rezultata i određivanje Ct je urađeno na 21 CFR Part 11 SDS v1.4.1 software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) podešavajući manuelno baseline na 3-15 ciklusa i Threshold vrednost na 0.2. Podaci su zatim

analizirani $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodom koristeći GAPDH kao housekeeping gen i normalizovani pomoću vrednosti dobijenim za netretirane kontrole (Pfaffl 2001).

3.5.3. Određivanje stepena infiltracije mijeloperoksidaza pozitivnih (engl. Myeloperoxidase MPO⁺) ćelija u *tunica muscularis* jejunuma

Nakon 24 časa od operacije, životinje su anestezirane inhalacijom izoflurana. Želudac, tanko crevo, cekum i deo kolona su izolovani i smešteni u Krebs-Ringerov bikarbonatni pufer u disekcionom sudu. Tanko crevo je pozicionirano u disekcionom sudu pomoću igala duž mezentera, bez rastezanja. Središnji deo tankog creva je izolovan i incizija je napravljena duž linije mezentera. Tkivo je „otvoreno“ i istegnuto do 150% dužine i 250% širine pomoću disekcionih igala. Koristeći tanke pincete, uklonjena je mukoza sa unutrašnje strane creva i ostatak tkiva je uronjen u 100% etanol 30 minuta. Nakon 30 minuta, tkivo je isprano nekoliko puta sa Krebs-Ringerov bikarbonatnim puferom i tretirano Hanker-Yates-ovim reagensom (Polysciences, Warrington, PA) za detekciju ćelija koje ekspimiraju mijeloperoksidazu. Kod miševa to su polimorfonuklearni neutrofili i u jednom malom procentu makrofagi. Tkivo je postavljeno na staklene pločice, prekriveno pokrovnim staklom i ispitivano pod svetlosnim mikroskopom sa kamerom (Nikon Microphot-FXA, Fryer, Huntley, IL) pri uvećanju od 200x (Sheibani, Lucas *i sar.* 1981). Mikrografije su analizirane koristeći se Fotošopom (Photoshop CS5). Mikrografije su konvertovane u crno beli format, izabrano je pet polja jednake površine koja nemaju MPO⁺ infiltrate i zatamnjenje iznad nivoa pozadine je izračunato i korišćeno za statističku analizu.

3.6. Statistička obrada rezultata

3.6.1. Statistička obrada rezultata proizišlih iz eksperimentalnog modela ishemije epigastričkog kožnog režnja

Svi rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna greška (eng. SEM-standard error of the mean). Sva statistička izračunavanja su urađena koristeći se GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California,

USA. Normalna raspodela je testirana Bartlett-ovim testom za jednake varijanse. One Way Analysis of Variance je korišćena za poređenje aritmetičkih sredina za specifične varijable između različitih grupa. Post hoc testiranje je izvedeno pomoću Tukey-jevog multiple comparison testa. Vrednosti $p < 0.05$ su smatrane statistički značajnim.

3.6.2. Statistička obrada MSD rezultata

Koncentracija citokina i hemokina u krvi i fluidu iz TBX je određena koristeći MSD Discovery Workbench TM2006 MSD_3_0_18 software (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) i Microsoft Excel. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška osim ukoliko je drugačije naglašeno. Studentov t-test i analiza varijanse (ANOVA) su korišćeni za određivanje statističke značajnosti rezultata kao i EZ Analyze add-in za Microsoft Excel za F-test i Boniferroni korekciju za post hoc poređenje među grupama. Statistička obrada podataka urađena je i Kruskal-Wallis-ovim testom rangova za utvrđivanje postojanja statističke značajnosti između više grupa, Mann-Whitney U test rangova je korišćen za poređenja između dve grupe koristeći JMP Statistical Discovery 10.0 software (SAS, Cary, NC). P vrednosti < 0.05 su smatrane statistički značajnim.

3.6.3. Statistička obrada qRT-PCR rezultata

Analiza rezultata i određivanje Ct je urađena na 21 CFR Part 11 SDS v1.4.1 software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) podešavajući manuelno baseline na 3-15 ciklusa i Threshold vrednost na 0.2. Podaci su zatim analizirani $\Delta\Delta Ct$ metodom koristeći GAPDH kao housekeeping gen i normalizovani pomoću vrednosti dobijenim za netretirane kontrole (Pfaffl 2001). Statistička značajnost razlike u ekspresiji gena od interesa je urađena između grupa pomoću Studentovog t-testa i analize varijanse (ANOVA) praćene Tukey-jevom post hoc testom, kao i Kruskal-Wallis-ovim testom rangova za utvrđivanje postojanja statističke značajnosti između više grupa, Mann-Whitney U test rangova je korišćen za poređenja između dve grupe koristeći JMP Statistical Discovery 10.0 software (SAS, Cary, NC). P vrednosti < 0.05 su smatrane statistički značajnim a vrednosti od 3 fold fiziološki relevantnim.

4. Rezultati

4.1. Model epigastričnih reznjeva kože

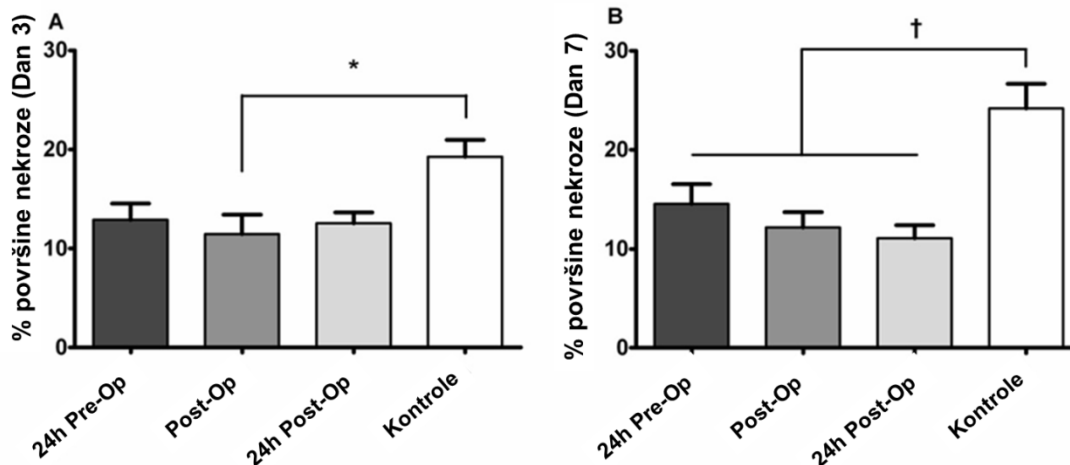
4.1.1. ESWT suprimira nekrozu i kontrakciju epigastričnih reznjeva kože nezavisno od vremena aplikacije

Ligacija jedne strane unutrašnjeg epigastričnog neurovaskularnog čvora rezultovala je u permanentnoj akutnoj ishемiji kožnih reznjeva koja se u netretiranim kontrolnim životinjama pogoršavala do nekroze. Nekroza je obuhvatala epidermis i dermis kože. Procenat površine nekrotičnog tkiva (gubitak tkiva) izračunavan je u odnosu na ukupnu površinu reznja po formuli:

$$\text{Gubitak tkiva} = P_{(\text{nekrotičnog tkiva})} / P_{(\text{ukupna površina reznja})} * 100, \text{ gde je } P \text{ površina.}$$

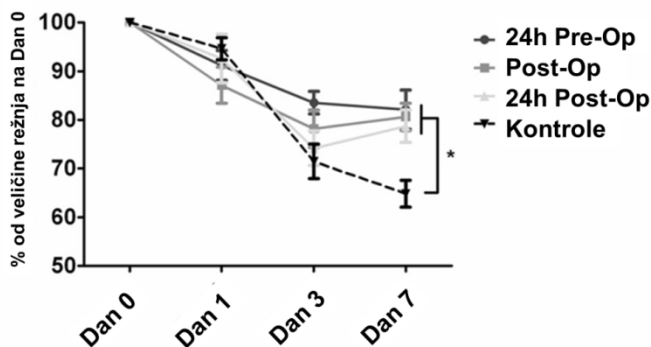
Do trećeg dana nakon operacije, analizom digitalnih fotografija kožnih reznjeva utvrdili smo da je nekrotično tkivo u kontrolnim životinjama bilo $19\% \pm 2\%$ od početne površine reznja i povećalo se do $24\% \pm 2\%$ nakon trećeg dana.

Tretman udarnimzvučnim talasima je redukovao gubitak tkiva (Grafik 4.1) nezavisno od vremena primene terapije (24h pre operacije, Pre-op), neposredno nakon operacije (Post-Op,) i 24h nakon operacije (24h Post-Op). Trećeg dana nakon operacije, u grupama koje su tretirane udarnim zvučnim talasima gubitak tkiva je bio u grupi koja je tretirana udarnim zvučnim talasima 24h pre hirurške intervencije- Pre-Op= $13\% \pm 2\%$, u grupi koja je tretirana neposredno nakon operacije- Post-Op= $12\% \pm 2\%$ ($p < 0.05$ vs. Kontrole), i u grupi koja je tretirana 24h nakon hirurške intervencije- Post-Op= $13\% \pm 1\%$. Nedelju dana nakon hirurške intervencije, gubitak tkiva je bio statistički značajno niži u svim grupama tretiranim sa ESWT u poređenju sa kontrolama ($p < 0.001$): 24h Pre-OP: $15\% \pm 2\%$, Post-Op: $12\% \pm 2\%$, 24h Post-Op: $11\% \pm 1\%$ u poređenju sa Kontrolnom grupom ($24\% \pm 2\%$).



Grafik 4.1. Nekroza tkiva izražena u procentima od ukupne površine režnja trećeg i sedmog dana nakon izazivanja ishemije hirurškim podvezivanjem kod kontrolnih i ESWT tretiranih životinja. Sedmog dana značajna redukcija stepena nekroze je registrovana u svim grupama koje su tretirane sa ESWT nezavisno od vremena aplikacije udarnih zvučnih talasa (B, † $p < 0.01$) u odnosu na kontrolne grupe životinja (a). Iako je jasno uočeno smanjenje površine nekrotičnog tkiva trećeg dana posle operacija, samo je kod životinja koje su tretirane neposredno nakon hirurške intervencije (Post-Op) zabeležena statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolama (* $p < 0.05$). Nije bilo statistički značajne razlike između tretiranih grupa. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška.

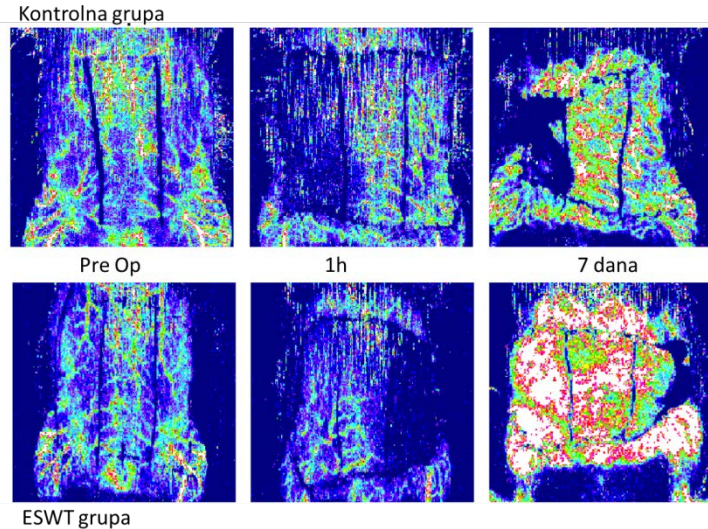
Sve životinje koje su primile terapiju, nezavisno od vremena primene ESWT imale su slične rezultate i trećeg i sedmog dana nakon terapije. Značajno je istaći da se za razliku od kontrolnih životinja, procenat veličine nekrotičnog tkiva nije značajno menjao tokom trajanja eksperimenata u svim grupama tretiranim udarnim zvučnim talasima. Analizirajući slike primećeno je da je došlo do kontrakcije režanjeva sedmog dana posle operacije kod svih životinja, kao i u slučaju površine nekrotičnog tkiva, kod tretiranih životinja je kontrakcija bila značajno manja ($65\% \pm 3\%$) u odnosu na kontrolnu grupu ($80\% \pm 5\%$) (Grafik 4.2.).



Grafik 4.2. Kontrakcija režnja sedmog dana nakon operacije (izražena kao procenat ukupne, inicijalne, površine režnja, 100%). Vidi se značajna redukcija kontrakcije režnja u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0.05$). Podaci su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

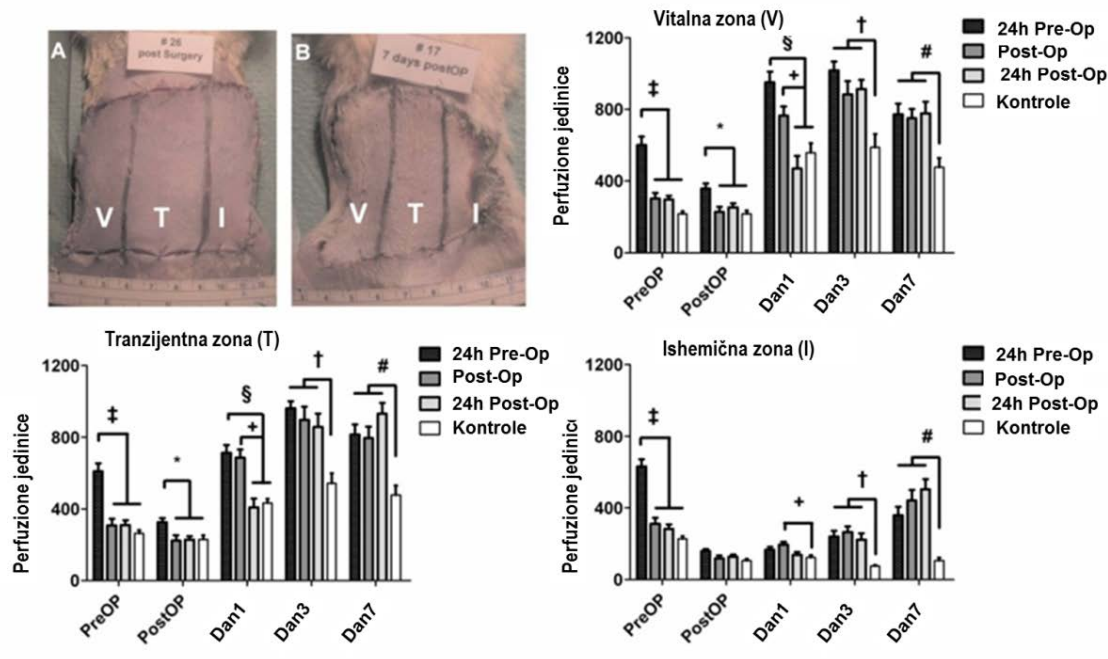
4.1.2. Perfuzija ishemičnih reznjeva raste primenom ESWT

Mi smo koristili laserski dopler sistem za oslikavanje da bi procenili kako terapija utiče na perfuziju tkiva (Grafik 4.3.).



Grafik 4.3. Ilustracija merenja perfuzije u ishemičnim kožnim reznjevima nakon hirurške intervencije. Kontrolna grupa i ESWT grupa pre operacije, 1sat nakon operacije i 7 dana nakon hirurški izazvane ishemije.

Ovaj sistem omogućava dobijanje dvodimenzionalne slike (kudirane mape) površinske perfuzije reznja koja se meri u svakoj površinskoj tački samog kožnog reznja koju smo koristili u daljoj analizi. Zarad što boljeg i objektivnijeg merenja perfuzije u kožnim reznjevima, reznjevi su podeljeni u tri zone kao sto je prethodno opisano. Osnovna, fiziološka vrednost perfuzije tkiva pre operacije je merena, i kao što je i očekivano, vrednost je statistički značajno bila viša u 24h Pre-Op ($p < 0.001$) u sve tri zone, vitalnoj, tranzicionoj i ishemičnoj, u poređenju sa svim ostalim grupama (Kontrolne, Post-Op, 24h Post-Op; Grafik 4.4.). Nakon hirurške intervencije je došlo do naglog smanjenja perfuzije u svim grupama a najizraženije je bilo u ishemičnoj zoni. Perfuzija tkiva u grupi koja je primila udarne talase 24h pre operacije, je u vitalnoj i tranzicionoj zoni bila značajno veća ($p < 0.05$) u poređenju sa istim zonama u svim ostalim grupama.



Grafik 4.4. Perfuzija superficijalnog sloja reznja je merena putem LDI sistema u tri predefinisane zone (V, Vital; T, Transition; I: Ischemic) i izražena je u perfuzionim jedinicama. Reprezentativne slike reznjeva sedmog dana nakon operacije su prikazane kao ilustracija (A: neposredno posle operacije; B: sedim dan posle operacije). Prekondicioniranje tkiva sa udarnim zvučnim talasima 24h pre operacije je rezultovalo u statistički značajnom uvećanju perfuzije u Pre-Op grupi u poređenju sa svim ostalim grupama (\ddagger $p < 0.001$) u svim zonama budućeg reznja (V, T and I). Indukcija ishemijske kroz unilateralno podvezivanje epigastričke petlje je izazvalo pad u perfuziji svih grupa ali je perfuzija u 24h Pre-Op grupi i dalje bila viša ($p < 0.05$) u poređenju sa svim ostalim grupama u Vitalnoj i Tranzijentnoj zoni. Tretman šok talasima neposredno posle hirurške intervencije (Post-Op grupa) je rezultovao u značajnom skoku perfuzije u prva 24 sata posle operacije u svim zonama reznja ($p < 0.05$) a u grupi koja je pretretirana (24h Pre-Op grupa) je porasla i ostala veća od kontrola i 24h Post-Op grupe u Vitalnoj i Tranzijentnoj zoni (\S $p < 0.001$). Slična situacija je primećena i u grupi koja je tretman primila 24sata nakon operacije (24h Post-Op grupa) kod koje je registrovan porast perfuzije na dan 3 postoperativno ($p < 0.01$). Značajno je istaći da je na dan 3 posle operacije, perfuzija reznja bila slična u svim grupama koje su primile terapiju udarnim zvučnim talasima i različita od kontrolne grupe (\dagger $p < 0.05$). Perfuzija je neznatno opala u Vitalnoj i Tranzijentnoj zoni u većini životinja do sedmog dana eksperimenta, Perfuzija u Ishemičnoj zoni je porasla. Sedmog dana nakon operacije, sve tretirane grupe su imale viši perfuzioni indeks u poređenju sa kontrolama ($\#$ $p < 0.05$). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Već prvog dana nakon izazivanja ishemijske u grupama koje su tretirane sa ESWT, grupa 24h Pre-Op i grupa Post-Op, uočen je statistički značajan napredak u povećanju perfuzije tkiva u vitalnoj i tranzijentnoj zoni i vrednosti perfuzije su bile na nivou fizioloških vrednosti ili čak veće (Grafik 4.4.).

Nakon 24 časa od izazivanja ishemije, režnjevi u kontrolnoj grupi i u 24h Post-Op grupi su imali jasno izražene ishemične zone. Sve do trećeg dana nakon operacije, grupa 24h Post-Op je pokazivala značajno povećanje perfuzije u poređenju sa kontrolama ($p < 0.01$), i vrednost su bile slične kao i kod drugih grupa životinja koje su bile tretirane ($p > 0.05$). Kontinuirani trend povećanja perfuzije režnja je uočen u obe grupe, 24h Pre-Op i Post-Op i trećeg dana nakon izazivanja ishemije. I zaista, sve grupe koje su primile terapiju udarnim zvučnim talasima, su pokazivale značajno poboljšanje perfuzije trećeg i sedmog dana nakon operacije u poređenju sa kontrolama i to u sve tri ispitivane zone Grafika 4.4. U svim grupama koje su primile udarne talase, perfuzija u vitalnoj i tranzijentnoj zoni je neznatno samnjena trećeg i sedmog dana posle operacije, ali je porasla u ishemičnoj zoni.

4.1.3. Makroskopska analiza ishemičnih epigastričnih režnjeva nakon tretmana udarnim zvučnim talasima

Pripojenost režnja za recipijentno mesto je veoma bitno za neovaskularizaciju ishemičnog tkiva. Serom koji se formira ispod režnja remeti ovaj proces i ima negativne posledice na ovaj proces. Posebno u ovom modelu, formiranje seroma je veoma često i javlja se u približno 30% životinja u svakoj grupi. Iako su režnjevi u ishemičnoj zoni u svim grupama koje su primile terapiju bolje srasli to nije bilo statistički značajno u poređenju sa kontrolama. U svim grupama, adherentnost režnjeva u Vitalnoj i Tranzijentnoj zoni je bila slična. Uočeno je formiranje edema u svim grupama, ono je u ishemičnoj zoni bilo slično u svim grupama. U Tranzijentnoj zoni, formiranje edema je bilo manje izraženo u tretiranim grupama nego u kontrolama, ali ova razlika nije dostigla prag statističke značajnosti. Konačno u Vitalnoj zoni formiranje edema je bilo statistički značajno manjeformirano u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolama (Tabela 3.1). Na ovom mestu, bitno je istaći i da je tranzijentna zona grupe koja je primila terapiju udarnim zvučnim talasima 24 sata nakon izazivanja ishemije bila sa značajno ($p < 0.05$) manjim edemom u poređenju sa svim ostalim grupama.

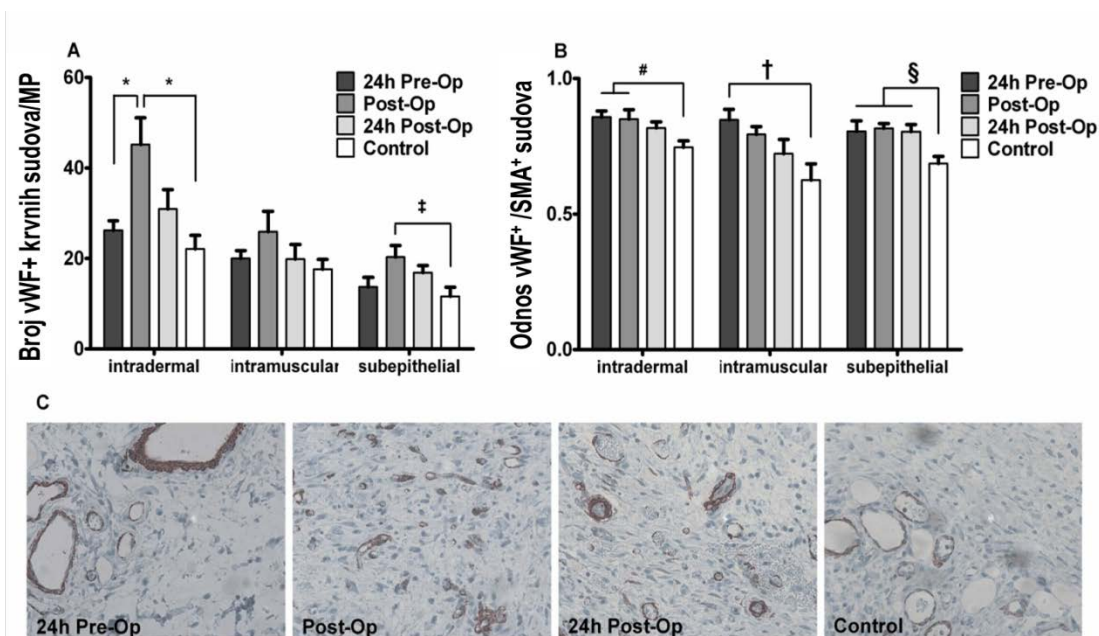
Tabela 3.1. Evaluacija adherentnosti režnjeva za recipijentno mesto i formiranje edema

	Seroma		Adherentnost režnja			Edema			
	Br. Životinja	mL	Vitalna zona	Tranzijentna zona	Nekrotična zona	Vitalna zona	Tranzijentna zona	Nekrotična zona	
24h Pre-Op	3 od 10	1.3	0.4	1.1	1.8	1.1	1.2	2	Mean
		0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2	SEM
Post-Op	4 od 10	4.8	1	1.4	2	1	1.7	2	Mean
		2.9	0.4	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2	SEM
24h Post-Op	3 od 10	2.2	0.4	0.7	1.2	0.2	0.3‡	1	Mean
		1.4	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.4	SEM
Kontrole	3 od 10	2	0.3	1	0.6	2.2*	2	2	Mean
		0.4	0.2	0.5	0.2	0.5	0.3	0.5	SEM
		0– nedostatak		3– najviši stepen		0 – nepostojanje nekroze		3– teška nekroza	

Simbol * označava p vrednost ($p < 0.05$) u poređenju sa Kontrolama; Simbol ‡ označava p vrednost ($p < 0.05$) u poređenju sa Kontrolama, 24h Pre-Op i Post-Op grupom. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost (Mean) \pm standardna greška (SEM).

4.1.4. Ekspresija von Willebrandovog faktora i ekspresija aktina glatkih mišića u ishemičnom kožnom režnju nakon ESWT

Kvantitativna imunohistohemijska analiza efekata udarnih zvučnih talasa na revaskularizaciju tkiva ishemičnog režnja je rađena od strane nezavisnih posmatrača koji su određivali broj von Willebrandovog faktora (vWF) pozitivnih ćelija po jednom vidnom polju pri uveličanju od (x200) u tri sloja (sub-epitelni, intra-dermalni, i intra-muskularni) u tranzicionoj zoni počev od vijabilne zone ka nekrotičnoj zoni (Grafik 4.5.A). Povećani broj vWF pozitivnih krvnih sudova je identifikovan u različitim nivoima epigastričnih režnjeva životinja koje su primile ESWT tretman u poređenju sa kontrolama. Ovakva situacija je bila najviše izražena u intra-dermalnom sloju životinja koje su primile ESWT neposredno posle operacije kod kojih je zabeležen statistički značajno veći broj vWF pozitivnih struktura u poređenju sa kontrolama ($p < 0.01$) i ostalim tretiranim životinjama 24h Pre-Op i 24h Post-Op ($p < 0.05$).



Grafik 4.5: Indukcija angiogeneze putem udarnih zvučnih talasa. (A) Broj vWF+ endotelijalnih struktura. Udarni zvučni talasi primenjeni 24 sata pre hirurške intervencije (24h Pre-Op grupa) i neposredno posle (Post-Op grupa) imaju više vWF pozitivnih struktura u intradermalnom sloju u poređenju sa kontrolom i ostalim grupama (* $p < 0.05$). Post-Op grupa je imala i veći broj vWF+ struktura u subepitelnom sloju u poređenju sa kontrolom (§ $p < 0.05$). (B) Odnos funkcionalnih krvnih sudova (SMA+) i endotelijalnih struktura ukupnog broja endotelijalnih struktura (vWF+) je računat i pokazao je da je statistički značajno više oformljenih, funkcionalnih krvnih sudova u sub-epitelijalnom sloju u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom (§ $p < 0.05$). U intradermalnom sloju (paniculus carnosus) grupa 24h Pre-Op je imala značajno više funkcionalnih krvnih sudova u († $p < 0.05$), dok su grupe 24h Pre-Op i Post-Op grupa u intradermalnom sloju imale statistički značajno više SMA+ sudova (# $p < 0.05$). (C) Reprezentativni imunohistohemijski presek za svaku grupu pokazuje SMA+ funkcionalne sudove. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Za uspešno preživljavanje režnja neophodno je da dođe do formiranja novih krvnih sudova, ali je isto tako potrebno da oni prođu kroz proces maturacije i počnu da vrše svoju funkciju. Da bismo procenili koliko je od ukupnog broja vaskularnih struktura prošlo kroz potpuni proces maturacije, mi smo preseke tkiva obojili i za SMA pozitivne strukture. Izračunavanje odnosa SMA⁺ / vWF⁺ struktura nam je dao odgovor na ovo pitanje. Mi smo identifikovali veći broj zrelih krvnih sudova u subepitelijalnom sloju tretiranih režnjeva u odnosu na kontrole (Grafik 4.5.B). Ovo je bilo uočeno bez obzira na vreme primene udarnih zvučnih talasa i dokazuje da primena udarnih zvučnih talasa male energije potpomaže maturaciju i angiogenezu (povećanje funkcionalnih krvnih sudova) u sub-epitelijalnom sloju. 24h Pre-Op grupa je imala značajno veći odnos SMA⁺ / vWF⁺ u intramuskularnom sloju (paniculus carnosus muscle) u poređenju sa kontrolnom grupom.

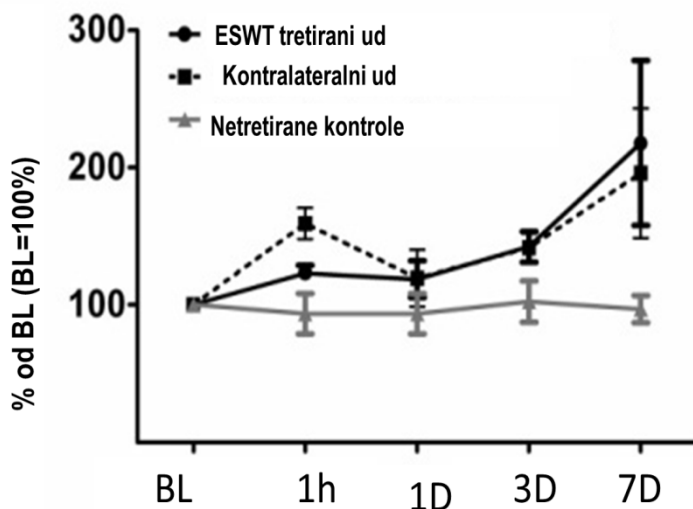
U dermalnom sloju su grupe 24h Pre-Op i Post-Op imale značajno veći odnos, funkcionalnih (SMA⁺) sudova u ishemičnom režnju (Grafik 4.5. B)

U ovom radu predstavljamo mikrografije anti-SMA IHC obojenih preseka (Grafik 4.5. C) na kojoj su prikazani funkcionalni krvni sudovi u različitim slojevima režnja iz grupe koja je primila tretman i kontrolne grupe.

4.2. Model transgenih VEGF-R2/luc miševa

4.2.1. ESTW povećava ekspresiju VEGF-R2 u zdravim transgeni VEGF-R2/luc miševima

Jedan sat nakon tretmana, na dane 1, 3 i 7 smo merili *in vivo* aktivnost luciferaze u udovima životinja i koristili smo IVIS sistem da je kvantifikujemo. Mi smo merili aktivnost u udu koji je tretiran kao i u kontralateralnom udu, koji nije tretiran. Tretman je rezultovao u konstantnom porastu bioluminiscentnog signala i periodu od sedam dana i bio je konzistentan sa ekspresijom VEGF-R2 (Grafik 4.6.). U kontrolnoj grupi, signal je ostao na fiziološkom, bazalnom nivou tokom čitavog perioda eksperimenta. Iako je istaknut, duplo veći signal registrovan sedmog dana posle tretmana, u oba, tretiranom i netretiranom zadnjem udu, ova razlika nije zadovoljila statističku značajnost.



Grafik 4.6. Ekspresija VEGF-R2 u zadnjim nogama transgenih miševa. Emitovani fotoni su normalizovani sa nivoom pre tretmana (fiziološki, bazalni nivo) koji je uzet kao 100%, i predstavljen kao procenat ove vrednosti. Mi smo analizirali nivo ekspresije receptora (jedan od glavnih receptora uključen u angiogenezu) i zabeležili kontinuirani rast od momenta primene udarnih zvučnih talasa pa sve do poslednjeg dana eksperimenata (dan 7 nakon tretmana). U tretiranim udovima, zabeležen je dva puta veći porast u nivou ekspresije VEGF-R2 u poređenju sa kontrolnom grupom ali ovaj rezultat nije imao statističku značajnost. Bitno je primetiti da je nivo ekspresije u netretiranom, kontralateralnom udu takođe bio povišen u poređenju sa kontrolama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

4.3. Model traumom izazvane inflamacije i gastrointestinalnog stazisa

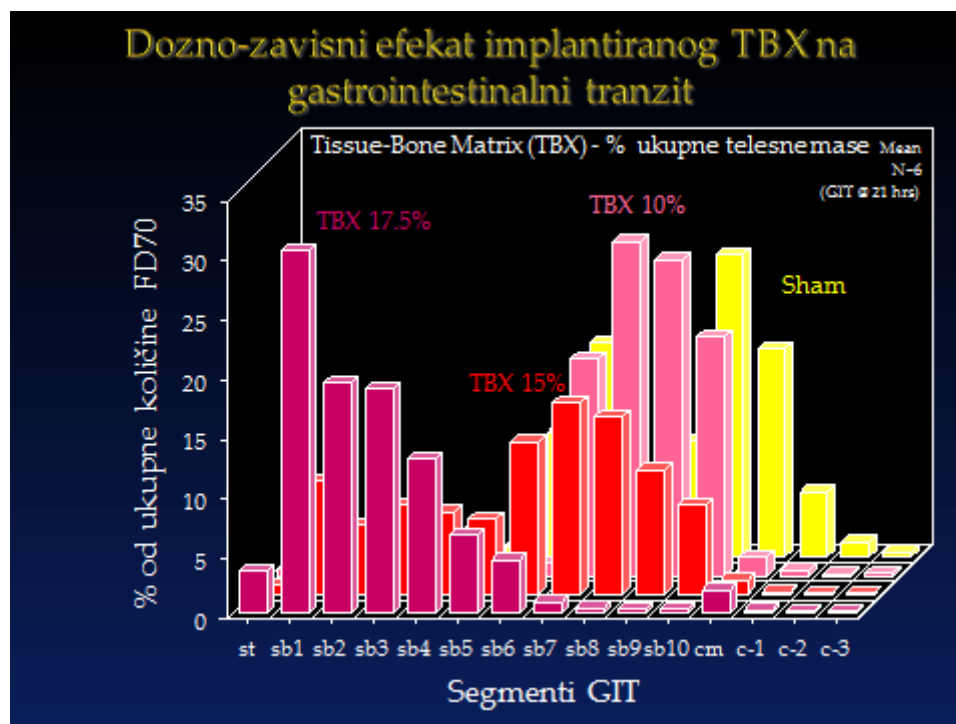
4.3.1. Transplantirani singeni subkutani model povrede tkiva

Imajući u vidu da direktna povreda zahteva upotrebu analgetika koji utiču na GIT, mi smo „transplantirali“ povredu tako što smo sakupili duge kosti i okružujuće mišiće od singenih donora, i nakon usitnjavanja implantirali „povređeno tkivo“ subkutano na dorzalnoj strani tela domaćina. Tkivno-kosni matriks (engl. Tissue Bone Matrix, TBX) je pripremljen u sterilnim uslovima i njegova sterilnost je potvrđena kultivacijom nakon žrtvovanja životinje. Ovaj model transplantiranja singenog tkiva je pouzdan i precizan, a „doziranje“ rane je veoma jednostavno, određivanjem procenta telesne mase recipijenta (5-25%). Nakon implantacije TBX narednih 21 sat se dešava odgovor na transplantirano tkivo bez uključivanja analgetika. Miševi kojima je izvršena transplantacija singenog tkiva nisu pokazivali nikakve bihejvioralne promene koje bi indikovale stres u prvih 6 sati nakon buđenja iz anestezije. U sledećih 10-12 sati miševi (TBX $\geq 10\%$) su postajali sve manje pokretljivi i zgrčeni, zauzimali pogrbljen stav i ubrzano su disali. Približno 16 sati nakon trans-implantacije, TBX 20% miševi se ne bi uopšte, ili bi se minimalno kretali, slabo bi odgovarali na guranje i bili bi eutanizirani iz humanih razloga. Nasuprot njima i kao što smo i očekivali, „sham“ grupa se nije razlikovala po ponašanju od kontrolnih životinja nakon buđenja iz anestezije.

4.3.2. TBX indukuje gastrointestinalni ileus

Iako je TBX modelom moguće izučavati odgovor bilo kog organskog sistema na veliku traumu i sistemsku inflamaciju, u narednim eksperimentima fokus je bio na GIT zbog njegove ključne uloge u razvoju patofizioloških stanja u teško povređenih pacijenata. Singeni TBX model prevazilazi upotrebu farmakoloških agenasa, i dozvoljava fino „doziranje“ povrede u cilju izučavanja uticaja ovog tretmana na motilitet GIT 21h nakon implantacije. Kao što je pokazano na grafiku 4.7. u sham kontrolama, 75 minuta nakon oralno datog markera motiliteta FD70, on je stigao do distalnog dela tankog creva i cekuma i proksimalnog dela kolona. Nasuprot njima, povećanje količine transplantiranog

TBX do postepenog zastoja FD70, zastoja koji je posebno uočljiv u grupama TBX15% i više. U grupi TBX17.5%, 3.5 % od date količine FD70 ostaje u želudcu, i uočljiv je veliki zastoj u intestinalnom motilitetu.

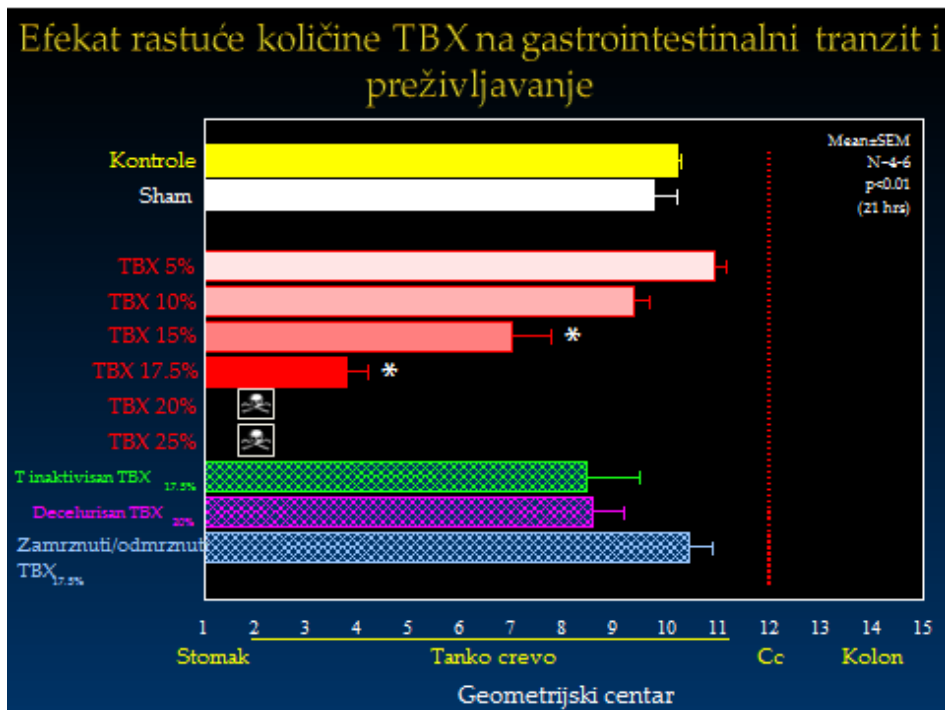


Grafik 4.7. Dozno-zavisni efekat količine implantiranog TBX na gastrointestinalni tranzit. Distribucija fluorescentno obeleženog dekstrana (70kD) po segmentima GIT.

Računajući geometrijski centar za distribuciju individualnih tranzita, mi smo pokazali statistički značajno usporavanje (Grafik 4.7.). Interesantno je primetiti da je TBX u količini većoj od 17.5% izaziva smrt u toku prva 21 sata nakon implantacije.

TBX model, pored toga što omogućava precizno podešavanje, “doziranje” povrede i što je oslobođen obavezne upotrebe farmakoloških agenasa, omogućava i manipulisanje TBX, praktično omogućavajući eksperimentatoru da manipuliše i samom „ranom“ ne bi li se izolovale komponente same rane koje imaju štetan uticaj na organizam. Mi smo primetili da kada se pre implantacije TBX17.5% ugreje na 90° C tokom dva sata, potpuno se gubi negativan efekat na GIT, i ileus se ne javlja (Grafik 4.8.). Isto tako, kada se TBX20% deceluriše pomoću blage persirćetne kiseline, životinje su preživljavale i nisu razvijale ileus (Slika 4.8). Ovo je indikativ da matriks sam po sebi

ne izaziva ileus, ali ostaje da se utvrdi da li su produkti njegove degradacije od strane živih i aktivnih ćelija u samom martiksu.



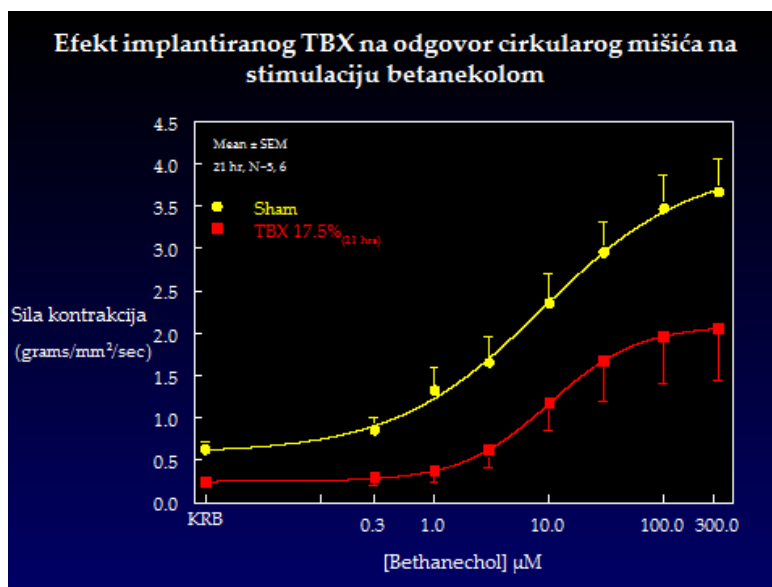
Grafik 4.8. Dozno-zavisni efekti TBX na tranzit i preživljavanje životinja primaoca. Povećanje u količini transplantiranog TBX gradijalno povećava usporavanje gastrointestinalnog tranzita sve do količine od 17.5% od ukupne telesne mase životinje primaoca. Preko te količine implantiranog TBX životinje umiru u prvih 21 sat. Implantacija TBX inaktivisanog pomoću toplote, ili nakon decelularizacije putem sirćetne kiseline ili putem zamrzavanja i odmrzavanja, u količinama koje su bile letalne ili sa velikim efektom, nema efekta na gastrointestinalni tranzit. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost GC ± standardna greška.

Prethodno, naši podaci su pokazali da su faktori neophodni za razvoj sistemskog odgovora temperaturno senzitivni, i da su zavisni od prisustva ćelija u subkutano implantiranom TBX i da su odgovorni za smrtnost koja je posledica tkivnog oštećenja zato što su inaktivacija toplotom i decelularizacija eliminisali štetne efekte TBX. Mi smo u serijskim eksperimentima pokušali da potvrdimo ovu činjenicu tako što smo TBX podvrgli višestrukim smrzavanje/odmrzavanje ciklusima. Miševi koji su imali implantirani TBX u vrednosti od 17.5% bw, su imali značajan zastoj u gastrointestinalnom tranzitu, GC= 3.7±0.41 i 17% smrtnosti u poređenju sa sham kontrolama koje su imale 100% preživljavanje i normalan gastrointestinalni tranzit GC= 9.7±0.46 (p<0.05, N=6). Kao što smo i očekivali, TBX koji je bio podvrgnut petostrukom zamrzavanju u tečnom azotu i zagrejan na 37°C je izgubio sposobnost da

izazove bilo kakve štetne efekte, gastrointestinalni tranzit je bio $GC=10.4\pm 0.45$ ($N=4$) sa 100% preživljavanja.

4.3.3. Implantacija TBX izaziva promene na cirkularnom mišiću iz zida tankog creva

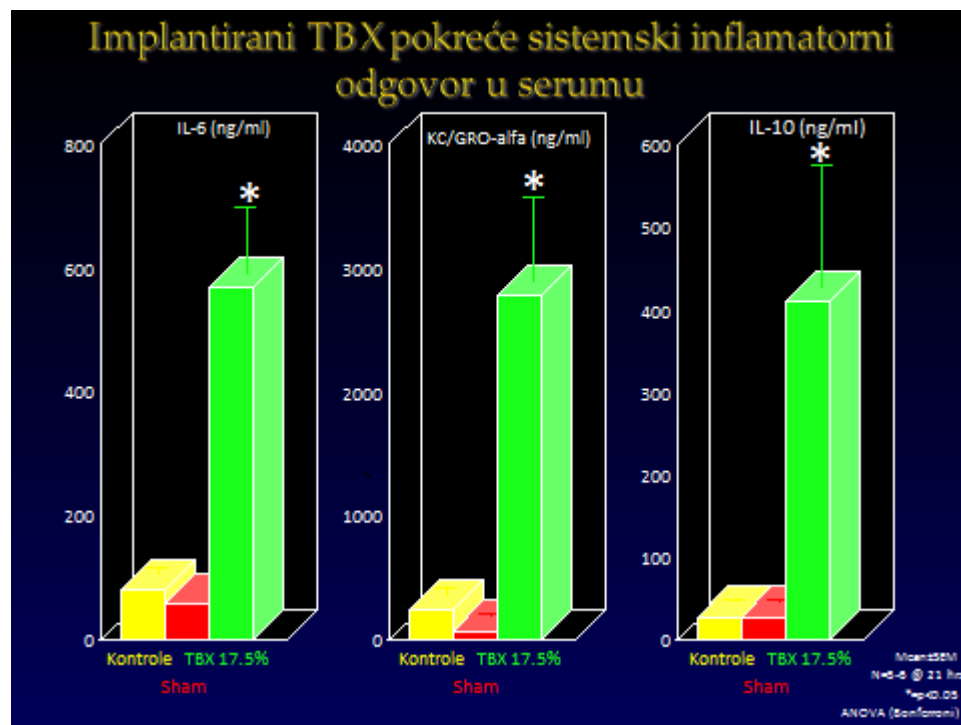
Dalje smo uradili eksperimente da bismo utvrdili da li ileus indukovani traumom ima iste efekte u *in vitro* uslovima i kakav efekat ima na aktivnost cirkularnog glatkog mišića koristeći standardnu kadicu za organe. Kao što se može videti na grafiku 4.9. spontane kontrakcije iz sham tretiranih kontrola su robusne, dok je spontana kontraktilnost iz TBX grupe značajno umanjena (0.63 ± 0.089 vs. 0.23 ± 0.052 $mg/mm^2/sec$, $p<0.05$). Isto tako, kada su stimulisani betanekolom, odgovor tkiva poreklom od TBX grupe je značajno smanjen (bethanechol $100\mu M$: 3.48 ± 0.392 vs. 1.96 ± 0.564 , $p<0.05$). Odavde sledi da kroz seriju događaja, povreda perifernih organa i tkiva izaziva neperkidnu supresiju kontraktilnosti glatke muskulature koja, čini se, doprinosi razvoju gastrointestinalnog ileusa.



Grafik 4.9. Aktivnost jejunalnog cirkularnog glatkog mišića, spontana i nakon stimulacije rastućom koncentracijom Betanekola u Sham i TBX17.5% grupama. Zabeležena spontana aktivnost mišića je značajno suprimirana nakon subkutane implantacije TBX u prvih 21h u poređenju sa Sham kontrolama (0.63 ± 0.089 vs. 0.23 ± 0.052 $mg/mm^2/sec$, $p<0.05$). Slično dozno-zavisna kriva konstruisana nakon stimulacije rastuće koncentracije betanekolom pokazuje značajno slabiji odgovor (bethanechol $100\mu M$: 3.48 ± 0.392 vs. 1.96 ± 0.564 , $p<0.05$). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost sile kontrakcija \pm standardna greška

4.3.4. Indukovanje sistemskog inflamatornog odgovora pomoću TBX

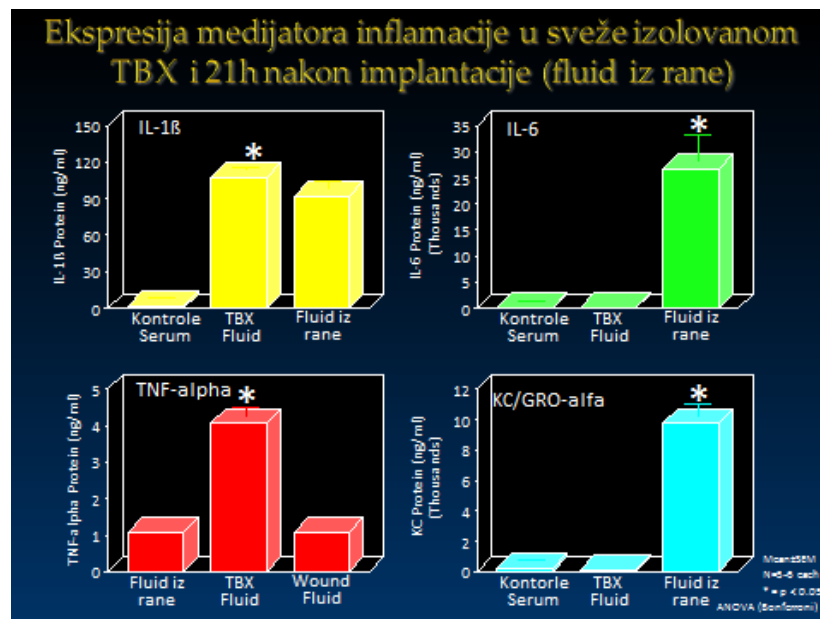
Ključna klinička karakteristika pacijenata sa teškim ranama je štetni sistemski inflamatorni sindrom-SIRS. Zbog toga, mi smo odlučili da ispitamo ekspresiju tipičnih proinflamatornih medijatora u serumu (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , Keratinocitni citokin i TNF- α) u grupi TBX17.5% 21 sata nakon TBX transplantacije. Mi smo koristili imunoesej zasnovan na elektrohemiluminiscenciji. Naši rezultati su pokazali povećanu koncentraciju IL-6, KC/GRO α (engl. Keratinocyte cytokine, keratinocyte chemoattractant; keratinocyte-derived chemokine/growth related oncogene, CXCL1, GRO α , GRO1, NAP-3, KC/GRO α) i IL-10 u TBX17.5% grupi u poređenju sa kontrolama i sham kontrolama (Grafik 4.10.). Kao što se moglo očekivati, neki od analiziranih citokina nisu bili povišeno eksprimirani, IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ i TNF- α i može se zaključiti da TBX izaziva sistemski inflamatorni odgovor za date citokine, u kasnijem periodu nakon implantacije.



Grafik 4.10. Koncentracija citokina u serumu. Inflamatorni proteini u serumu indukovani subkutanom implantacijom TBX (TBX17.5%) u domaćina izazivaju sistemski inflamatorni odgovor meren 21h nakon implantacije. Detekcijom pomoću elektrohemiluminiscencije smo utvrdili da implantacija povređenog tkiva izaziva statistički značajno povećanje koncentracije IL-6 (Panel A), keratinocitni citokin (KC) (Panel B) i antiinflamatorni citokin IL-10 (Panel C) poređeno sa kontrolama i sham kontrolama. Srednja vrednost koncentracije \pm standardna greška

4.3.5. Inflamatorni odgovor u TBX fluidu

Razumevanje molekularnih i ćelijskih interakcija koje se dešavaju u domaćinu i u samoj rani je neophodan korak za uspešno razvijanje novih terapijskih pomagala. Kao dodatak predhodno pomenutim prednostima našeg modela u odnosu na druge, mi ovde pokazujemo i da je ovaj model veoma pogodan za analiziranje fluida iz rane. Kao što se da videti u grafiku 3.10. nakon centrifugiranja, supernatan iz kontrolnih životinja, fluid iz sveže pripremljenog TBX17.5% i transimplantiranog TBX17.5% sakupljenog 21sat nakon implantacije, odmah nakon žrtvovanja može biti analiziran. Kao i u slučaju seruma, mi smo koristili MSD 7-plex da analiziramo koncentraciju istih sedam citokina i hemokina i uporedimo ih. Interesantno je da se primeti da postoje tri različita paternna citokinske ekspresije. Grafik 4.11. pokazuje da IL-1 β pokazuje povećanu ekspresiju u oba fluida izolovana iz sveže pripremljenog TBX17.5% i 21 sat nakon transimplantacije. TNF- α je bio povećan samo u fluidu iz sveže pripremljenog TBX (Grafik 4.11.). IL-6 i KC/GRO α su bili značajno viši u TBX koji je sakupljen 21 sat nakon trans-implantacije što je indikativ da se dešavaju procesi unutar samog TBX nakon implantacije (Grafik 4.11.).



Grafik 4.11. Komparativna analiza medijatora inflamacije u sveže izolovanom fluidu iz TBX, fluidu iz TBX 21 sat nakon transplantacije i serumu kontrolnih životinja. Uočljiva su tri obrasca ekspresije inflamatornih citokina. IL-1 β je bio značajno povišen u sveže izolovanom TBX kao i u TBX izolovanom 21 sat nakon implantacije. IL-6 i KC/GRO α su bili značajno povišeni samo u TBX koji je izolovan 21 sat nakon implantacije dok je TNF- α bio povišen samo u sveže izolovanom TBX. Srednja vrednost koncentracije \pm standardna greška.

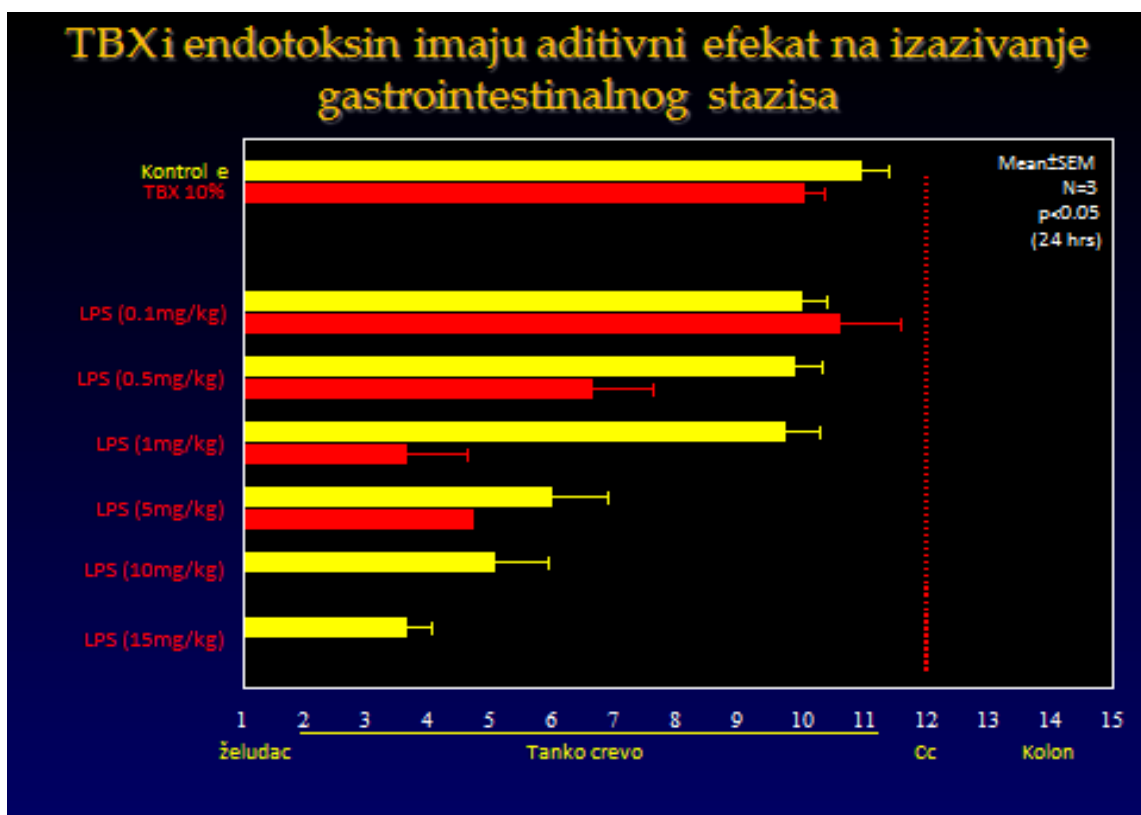
4.4. Genetička modifikacija imunskog odgovora na povredu kroz TLR4/MyD88 put

4.4.1. Implantacija TBX pokreće ekspresiju TLR4 receptora

U literaturi se sve češće mogu pronaći podaci koji govore u prilog činjenici da je oslobađanje endogenih DAMP molekula, kroz aktivaciju TLR4 puteva odgovorno za sistemski odgovor organizma i odgovor udaljenih organa nakon ishemije, reperfuzija povreda i šoka nakon hipovolemičke hemoragije. U našem novoopisanom modelu, pokušali smo da utvrdimo značaj TLR4 puteva u odgovoru na aktivno generisane medijatore iz TBX. Prvo smo ispitali ekspresiju gena za TLR4 u intestinalnom *tunica muscularis*, kvantitativnim RT-PCR procenjivali smo nivo iRNK transkripta u odgovoru na perifernu traumu (TBX implantaciju). Subkutana implantacija svežeg TBX je izazvala značajno povećanje nivoa iRNK za TLR4 čak 26.4 ± 3.22 puta u poređenju sa kontrolnim životinjama 24h nakon implantacije.

4.4.2. Senzitivizacija životinja na lipopolisaharide nakon implantacije TBX

Dobro je poznata činjenica da standardna doza LPS manja 5mg/kg ne izaziva nikakav efekat na gastrointestinalni tranzit i smrtnost u prvih 24 sata nakon primene (Eskandari, Kalff *i sar.* 1997; Buchholz, Chanthaphavong *i sar.* 2009), međutim od ranije je poznato i da jednom primenjena viša doza LPS-a (>15mg/kg) izaziva povećanje zastoja u tranzitu i povećava smrtnost. Mi smo ranije pokazali da TBX_{10% bw} ne dostiže granicu kada izaziva efekte na GIT (Tsukamoto, Antonic *i sar.* 2011). Zatim smo pokušali da utvrdimo da li TBX implantacija izaziva senzitivizaciju GIT putem upregulacije TLR4 i odgovor organizma na LPS (lipopolisaharide poreklom iz bakterija), 3 sata nakon implantacije TBX_{10% bw}. Kao što se da videti na grafiku 4.12. kombinovano, LPS i TBX aditivno deluju u izazivanju ileusa i smrtnosti. Dok sama intraperitonealna primena LPS-a 0.5 i 1 mg/kg ne izaziva ileus, kada je kombinovana sa TBX izaziva značajnu supresiju gastrointestinalnog tranzita. Kada je veća doza LPS-a primenjena u kombinaciji sa TBX, smrtnost je bila 100% već na 5mg/kg.

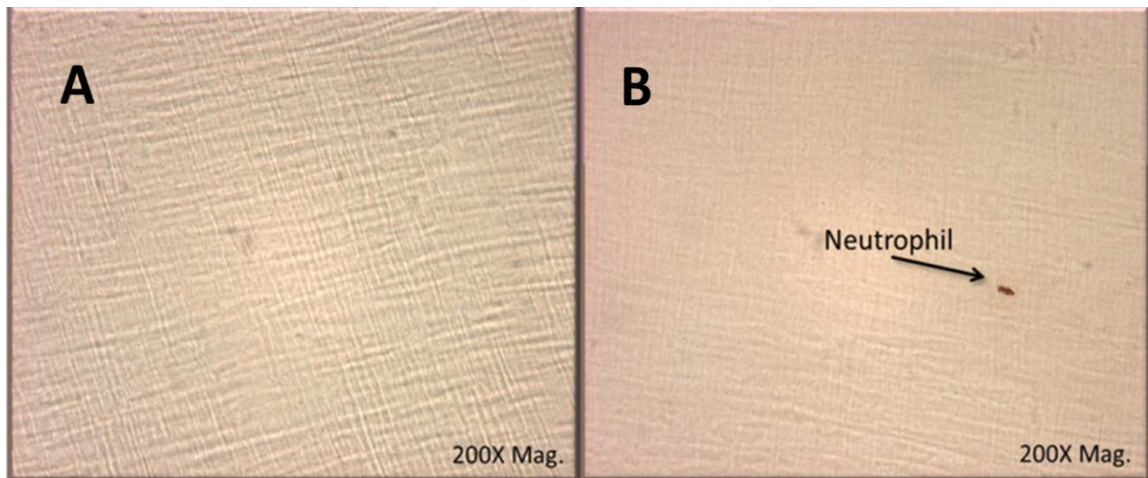


Grafik 4.12. Oštećenje perifernih tkiva sinergistički deluje sa LPS-om u izazivanju stazisa GIT i senzitivira miševе, povećavajući letalnost TBX. Oralno primenjeni FITC-dextran (70kD) u kontrolama i primenjenom malom dozom TBX se kretao kroz GIT bez usporavanja sa komparabilnim izračunatim GC u distalnom ileumu (gornja dva stubca) 75 minuta nakon primene. Primenjen sam, LPS izaziva dozno zavisnu supresiju gastrointestinalnog tranzita sa granicom od 5mg/kg i ne izaziva smrtnost ni pri dozi od 15mg/kg (crni stubci). LPS u kombinaciji sa TBX sinergistički deluje na gastrointestinalni tranzit sa desetostruko nižom granicom za kada počinje da ima efekte. 0.5mg/kg i smrtnost od 100% pri dozama većim od 5mg/kg kada je kombinovan sa malom dozom TBX (sivi stubci). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost GC ± standardna greška.

4.4.3. Subkutana implantacija singenog TBX ne izaziva infiltraciju neutrofila u *tunica muscularis* jejunuma

Uloga neutrofila u izazivanju stazisa GIT je prethodno pokazana i mi smo bojenjem za mijeloperoksidaza pozitivne ćelije pokušali da utvrdimo da li inflamatorni odgovor na TBX implantaciju izaziva regrutovanje neutrofila u zid tankog creva i posledični ileus. Bojenje *tunica muscularis* Hanker-Yates-ovim reagensom je pokazalo

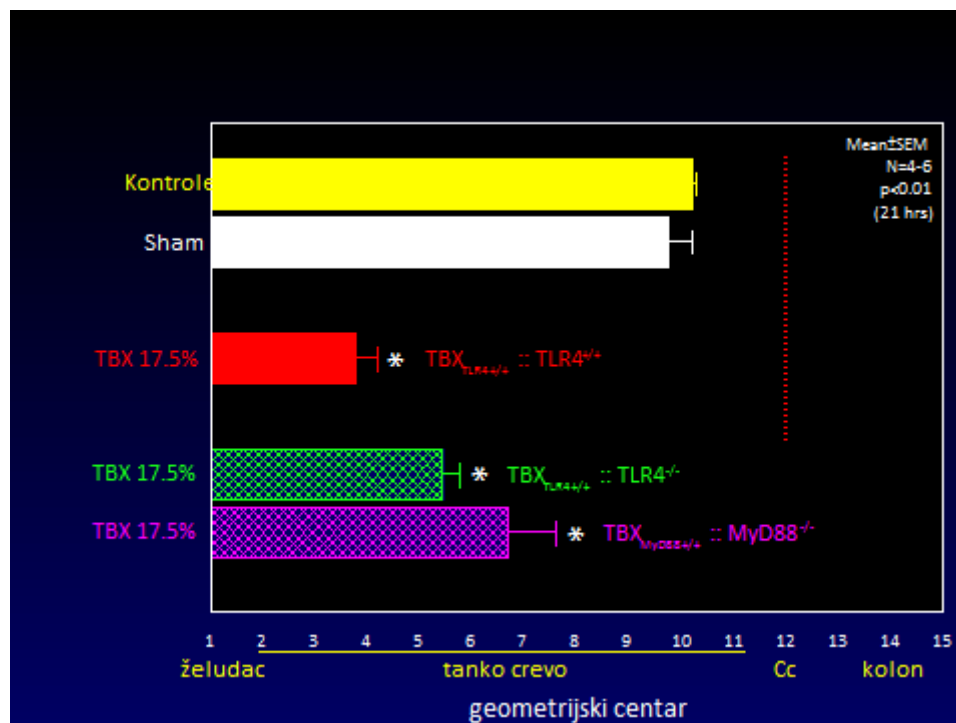
da implantacija TBX ne izaziva regrutovanje neutrofila i da je uključen drugi mehanizam koji dovodi do prestanka motiliteta creva (Slika 3.1.).



Slika 3.1. TBX implantacija nema efekta na regrutovanje neutrofila (MPO+ ćelija) u jejunusnoj *tunica muscularis*. Svetlosna mikrografija uzdužno postavljenog, nesečenog, *tunica muscularis* obojenog Haker-Yates-ovim reagensom za mijeloperoksidazu. A. Sham implantirane životinje. B. TBX implantirane životinje.

4.4.4. TLR4/MyD88 put je delimično odgovoran za inflamacijom izazvani ileus

Ovi podaci sugerišu da TLR4 potencijalno ima glavnu ulogu u našem modelu koji ne koristi ishemiju ili povredu domaćina. Da bismo testirali ovu hipotezu, mi smo koristili TBX17.5% bw model u TLR4 KO i MyD88 KO miševima. Kontrole, TLR4 KO i MyD88 KO miševi imaju slične distribucije tracer-a i izračunate GC. Međutim, kao što se može videti na grafiku 4.13., trauma izaziva značajno smanjenje u gastrointestinalnom tranzitu u wild-type životinjama ($GC=3.8\pm 9.41$), i bio je značajno, ali ne i u potpunosti restauriran u TLR4 KO miševima ($GC=5.4\pm 0.33$) i MyD88 KO miševima ($GC=6.7\pm 0.94$) ($p>0.05$, $N=4$).

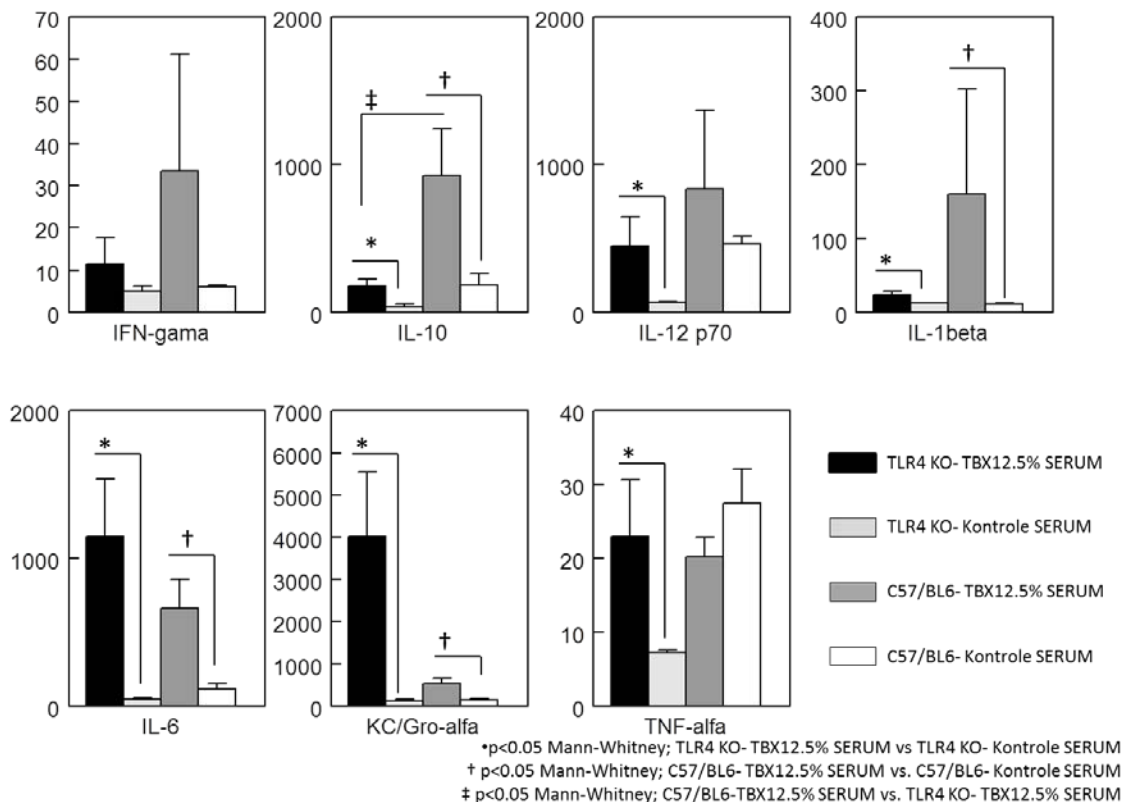


Grafik 4.13. Nedostatak TLR4 i MyD88 signalnih puteva delimično sprečava gastrointestinalni stazis nakon velikog oštećenja perifernih tkiva. Oralno dati FITC-dekstran (70kD) u kontrolnim i sham kontrolama je normalno prošao niz GIT i izračunati GC imaju slične vrednosti 75 minuta nakon primene (ispunjeni stubci). Subkutana implantacija TBX poreklom od C57/BL6 u primaoce je dovela do značajnog umanjavanja tranzita kroz GIT (forward-slash stubci). Nasuprot njima, TBX implantiran u TLR4 KO i MyD88 KO životinje ima značajno manji efekat na gastrointestinalni tranzit (hatched i back-slash stubci) ali životinja i dalje ispoljava smanjeni motilitet u poređenju sa kontrolama i sham kontrolama. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost GC \pm standardna greška.

4.4.5. TBX implantacijom izazvani sistemski inflamatorni odgovor je suprimiran u TLR4 KO miševima

Prethodno smo demonstrirali da TBX pokreće sistemski inflamatorni odgovor koji je karakterisan značajnim povećanjem koncentracije IL-6, KC/GRO α i IL-10, 21 sat nakon implantacije oštećenog implantiranog tkiva u poređenju sa kontrolama i “sham” kontrolama. Zato smo, imajući u vidu prethodne rezultate, pokušali da utvrdimo zavisnost ove observacije, i sistemskog imunskog odgovora od TLR4 puta. Kao što smo i prepostavili, bazalni nivoi IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 p70, KC/GRO α i TNF- α u TLR4 KO miševima su bili niži nego u wild-type C57/BL6 miševa, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Kao što smo napomenuli, kod wilde-type miševa, kao posledica implantacije TBX dešava se snažan sistemski inflamatorni odgovor koji se

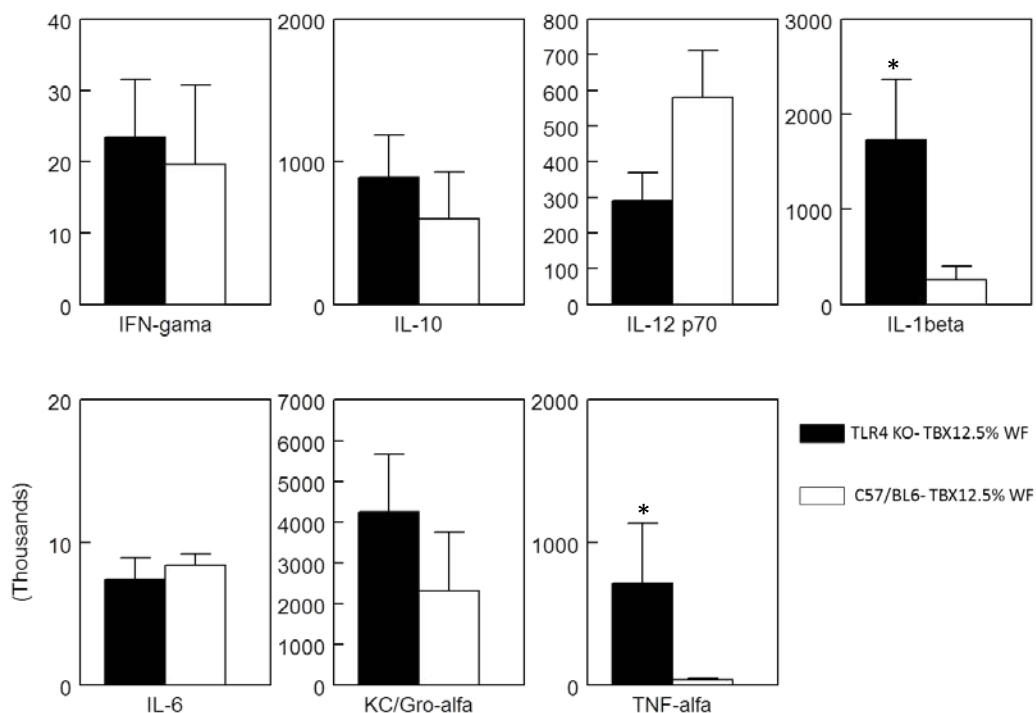
ogleda u povećanom nivou IL-1 β , IL-6, IL-10 and KC/GRO α (N=5, p<0.05) u serumu. U TLR4 KO miševa, većina sistemskih nivoa ispitivanih citokina je bila slična onima u wilde-type miševima 24h nakon implantacije, sem IL-10 koji je bio značajno suprimiran (Grafik 4.14.).



Grafik 4.14. Koncentracija citokina i hemokina u serumu wild-type (C57/BL6) i TLR4^{-/-} (TLR4 KO) životinja nakon implantacije singenog TBX. U obe grupe životinja uočljivo je da TBX izaziva uvećanje koncentracije cirkulišućih citokina i hemokina u serumu u poređenju sa singenim kontrolama bez implantiranog TBX (* i †). Naši rezultati impliciraju da postoji razlika u imunskom odgovoru C57/BL6 i TLR4^{-/-} životinja, međutim usled velike varijabilnosti unutar grupa ova razlika nije dostigla statističku značajnost, pa možemo govoriti o trendu povećane koncentracije INF γ i IL-1 β , smanjenju IL-6 i KC-GRO α u TLR4^{-/-} grupi. Nasuprot njima, koncentracija IL-10 je bila značajno viša u wild-type životinjama (‡). Rezultati su predstavljeni kao Mean \pm SEM, Mann-Whitney test p<0.05 *, †, ‡.

Jedinstveno za TBX model je da se može sakupiti i izučavati eksudat iz rane (TBX fluid) u različitim vremenskim intervalima. U poređenju sa bazalnim nivoom, wilde-type C57/BL6 miševi su ekspimirali značajno veći nivo IL-1 β , IL-6, IL-10 i KC/GRO α (N=5, p<0.05) u TBX fluidu, 24 sata nakon implantacije. U slučaju TLR4 KO, kao što smo videli i u slučaju seruma, zabeležena je slična koncentracija ispitivanih

citokina, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12 p70 i KC/GRO α u poređenju sa TBX fluidom iz wild-type miševa. Međutim, TLR4 KO TBX fluid ima veću koncentraciju IL-1 β i TNF- α (Grafik 4.15.).



Grafik 4.15. Koncentracija citokina i hemokina u TBX fluidu u wild-type (C57/BL6) i genetički modifikovanim TLR4^{-/-} miševima. U poređenju sa wild-type miševima, miševi sa isključenim TLR4 receptorom imaju povećanu koncentraciju TNF- α i IL-1 β u fluidu izolovanom iz TBX implantiranom u životinje primaocce. Rezultati su predstavljeni kao Mean \pm SEM, Mann-Whitney test $p < 0.05$ *

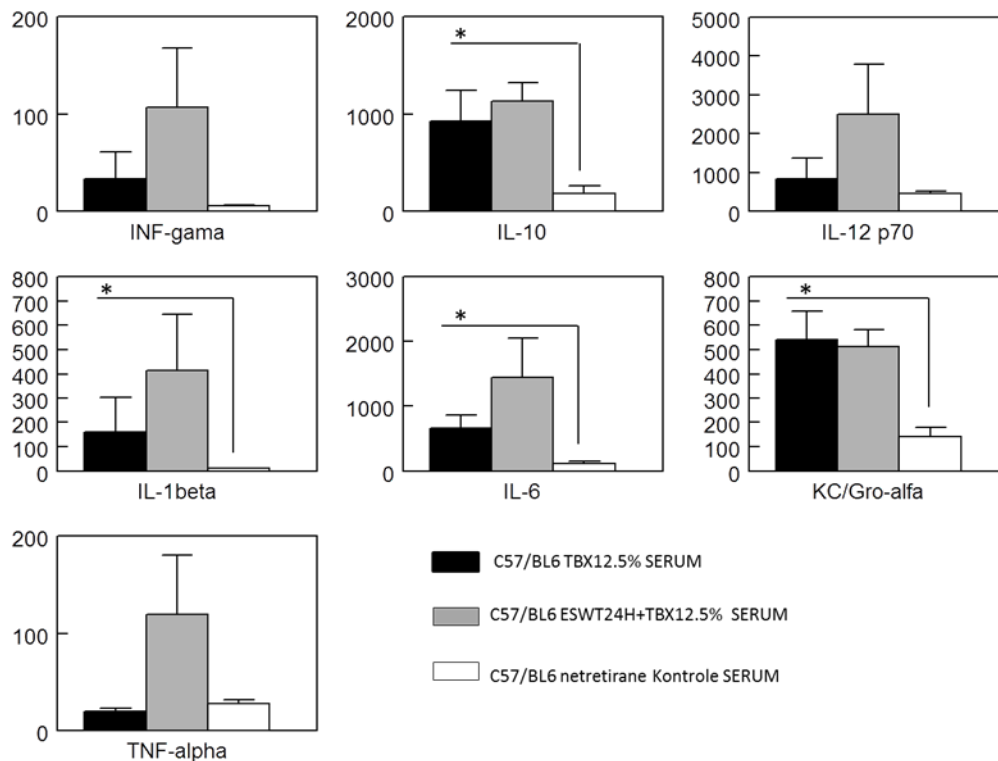
4.4.6. ESTW moduliše TBX izazvanu supresiju gastrointestinalnog motiliteta

Naš drugi glavni cilj u ovim eksperimentima je bio da odredimo da li možemo na neki način da modulišemo inflamatorni odgovor na traumu, i traumom praćene negativne efekte na motilitet GIT. Mi smo izabrali ESWT kao terapijsku opciju zbog njenih prethodno opisanih i navedenih protektivnih efekata u različitim animalnim modelima. Da bismo ovo utvrdili, mi smo prvo morali da utvrdimo da li je bezbedno primeniti ESWT terapiju na abdomen, zbog gore navedenih efekata koje terapija ima na tkiva i

organe ispunjene vazduhom. Mi smo posebno pokušali da utvrdimo da li prekondicioniranje organizma putem ESWT ima protektivni efekat i u našem novoopisanom modelu. U ovim eksperimentima, primenjeno je 600 impulsa, frekvencije 4HHz i EFD=0.03mJ/mm² direktno na abdomen, neposredno ili 24 sata pre merenja gastrointestinalnog motiliteta. Mi smo utvrdili da ESWT ne izaziva negativne posledice na motilitet (GC=9.9±0.07 i 10.8±0.03 u poređenju sa kontrolama GC=10.5±0.09) i ne izaziva nikakva mikroskopska oštećenja na GIT. Međutim, ukoliko se isti tretman primeni na grudni koš, pluća su značajno oštećena. Kao što je prethodno opisano, TBX rezultuje u značajnoj supresiji gastrointestinalnog motiliteta (GC=3.83±0.076). Kao što smo hipotetisali gore, analiza gastrointestinalnog tranzita je pokazala značajne protektivne efekte prekondicioniranja putem ESWT na TBX-izazvani ileus (GC=6.54±0.195). Očigledno je i da je vreme primene ESWT bilo od ključne važnosti na rezultate naših eksperimenata zato što kada je primenjena 4 sata nakon implantacije, ESWT nije imala nikakvih efekata (4.41±0.040)(p<0.05, N=5).

4.4.7. ESTW Moduliše inflamatorni odgovor izazvan implantacijom TBX

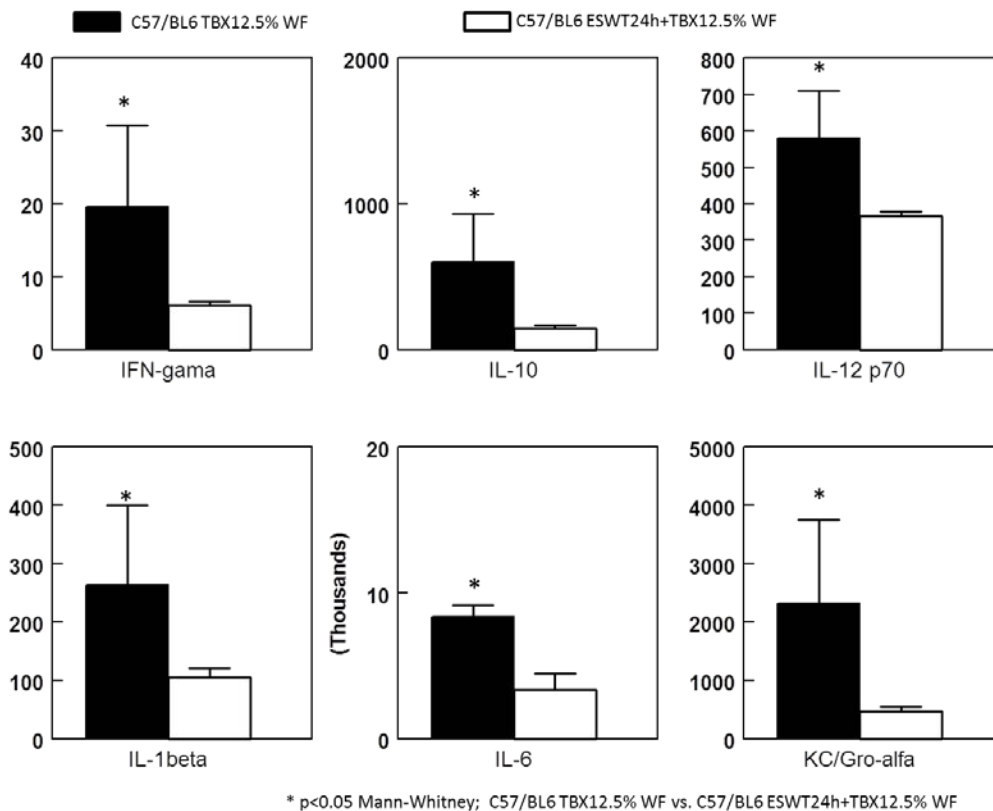
U kliničkim uslovima, praktično ne postoji tretman za SIRS izazvan traumom. Pošto je ESWT imalo protektivni efekat na funkcionalnost GIT, mi smo dalje ispitali da li ESWT ima imunomodulatorni efekat na serumske i TBX fluid nivo citokina i hemokina IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 p70, KC/GRO α i TNF- α u našem modelu. Potvrđujući naše prethodne rezultate, videli smo da subkutana implantacija TBX izaziva sistemski inflamatorni odgovor putem značajnog uvećanja serumskih nivoa IL-1 β , IL-6, IL-10 i KC/GRO α (p<0.05). Prekondicioniranje sa ESWT nije značajno uticalo na izmereni nivo ovih medijatora 48 sati nakon primene terapije. Međutim, kada je prekondicioniranje usledila TBX implantacija, mi smo videli trend u višem nivou IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12 p70, IL-6 i TNF- α i promenu u koncentraciji KC/GRO α u poređenju sa TBX grupom (Grafik 4.16.). Ove vrednosti nisu dostigle statističku značajnost usled varijabilnosti unutar grupe.



*p<0.05 Mann-Whitney; C57/BL5 TBX12.5% SERUM vs. C57/BL6 netretirane Kontrole SERUM

Grafik 4.16. Koncentracija citokina ii hemokina u serumu nakon implantacije TBX. Crni stubci C57/BL6 TBX12.5%, sivi stubci grupa pretretirana ESWT (C57/BL6 ESWT24h+TBX12.5%) i netretirane kontrole- beli stubci. Rezultati su predstavljeni kao Mean ± SEM, Mann-Whitney test p<0.05 * C57/BL6 TBX12.5%, vs. Netretirane kontrole.

Da bi utvrdili dalje efekte ESWT na lokalnom nivou, mi smo analizirali TBX fluid za koncentraciju istih citokina i hemokina. Videli samo da prekondicioniranje sa ESWT 24 sata pre TBX implantacije značajno umanjuje produkciju posmatranih citokina i hemokina u TBX fluidu, IFN- γ , IL-10, IL-12 p70, IL-6, KC/GRO α i TNF- α (p<0.05) u poređenju sa netretiranim TBX implantiranim životinjama (Grafik 4.17.). Interesantno je da IL-1 β , sa uvećanjem koncentracije od skoro dva puta u prekondicioniranoj grupi, nije dostigao prag statističke značajnosti zbog intragrupne varijabilnosti (p>0.05).



Grafik 4.17. Nivo citokina i hemokina u TBX fluidu 24 sata nakon implantacije u ESWT pretretirane životinje (C57/BL6 ESWT24h+TBX12.5% crni stubci) i životinje koje su primile samo TBX (C57/BL6 TBX12.5% beli stubci). ESWT pretretman značajno suprimira produkciju IFN- γ , IL-10, IL-12 p70, IL-6, KC/GRO α i TNF- α u oštećenom tkivu. Rezultati su predstavljeni kao Mean \pm SEM, Mann-Whitney test p<0.05 *

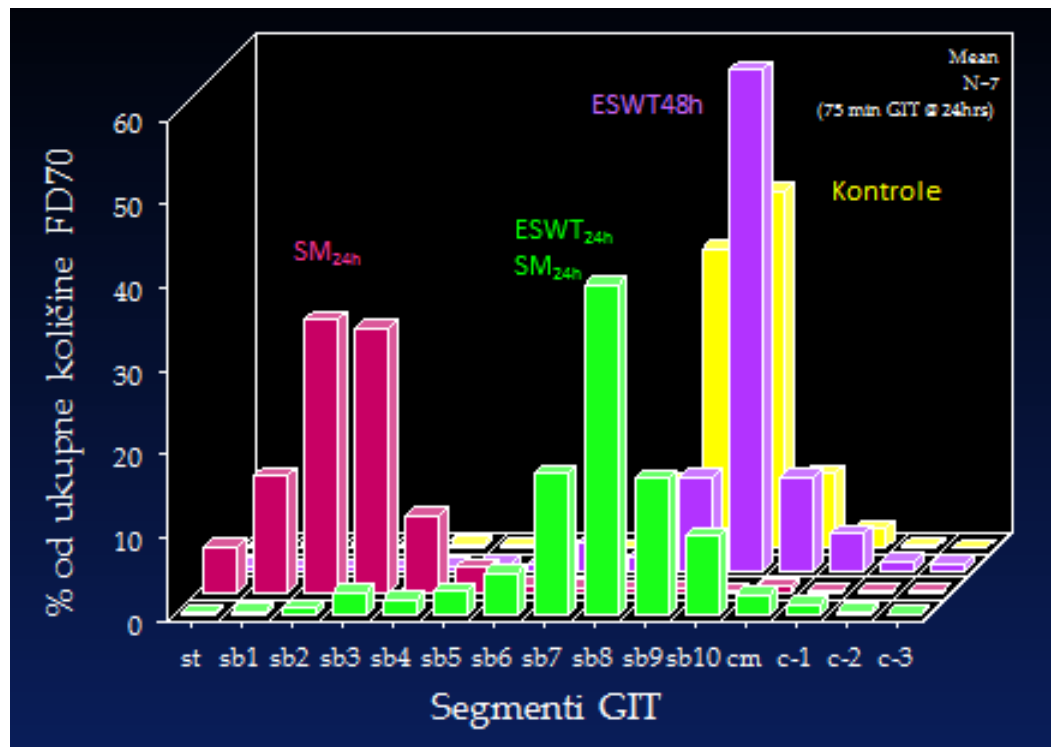
4.5. Model postoperativnog ileusa izazvanog hirurškom manipulacijom tankim crevom

4.5.1. ESWT prekondicioniranje smanjuje negativni gastrointestinalni stazis izazvan hirurškom manipulacijom tankim crevom

Rezultati prethodnih eksperimenata su pokazali da ESWT prekondicioniranje moduliše inflamaciju i sprečava gastrointestinalni dismotilitet izazvan implantacijom TBX. Iz razloga praktične upotrebnosti terapije, testirali smo da li ESWT ima isto tako pozitivne efekte u animalnom modelu hirurške intervencije u abdomenu u kome se

vreme povrede može sa sigurnošću predvideti,. Hipotetisali smo da ESWT prekondicionirajne ima protektivne efekte i u modelu postoperativnog ileusa. To smo testirali merenjem tranzita u kontrolama, pretretiranim sham manipuliranim kontrolama, 24 sata ESWT pretretmanom praćenim hirurškom intervencijom i životinje koje su primile samo hiruršku intervenciju. Kao što smo prethodno naveli, i u ovim eksperimentima potvrdili, ESWT sama po sebi ne izaziva negativne efekte na tranzit kroz nemanipulirani GIT ni neposredno nakon tretmana, a ni 24 sata nakon tretmana meren distribucijom fluorescentno obeleženog dekstrana (GC=10.5±0.09) kao i makroskopskim i mikroskopskim ispitivanjem creva.

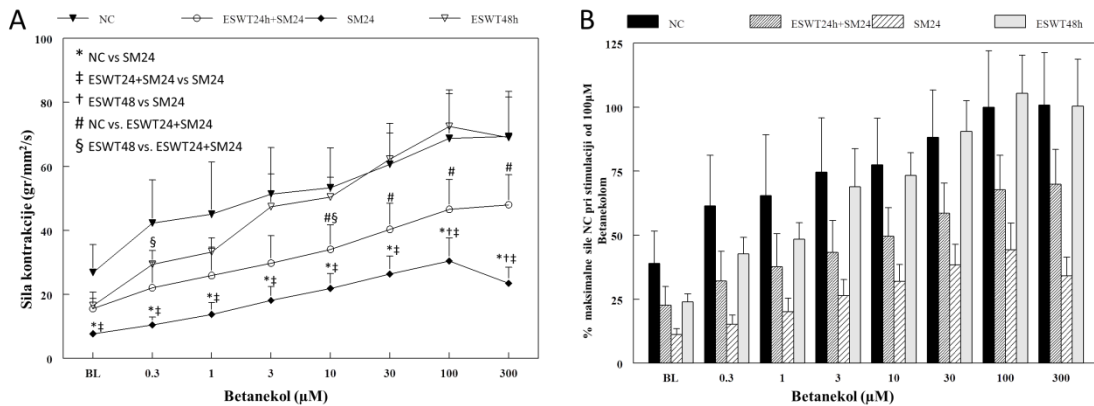
Kao što se može videti na grafiku 4.18. ESWT prekondicioniranje je statistički značajno umanjilo negativne efekte hirurške manipulacije na tranzit FD70 kroz GIT, 75 minuta nakon hranjenja životinja u poređenju sa grupom koja je imala samo hiruršku intervenciju.



Grafik 4.18. Distribucija fluorescentno obeleženog dekstrana (FITC Dextrane 70D) markera izražena geometrijskim centrom. Crveno-sham pretretman + hirurška intervencija, zeleno pretretman sa ESWT i hirurška intervencija, ljubičasto pretretman + hirurška intervencija, žuto kontrole.

4.5.2. ESWT prekondicioniranje pomaže očuvanju kontraktilnosti cirkularnih mišićnih vlakana, stratum circulare, u zidu tankog creva

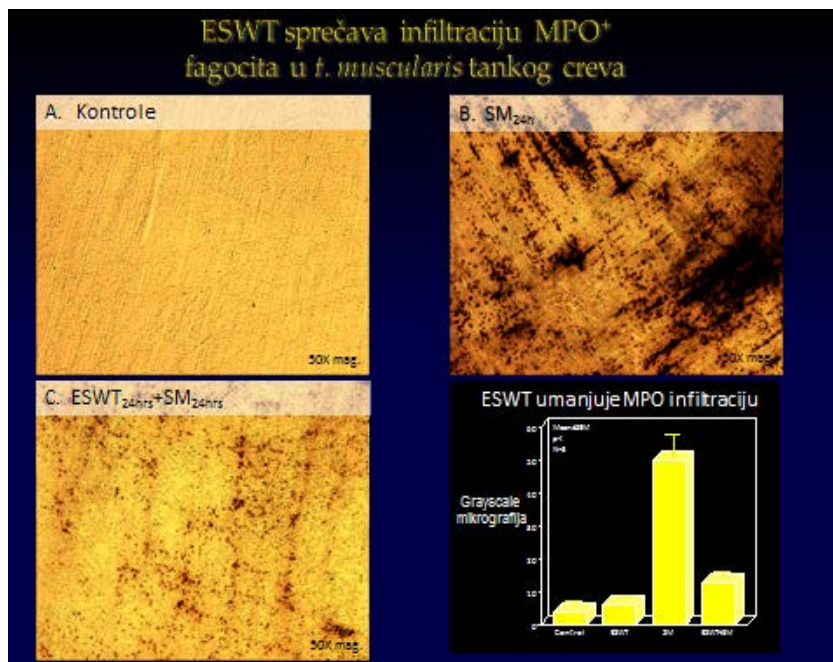
Hirurška manipulacija tankim crevom izaziva zastoj kontraktilnosti mišića zida tankog creva. Nakon što smo pokazali da ESWT pretretman sprečava negativne efekte na zastoj gastrointestinalnog tranzita, sledeći korak bio je da se utvrdi kakve efekte pretretman sa ESWT ima na silu kontrakcija mišićnih vlakana u odgovoru na Betanekol, selektivni aktivator muskarinskih receptora. Na Grafiku 4.19.A vidi se odgovor tkiva na uvećavajuću dozu Betanekola izraženu kao sila (gr/mm²/s) i procenat od maksimalne kontraktilnosti kontrolnih životinja (kontraktilnost pri stimulaciji od 100μM Betanekola). Kontraktilnost mišića iz *stratum circulare* je statistički značajno očuvana u poređenju sa životinjama koje su primile samo hiruršku intervenciju (SM24). Kontraktilnost cirkularnog mišića je takođe merena i u grupi životinja 48 sati nakon ESWT tretmana da bismo utvrdili da li ESWT ispoljava negativne efekte na funkcionalnost mišićnih vlakana. Kao što se može videti sa grafika 4.19.B, kontraktilnost mišića je u potpunosti očuvana i identična sa maksimalnom kontraktilnosti mišića netretiranih kontrola.



Grafik 4.19. Dozno-zavisni odgovor mišićnih vlakana iz *stratum circulare* na stimulaciju Betanekolom. A. Kontraktilnost mišićnih vlakana u odgovoru na stimulaciju muskarinskih receptora u netretiranim kontrolama (NC), pretretiranim životinjama (ESWT24+SM24), grupi koja je primila samo hiruršku intervenciju (SM24) i grupi 48 sati nakon tretmana sa ESWT (ESWT48). B. Odgovor tkiva na stimulaciju Betanekolom izražen kao procenat od maksimalne kontraktilne sile netretiranih kontrola (100μM Betanekol). Rezultati su izraženi kao Mean±SEM. ANOVA, Tuckey posthoc test, p<0.05 je smatrana statistički značajnom.

4.5.3. ESWT prekondicioniranje smanjuje regrutovanje neutrofila u tunica muscularis tankog creva

Hirurška manipulacija tankim crevom izaziva veliki ćelijski inflamatorni odgovor u *tunica muscularis*. Negativni efekti infiltracije neutrofila u zid creva su dobro opisani. (Kalff, Schraut *i sar.* 1998). Leukociti, kroz sekreciju citokina, hemokina u mišiću utiču na rad ganglija kao i neuromuskularne transmisije sekrecijom NO i prostaglandina. Mi smo ispitivali da li pretretman životinja sa ESWT 24 sata pre hirurške intervencije umanjuje infiltraciju MPO⁺ ćelija, velikom većinom neutrofila u *tunica muscularis*. Slika 3.2. pokazuje reprezentativne mikrografije Hanker-Yates histohemijskih bojenja *tunica muscularis* u NC, ESWT_{24h}, ESWT_{24h}+ SM_{24h}, SM_{24h}. U neoperisanom tkivu, broj MPO⁺ ćelija je bio nula ili veoma nizak (Grafik 4.20). Manipulacija tankim crevom je izazvala veliki porastu broja infiltriranih ćelija 24 sata nakon operacije. Prekondicioniranje životinja primenom ESWT je značajno smanjilo stepen infiltracije u ESWT_{24h}+ SM_{24h} grupi (5 puta manje u poređenju sa netretiranim kontrolama SM_{24h}).



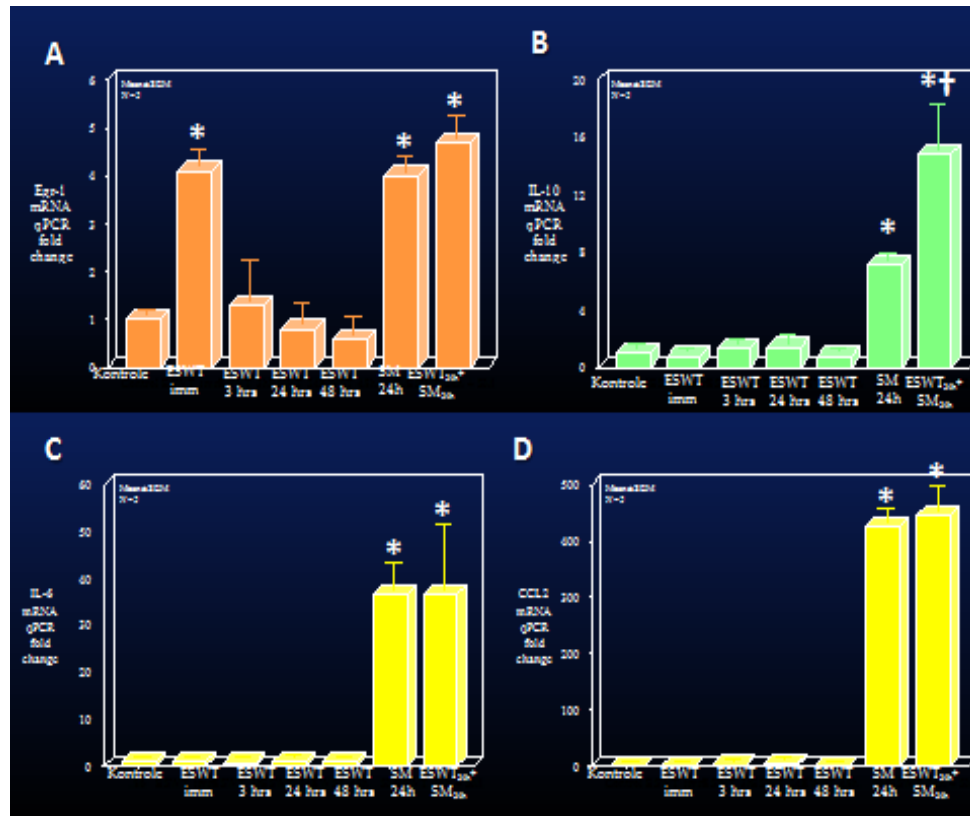
Grafik 4.20.Imunohistohemijsko bojenje za mijeloperoksidazu, obeležavanje infiltrata leukocita u tunica muscularis nakon hirurške manipulacije. Slika 3.2. A predstavlja kontrole, gde se može uočiti da MPO⁺ ćelije nisu prisutne u jejunalnom tunica muscularis. Nakon hirurške intervencije i anipulacije GIT, može se uočiti velika količina tamno obojenih infiltriranih, MPO⁺ ćelija (B), koja je značajno atenuirana ESWT prekondicioniranjem (C). Numerički prikaz analize fotografija. Podaci su predstavljani kao srednja vrednost intenziteta zatamnjenosti ± standardna greška.

4.5.4. ESWT prekondicioniranje modifikuje ekspresiju gena u tunica muscularis tankog creva

Da bismo videli kakve efekte ESWT ima na *tunica muscularis*, mi smo uradili qRT-PCR da ispitamo nivoe ekspresije iRNK IL-6, IL-10, EGR1, VEGFA i CCL2. Ovim eksperimentima smo hteli da vidimo kako ESWT utiče na dinamiku ekspresije gena ESWT_{3h}, ESWT_{24h} i ESWT_{48h}, i kako prekondicioniranje utiče na ekspresiju gena nakon hirurške intervencije ESWT_{24h}+SM_{24h} u poređenju sa SM_{24h}.

Kao što se moglo očekivati, hirurška manipulacija tankim crevom indukuje značajan inflamatorni odgovor u obe, ESWT_{24h}+SM_{24h} i SM_{24h}. Mi smo zabeležili statistički značajno povećanje ekspresije antiinflamatornog *il-10* u ESWT prekondicioniranim životinjama (14.8 fold) nasuprot životinjama koje su imale duplo manju ekspresiju ovog gena (7.1 fold) ($p < 0.05$). Iako smo zabeležili razlike u ekspresiji ostalih ispitivanih gena, ove razlike nisu bile statistički značajne (*il-6*:41.7 vs. 36.6, *ccl-2*: 446.0 vs. 425.3).

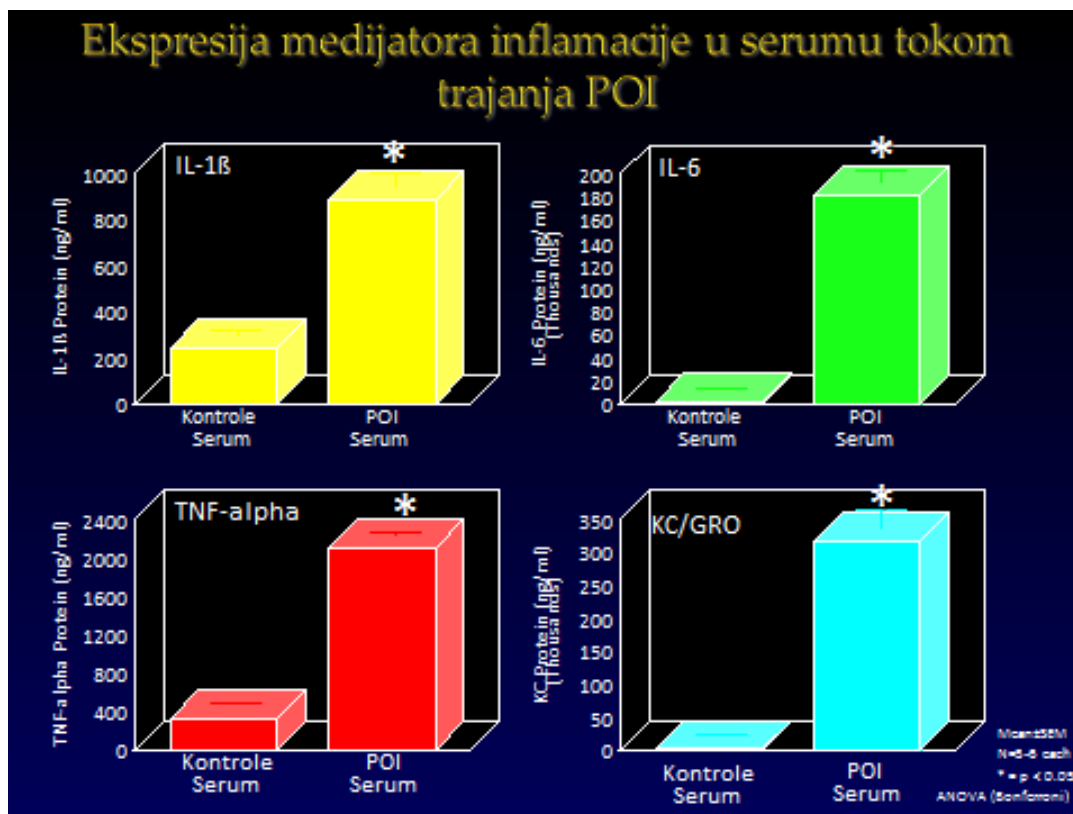
Naši rezultati daju uvid u događaje koji se dešavaju tokom 48 sati nakon tretmana sa ESWT u neozleđenom tkivu. Mi smo pokazali da ekspresija *egr-1* gena, koji je odgovoran za kontrolu ekspresije preko 300 gena i za koji je prethodno pokazano da je esencijalan za razvoj postoperativnog ileusa, značajno povećana neposredno nakon tretmana (4.1 puta) i zatim se smanjuje u prva 24 sata do 70% fiziološke vrednosti da bi dostigao minimum od 60% fiziološke vrednosti 48 sati nakon tretmana. Ostali ispitivani geni nisu značajno menjali dinamiku ekspresije kao posledicu pretretmana sa ESWT (Grafik4.21.).



Grafik 4.21. ESWT prekondicioniranje utiče na ekspresiju gena u jejunalnoj tunica muscularis. Pfaffl metod za analizu qRT-PCR rezultata je primenjen i rezultati su normalizovani u odnosu na netretirane kontrole (naive controls) i predstavljeni kao promena izražena sa fold. Svi ispitivani geni su bili pojačano ekspimirani nakon hirurške intervencije (* grupe SM_{24h} ESWT_{24h}+SM_{24h}). A. Brza promena ekspresije egr-1 neposredno nakon ESWT i hirurške intervencije. B. IL-10 je statistički značajno više ekspimiran u ESWT pretretiranoj grupi u poređenju sa grupom koja je primila samo hiruršku intervenciju (†). Kruskal-Wallis i Mann Whitney U test rangova je primenjen gde je bilo prikladno i $p < 0.05$ se smatra statistički značajnom razlikom.

4.5.5. ESWT moduliše hirurškom manipulacijom tankog creva i izaziva sistemski inflamatorni odgovor

Inflamacija koje se javlja kao posledica abdominalne hirurške intervencije je dobro opisana od strane nekoliko grupa uključujući i našu. U prethodnim eksperimentima, pokazana je višestruko veća koncentracija proinflamatornih citokina IL-1 β , IL-6, KC/GRO α i TNF- α (Nakao, Kimizuka *i sar.* 2003; Moore, Overhaus *i sar.* 2005) (Grafik 4.22.).

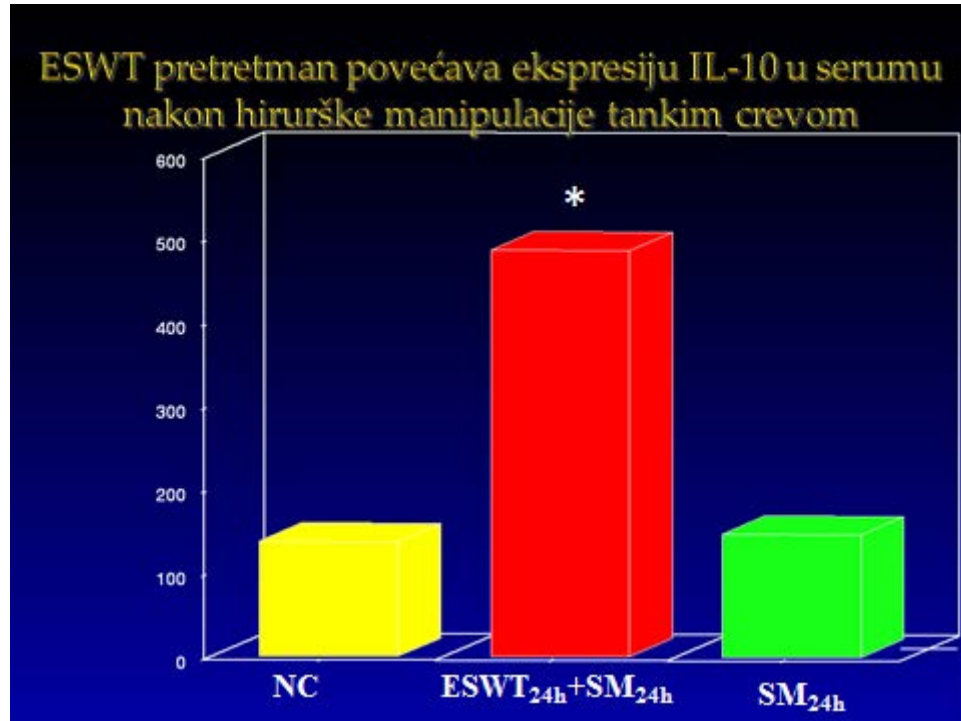


Grafik 4.22. Koncentracija citokina u serumu nakon manipulacije gastrointestinalnim traktom. Značajno povećanje koncentracija proinflamatornih citokina u serumu je izmerena za IL-1 β , IL-6, TNF- α i KC/GRO α . Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije \pm standardna greška.

4.5.6. ESWT moduliše inflamatorni odgovor putem povećanja koncentracije IL-10 u serumu

Nakon što smo utvrdili da prekondicioniranje životinja sa ESWT moduliše serumske nivoe citokina i hemokina, mi smo aplicirali isti pristup na model postoperativnog ileusa. Kao što smo i očekivali, prekondicioniranje životinja nije značajno uticalo na koncentraciju citokina i hemokona u serumu neoperisanih kontrola (ESWT_{3h}, ESWT_{24h} and ESWT_{48h}). Hirurška manipulacija tankim crevom je sa druge strane, očekivano izazvala snažan sistemski inflamatorni odgovor u obe operisane grupe (ESWT_{24h}+SM_{24h} and SM_{24h} groups). Prekondicioniranje sa ESWT 24h pre hirurške intervencije je imalo značajan uticaj na IL-10 povećavajući njegovu (p<0.05) (Grafik4.23.). ESWT prekondicioniranje je uticalo i na trend u povećanju koncentracije IL-12p70 i IL-6 kao i smanjenju IL-1 β . Na žalost ovi rezultati nisu uspeli da zadovolje

uslove za statističku značajnost. Mogući razlog za to je bila razlika između pojedinih životinja unutar grupe.



Grafik 4.23. Koncentracija antiinflamatornog citokina IL-10 u serumu 24h nakon hirurške manipulacije GIT. ESWT pretretman povećava nivo antiinflamatornog citokina IL-10 u serumu i suprimira inflamaciju izazvanu hirurškom manipulacijom GIT u poređenju sa kontrolama (NC) i sham tretmanom (SM24h) koje su primile samo hirurško manipulisanje GIT-om. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije \pm standardna greška.

5. Diskusija:

5.1. ESWT ima protektivne efekte u modelu ishemije kožnih reznjeva nezavisno od vremena aplikacije

Nekroza kože i kompozitnih kožnih reznjeva je i dalje veoma prisutan klinički problem koji je povezan sa značajnim troškovima u zdravstvu, velikim teretom za pacijente i njihove porodice zbog rana koje ne zarastaju, veoma poremećenim kvalitetom života, potrebe za ponovnim hospitalizacijama i potrebom za intervencijama na istoj rani da bi se postiglo potpuno zarastanje i rekonstrukcija. Veliki broj farmaceutskih preparata, terapija zasnovanih na specifičnim ćelijama i genska terapija, se trenutno ispituju u cilju poboljšanja perfuzije kožnih reznjeva i boljih kliničkih rezultata. Zajednička karakteristika svih navedenih terapija je činjenica da ne postoji uniformna efikasnost u smanjenju komplikacija reznjeva. U prethodnim publikacijama naše grupe i drugih autora, pokazano je da zvučna terapija udarnim zvučnim talasima ima proangiogeni i antiinflamatorni efekat na tkiva zahvaćena ishemijom (Stojadinovic, Elster *i sar.* 2008) i u modelu toplotne opekotine (Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009). U ovoj studiji, želeli smo da ispitamo efekte koje terapija udarnim zvučnim talasima izaziva u dobro objašnjenom i izučenom modelu nekroze tkiva usled ishemije, epigastričkom modelu kožnih reznjeva i tako steknemo bolji uvid u mehanizme kojima ova terapija ispoljava korisne efekte na tkiva. U ovom radu smo pokazali da terapija udarnim zvučnim talasima (300 impulsa, EDF=0.1 mJ/mm²) primenjena 24 sata pre operacije, neposredno nakon ishemije ili 24 sata posle operacije značajno poboljšava perfuziju reznja kože, povećava broj krvnih sudova i vijabilnost reznja tako što smanjuje stepen kontrakcije i smanjuje brzinu nekroze i količinu nekrotičkog tkiva.

U literaturi postoji nekoliko studija koje su ispitivale efekte udarnih zvučnih talasa na nekrozu tkiva distalnog dela kožnih reznjeva. U tim studijama je terapija udarnim zvučnim talasima primenjena nakon izazivanja ishemije (Meirer, Kamelger *i sar.* 2005; Kuo, Wu *i sar.* 2007; Meirer, Brunner *i sar.* 2007; Yan, Zeng *i sar.* 2008; Kuo, Wang *i sar.* 2009). Za razliku od tih studija, mi smo procenjivali efekte terapije udarnim

zvučnim talasima u zavisnosti od vremena njene primene, a sve u cilju definisanja da li bi pretretman tkiva udarnim zvučnim talasima imao protektivni efekat u cilju boljeg preživljavanja reznjeva i smanjenja stepena nekroze. Naši rezultati su pokazali da lokalna primena udarnih zvučnih talasa značajno smanjuje brzinu i količinu nekroze u kompromitovanom tkivu kožnih reznjeva i posledični gubitak tkiva. Ovaj protektivni efekat je ispoljen bez obzira na vreme primene terapije, bilo pre izazivanja ishemije (24h Pre-Op), neposredno posle (Post-Op) ili jedan dan nakon ishemije (24h Post-Op). Značajno smanjenje površine nekrotičnog tkiva je postignuto u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolama. U svim grupama koje su primile terapiju trećeg i sedmog dana nakon ishemije zabeležen je približno isti procenat nekroze bez obzira na vreme primene ESWT terapije. Naši rezultati se mogu uporediti sa drugim terapijama egzogenim faktorima rasta za sprečavanje nekroze tkiva usled ishemije (Michlits, Mittermayr *i sar.* 2007; Mittermayr, Morton *i sar.* 2008).

Brojni klinički relevantni razlozi govore u prilog terapijskoj primeni udarnih zvučnih talasa u poređenju sa farmakološkim agensima za poboljšanje angiogeneze. Ova terapija je testirana dugi niz godina i pokazana je njena bezbednost, lako se primenjuje, nije invazivna, cena po tretmanu je izuzetno niska i nema zabeleženih efekata na redovne terapije (Schaden, Thiele *i sar.* 2007). I naša studija, kao i ostale publikovane studije, nije pokazala da upotreba udarnih zvučnih talasa male energije ima negativne kliničke i histološke posledice. Pozitivni efekti na smanjanje stepena nekroze tkiva su zabeleženi od strane nekoliko autora na različitim animalnim modelima ishemičnih reznjeva (Huemer, Meirer *i sar.* 2005; Meirer, Kamelger *i sar.* 2005; Kuo, Wu *i sar.* 2007) pa čak i u slučaju komplikovanih modela koji kombinuju hemijski indukovani diabetes kao komorbiditet sa ishemijom reznja (Kuo, Wang *i sar.* 2009). Kao što smo prethodno spomenuli, nasuprot njima, mi smo testirali terapiju kao metod za pripremu tkiva za ishemiju. Problem i značaj ishemije reznjeva u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji je rezultovao u brojnim terapijskim rešenjima koja za cilj imaju da predvide perfuziju tkiva da bi slabo prokrvljeno tkivo bilo ukolonjeno, ali isto tako i da pretretman tkiva pre hirurije smanji ishemiju u cilju očuvanja što većeg dela reznja (Reichenberger, Germann *i sar.* 2009). Zaključak ove studije je da terapija udarnim zvučnim talasima ima mesto u rekonstruktivnoj hirurgiji za poboljšanje angiogeneze i da se njena efikasnost može

porediti sa hirurškim opcijama sa znatno nižim rizikom. Slični ovim rezultatima su i rezultati Kuo i saradnika (2008) koji su pokazali da terapija udarnim zvučnim talasima male energije poboljšava vijabilnost reznjeva u modelu ishemije kožnih reznjeva u pacova sve do 7 dana nakon izazivanja ishemije. Ovi rezultati su od posebnog značaja za lekare i hirurge koji se sreću sa ovim problemima, posebno u rekonstrukciji rana i zarastanju hirurških defekata. Takođe, bitno je istaći da su udarni zvučni talasi male energije uspeali da zaustave gubitak tkiva i kod jasne nekroze nastale usled ishemije.

Cilj ove studije je bio da se utvrde potencijalni mehanizmi pomoću kojih terapija udarnim zvučnim talasima ispoljava svoje blagotvorne efekte na tkiva. Iz tog razloga merena je vijabilnost i perfuzija reznjeva pomoću laserskog dopler sistema koji nam je dao slike površinske perfuzije reznja. Ovim merenjima je zabeleženo značajno povećanje perfuzije kao odgovor na udarne talase lokalno i regionalno. Lokalno je utvrđeno povećanje perfuzije tkiva u ishemičnoj zoni (deo reznja sa disekovanom neurovaskularnom petljom) i regionalno uvećanje perfuzije u susednim delovima reznja, vitalnoj i tranzijentnoj zoni. Uticaj pretretmana tkiva smo utvrdili merenjem perfuzije neposredno nakon hirurške intervencije i disekovanja krvnih sudova. Kao što je i za očekivati, ESWT tretman je doveo do smanjenja perfuzije tkiva u svim grupama. U grupi koja je bila tretirana 24 sata pre operacije, ovo smanjanje je bilo značajno manje u poređenju sa svim ostalim grupama. Sedmog dana posle ishemije, nivo perfuzije je dosegao tri puta veću vrednost u poređenju sa perfuzijom u kontrolnoj grupi. Interesantno je da je sedmog dana nakon ishemije vrednost perfuzije u svim tretiranim grupama bila jednaka (24h Pre-Op, Post-Op i 24h Post-Op). Kao što je bilo i za očekivati, nekroza u kontrolnoj grupi i 24h Post-Op grupi je bila jednaka prvi dan. Nakon tretmana, perfuzija u 24h Post-Op grupi je počela da raste i do kraja eksperimenata, postala je statistički značajno veća od kontrola, i izjednačila se sa ostale dve tretirane grupe. Dinamika kojom se perfuzija povećavala u ovoj grupi je u saglasnosti sa rezultatima prethodno publikovanih studija (Kuo, Wu *i sar.* 2007; Zimpfer, Aharinejad *i sar.* 2009).

U prethodnim studijama pokazano je da terapija udarnim zvučnim talasima utiče na homeostazu azot monoksida (NO) (Ciampa, de Prati *i sar.* 2005; Mariotto, Cavalieri *i sar.* 2005; Aicher, Heeschen *i sar.* 2006; Yan, Zeng *i sar.* 2008). Mi smo dobili preliminarne rezultate (podaci nisu prikazani) pomoću elektronske paramagnetne

rezonance, a koji oslikavaju događaje u tkivu vezane za NO put. Ovi preliminarni rezultati podržavaju hipotezu da NO ima uticaja na povećanje perfuzije zabeleženo pomoću LDI sistema neposredno nakon primene udarnih zvučnih talasa. NO je takođe povezivan sa antiinflamatornim efektima udarnih zvučnih talasa male energije (Kuo, Wu *i sar.* 2007; Davis, Stojadinovic *i sar.* 2009) koji su potencijalno odgovorni za poboljšanu vijabilnost reznjeva. Bitno je istaći da je poluživot NO veoma kratak ($T_{1/2}$ meren u sekundama) što sugeriše da efekti koje udarni zvučni talasi imaju na tkivo nisu samo NO zavisni već da je proangiogeni efekat udarnih zvučnih talasa takođe bitan. Dobro je utvrđena veza između povećanja nivoa NO i povećanja ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) i *vice versa* (Zachary i Glicki 2001; Gotte, Amelio *i sar.* 2002). Dve grupe autora, Stojadinovic i saradnici (2008) i Davis i saradnici (2009), su pokazale da udarni zvučni talasi stimulišu angiogenezu i suprimiraju proinflamatorni odgovor u ishemičnom tkivu. Ova dva procesa nisu divergentna, već naprotiv, trenutno preovladava jedan ili drugi proces što ima definišući efekat na konačni ishod reparaciju tkiva i regeneraciju. U našoj studiji, kvantitativnom imunohistohemijskom analizom pratili smo efekte udarnih zvučnih talasa na revaskularizaciju ishemičnog tkiva koja obuhvata stvaranje malih krvnih sudova. Utvrđivan je odnos funkcionalnih, formiranih, krvnih sudova i ukupnog broja svih krvnih sudova. Izrazito veći broj vWF⁺ krvnih struktura je detektovan u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolama, međutim, samo je intradermalni sloj Post-Op grupe dosegao statistički značajnu razliku. Broj *de novo* formiranih zrelih, funkcionalnih sudova (SMA⁺ struktura) u odnosu na ukupan broj endotelnih struktura je dao novi pogled na efekte udarnih zvučnih talasa. Udarni zvučni talasi su izazvali formiranje većeg broja funkcionalno zrelih krvnih sudova u poređenju sa kontrolnim životinjama.

Nakon što smo pokazali da udarni zvučni talasi ispoljavaju lokalni i regionalni efekat na tkivo, pokušali smo da utvrdimo da li terapija udarnim zvučnim talasima ima sistemske efekte i da ispitamo dublje mehanizme angiogenetskih efekata udarnih zvučnih talasa. U tu svrhu korišćeni su transgeni miševi koji zajedno sa VEGF-R2 ispoljavaju i luciferazu. Uloga VEGF-R2 je dobro opisana u literaturi, i smatra se da je ovaj receptor jedan od glavnih molekula u procesu angiogeneze. U intaktnim transgenim miševima, ESWT tretman zadnjeg ekstremiteta je izazvao povećanje bioluminiscencije ne samo

lokalno, u tretiranom ekstremitetu, već je ispoljen i efekat u udaljenim tkivima od mesta tretmana, tj na netretiranom, kontralateralnom ekstremitetu. Sedmog dana nakon tretmana bioluminiscencija fotona koje je emitovao luciferin, bila je dva puta veća nego kod netretiranih kontrolnih životinja iako to nije bilo statistički značajno. Interesantni eksperimenti (Aicher, Heeschen *i sar.* 2006) na nude-pacovima, su pokazali da pretretman pomoću udarnih zvučnih talasa neishemičnih i zadnjih ekstremiteta podvrgnutih hroničnoj ishemiji ima pozitivne efekte, kako na lokalnom/regionalnom nivou, tako je ispoljen i sistemski efekat. Oni su pokazali povećanje regrutovanja i homing cirkulišućih endotelnih progenitorskih ćelija, putem tretmana tkiva pomoću udarnih zvučnih talasa a kroz povećanje ekspresije hemoatraktanata, STF-1 (engl, stromal-cell derived factor 1) i VEGF. Naši rezultati iz eksperimenata na transgenim životinjama takođe govore u prilog rezultata koje smo zabeležili ispitujući angiogenezu u režnjevima, gde smo videli da tretirano tkivo, kao i susedno tkivo (tranzijentna i vitalna zona) imaju povećanu ekspresiju vonWillebrand faktora i aktina glatke muskulature.

Jedan od velikih problema koji je prisutan u rekonstruktivnoj hirurgiji je i kontrakcija režnjeva, naročito na mestima koja trpe velika istezanja i savijanja (npr. zglobovi). Kontrakcija tkiva je u direktnoj vezi sa depozicijom kolagena i njegovim remodelovanjem. U našim eksperimentima, uočena je kontrakcija tkiva režnja u svim životinjama, ali smo među grupama mogli da utvrdimo značajne rezlike u stepenu kontrakcije i ona je bila manja u svim tretiranim grupama. Ovo ima veliki značaj za kliničku praksu gde je neophodna i veoma je značajna redukcija kontrakcije tkiva, kako bi se na primer u slučaju zglobova omogućila veća pokretljivost i veći obim pokreta. Neki autori su posebnu pažnju posvetili upravo ovom problemu, deponovanju kolagena u tkivu nakon tretmana udarnim zvučnim talasima i pokazali da ona utiče kako na ekspresiju kolagena, tako i na njegovo deponovanje i orijentaciju (Berta, Fazzari *i sar.* 2009; Bosch, de Mos *i sar.* 2009; Vetrano, d'Alessandro *i sar.* 2011; Carcamo, Aliaga *i sar.* 2012).

Naši rezultati dalje govore u prilog hipotezi da aplikacija fizičke energije ili mehaničkog stimulusa može da pokrene seriju događaja u ćelijama koje imaju pozitivne biološke efekte na čitav organizam. Ovaj proces je poznat pod terminom mehanotransdukcija i izgleda da ima značajnu ulogu u procesu interakcije među ćelijama,

njihovom homingu, remodelovanju tkiva kao i regeneraciji. Verovatno najbolji primer za primenu fizičkih sila u biološke svrhe je terapija negativnim pritiskom koja je promenila način na koji se velike rane tretiraju. Mehaničke sile, koje mikroskopski deformišu tkivo putem usisavanja, pomaže proliferaciju i angiogenezu, tako i remodelovanje povećanjem ekspresije MMP (Saxena, Hwang *i sar.* 2004; Greene, Puder *i sar.* 2006).

Naša studija pokazuje da udarni zvučni talasi male energije izazivaju mehanotransdukcione promene u modelu ishemije kožnih režnjeva. Razumevanje ovih stimulatornih efekata na angiogenezu u koži je produbljeno ovim putem kroz izučavanje specifičnih proteina u koži, ključnih za angiogenezu. Naši rezultati sugerišu da jedan tretman udarnim zvučnim talasima od 300 impulsa, EDF=0.1 mJ/mm² primenjeni 24 sata pre, neposredno nakon i 24 sata nakon ishemije značajno ubrzava proces revaskularizacije, potpomaže vijabilnost režnja kroz ranu povećanu ekspresiju faktora značajnih za angiogenezu i poboljšava perfuziju kompromitovanog tkiva. Takođe, naša studija sugeriše potrebu za daljim izučavanjem sistemskih efekata koje terapija udarnim zvučnim talasima potencijalno ispoljava a koja je povezana sa lokalnim, regionalnim i kontralateralnim efektima uočenim nakon tretmana.

5.2. Konstrukcija modela gastrointestinalnog stazisa i inflamacije izazvanih traumom perifernih tkiva

Klinički ishod i preživljavanje pacijenata koji su pretrpeli teške traume je značajno povećan u prošloj deceniji zbog napretka u nezi ovih pacijenata, povećanja efikasnosti terapeutika koji se primenjuju, značajnog skraćanja vremena koje protekne od momenta povrede do prvog tretmana, brzog transporta do medicinskih ustanova (vojska prednjači u ovome), efikasne reanimacije i inicijalnog tretmana u sprečavanju gubitaka života. Uprkos tome, trauma je veliki klinički problem zato što ne postoji specifična terapija za post-traumatski sindroma u kome dolazi do otkazivanja mnogih organa (engl. Multiple Organ Failure syndrome, MOF)(Dewar, Moore *i sar.* 2009). Iz tog razloga je razumevanje patofizioloških mehanizama u samoj rani, naročito onih ćelijskih i molekularnih događaja koji dovode do sistemskih poremećaja (SIRS, MODS, MOFS)

neophodno za razvoj uspešnih terapeutika. Pouzdan animalni model koji oponaša povredu perifernih tkiva i koji omogućava gradaciju same povrede, a naročito model koji reprodukuje posledične događaje koji uključuju i GIT, i njegovu ulogu u razvoju sistemskog inflamatornog odgovora je preko porteban. Novi TBX model je razvijen u ovoj studiji i kod njega je moguće precizno podešavati stepen povrede, on uključuje sve klinički relevantne biološke događaje i kao takav omogućava izučavanje sistemskih i organ-specifičnih molekularnih i ćelijskih efekata traume.

GIT igra odlučujuću ulogu u visokoj stopi mortaliteta i morbiditeta (Marshall, Christou *i sar.* 1993; Soeters, Luyer *i sar.* 2007). Izučavanje efekata traume na GIT i izučavanje sekundarnih sistemskih efekata traume je bilo veoma otežano i nekonkluzivno zato što je postojala obavezna upotreba analgetika u trenutno dostupnim animalnim modelima, za analgetike je pokazano da imaju velike, neizbežne efekte na više sistemskih organa, posebno na gastrointestinalnu funkciju i epitelijalnu sekreciju i motilitet GIT (Bauer, Sarr *i sar.* 1991; Schmidt, Stoffels *i sar.* 2008). Klinički domen gastrointestinalnog stazisa i sistemskog oslobađanja brojnih inflamatornih medijatora oslobođenih od strane GITa koje prati traumu je dobro opisan. Ovi postraumatski događaji kompromituju nutritivni status pacijenata, povećavaju rizik od pneumonije i doprinose prenamnožavanju bakterija u samom gastrointestinalnom taktu i probijanje mukoznih barijera, što predstavlja kritični „drugi udar“ na organizam u razvoju pogubnog sindroma sistemskog inflamatornog odgovora.

Do sada, kako smo mi zaključili, specifična veza između tkivne povrede i gastrointestinalnog dismotiliteta nije bila izučavana. Ovo je uglavnom zbog nedostatka odgovarajućeg, pouzdanog i podesivog modela za dugoročno izučavanje gastrointestinalnog trakta. Jasno, postoji nekoliko modela traume/hemoragije koji uglavnom podrazumevaju laporatomiju ili frakturu kostiju kao traumatsku komponentu modela (Tsukamoto i Pape 2009). Nedostatak ovih modela je u tome što iako ključan element, trauma nije jasno definisana i postoji velika varijabilnost u stepenu oštećenja tkiva među životinjama. Treba dodati i da u dosadašnjim modelima traume/hemoragije postoji obavezna upotreba analgetika da bi se omogućilo dugoročno izučavanje životinja, što samo po sebi ima velike efekte na ceo sistem.

Prvi cilj ove studije je bio da se razvije pozdan, podesiv i IACUC odobreni model traume tkiva koji bi mogao da omogući i kratkoročno i dugoročno izučavanje i koji bi omogućio eksperimentisanje bez upotrebe analgetika. Mi smo ovo uspešno postigli konstrukcijom precizno graduisanog mišijeg modela povrede tkiva, koji se sastoji u implantaciji (presađivanju) specifične, predodređene količine sterilnog, singenog, povređenog tkiva (TBX) u dorzalni subkutani prorez u miša primaoca. Interesantno je da je presađeni TBX u količini višoj od 17.5% od ukupne telesne mase primaoca bio poguban za životinje, nakon potpunog opravka od anestezije posle operacije. Jasno je da je nakon vremenskog perioda koliko su trajali ovi eksperimenti (21 sat nakon transimplantacije) životinje nisu mogle ozbiljno da obole od nedostatka ishrane, ali je brzo disanje sugerisalo da su životinje razvile akutne plućne probleme. Zbog toga, mi smatramo da TBX model može uspešno da se koristi i za izučavanje pulmonarnih efekata koje može da ima masivno oštećenje tkiva.

Bitno je istaći da smo mi koristili novi eksperimentalni model, TBX model, da pouzdano rekapituliramo česti klinički problem gastrointestinalne staze u pacijenata sa traumom. Predstavljeni podaci pokazuju da postepeno povećanje količine implantiranog TBX od $\geq 10\%$ od ukupne mase primaoca dovodi do postepenog kašnjenja u gastrointestinalnom tranzitu praćenim pomoću tečnog FD70. Dalje, periferno implantirano oštećeno tkivo rezultuje u značajnoj i neprekidnoj supresiji kontraktilnosti izolovanog jejunalnog cirkularnog glatkog mišića po za sada nepoznatom mehanizmu. Težak gastrointestinalni stazis se pojavljuje u velikom broju pacijenata izazivajući povišenu stopu mortaliteta i morbiditeta. Iako je hranjenje pacijenata oralnim putem preferiran način davanja hrane kritično obolelim pacijentima, pacijenti koji su hranjeni nazo-gastralnim putem. Pacijenti koji su hranjeni drugim putevima dobijaju polovinu od željenje količine nutrijenata (Stapleton, Jones *i sar.* 2007). Dalje, gastrointestinalni stazis je često povezan sa povećanim rizikom od prenamnožavanja bakterija, aspiracijom gastričnog sadržaja i sekundarnom pneumonijom (Chapman, Fraser *i sar.* 2005). Zbog navedenih razloga, model koji bi se koristio da se specifično izučava mehanizam tramom izazvanog gastrointestinalnog stazisa je veoma potreban.

Jos jedna prednost našeg modela je u tome što u novoopisanom modelu povrede postoji mogućnost da se manipuliše TBXpre same implantacije. Mi smo pokazali da je

denaturacija proteina u TBX potpuno eliminisala pogubne efekte TBX. Dobro je poznato da citoplazmatski i nuklearni proteini oslobođeni u međucelijski prostor od strane povređenih ćelija mogu da izazovu snažan inflamatorni odgovor. Ovi događaji u prvim stupnjevima posledično aktiviraju koagulacione faktore, iniciraju agregaciju krvnih pločica i generišu citokine i hemokine koji zatim regrutuju neutrofile, monocite, B i T ćelije na mesto povrede. Svi oni skupa doprinose razvoju sistemskog inflamatornog odgovora, koji potencijalno može da preraste u MOF sindrom.

Slično, transimplantacija izolovanog ekstraćelijskog matriksa iz TBX koji je oslobođen ćelija pomoću kiseline, smanjuje smrtnost i uklanja efekte koje TBX ima na GIT. Ipak, neophodno je ovo dalje izučiti i utvrditi da li produkti degradacije samog matriksa od strane aktiviranih ćelija u TBX imaju zapažen inflamatorni potencijal koji bi mogao da utiče na tkivni odgovor na povredu. Hijaluronska kiselina je ubikvitarni molekul i glavna komponenta ekstraćelijskog matriksa koja je sintetisana kao veliki polimer. Poznato je da je tokom povrede, inflamacije i debrisa mrtvog tkiva povećana koncentracija hijaluronana delovanjem MMP (Wang, Ba *i sar.* 1996). I zaista, povećana koncentracija hijaluronana je bila merena u studijama mnogih inflamatornih poremećaja a i fragmenti ekstraćelijskog matriksa (hijaluronan i fibronektin) imaju ulogu pro-inflamatornog stimula za makrofage i endotel (McKee, Lowenstein *i sar.* 1997; Rockey, Chung *i sar.* 1998; Bot, Hoefler *i sar.* 2008). Nedavno je pokazano da su inflamatorni događaji koji su posledica degradiranog ekstraćelijskog matriksa posredovani TLR2 i TLR4 i da MyD88 zavisnim putem aktiviraju NF- κ B (Jiang, Liang *i sar.* 2005; Levy, Prince *i sar.* 2006)

Klinički posmatrano, teška trauma rezultuje u SIRS koji kada progresira prelazi u MOD. U TBX modelu, smo u serumu 21 sat nakon implantacije zabeležili značajno povećanje koncentracije IL-6, KC/GRO α i anti-inflamatornog citokina IL-10. Poznato je da serumski nivo IL-6 i IL-10 predstavljaju značajne prognostičke faktore koji su nezavisni faktori rizika mortaliteta i morbiditeta (Nast-Kolb, Waydhas *i sar.* 1997; Hawksworth, Stojadinovic *i sar.* 2009). Nasuprot tome, do sada u ovom modelu nije zabeleženo povećanje u serumskog nivoa IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ i TNF- α . Treba istaći da smo mi posmatrali samo jednu vremensku tačku, a nivoi različitih medijatora inflamacije u serumu variraju u toku vremena i postoji mogućnost da smo uzorke

sakupljali ranije da bismo zabeležili i promenu koncentracije drugih citokina. S toga, detaljni vremenski profil specifičnih regulatora inflamacije u serumu treba da se odredi i u tom momentu bi se detaljniji mehanizam mogao predložiti.

Razumevanje molekularnih i ćelijskih interakcija između domaćina i rane je takođe značajno za razvoj terapeutika u cilju sprečavanja štetnih sistemskih efekata traume kao i za poboljšanje remodelovanja tkiva i regeneracije. Uz prethodno pomenute prednosti TBX modela, pokazali smo da je ovaj model jedinstven i pogodan za istraživanje medijatora u sterilnoj rani. Interesantno je da su IL-1 β i TNF- α bili povećano eksprimirani u sveže pripremljenom TBX fluidu, sugerišući da su oni bili prisutni u preformiranom stanju. Nasuprot njima, TNF- α , IL-6 i KC/GRO α su bili generisani unutar TBX tek nakon implantacije dok je IL-1 β bio konstantno prisutan. Profil ekspresije hemokina i citokina u serumu i fluidu iz rane bi mogao da bude prediktivni faktor za zarastanje rana, jer je disregulacija inflamacije bila pokazana kod pacijenata koji su imali usporeno zarastanje rana (Hawksworth, Stojadinovic *i sar.* 2009). Dodatne studije koje kombinuju TBX model i kliničke podatke bi trebalo da dovedu do razvoja panela biomarkera zarastanja rana, koji bi potencijalno mogao da bude sredstvo za predviđanje ishoda zarastanja rane, kao i da se proceni uticaj koji povreda tkiva ima na različite organske sisteme, posebno na GIT. Značajan napor je napravljen u istraživanju posttraumatskih bronhoalveolarnih fluida i ove studije su takođe pokazale više nivoa TNF- α , IL-1 β i IL-6, ali primarno u modelima hemoragičnog šoka u različitim vrstama životinja (Tasoulis, Livaditi *i sar.* 2009). Ćelijsko poreklo specifičnih inflamatornih medijatora u traumi je i dalje nejasno kako u kliničkim tako i u eksperimentalnim istraživanjima. Ovaj jedinstveni model omogućava da se izučavaju dve komponente: sa jedne strane sam proces zarastanja rane, a sa druge strane organizam kao celina i da se utvrdi da li povećana koncentracija cirkulišućih inflamatornih medijatora potiče iz rane ili drugih delova tela.

Da sumiramo, mi smo konstruisali i okarakterisali novi, donorski TBX mišiji model traume koji je precizno kontrolisan i reproducibilan, model koji rekapitulira mnoge važne kliničke fenomene i koji može da se koristi u kombinaciji sa genetski modifikovanim miševima već opisanim ili *de novo* napravljenim. Važno je da model ne zahteva obaveznu upotrebu analgetika kao u drugim dostupnim modelima, i tako

izbegavamo nepouzdana farmakološki efekat analgetika na imunski sistem, pluća i gastrointestinalno funkcionisanje, i stoga je po prvi put omogućeno izučavanje posttraumatskog gastrointestinalnog motiliteta. Jedinstveno za ovaj model je to što se povređenim tkivom i fluidom može manipulirati i tako doprineti razumevanju štetnih sistemskih efekata koje traume imaju, što bi dovelo do boljeg uvida u mehanizme zarastanja rane. Konačno, ovaj inovativan model nudi mogućnost da se istražuju dugoročni molekularni i funkcionalni događaji u sindrom kompenzatornog anti-inflamatornog odgovora indukovano tkivnom traumom, poznat i kao „two hit“ scenario traume.

5.3. Genetičko i terapeutsko modifikovanje imunskim odgovorom na traumu sprečava pojavu gastrointestinalnog stazisa u odgovoru na implantirani TBX

Trauma je glavni uzročnik smrti u civilnim nesrećama, i u vojsci, usled ranjavanja i povredama od eksplozija, zato što ne postoji terapeutsko rešenje za ravijanje SIRS i kasnijeg MOF sindroma koji dovodi do smrti (Dewar, Moore *i sar.* 2009). Na žalost, svih 150 i više kliničkih studija koje su imale budžete i od nekoliko milijardi dolara nije uspelo da pomogne kritično obolelima (Xiao, Mindrinos *i sar.* 2011). Nedavno je konzorcijum 21 istraživačkog centra specijalizovan za traume u SAD (engl. The Inflammation and Response to Injury Large Scale Collaborative Research Program) zaključio da tradicionalni animalni modeli opekotine, sepe i traume slabo oponašaju njihove pandame u stanjima kod ljudi (Seok, Warren *i sar.* 2013). Među 4918 ortoloških, inflamatornih gena koji su komparativno analizirani, patološki odgovor ljudi je bio veći na genomskom nivou u poređenju sa mišijim modelima. Imajući u vidu ublaženi odgovor u mišijim modelima, autori su sugerisali da bi model sa većim stepenom povrede/oštećenja tkiva bolje oponašao kliničku sliku viđenu u ljudima.

Kao što smo istakli, eksperimentalni modeli se uglavnom sastoje od preloma femura praćenim nagnječenjem okolnih mišića i hemoragije (Mollen, Levy *i sar.* 2008), manipulacije crevima u kombinaciji sa hemoragijom (Yu, Pang *i sar.* 2013), ili od

nekoliko tupih trauma u kombinaciji sa hemoragijom (Tsukamoto i Pape 2009; Gentile, Nacionales *i sar.* 2013; Seok, Warren *i sar.* 2013). Ovi modeli imaju primarno hipovolemički uticaj koji ima ograničenu povredu tkiva kao komponentu i koji zbog preživljavanja zahteva obaveznu upotrebu lekova za analgeziju. Mi smo koristili klinički uočene promene na nivou transkriptomiksa u ljudi, da razvijemo novi model inflamacije izazvane povredom sa velikim oštećenjem perifernih tkiva. Mi smo prethodno opisali TBX model u kome može precizno da se kontroliše stepen oštećenja tkiva, koji je reproducibilan i koji rekapitulira mnoge važne kliničke fenomene (Tsukamoto, Antonic *i sar.* 2011).

Klinički i u svim eksperimentalnim modelima, GIT ima odlučujuću ulogu u preživljavanju i morbiditetu pacijenata (Marshall, Christou *i sar.* 1993; Soeters, Luyer *i sar.* 2007). Međutim, istraživanje traume i njenih efekata na GIT i sekundarnih sistemskih efekata je bila značajno smanjena zbog obavezne upotrebe analgetika, zato što analgetici imaju snažne neželjene efekte na nekoliko organskih sistema, posebno na ekskreciju i motilitet GIT (Bauer, Sarr *i sar.* 1991; Schmidt, Stoffels *i sar.* 2008). Gastrointestinalni stazis i oslobađanje inflamatornih medijatora poreklom iz GIT u cirkulaciju je dobro poznato. Dalje, razumevanje mehanizama po kojima GIT funkcioniše je neophodno zato što GIT stazis koji se javlja nakon traume kompromituje nutritivno stanje organizma, jer pacijenti ne mogu da unose hranu, povećava rizik od aspirativne pneumonije (Chapman, Fraser *i sar.* 2005) i doprinosi prenamnožavanju bakterija i konačnom probijanju mukozne barijere što izaziva razvoj sepse, koja dalje potpomaže razvoj SIRS i MOF.

Do sada, naši rezultati su pokazali da bioaktivni medijatori generisani u dinamičnoj i evoluirajućoj mikro-sredini rane (Hawksworth, Stojadinovic *i sar.* 2009), a ne strukturni elementi tkiva (fragmenti kosti, intaktni ekstracelularni matriks i ćelijske membrane), pokreću inflamatorni odgovor. Ova tvrdnja je zasnovana na rezultatima eksperimenata sa zamrzavanjem i odmrzavanjem tkiva, inaktivacijom tkiva zagrevanjem na visokoj temperaturi i decelularizacijom tkiva, gde svaki od ovih metoda u potpunosti eliminiše negativne efekte na organizam (Tsukamoto, Antonic *i sar.* 2011). Brojni medijatori, koji indukuju snažan inflamatorni odgovor nakon oslobađanja iz oštećenog tkiva u ekstracelularni matriks su dobro poznati i opisani. U drugim organskim sistemima

studije su pokazale da se urođeni imunski sistem i endotel aktiviraju širokim spektrom intracelularnih molekula uključujući IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , HSP, mokraćnu kiselinu, ATP, S100 proteine, HMGB-1 protein, histone i DNK-RNK-protein komplekse od kojih neki ispoljavaju svoje efekte putem pattern-recognition receptora kao što su TLR (Flohe, Bangen *i sar.* 2007; Bitto, Barone *i sar.* 2010; Xu, Zhang *i sar.* 2011).

U kliničkoj studiji je TLR put identifikovan kao signalni put koji ima glavnu ulogu u odgovoru pacijenata na traumu (Seok, Warren *i sar.* 2013) i u eksperimentalnim modelima sistemskog odgovora i odgovora udaljenih organa na ishemija-reperfuzija tip povrede, hemoragijski šok i hemoragiju kombinovanu sa traumom. U prethodnim studijama nije bilo lako odrediti poreklo TLR liganda: da li je poreklom od oštećene mukozne barijere koja je osetljiva na ishemiju (engl. pathogen associated molecular patterns, PAMP poreklom od bakterija) ili od signala formiranih endogeno (engl. danger associated molecular patterns, DAMP). Koristeći TBX model, u kojem ne koristimo ni ishemiju niti oštećenje tkiva domaćina, mi smo mogli da pokažemo važnost TLR4 receptora u izazivanju patofizioloških stanja tokom povrede. Mi smo pokazali da subkutano implantirani TBX izaziva povećanje iRNK za TLR4 u *tunica muscularis*, koje verovatno odlikava situaciju i u ostalim tkivima i organima. Ovo je veoma važno istaći, zato što povećana ekspresija TLR4 putem TBX dovodi do senzitivacije životinja na male doze LPS čak i pri niskim dozama, dozama koje prethodno nisu imale efekat i izazivale su smrtnost pri samo malo višim dozama (5-10mg/kg) koje tipično nisu letalne. Naša zapažanja daju uvid u moguću ulogu TLR4 u štetnoj sinergiji traume i posledičnog razvijanja infekcije. U ovom „double hit“ scenariju, dodatno uvećavanja sistemskog inflamatornog odgovora zbog infekcije povećava lokalnu disfunkcionalnost i potencira disfunkcionalnost udaljenih organa, koja ukoliko ostane netretirana, dovodi u opasnost život bolesnika (Deitch 1990).

U našim eksperimentima, gubitak funkcionalnih TLR4 je doveo do poboljšanja od 20% u gastrointestinalnom motilitetu u poređenju sa wild-type miševima kod kojih je izazvan ozbiljan gastrointestinalni stazis nakon implantacije TBX. Naši podaci snažno govore u prilog činjenice da DAMP oslobođeni oštećenjem tkiva direktno aktiviraju TLR4 signalne puteve domaćina. Nakon što se DAMP ligand veže za TLR4 kompleks (TLR4/CD14/LBP) signal se dalje prenosi putem MyD88 i TRIF molekula (Buchholz i

Bauer 2010). Pošto je MyD88 funkcionalni adaptorski protein za više TLR (TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 i TLR9) mi smo pokušali da odredimo ulogu TBX u aktivaciji MyD88 nizvodnih molekularnih događaja koristeći MyD88 KO miševe. Pokazali smo da genetska eliminacija MyD88 dovodi do poboljšanja od oko 30% u poređenju sa wild-type miševima. Pošto genetička eliminacija funkcije više TLR (putem eliminacije MyD88 signalinga) dalje poboljšava motilitet GIT, naši podaci sugerišu da DAMP poreklom iz TBX aktiviraju više različitih TLR koji doprinose razvoju stazisa. Naredni eksperimenti u kojima bi se koristile himere kosne srži u kombinaciji sa našim modelom bi mogli da daju bolji uvid u ovu problematiku, i eksperimenti specifično dizajnirani za istraživanje specifičnih mesta gde se TLR aktivacija odigrava nakon povrede su aktuelni i trenutno se radi na njima. Interesantno je i da upotreba modela hemoragijskog šoka i bilateralne frakture femura identifikovala TLR4 i TLR9 na ćelijama poreklom iz kosne srži kao i parenhimalnim ćelijama koje nisu poreklom iz kosne srži kao neophodan uslov za razvoj optimalnog inflamatornog odgovora i posledičnog oštećenja jetre (Mollen, Levy *i sar.* 2008; Gill, Ruan *i sar.* 2011).

Mi smo pokušali da odredimo zavisnost sistemskog inflamatornog odgovora na TLR4 aktivaciju. Kao što smo videli i u prethodnim studijama, bazalni nivo citokina u serumu TLR4 KO miševa je niži u odnosu na nivoe kod C57/B6 wild-type miševa (Buchholz, Chanthaphavong *i sar.* 2009). Prethodno predstavljeni rezultati pokazuju da subkutana implantacija sterilnog TBX izaziva snažan sistemski inflamatorni odgovor u wild-type miševima, kao i u TLR4 KO miševima 24 sata nakon implantacije. Interesantno je da je većina citokina u serumu TLR4KO miševa imala slične vrednosti kao i kod wild-type životinja, samo je IL-10 bio značajno suprimiran u TLR4 KO. Ovo najverovatnije reflektuje ublažavanje efekata TBX na domaćina što se ogleda u poboljšanju tranzita kroz GIT u TLR4 KO grupi. Zaista, nivo IL-10 u plazmi pacijenata predstavlja prediktivni faktor za konačni ishod pacijenata (Friedman, Jankowski *i sar.* 1997; Nast-Kolb, Waydhas *i sar.* 1997; Hawksworth, Stojadinovic *i sar.* 2009; Csontos, Foldi *i sar.* 2010). Eksudat iz rane (TBX fluid) je bio analiziran za određivanje razlike u nivoima citokina i hemokina 24 sata nakon TBX implantacije između C57/B6 i TLR4 KO miševa. Mi smo videli uvećanje u nivou IL-1 β i TNF- α u TLR4 KO miševima koji su bili implantirani sa C57/B6 u poređenju sa wild-type domaćinima u koje je bio

transplantiran singeni TBX. Zajedno ovi podaci sugerišu da smanjeni nivo IL-10 može da dovedo do nesprečene produkcije nekih medijatora inflamacije u samoj rani, TBX, u TLR4 KO miševima.

Dalje smo ispitali razvoj nove kliničke upotrebe ESWT da pokušamo da modulišemo odgovor domoćina na perifernu traumu. Naši podaci pokazuju da je izbor odgovarajućih udarnih zvučnih talasa, sa odgovarajućim EFD, brojem impulsa može da pokrene molekularne puteve koji će imati protektivni efekat. I zaista, još od 1980, ESWT je bila korišćena u ortopedске svrhe, lečenje rana i opekotina, protiv povrede krvnih sudova i ishemiji (Iannone, Moretti *i sar.* 2009). Kao što smo istakli, mehanizmi kojim ESWT deluje na organizam nisu jasno opisani, i ostaju nepoznanica. Mi smo ovim eksperimentima pokazali da akustička energija primenjena na abdomen ne izaziva strukturne i funkcionalne neželjene efekte na GIT, jetru, mokraćnu bešiku i gušteraču i time napravili korak dalje u potencijalnoj primeni terapije. Primena terapije takođe mora da bude veoma strogo kontrolisana jer smo u našim eksperimentima videli da primenjena na toraks, ESWT izaziva povredu pluća usled stvaranja velikih tenzionih sila na granici vazduha i tkiva. Kao što smo napomenuli, naši rezultati su pokazalali da ESWT pokreće molekularne puteve u organizmu koji imaju protektivni efekat protiv buduće sistemske inflamacije izazvane implantacijom TBX. Uprkos našim prethodnim rezultatima, u modelu ishemije kožnih režnjeva, kada smo pokazali da vreme primene terapije nije od krucijalne važnosti za uspešnost tretmana, u TBX modelu, vreme aplikacije je imalo odlučujuću ulogu pri čemu je pretretman efektivan, a terapija primenjena odmah nakon implantacije ili 4-24 sata nakon implantacije nema efekta. Razlozi za ovo možda leže u nivou oštećenja tkiva, razlici u mehanizmima imunskog sistema koji povreda pokreće i uopšte modelima. Kao što smo naveli u prethodnim eksperimentima, mi smo uvideli lokalne efekte koje ESWT ima i ukazali na sistemske efekte koje ESWT možda pokreće. I u ovim eksperimentima je pokazano da lokalno, u samom TBX tkivu, a mereno u fluidu sakupljenim iz TBX, ESWT smanjuje produkciju brojnih medijatora inflamacije. Posebno se mora istaći desetostruko smanjenje KC/GRO α , važnog hemoatraktanta za leukocite. Nasuprot tome, pretretman sa ESWT nije značajno uticao na bazalni nivo cirkulišućih citokina i hemokina u grupi koja je primila ESWT 48 sati pre sakupljanja uzoraka ali jeste delimično uticala na nivoe citokina u grupi koja je primila ESWT i TBX.

Prethodno je pokazano da ESWT blago deluje na nivo IL-10 (Zhou, Zhu *i sar.* 2008; Iannone, Moretti *i sar.* 2009) koji je onda mogao da dovede do smanjanja ostalih citokina i hemokina u TBX fluidu.

Sa tačke gledišta primenjivosti, EWST u našem modelu nije ispunila očekivanja. Da bi bila uspešno primenjena, tretman je morao da se primeni 24 sata pre implantacije TBX. Praktično, to bi značilo da bismo morali pacijente da tretiramo pre nego što se povrede, a to je neizvodljivo. Dalje istraživanje u cilju primenjivosti ESWT kao imunomodulatorske terapije su neophodna. Za sada, mi smo uspešno potvrdili hipotezu da ESWT moduliše sistemski inflamatorni odgovor i pokazali da je terapija bezbedna, da može da izazove pozitivne efekte na GIT i da restaurira njegov motilitet koji je značajno umanjen sistemskim inflamatornim odgovorom na implantirani TBX. Sa mehanističke tačke gledišta, ovim eksperimentima smo pokazali da ESWT moduliše sistemski (nivo u serumu) IL-10 odgovor, videli smo trend u višem nivou IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12 p70, IL-6 i TNF- α i koncentraciji KC/GRO α . Videli smo da pretretman sa ESWT 24 sata pre TBX implantacije značajno umanjuje produkciju posmatranih citokina i hemokina u samoj rani, IFN- γ , IL-10, IL-12 p70, IL-6, KC/GRO α i TNF- α .

5.4. ESWT modifikuje imunski odgovor i ima protektivni efekat protiv postoperativnog ileusa u mišijem modelu

POI je jatrogeno oboljenje koje se skoro obavezno javlja kao posledica abdominalnih hirurških intervencija. Iako nije smrtno, ovo oboljenje je uzročnik velikog broja komorbiditeta. Kao posledica nemogućnosti da vari i procesuje čvrstu hranu, javljaju se mučnina i povraćanje. Izdaci povezani sa postoperativnim ileusom su ogromni, premašuju cifru od 1.4 milijarde dolara (Goldstein 2007). Iz tog razloga neophodno je razviti univerzalno efikasnu i bezbednu terapiju. Do sada POI je tretiran sa nekoliko terapijskih modaliteta. Najznačajnija je laporaskopska hirurška tehnika koja je značajno umanjila procenat pacijenata koji razvijaju POI. Međutim, taj broj je i dalje visok i i dalje predstavlja teret za pacijente i minisarstva zdravlja (Delaney, Marcello *i*

sar. 2010). „Fast track protocol“, multimodalni pristup koji uključuje epiduralnu anesteziju, laporaskopsku hirurgiju i pretretman farmakološkim angensima je primenjen ali sa relativnim uspehom i skoro svi autori zaključuju da postoji potreba za boljim profilaktičkim tretmanom ili tretmanom nakon hirurške intervencije (Kehlet i Wilmore 2002; Feo, Lanzara i sar. 2009; Larson, Batdorf i sar. 2010; Moronczyk i Krasnodebski 2011). Mi smo u ovu svrhu koristili ESWT koja je uspešno bila primenjena u TBX modelu kao profilaktički tretman, i pokazala protektivne efekte protiv gastrointestinalnog stazisa izazvanog inflamatornim odgovorom na traumu. Cilj ovih eksperimenata bio je da utvrdimo da li ESWT pretretman ima pozitivne efekte na GIT i priprema životinje da bolje odgovore na buduću hiruršku intervenciju i negativne efekte koje manipulisanje tankim crevom ima na motilitet i razvoj postoperativnog ileusa.

Mi smo pokazali da ESWT ne izaziva negativne efekte na motilitet GIT i ne oštećuje strukture GIT kao i mikroarhitektoniku GIT. Histološki je pokazano da nema histoarhitektonskih promena na tkivima GIT što je značajno iz nekoliko razloga. Ovi podaci govore u prilog bezbednosti terapije na GIT i otvaranju „vrata“ za dalje testiranje ESWT na abdomenu. Naši podaci su prvi u literaturi koji prevazilaze ustručavanje koje se javlja među istraživačima kada je reč o baro-traumama na organima kao što su pluća ili GIT. Mi smo potvrdili da kada je primenjena na toraks, ESWT izaziva trenutne i teške povrede pa i smrt usled njih. Razlog za različitost u odgovoru tkiva, pluća u poređenju sa crevima možda leži i u tome što je procentualno veća količina vazduha u plućima, i okružena su kostima u poređenju sa mišićnim tkivom koje okružuje abdomen. Veća razlika između zvučne impedance kosti i vazduha, u poređenju sa razlikom u zvučnoj impedanci mišića i vazduha je potencijalno objašnjenje za ono što je pokazano nakon primene ESWT na toraks i abdomen. Kada je primenjena na zdravo tkivo, ESWT nema efekte na tranzit i infiltraciju leukocita u *tunica muscularis*. Međutim kada je ESWT prethodila hirurškoj manipulaciji tankim crevom, ona je pokazala značajan protektivni efekat na motilitet GIT. Ovaj efekat nije bio dovoljan da u potpunosti povрати motilitet u poređenju sa kontrolama, ali je bio značajno bolji u odnosu na sham tretirane životinje (SM_{24h}).

Nakon što smo pokazali da ESWT pretretman sprečava pojavu POI mi smo dizajnirali eksperimente u cilju objašnjenja mehanizama kojim ESWT ispoljava

protetivne efekte. POI je kao što je prethodno bilo opisano, posledica kompleksne mreže događaja koji se dešavaju na genskom, ćelijskom, lokalnom i sistemskom nivou (Bauer, Schwarz *i sar.* 2002; Bauer i Boeckxstaens 2004). Kao jedan od glavnih nosilaca negativnih efekata hirurške manipulacije na motilitet GIT je izdvojena inflamacija. Mreža rezidentnih makrofaga koja se javlja duž celog GIT postaje aktivirana fizičkim silama koje nastaju usled manipulisanja GIT i pokreće čitavu kaskadu inflamatornih događaja koji rezultuju u gastrointestinalnom stazisu. Kao posledica manipulacije, dolazi do oslobađanja NO, prostaglandina i povećane aktivnosti i ekspresije COX-2. Oni za posledicu imaju oslobađanje proinflamatornih citokina i hemokina koji u *tunica muscularis* privlače aktivirane leukocite koji povećavaju inflamatorni odgovor. Imunski sistem je evoluirao tako da je inflamacija striktno kontrolisana zbog njenog potencijala da ošteti tkiva, a uloga oba sistema je pokazana i u modelu postoperativnog ileusa: pro- (Hierholzer, Kalff *i sar.* 2001; Kalff, Turler *i sar.* 2003; Hierholzer, Kalff *i sar.* 2004; Wehner, Schwarz *i sar.* 2005; Moore, Albers *i sar.* 2007; Schmidt, Stoffels *i sar.* 2008) i anti-inflamatorni sistem (Moore, Otterbein *i sar.* 2003; Nakao, Moore *i sar.* 2003; Moore, Albers *i sar.* 2007; Stoffels, Schmidt *i sar.* 2009). Oba se pokreću istovremeno i njihov međusobni odnos određuje konačni ishod hirurške intervencije. Ukoliko je balans ova dva odgovora poremećen u korist proinflamatornih faktora, dolazi do sistemskog inflamatornog odgovora, koji može da rezultuje u daljem oštećenju udaljenih tkiva i organa, razvoju MOF sindroma i konačno smrti. Za ESWT je u mnogobrojnim publikacijama u literaturi pokazano da modifikuje inflamatorni odgovor u mnogobrojnim animalnim modelima (Antonic 2011; Mittermayr, Antonic *i sar.* 2012). Mi smo utvrdili efekte ESWT na svim nivoima inflamacije koja se javlja kao posledica hirurške intervencije na abdomenu. Ispitivanje ekspresije gena pokazalo je da pretretman sa ESWT pokreće ekspresiju gena za antiinflamatorni molekul IL-10 u *tunica muscularis*. U serumu, IL-10 ima značajno višu koncentraciju u pretretiranim životinjama u poređenju sa sham tretiranim (SM_{24h}) kontrolama. Ovi rezultati pokazuju da ESWT pretretman pokreće antiinflamatorne događaje unutar samog mišića kao i sistemske antiinflamatorne procese. IL-10 reguliše ekspresiju velikog broja gena putem JAK/STAT puta supresijom Ik kinaze, čija supresija dovodi do smanjene moći vezivanja za NF-κB [151] i posledično NF-κB zavisnih proinflamatornih gena. IL-10 takođe suprimira aktivnost makrofaga, čija

je uloga u razvoju POI dobro opisana [153, 154]. U eksperimentima sa genetički modifikovanim IL-10 KO životinjama, pokazano je značajno uvećanje inflamatornog odgovora na nivou ekspresije gena, serumskim nivoima citokina i hemokina, očuvanje kontraktilnosti cirkularnog mišića i normalnog motiliteta creva nakon egzogeno primenjenog IL-10 [150, 155]. IL-10 je pokazano smanjivao infiltraciju leukocita u pluća (Kobbe, Schmidt *i sar.* 2009) i *tunica muscularis* i posledični gastrointestinalni stazis (Friedman, Jankowski *i sar.* 1997; Stoffels, Schmidt *i sar.* 2009). U našim eksperimentima, indukcija ekspresije IL-10 na genskom i sistemskom nivou je pokazala bojenjem za MPO⁺ ćelije, u miševima da su to leukociti, i da ESWT suprimira njihovu infiltraciju u *tunica muscularis*. Smanjenje infiltracije leukocita dovodi i do smanjene produkcije proinflamatornih citokina u *tunica muscularis* od strane leukocita i posledično dovodi do smanjenja inflamatornog odgovora u *tunica muscularis* (Turler, Kalff *i sar.* 2006; Stoffels, Turler *i sar.* 2011). Dodatno, za IL-10 je pokazano da smanjuje aktivnost leukocita i monocita (Raisanen-Sokolowski, Glysing-Jensen *i sar.* 1998; Ocuin, Bamboat *i sar.* 2011). Potencijalno objašnjenje za povećanje ekspresije antinflatornih faktora je da ESWT pokreće veoma blagu inflamaciju u pretretiranim životinjama što je dokazano povećanjem ekspresije *egr-1* odmah nakon pretretmana, i ona opada sve do momenta kada životinje pretrpe manipulisanje tankim crevom, 80% svoje fiziološke vrednosti. To bi moglo da se protumači i kao supresija inflamacije u odgovoru na hiruršku intervenciju u poređenju pretretiranih i netretiranih operisanih grupa (ESWT_{24h}+SM_{24h} i SM_{24h}). Supresija inflamacije i postoperativnog ileusa je pokazana kako primenom farmakoloških agenasa tako i u modelima sa isključivanjem *egr-1* gena (Schmidt, Stoffels *i sar.* 2008; De Backer, Elinck *i sar.* 2009).

Cilj predstavljenog rada je bio da se utvrde ćelijski, molekularni i sistemski efekti ESWT u animalnim modelima. Naši rezultati sugerišu da ESWT ima blagotvorno dejstvo na organizam. Mi smo utvrdili da ona ne samo što pospešuje prokrvljenost kožnog reznja, dodatno povećava de novo formiranje krvnih sudova. Ovi rezultati imaju potencijalno veliku primenjivost obzirom da je nekroza tkiva u rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji izuzetno veliki problem. U istim eksperimentima smo uvideli potencijalni sistemski efekat koji ESWT ima na tkivima koja nisu bila direktno izložena udarnim zvučnim talasima i potvrdili to u eksperimentima sa transgenim VEGF-R2/luc miševima kada smo

pokazali da ESWT izaziva povećanje ekspresije u tretiranom, kao i u kontralateralnom udu. U literaturi su postojale indikacije o sistemskim efektima ESWT kroz povećanje koncentracije H₂O₂ i NO kod pacijenata koji su njome bili tretirani za razbijanje kamena u bubregu. Kao posledica ovih i naših rezultata sa transgenim miševima, mi smo hipotetisali da ESWT može da moduliše sistemski inflamatorni odgovor i dalje koristili dva animalna modela u kojima je inflamacija ključni proces, TBX i POI modeli. Mi smo potvrdili u ova dva animalna modela da ESWT ima imunomodulatorne efekte i pri tome pokazali potencijalno veliku primenjivost terapije udarnim zvučnim talasima u ljudi. Obzirom da ne postoji „pravi“ tretman za POI, velike količine novca se troše na pacijente koji imaju produženu hospitalizaciju usled ovog jatrogenog poremećaja. Mi smo potvrdom hipoteze o uticaju ESWT na inflamaciju putem promene koncentracije humoralnih faktora u sistemske cirkulaciji pokazali da putem povećanja koncentracije IL-10, pretretman sa ESWT eksprimira antiinflamatorne efekte i skraćuje trajanje gasatointestinalnog dismotiliteta. ESWT ima nekoliko prednosti u poređenju sa farmakološkim agensima zato što ona ima izuzetno povoljan odnos rizika (koji praktično ne postoji) i dobiti, pokreće one fiziološke procese koji su organizmu potrebni da se uspešno izbori sa negativnim uticajima, kao što su hipoksija ili prekomerna inflamacija i time ubrzano dovodi organizam do željenog cilja. Dalja istraživanja u ovoj oblasti su neophodna da bi se ESWT uspešno prenela sa animalnih modela na ljude.

6. Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji može se zaključiti da:

1. ESWT povećava perfuziju tkiva.
2. ESWT produžava preživljavanje reznjeva kože suprimiranjem formiranja edema, suprimiranjem nekroze tkiva i poboljšanjem prijanjanja reznja za recipijentno mesto.
3. ESWT indukuje *de novo* formiranje krvnih sudova, i povećava njihovu maturaciju.
4. ESWT ispoljava lokalne i sistemske efekte kroz povećanje ekspresije VEGF-R2 u tretiranom i netretiranom ekstremitetu zdravih životinja.
5. Uspešno smo dizajnirali i opisali model za izučavanje traumom izazvanog sistemskog inflamatornog odgovora i posledični uticaj na gastrointestinalni trakt i iskoristili ovaj model za utvrđivanje sistemskih efekata ESWT.
6. ESWT se bezbedno može primeniti na abdomen bez negativnog uticaja na gastrointestinalni trakt i njegov motilitet čime se otvaraju vrata za potencijalno nove indikacije ove terapije.
7. ESWT moduliše lokalni inflamatorni odgovor, produkciju citokina i hemokina u fluidu oštećenog tkiva u TBX modelu kao i u mišićnom sloju zida creva, *tunica muscularis*, i ostaje očuvana kontraktilnost cirkularnih mišića (*stratum circulare*) u animalnom modelu postoperativnog ileusa.
8. ESWT moduliše sistemski inflamatorni odgovor u TBX modelu i modelu postoperativnog ileusa koji se ogleda u promeni koncentracije nivoa citokina u serumu.

7. Literatura

Aicher, A., C. Heeschen, K.-i. Sasaki, C. Urbich, A. M. Zeiher i S. Dimmeler (2006). "Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia." *Circulation* 114(17145991): 2823-2830.

Aicher, A., C. Heeschen, K. Sasaki, C. Urbich, A. M. Zeiher i S. Dimmeler (2006). "Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia." *Circulation* 114(25): 2823-2830.

Antonic, V., Mittermayr, R., Schaden, W., Stojadinovic, A., (2011). "Evidence Supporting Extracorporeal Shockwave Therapy for Acute and Chronic Soft Tissue Wounds." *Wounds: a compendium of clinical research and practice* 23((7)): 204-215.

Barquist, E., B. Bonaz, V. Martinez, J. Rivier, M. J. Zinner i Y. Tache (1996). "Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats." *Am J Physiol* 270(4 Pt 2): R888-894.

Bauer, A. J. (1996). "Transplantation-induced injuries of the intestinal muscularis and its innervation: from preservation to chronic rejection." *Transplant Proc* 28(5): 2539-2541.

Bauer, A. J. i G. E. Boeckxstaens (2004). "Mechanisms of postoperative ileus." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 2: 54-60.

Bauer, A. J., M. G. Sarr i J. H. Szurszewski (1991). "Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum." *Gastroenterology* 101(4): 970-976.

Bauer, A. J., N. T. Schwarz, B. A. Moore, A. Turler i J. C. Kalff (2002). "Ileus in critical illness: mechanisms and management." *Curr Opin Crit Care* 8(2): 152-157.

Beltz, K., A. Christaras, A. Kovacevic, J. Schaper, H. Strelow i T. Niehues (2008). "A novel element in the management of chronic granulomatous disease (CGD)? - treatment of osteomyelitis with additional hyperbaric oxygen therapy (HBO)." *Klin Padiatr* 220(6): 380-383.

Benest, A. V., A. H. Salmon, W. Wang, C. P. Glover, J. Uney, S. J. Harper i D. O. Bates (2006). "VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes that

combine to enhance functional neovascularization in adult tissue." *Microcirculation* 13(6): 423-437.

Berta, L., A. Fazzari, A. M. Ficco, P. M. Enrica, M. G. Catalano i R. Frairia (2009). "Extracorporeal shock waves enhance normal fibroblast proliferation in vitro and activate mRNA expression for TGF-beta1 and for collagen types I and III." *Acta Orthop* 80(5): 612-617.

Bitto, A., M. Barone, A. David, F. Polito, D. Familiari, F. Monaco, M. Giardina, T. David, R. Messina, A. Noto, V. Di Stefano, D. Altavilla, A. Bonaiuto, L. Minutoli, S. Guarini, A. Ottani, F. Squadrito i F. S. Venuti (2010). "High mobility group box-1 expression correlates with poor outcome in lung injury patients." *Pharmacol Res* 61(2): 116-120.

Boeckxstaens, G. E., D. P. Hirsch, A. Kodde, T. M. Moojen, A. Blackshaw, G. N. Tytgat i P. J. Blommaert (1999). "Activation of an adrenergic and vagally-mediated NANC pathway in surgery-induced fundic relaxation in the rat." *Neurogastroenterol Motil* 11(6): 467-474.

Bohm, B., J. W. Milsom i V. W. Fazio (1995). "Postoperative intestinal motility following conventional and laparoscopic intestinal surgery." *Arch Surg* 130(4): 415-419.

Bonaz, B. i Y. Tache (1997). "Corticotropin-releasing factor and systemic capsaicin-sensitive afferents are involved in abdominal surgery-induced Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus." *Brain Res* 748(1-2): 12-20.

Bosch, G., M. de Mos, R. van Binsbergen, H. T. van Schie, C. H. van de Lest i P. R. van Weeren (2009). "The effect of focused extracorporeal shock wave therapy on collagen matrix and gene expression in normal tendons and ligaments." *Equine Vet J* 41(4): 335-341.

Bot, P. T., I. E. Hoefler, J. J. Piek i G. Pasterkamp (2008). "Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis." *Curr Med Chem* 15(8): 786-791.

Brañes, C., H. Contreras, P. Cabello, V. Antonic, L. Guiloff i M. Brañes (2012). "Rotator Cuff Responses to Extracorporeal Shockwave Therapy (ESWT): Morphological and Immunohistochemical Analysis." *Shoulder and Elbow* 4(3): 163-168.

Brett, D. W. (2006). "A review of moisture-control dressings in wound care." *J Wound Ostomy Continence Nurs* 33(6 Suppl): S3-8.

Buchholz, B. M. i A. J. Bauer (2010). "Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis." *Neurogastroenterol Motil* 22(3): 232-245.

Buchholz, B. M., T. R. Billiar i A. J. Bauer (2010). "Dominant role of the MyD88-dependent signaling pathway in mediating early endotoxin-induced murine ileus." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(2): G531-538.

Buchholz, B. M., R. S. Chanthaphavong i A. J. Bauer (2009). "Nonhemopoietic cell TLR4 signaling is critical in causing early lipopolysaccharide-induced ileus." *J Immunol* 183(10): 6744-6753.

Bueno, L., J. P. Ferre i Y. Ruckebusch (1978). "Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats." *Am J Dig Dis* 23(8): 690-695.

Bueno, L., J. Fioramonti i Y. Ruckebusch (1978). "Postoperative intestinal motility in dogs and sheep." *Am J Dig Dis* 23(8): 682-689.

Carcamo, J. J., A. E. Aliaga, R. E. Clavijo, M. R. Branes i M. M. Campos-Vallette (2012). "Raman study of the shockwave effect on collagens." *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 86: 360-365.

Cha, J. i V. Falanga (2007). "Stem cells in cutaneous wound healing." *Clin Dermatol* 25(1): 73-78.

Chao, Y. H., Y. H. Tsuang, J. S. Sun, L. T. Chen, Y. F. Chiang, C. C. Wang i M. H. Chen (2008). "Effects of shock waves on tenocyte proliferation and extracellular matrix metabolism." *Ultrasound Med Biol* 34(5): 841-852.

Chapman, M., R. Fraser, R. Vozzo, L. Bryant, W. Tam, N. Nguyen, B. Zacharakis, R. Butler, G. Davidson i M. Horowitz (2005). "Antro-pyloro-duodenal motor responses to gastric and duodenal nutrient in critically ill patients." *Gut* 54(10): 1384-1390.

Cheatham, M. L., W. C. Chapman, S. P. Key i J. L. Sawyers (1995). "A meta-analysis of selective versus routine nasogastric decompression after elective laparotomy." *Ann Surg* 221(5): 469-476; discussion 476-468.

Chen, Y. J., T. Wurtz, C. J. Wang, Y. R. Kuo, K. D. Yang, H. C. Huang i F. S. Wang (2004). "Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1

and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats." *J Orthop Res* 22(3): 526-534.

Ciampa, A. R., A. C. de Prati, E. Amelio, E. Cavalieri, T. Persichini, M. Colasanti, G. Musci, E. Marlinghaus, H. Suzuki i S. Mariotto (2005). "Nitric oxide mediates anti-inflammatory action of extracorporeal shock waves." *FEBS Lett* 579(30): 6839-6845.

Cicalese, L., K. Lee, W. Schraut, S. Watkins, A. Borle i R. Stanko (1996). "Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine." *Am J Surg* 171(1): 97-100; discussion 100-101.

Cicalese, L., C. Rastellini, A. S. Rao i R. T. Stanko (1996). "Pyruvate prevents mucosal reperfusion injury, oxygen free-radical production, and neutrophil infiltration after rat small bowel preservation and transplantation." *Transplant Proc* 28(5): 2611.

Collins, S. M., S. M. Hurst, C. Main, E. Stanley, I. Khan, P. Blennerhassett i M. Swain (1992). "Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release." *Ann N Y Acad Sci* 664: 415-424.

Corson, M. A., N. L. James, S. E. Latta, R. M. Nerem, B. C. Berk i D. G. Harrison (1996). "Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress." *Circ Res* 79(5): 984-991.

Csontos, C., V. Foldi, L. Palinkas, L. Bogar, E. Roth, G. Weber i J. Lantos (2010). "Time course of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in patients with burns--prognostic value of interleukin-10." *Burns* 36(4): 483-494.

Dag, A., T. Colak, O. Turkmenoglu, R. Gundogdu i S. Aydin (2011). "A randomized controlled trial evaluating early versus traditional oral feeding after colorectal surgery." *Clinics (Sao Paulo)* 66(12): 2001-2005.

Davies, P. F., J. Zilberberg i B. P. Helmke (2003). "Spatial microstimuli in endothelial mechanosignaling." *Circ Res* 92(4): 359-370.

Davis, R. E., J. H. Wachholz, D. Jassir, C. A. Perlyn i M. H. Agrama (1999). "Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats." *Arch Facial Plast Surg* 1(1): 27-32.

Davis, T. A., A. Stojadinovic, K. Anam, M. Amare, S. Naik, G. E. Peoples, D. Tadaki i E. A. Elster (2009). "Extracorporeal shock wave therapy suppresses the early

proinflammatory immune response to a severe cutaneous burn injury." *Int Wound J* 6(1): 11-21.

Davis, T. A., A. Stojadinovic, K. Anam, M. Amare, S. Naik, G. E. Peoples, D. Tadaki i E. A. Elster (2009). "Extracorporeal shock wave therapy suppresses the early proinflammatory immune response to a severe cutaneous burn injury." *Int Wound J* 6(19291111): 11-21.

De Backer, O., E. Elinck, E. Priem, L. Leybaert i R. A. Lefebvre (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation alleviates postoperative ileus in mice by inhibition of Egr-1 expression and its downstream target genes." *J Pharmacol Exp Ther* 331(2): 496-503.

de Jonge, W. J., R. M. van den Wijngaard, F. O. The, M. L. ter Beek, R. J. Bennink, G. N. Tytgat, R. M. Buijs, P. H. Reitsma, S. J. van Deventer i G. E. Boeckxstaens (2003). "Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice." *Gastroenterology* 125(4): 1137-1147.

De Winter, B. Y., P. Robberecht, G. E. Boeckxstaens, J. G. De Man, T. G. Moreels, A. G. Herman i P. A. Pelckmans (1998). "Role of VIP1/PACAP receptors in postoperative ileus in rats." *Br J Pharmacol* 124(6): 1181-1186.

Deitch, E. A. (1990). "The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure." *Arch Surg* 125(3): 403-404.

Delaney, C. P., P. W. Marcello, T. Sonoda, P. Wise, J. Bauer i L. Techner (2010). "Gastrointestinal recovery after laparoscopic colectomy: results of a prospective, observational, multicenter study." *Surg Endosc* 24(3): 653-661.

DeLisser, H. M., M. Christofidou-Solomidou, R. M. Strieter, M. D. Burdick, C. S. Robinson, R. S. Wexler, J. S. Kerr, C. Garlanda, J. R. Merwin, J. A. Madri i S. M. Albelda (1997). "Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis." *Am J Pathol* 151(3): 671-677.

Deloose, E., P. Janssen, I. Depoortere i J. Tack (2012). "The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(5): 271-285.

Dewar, D., F. A. Moore, E. E. Moore i Z. Balogh (2009). "Postinjury multiple organ failure." *Injury* 40(9): 912-918.

Dubois, F., P. Icard, G. Berthelot i H. Levard (1990). "Coelioscopic cholecystectomy. Preliminary report of 36 cases." *Ann Surg* 211(1): 60-62.

Eming, S. A., T. Krieg i J. M. Davidson (2007). "Gene therapy and wound healing." *Clin Dermatol* 25(1): 79-92.

Eskandari, M. K., J. C. Kalff, T. R. Billiar, K. K. Lee i A. J. Bauer (1997). "Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity." *Am J Physiol* 273(3 Pt 1): G727-734.

Falanga, V. (2005). "Wound healing and its impairment in the diabetic foot." *Lancet* 366(9498): 1736-1743.

Faussone-Pellegrini, M. S., D. Pantalone i C. Cortesini (1990). "Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon." *Acta Anat (Basel)* 139(1): 31-44.

Feo, C. V., S. Lanzara, D. Sortini, R. Ragazzi, M. De Pinto, G. C. Pansini i A. Liboni (2009). "Fast track postoperative management after elective colorectal surgery: a controlled trail." *Am Surg* 75(12): 1247-1251.

Ferreira, M. C., P. Tuma, Jr., V. F. Carvalho i F. Kamamoto (2006). "Complex wounds." *Clinics (Sao Paulo)* 61(6): 571-578.

Fitzgerald, J. E. i I. Ahmed (2009). "Systematic review and meta-analysis of chewing-gum therapy in the reduction of postoperative paralytic ileus following gastrointestinal surgery." *World J Surg* 33(12): 2557-2566.

Fleming, I., J. Bauersachs, B. Fisslthaler i R. Busse (1998). "Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress." *Circ Res* 82(6): 686-695.

Flohe, S. B., J. M. Bangen, S. Flohe, H. Agrawal, K. Bergmann i F. U. Schade (2007). "Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins." *Shock* 27(5): 494-502.

Friedman, G., S. Jankowski, A. Marchant, M. Goldman, R. J. Kahn i J. L. Vincent (1997). "Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock." *J Crit Care* 12(4): 183-187.

Fujiwara, K. (2006). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells." *J Intern Med* 259(4): 373-380.

Galeazzi, F., E. M. Haapala, N. van Rooijen, B. A. Vallance i S. M. Collins (2000). "Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(2): G259-265.

Galli, S. J., J. R. Gordon i B. K. Wershil (1991). "Cytokine production by mast cells and basophils." *Curr Opin Immunol* 3(6): 865-872.

Garcia-Caballero, M. i C. Vara-Thorbeck (1993). "The evolution of postoperative ileus after laparoscopic cholecystectomy. A comparative study with conventional cholecystectomy and sympathetic blockade treatment." *Surg Endosc* 7(5): 416-419.

Gentile, L. F., D. C. Nacionales, A. G. Cuenca, M. Armbruster, R. F. Ungaro, A. S. Abouhamze, C. Lopez, H. V. Baker, F. A. Moore, D. N. Ang i P. A. Efron (2013). "Identification and Description of a Novel Murine Model for Polytrauma and Shock." *Crit Care Med*.

Giacca, M. (2007). "Virus-mediated gene transfer to induce therapeutic angiogenesis: where do we stand?" *Int J Nanomedicine* 2(4): 527-540.

Gill, R., X. Ruan, C. L. Menzel, S. Namkoong, P. Loughran, D. J. Hackam i T. R. Billiar (2011). "Systemic inflammation and liver injury following hemorrhagic shock and peripheral tissue trauma involve functional TLR9 signaling on bone marrow-derived cells and parenchymal cells." *Shock* 35(2): 164-170.

Goldstein, J. L., Matuszewski K.A., Delaney C.P., Senagore A., Chiao E.F., Shah M., Meyer K., Bramley T., (2007). "Inpatient Economic Burden of Postoperative Ileus Associated with Abdominal Surgery in the United States." *P&T* 32((2)): 82-90.

Gotte, G., E. Amelio, S. Russo, E. Marlinghaus, G. Musci i H. Suzuki (2002). "Short-time non-enzymatic nitric oxide synthesis from L-arginine and hydrogen peroxide induced by shock waves treatment." *FEBS Lett* 520(1-3): 153-155.

Greene, A. K., M. Puder, R. Roy, D. Arsenault, S. Kwei, M. A. Moses i D. P. Orgill (2006). "Microdeformational wound therapy: effects on angiogenesis and matrix metalloproteinases in chronic wounds of 3 debilitated patients." *Ann Plast Surg* 56(4): 418-422.

Grunewald, M., I. Avraham, Y. Dor, E. Bachar-Lustig, A. Itin, S. Jung, S. Chimenti, L. Landsman, R. Abramovitch i E. Keshet (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." *Cell* 124(1): 175-189.

Gue, M., M. Alvinerie, J. L. Junien i L. Bueno (1989). "Stimulation of kappa opiate receptors in intestinal wall affects stress-induced increase of plasma cortisol in dogs." *Brain Res* 502(1): 143-148.

Gurunluoglu, R., R. Meirer, M. Shafighi, G. M. Huemer, B. Yilmaz i H. Pizakater (2005). "Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication." *Microsurgery* 25(5): 433-441.

Han-Geurts, I. J., W. C. Hop, N. F. Kok, A. Lim, K. J. Brouwer i J. Jeekel (2007). "Randomized clinical trial of the impact of early enteral feeding on postoperative ileus and recovery." *Br J Surg* 94(5): 555-561.

Harding, K. G., H. L. Morris i G. K. Patel (2002). "Science, medicine and the future: healing chronic wounds." *BMJ* 324(7330): 160-163.

Hawksworth, J. S., A. Stojadinovic, F. A. Gage, D. K. Tadaki, P. W. Perdue, J. Forsberg, T. A. Davis, J. R. Dunne, J. W. Denobile, T. S. Brown i E. A. Elster (2009). "Inflammatory biomarkers in combat wound healing." *Ann Surg* 250(6): 1002-1007.

Hierholzer, C., J. C. Kalff, T. R. Billiar, A. J. Bauer, D. J. Tweardy i B. G. Harbrecht (2004). "Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following hemorrhagic shock." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286(2): G225-233.

Hierholzer, C., J. C. Kalff, A. Chakraborty, S. C. Watkins, T. R. Billiar, A. J. Bauer i D. J. Tweardy (2001). "Impaired gut contractility following hemorrhagic shock is accompanied by IL-6 and G-CSF production and neutrophil infiltration." *Dig Dis Sci* 46(2): 230-241.

Hofmann, A., U. Ritz, M. H. Hessmann, M. Alini, P. M. Rommens i J. D. Rompe (2008). "Extracorporeal shock wave-mediated changes in proliferation, differentiation, and gene expression of human osteoblasts." *J Trauma* 65(6): 1402-1410.

Holte, K. i H. Kehlet (2000). "Postoperative ileus: a preventable event." *Br J Surg* 87(11): 1480-1493.

Holzer, P., I. T. Lippe i R. Amann (1992). "Participation of capsaicin-sensitive afferent neurons in gastric motor inhibition caused by laparotomy and intraperitoneal acid." *Neuroscience* 48(3): 715-722.

Huemer, G. M., R. Meirer, R. Gurunluoglu, F. S. Kamelger, K. M. Dunst, S. Wanner i H. Piza-Katzer (2005). "Comparison of the effectiveness of gene therapy with transforming growth factor-beta or extracorporeal shock wave therapy to reduce ischemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats." *Wound Repair Regen* 13(3): 262-268.

Huemer, G. M., M. Shafighi, R. Meirer, P. Debagge, H. Piza-Katzer i R. Gurunluoglu (2004). "Adenovirus-mediated transforming growth factor-beta ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model." *J Surg Res* 121(1): 101-107.

Iannone, F., B. Moretti, A. Notarnicola, L. Moretti, S. Patella, V. Patella i G. Lapadula (2009). "Extracorporeal shock waves increase interleukin-10 expression by human osteoarthritic and healthy osteoblasts in vitro." *Clin Exp Rheumatol* 27(5): 794-799.

Ikeda, Y., N. Fukuda, M. Wada, T. Matsumoto, A. Satomi, S. Yokoyama, S. Saito, K. Matsumoto, K. Kanmatsuse i H. Mugishima (2004). "Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene." *Hypertens Res* 27(2): 119-128.

Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov i P. W. Noble (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." *Nat Med* 11(11): 1173-1179.

Johnson, S. (2003). "Low-frequency ultrasound to manage chronic venous leg ulcers." *Br J Nurs* 12(19 Suppl): S14-24.

Kabelitz, D. (2007). "Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes." *Curr Opin Immunol* 19(1): 39-45.

Kaczorowski, D. J., K. P. Mollen, R. Edmonds i T. R. Billiar (2008). "Early events in the recognition of danger signals after tissue injury." *J Leukoc Biol* 83(3): 546-552.

Kaczorowski, D. J., A. Nakao, R. Vallabhaneni, K. P. Mollen, R. Sugimoto, J. Kohmoto, B. S. Zuckerbraun, K. R. McCurry i T. R. Billiar (2009). "Mechanisms of Toll-

like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart." *Transplantation* 87(10): 1455-1463.

Kaczorowski, D. J., A. Tsung i T. R. Billiar (2009). "Innate immune mechanisms in ischemia/reperfusion." *Front Biosci (Elite Ed)* 1: 91-98.

Kagan, B. L., T. Ganz i R. I. Lehrer (1994). "Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides." *Toxicology* 87(1-3): 131-149.

Kalff, J. C., B. M. Buchholz, M. K. Eskandari, C. Hierholzer, W. H. Schraut, R. L. Simmons i A. J. Bauer (1999). "Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat." *Surgery* 126(3): 498-509.

Kalff, J. C., T. M. Carlos, W. H. Schraut, T. R. Billiar, R. L. Simmons i A. J. Bauer (1999). "Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus." *Gastroenterology* 117(2): 378-387.

Kalff, J. C., W. H. Schraut, T. R. Billiar, R. L. Simmons i A. J. Bauer (2000). "Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents." *Gastroenterology* 118(2): 316-327.

Kalff, J. C., W. H. Schraut, R. L. Simmons i A. J. Bauer (1998). "Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus." *Ann Surg* 228(5): 652-663.

Kalff, J. C., A. Turler, N. T. Schwarz, W. H. Schraut, K. K. Lee, D. J. Tweardy, T. R. Billiar, R. L. Simmons i A. J. Bauer (2003). "Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy." *Ann Surg* 237(3): 301-315.

Keel, M. i O. Trentz (2005). "Pathophysiology of polytrauma." *Injury* 36(6): 691-709.

Kehlet, H. i D. W. Wilmore (2002). "Multimodal strategies to improve surgical outcome." *Am J Surg* 183(6): 630-641.

Kitamura, Y., S. Go i K. Hatanaka (1978). "Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation." *Blood* 52(2): 447-452.

Knight, K. R. (1994). "Review of postoperative pharmacological infusions in ischemic skin flaps." *Microsurgery* 15(10): 675-684.

Knight, K. R., H. Kawabata, S. A. Coe, J. A. Angus, B. M. O'Brien i K. Sakai (1991). "Prostacyclin and prostanoid modifiers aid ischemic skin flap survival." *J Surg Res* 50(2): 119-123.

Kobbe, P., J. Schmidt, B. Stoffels, R. S. Chanthaphavong, A. J. Bauer i H. C. Pape (2009). "IL-10 administration attenuates pulmonary neutrophil infiltration and alters pulmonary iNOS activation following hemorrhagic shock." *Inflamm Res* 58(3): 170-174.

Komorowska-Timek, E., L. Newlin, F. Zhang, T. Dogan, W. C. Lineaweaver i H. J. Buncke (1999). "Shortening of rat teeth prevents autocannibalization of surgical flaps." *J Reconstr Microsurg* 15(4): 303-306.

Kontoyiannis, D., A. Kotlyarov, E. Carballo, L. Alexopoulou, P. J. Blakeshear, M. Gaestel, R. Davis, R. Flavell i G. Kollias (2001). "Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology." *EMBO J* 20(14): 3760-3770.

Korompilias, A. V., L. E. Chen, A. V. Seaber i J. R. Urbaniak (1996). "Actions of glucocorticosteroids on ischemic-reperfused muscle and cutaneous tissue." *Microsurgery* 17(9): 495-502.

Korpisalo, P., H. Karvinen, T. T. Rissanen, J. Kilpijoki, V. Marjomaki, P. Baluk, D. M. McDonald, Y. Cao, U. Eriksson, K. Alitalo i S. Yla-Herttuala (2008). "Vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B combination gene therapy prolongs angiogenic effects via recruitment of interstitial mononuclear cells and paracrine effects rather than improved pericyte coverage of angiogenic vessels." *Circ Res* 103(10): 1092-1099.

Kreiss, C., L. A. Birder, S. Kiss, M. M. VanBibber i A. J. Bauer (2003). "COX-2 dependent inflammation increases spinal Fos expression during rodent postoperative ileus." *Gut* 52(4): 527-534.

Krokowicz, L., A. Klimczak, J. Cwykiel, M. Mielniczuk, C. Grykien i M. Siemionow (2012). "Pulsed acoustic cellular expression as a protective therapy against I/R injury in a cremaster muscle flap model." *Microvasc Res* 83(2): 213-222.

Krzyzaniak, M., G. Cheadle, C. Peterson, W. Loomis, J. Putnam, P. Wolf, A. Baird, B. Eliceiri, V. Bansal i R. Coimbra (2011). "Burn-induced acute lung injury requires a functional Toll-like receptor 4." *Shock* 36(1): 24-29.

Kubes, P. i S. Kanwar (1994). "Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event." *J Immunol* 152(7): 3570-3577.

Kubo, M., T. S. Li, T. Kamota, M. Ohshima, B. Shirasawa i K. Hamano (2010). "Extracorporeal shock wave therapy ameliorates secondary lymphedema by promoting lymphangiogenesis." *J Vasc Surg* 52(2): 429-434.

Kuo, Y.-R., C.-T. Wang, F.-S. Wang, Y.-C. Chiang i C.-J. Wang (2009). "Extracorporeal shock-wave therapy enhanced wound healing via increasing topical blood perfusion and tissue regeneration in a rat model of STZ-induced diabetes." *Wound Repair Regen* 17(19614917): 522-530.

Kuo, Y. R., C. T. Wang, F. S. Wang, Y. C. Chiang i C. J. Wang (2009). "Extracorporeal shock-wave therapy enhanced wound healing via increasing topical blood perfusion and tissue regeneration in a rat model of STZ-induced diabetes." *Wound Repair Regen* 17(4): 522-530.

Kuo, Y. R., C. T. Wang, F. S. Wang, K. D. Yang, Y. C. Chiang i C. J. Wang (2009). "Extracorporeal shock wave treatment modulates skin fibroblast recruitment and leukocyte infiltration for enhancing extended skin-flap survival." *Wound Repair Regen* 17(1): 80-87.

Kuo, Y. R., W. S. Wu, Y. L. Hsieh, F. S. Wang, C. T. Wang, Y. C. Chiang i C. J. Wang (2007). "Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation." *J Surg Res* 143(2): 385-392.

Larson, D. W., N. J. Batdorf, J. G. Touzios, R. R. Cima, H. K. Chua, J. H. Pemberton i E. J. Dozois (2010). "A fast-track recovery protocol improves outcomes in elective laparoscopic colectomy for diverticulitis." *J Am Coll Surg* 211(4): 485-489.

Lee, S. H., P. L. Wolf, R. Escudero, R. Deutsch, S. W. Jamieson i P. A. Thistlethwaite (2000). "Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction." *N Engl J Med* 342(9): 626-633.

Levy, R. M., J. M. Prince, R. Yang, K. P. Mollen, H. Liao, G. A. Watson, M. P. Fink, Y. Vodovotz i T. R. Billiar (2006). "Systemic inflammation and remote organ damage following bilateral femur fracture requires Toll-like receptor 4." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(4): R970-976.

Livingston, E. H. i E. P. Passaro, Jr. (1990). "Postoperative ileus." *Dig Dis Sci* 35(1): 121-132.

Luckey, A., E. Livingston i Y. Tache (2003). "Mechanisms and treatment of postoperative ileus." *Arch Surg* 138(2): 206-214.

Ludwig, K. A., C. T. Frantzides, M. A. Carlson i K. L. Grade (1993). "Myoelectric motility patterns following open versus laparoscopic cholecystectomy." *J Laparoendosc Surg* 3(5): 461-466.

Ma, H. Z., B. F. Zeng i X. L. Li (2007). "Upregulation of VEGF in subchondral bone of necrotic femoral heads in rabbits with use of extracorporeal shock waves." *Calcif Tissue Int* 81(2): 124-131.

Mariotto, S., E. Cavalieri, E. Amelio, A. R. Ciampa, A. C. de Prati, E. Marlinghaus, S. Russo i H. Suzuki (2005). "Extracorporeal shock waves: from lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production." *Nitric Oxide* 12(2): 89-96.

Mariotto, S., E. Cavalieri, E. Amelio, A. R. Ciampa, A. C. de Prati, E. Marlinghaus, S. Russo i H. Suzuki (2005). "Extracorporeal shock waves: from lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production." *Nitric Oxide* 12(15740982): 89-96.

Marshall, J. C., N. V. Christou i J. L. Meakins (1993). "The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure." *Ann Surg* 218(2): 111-119.

McKee, C. M., C. J. Lowenstein, M. R. Horton, J. Wu, C. Bao, B. Y. Chin, A. M. Choi i P. W. Noble (1997). "Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism." *J Biol Chem* 272(12): 8013-8018.

Meirer, R., A. Brunner, M. Deibl, M. Oehlbauer, H. Piza-Katzer i F. S. Kamelger (2007). "Shock wave therapy reduces necrotic flap zones and induces VEGF expression in animal epigastric skin flap model." *J Reconstr Microsurg* 23(17530616): 231-236.

Meirer, R., F. S. Kamelger, G. M. Huemer, S. Wanner i H. Piza-Katzer (2005). "Extracorporeal shock wave may enhance skin flap survival in an animal model." *Br J Plast Surg* 58(1): 53-57.

Michlits, W., R. Mittermayr, R. Schafer, H. Redl i S. Aharinejad (2007). "Fibrin-embedded administration of VEGF plasmid enhances skin flap survival." *Wound Repair Regen* 15(3): 360-367.

Michlits, W., R. Mittermayr, R. Schafer, H. Redl i S. Aharinejad (2007). "Fibrin-embedded administration of VEGF plasmid enhances skin flap survival." *Wound Repair Regen* 15(17537123): 360-367.

Mikkelsen, H. B. (1995). "Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines." *Histol Histopathol* 10(3): 719-736.

Miller, M. S., J. J. Galligan i T. F. Burks (1981). "Accurate measurement of intestinal transit in the rat." *J Pharmacol Methods* 6(3): 211-217.

Mittermayr, R., V. Antonic, J. Hartinger, H. Kaufmann, H. Redl, L. Teot, A. Stojadinovic i W. Schaden (2012). "Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: Technology, mechanisms, and clinical efficacy." *Wound Repair Regen* 20(4): 456-465.

Mittermayr, R., J. Hartinger, V. Antonic, A. Meinel, S. Pfeifer, A. Stojadinovic, W. Schaden i H. Redl (2011). "Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) minimizes ischemic tissue necrosis irrespective of application time and promotes tissue revascularization by stimulating angiogenesis." *Ann Surg* 253(5): 1024-1032.

Mittermayr, R., T. Morton, M. Hofmann, S. Helgerson, M. van Griensven i H. Redl (2008). "Sustained (rh)VEGF(165) release from a sprayed fibrin biomatrix induces angiogenesis, up-regulation of endogenous VEGF-R2, and reduces ischemic flap necrosis." *Wound Repair Regen* 16(4): 542-550.

Mittermayr, R., T. Morton, M. Hofmann, S. Helgerson, M. van Griensven i H. Redl (2008). "Sustained (rh)VEGF(165) release from a sprayed fibrin biomatrix induces angiogenesis, up-regulation of endogenous VEGF-R2, and reduces ischemic flap necrosis." *Wound Repair Regen* 16(18494746): 542-550.

Mollen, K. P., R. M. Levy, J. M. Prince, R. A. Hoffman, M. J. Scott, D. J. Kaczorowski, R. Vallabhaneni, Y. Vodovotz i T. R. Billiar (2008). "Systemic inflammation and end organ damage following trauma involves functional TLR4 signaling in both bone marrow-derived cells and parenchymal cells." *J Leukoc Biol* 83(1): 80-88.

Moncada, S., R. M. Palmer i E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43(2): 109-142.

Moore, B. A., K. M. Albers, B. M. Davis, J. R. Grandis, S. Togel i A. J. Bauer (2007). "Altered inflammatory gene expression underlies increased susceptibility to murine postoperative ileus with advancing age." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(6): G1650-1659.

Moore, B. A., L. E. Otterbein, A. Turler, A. M. Choi i A. J. Bauer (2003). "Inhaled carbon monoxide suppresses the development of postoperative ileus in the murine small intestine." *Gastroenterology* 124(2): 377-391.

Moore, B. A., M. Overhaus, J. Whitcomb, E. Ifedigbo, A. M. Choi, L. E. Otterbein i A. J. Bauer (2005). "Brief inhalation of low-dose carbon monoxide protects rodents and swine from postoperative ileus." *Crit Care Med* 33(6): 1317-1326.

Moore, K. W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira i T. R. Mosmann (1993). "Interleukin-10." *Annu Rev Immunol* 11: 165-190.

Moronczyk, D. A. i I. W. Krasnodebski (2011). "Implementation of the fast track surgery in patients undergoing the colonic resection: own experience." *Pol Przegl Chir* 83(9): 482-487.

Muhs, B. E., P. J. Gagne, T. Maldonado i P. Sheehan (2006). "Minimally invasive revascularization strategies for chronic lower limb ischemia." *Int J Low Extrem Wounds* 5(1): 35-39.

Murphy, T. J., H. M. Paterson, J. A. Mannick i J. A. Lederer (2004). "Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses." *J Leukoc Biol* 75(3): 400-407.

Murray, P. J. (2006). "Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response." *Curr Opin Pharmacol* 6(4): 379-386.

Nakao, A., K. Kimizuka, D. B. Stolz, J. Seda Neto, T. Kaizu, A. M. Choi, T. Uchiyama, B. S. Zuckerbraun, A. J. Bauer, M. A. Nalesnik, L. E. Otterbein, D. A. Geller i N. Murase (2003). "Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts." *Surgery* 134(2): 285-292.

Nakao, A., B. A. Moore, N. Murase, F. Liu, B. S. Zuckerbraun, F. H. Bach, A. M. Choi, M. A. Nalesnik, L. E. Otterbein i A. J. Bauer (2003). "Immunomodulatory effects of inhaled carbon monoxide on rat syngeneic small bowel graft motility." *Gut* 52(9): 1278-1285.

Nast-Kolb, D., C. Waydhas, C. Gippner-Steppert, I. Schneider, A. Trupka, S. Ruchholtz, R. Zettl, L. Schweiberer i M. Jochum (1997). "Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries." *J Trauma* 42(3): 446-454; discussion 454-445.

Nishida, T., H. Shimokawa, K. Oi, H. Tatewaki, T. Uwatoku, K. Abe, Y. Matsumoto, N. Kajihara, M. Eto, T. Matsuda, H. Yasui, A. Takeshita i K. Sunagawa (2004). "Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo." *Circulation* 110(15520304): 3055-3061.

Noble, E. J., R. Harris, K. B. Hosie, S. Thomas i S. J. Lewis (2009). "Gum chewing reduces postoperative ileus? A systematic review and meta-analysis." *Int J Surg* 7(2): 100-105.

Ocuin, L. M., Z. M. Bamboat, V. P. Balachandran, M. J. Cavnar, H. Obaid, G. Plitas i R. P. DeMatteo (2011). "Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis." *J Leukoc Biol* 89(3): 423-432.

Ogden, J. A., A. Toth-Kischkat i R. Schultheiss (2001). "Principles of shock wave therapy." *Clin Orthop Relat Res*(387): 8-17.

Oi, K., Y. Fukumoto, K. Ito, T. Uwatoku, K. Abe, T. Hizume i H. Shimokawa (2008). "Extracorporeal shock wave therapy ameliorates hindlimb ischemia in rabbits." *Tohoku J Exp Med* 214(2): 151-158.

Okan, D., K. Woo, E. A. Ayello i G. Sibbald (2007). "The role of moisture balance in wound healing." *Adv Skin Wound Care* 20(1): 39-53; quiz 53-35.

Ottomann, C., B. Hartmann, J. Tyler, H. Maier, R. Thiele, W. Schaden i A. Stojadinovic (2010). "Prospective randomized trial of accelerated re-epithelization of skin graft donor sites using extracorporeal shock wave therapy." *J Am Coll Surg* 211(3): 361-367.

Ottomann, C., A. Stojadinovic, P. T. Lavin, F. H. Gannon, M. H. Heggeness, R. Thiele, W. Schaden i B. Hartmann (2012). "Prospective randomized phase II Trial of accelerated reepithelialization of superficial second-degree burn wounds using extracorporeal shock wave therapy." *Ann Surg* 255(1): 23-29.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.

Plourde, V., H. C. Wong, J. H. Walsh, H. E. Raybould i Y. Tache (1993). "CGRP antagonists and capsaicin on celiac ganglia partly prevent postoperative gastric ileus." *Peptides* 14(6): 1225-1229.

Prince, L. R., M. K. Whyte, I. Sabroe i L. C. Parker (2011). "The role of TLRs in neutrophil activation." *Curr Opin Pharmacol* 11(4): 397-403.

Qi, Z., A. Hiura, N. Nakagawa, M. Koga, G. Yanai, S. Sumi i K. Inoue (2006). "Oral administration of nicorandil enhances the survival of ischemic skin flaps in rats." *Eur J Pharmacol* 550(1-3): 127-133.

Radu, C. A., J. Kiefer, D. Horn, M. Rebel, E. Koellensperger, M. M. Gebhard, H. Ryssel, G. Germann i M. A. Reichenberger (2011). "Shock wave treatment in composite tissue allotransplantation." *Eplasty* 11: e37.

Raisanen-Sokolowski, A., T. Glysing-Jensen i M. E. Russell (1998). "Leukocyte-suppressing influences of interleukin (IL)-10 in cardiac allografts: insights from IL-10 knockout mice." *Am J Pathol* 153(5): 1491-1500.

Ramundo, J. i M. Gray (2008). "Enzymatic wound debridement." *J Wound Ostomy Continence Nurs* 35(3): 273-280.

Reed, M. J. i J. M. Edelberg (2004). "Impaired angiogenesis in the aged." *Sci Aging Knowledge Environ* 2004(7): pe7.

Reichenberger, M. A., G. Germann, H. J. Roth, R. Meirer i H. Engel (2009). "Preoperative shock wave therapy reduces ischemic necrosis in an epigastric skin flap model." *Ann Plast Surg* 63(19816153): 682-684.

Rennick, D. M. i M. M. Fort (2000). "Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-) mice and intestinal inflammation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(6): G829-833.

Richter, H. M., 3rd i K. A. Kelly (1986). "Effect of transection and pacing on human jejunal pacesetter potentials." *Gastroenterology* 91(6): 1380-1385.

Rigatti, P., F. Montorsi, G. Guazzoni i M. Maffezzini (1989). "Extracorporeal shock wave lithotripsy: first choice therapy for ureteral stones." *Scand J Urol Nephrol* 23(1): 67-69.

Rinsch, C., P. Quinodoz, B. Pittet, N. Alizadeh, D. Baetens, D. Montandon, P. Aebischer i M. S. Pepper (2001). "Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated

genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia." *Gene Ther* 8(7): 523-533.

Rockey, D. C., J. J. Chung, C. M. McKee i P. W. Noble (1998). "Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments." *Hepatology* 27(1): 86-92.

Sadoun, E. i M. J. Reed (2003). "Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression." *J Histochem Cytochem* 51(9): 1119-1130.

Sagar, P. M., G. Kruegener i J. MacFie (1992). "Nasogastric intubation and elective abdominal surgery." *Br J Surg* 79(11): 1127-1131.

Sarna, S. K. (1985). "Cyclic motor activity; migrating motor complex: 1985." *Gastroenterology* 89(4): 894-913.

Saxena, V., C. W. Hwang, S. Huang, Q. Eichbaum, D. Ingber i D. P. Orgill (2004). "Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation." *Plast Reconstr Surg* 114(5): 1086-1096; discussion 1097-1088.

Schaden, W., R. Thiele, C. Kolpl, M. Pusch, A. Nissan, C. E. Attinger, M. E. Maniscalco-Theberge, G. E. Peoples, E. A. Elster i A. Stojadinovic (2007). "Shock wave therapy for acute and chronic soft tissue wounds: a feasibility study." *J Surg Res* 143(17904157): 1-12.

Schippers, E., A. P. Ottinger, M. Anurov, M. Polivoda i V. Schumpelick (1993). "Laparoscopic cholecystectomy: a minor abdominal trauma?" *World J Surg* 17(4): 539-542; discussion 543.

Schmidt, J., B. Stoffels, B. A. Moore, R. S. Chanthaphavong, A. R. Mazie, B. M. Buchholz i A. J. Bauer (2008). "Proinflammatory role of leukocyte-derived Egr-1 in the development of murine postoperative ileus." *Gastroenterology* 135(3): 926-936, 936 e921-922.

Schmidt, J., B. Stoffels, A. Nazir, D. L. Dehaven-Hudkins i A. J. Bauer (2008). "Alvimopan and COX-2 inhibition reverse opioid and inflammatory components of postoperative ileus." *Neurogastroenterol Motil* 20(6): 689-699.

Schottelius, A. J., M. W. Mayo, R. B. Sartor i A. S. Baldwin, Jr. (1999). "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding." *J Biol Chem* 274(45): 31868-31874.

Schultz, G. S., D. J. Barillo, D. W. Mazingo i G. A. Chin (2004). "Wound bed preparation and a brief history of TIME." *Int Wound J* 1(1): 19-32.

Schultz, G. S., R. G. Sibbald, V. Falanga, E. A. Ayello, C. Dowsett, K. Harding, M. Romanelli, M. C. Stacey, L. Teot i W. Vanscheidt (2003). "Wound bed preparation: a systematic approach to wound management." *Wound Repair Regen* 11 Suppl 1: S1-28.

Schwarz, N. T., D. Beer-Stolz, R. L. Simmons i A. J. Bauer (2002). "Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis." *Ann Surg* 235(1): 31-40.

Schwarz, N. T., J. C. Kalff, A. Turler, B. M. Engel, S. C. Watkins, T. R. Billiar i A. J. Bauer (2001). "Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus." *Gastroenterology* 121(6): 1354-1371.

Schwenk, W., B. Bohm, O. Haase, T. Junghans i J. M. Muller (1998). "Laparoscopic versus conventional colorectal resection: a prospective randomised study of postoperative ileus and early postoperative feeding." *Langenbecks Arch Surg* 383(1): 49-55.

Seok, J., H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. Lopez, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao i R. G. Tompkins (2013). "Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9): 3507-3512.

Shalom, A., T. Friedman i M. Westreich (2008). "Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats." *Dermatol Surg* 34(6): 785-790; discussion 790.

Sheibani, K., F. V. Lucas, R. R. Tubbs, R. A. Savage i G. A. Hoeltge (1981). "Alternate chromogens as substitutes for benzidine for myeloperoxidase cytochemistry." *Am J Clin Pathol* 75(3): 367-370.

Smith, R. G. (2008). "Enzymatic debriding agents: an evaluation of the medical literature." *Ostomy Wound Manage* 54(8): 16-34.

Soeters, P. B., M. D. Luyer, J. W. Greve i W. A. Buurman (2007). "The significance of bowel permeability." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(5): 632-638.

Stapleton, R. D., N. Jones i D. K. Heyland (2007). "Feeding critically ill patients: what is the optimal amount of energy?" *Crit Care Med* 35(9 Suppl): S535-540.

Stephen-Haynes, J. i G. Thompson (2007). "The different methods of wound debridement." *Br J Community Nurs* 12(6): S6, S8-10, S12-14, S16.

Stewart, B. T., R. J. Woods, B. T. Collopy, R. J. Fink, J. R. Mackay i J. O. Keck (1998). "Early feeding after elective open colorectal resections: a prospective randomized trial." *Aust N Z J Surg* 68(2): 125-128.

Stoffels, B., J. Schmidt, A. Nakao, A. Nazir, R. S. Chanthaphavong i A. J. Bauer (2009). "Role of interleukin 10 in murine postoperative ileus." *Gut* 58(5): 648-660.

Stoffels, B., A. Turler, J. Schmidt, A. Nazir, T. Tsukamoto, B. A. Moore, C. Schnurr, J. C. Kalff i A. J. Bauer (2011). "Anti-inflammatory role of glycine in reducing rodent postoperative inflammatory ileus." *Neurogastroenterol Motil* 23(1): 76-87, e78.

Stojadinovic, A., J. W. Carlson, G. S. Schultz, T. A. Davis i E. A. Elster (2008). "Topical advances in wound care." *Gynecol Oncol* 111(2 Suppl): S70-80.

Stojadinovic, A., E. A. Elster, K. Anam, D. Tadaki, M. Amare, S. Zins i T. A. Davis (2008). "Angiogenic response to extracorporeal shock wave treatment in murine skin isografts." *Angiogenesis* 11(4): 369-380.

Stojadinovic, A., E. A. Elster, K. Anam, D. Tadaki, M. Amare, S. Zins i T. A. Davis (2008). "Angiogenic response to extracorporeal shock wave treatment in murine skin isografts." *Angiogenesis* 11(18998221): 369-380.

Tasoulis, M. K., O. Livaditi, M. Stamatakos, C. Stefanaki, P. Paneris, P. Prigouris, A. Flevari, N. Goutas, D. Vlachodimitropoulos, V. Villiotou i E. E. Douzinas (2009). "High concentrations of reactive oxygen species in the BAL fluid are correlated

with lung injury in rabbits after hemorrhagic shock and resuscitation." *Tohoku J Exp Med* 219(3): 193-199.

Thackham, J. A., D. L. McElwain i R. J. Long (2008). "The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review." *Wound Repair Regen* 16(3): 321-330.

Tsukamoto, T., V. Antonic, H. El, II, A. Stojadinovic, D. G. Binion, M. J. Izadjoo, H. Yokota, H. C. Pape i A. J. Bauer (2011). "Novel model of peripheral tissue trauma-induced inflammation and gastrointestinal dysmotility." *Neurogastroenterol Motil* 23(4): 379-386, e164.

Tsukamoto, T. i H. C. Pape (2009). "Animal models for trauma research: what are the options?" *Shock* 31(1): 3-10.

Tugcu, V., M. Bas, E. Ozbek, E. Kemahli, Y. V. Arinci, M. Tuhri, T. Altug i A. I. Tasci (2008). "Pyrolidinium dithiocarbamate prevents shockwave lithotripsy-induced renal injury through inhibition of nuclear factor-kappa B and inducible nitric oxide synthase activity in rats." *J Endourol* 22(3): 559-566.

Turler, A., J. C. Kalff, B. A. Moore, R. A. Hoffman, T. R. Billiar, R. L. Simmons i A. J. Bauer (2006). "Leukocyte-derived inducible nitric oxide synthase mediates murine postoperative ileus." *Ann Surg* 244(2): 220-229.

Ubbink, D. T., S. J. Westerbos, E. A. Nelson i H. Vermeulen (2008). "A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds." *Br J Surg* 95(6): 685-692.

Vermeulen, H., M. N. Storm-Versloot, O. R. Busch i D. T. Ubbink (2006). "Nasogastric intubation after abdominal surgery: a meta-analysis of recent literature." *Arch Surg* 141(3): 307-314.

Vetrano, M., F. d'Alessandro, M. R. Torrisi, A. Ferretti, M. C. Vulpiani i V. Visco (2011). "Extracorporeal shock wave therapy promotes cell proliferation and collagen synthesis of primary cultured human tenocytes." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19(12): 2159-2168.

Vig, S. (2008). "A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds (*Br J Surg* 2008; 95: 685-692)." *Br J Surg* 95(9): 1185-1186; author reply 1186.

Wang, C. J. (2003). "An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders." *Chang Gung Med J* 26(4): 220-232.

Wang, C. J., Y. R. Kuo, R. W. Wu, R. T. Liu, C. S. Hsu, F. S. Wang i K. D. Yang (2009). "Extracorporeal shockwave treatment for chronic diabetic foot ulcers." *J Surg Res* 152(1): 96-103.

Wang, F. S., C. J. Wang, Y. J. Chen, P. R. Chang, Y. T. Huang, Y. C. Sun, H. C. Huang, Y. J. Yang i K. D. Yang (2004). "Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts." *J Biol Chem* 279(11): 10331-10337.

Wang, L., L. Qin, H. B. Lu, W. H. Cheung, H. Yang, W. N. Wong, K. M. Chan i K. S. Leung (2008). "Extracorporeal shock wave therapy in treatment of delayed bone-tendon healing." *Am J Sports Med* 36(2): 340-347.

Wang, P., Z. F. Ba, A. Biondo i I. Chaudry (1996). "Liver endothelial cell dysfunction occurs early following hemorrhagic shock and persists despite crystalloid resuscitation." *J Surg Res* 63(1): 241-247.

Wehner, S., N. T. Schwarz, R. Hundsdoerfer, C. Hierholzer, D. J. Tweardy, T. R. Billiar, A. J. Bauer i J. C. Kalff (2005). "Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress." *Surgery* 137(4): 436-446.

Werdin, F., M. Tenenhaus i H. O. Rennekampff (2008). "Chronic wound care." *Lancet* 372(9653): 1860-1862.

Wershil, B. K. (1995). "Role of mast cells and basophils in gastrointestinal inflammation." *Chem Immunol* 62: 187-203.

Wershil, B. K., G. T. Furuta, Z. S. Wang i S. J. Galli (1996). "Mast cell-dependent neutrophil and mononuclear cell recruitment in immunoglobulin E-induced gastric reactions in mice." *Gastroenterology* 110(5): 1482-1490.

Woodcock, J. i R. Woosley (2008). "The FDA critical path initiative and its influence on new drug development." *Annu Rev Med* 59: 1-12.

Xiao, W., M. N. Mindrinos, J. Seok, J. Cuschieri, A. G. Cuenca, H. Gao, D. L. Hayden, L. Hennessy, E. E. Moore, J. P. Minei, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, B. H. Brownstein, P. H. Mason, H. V. Baker, C. C. Finnerty, M. G. Jeschke, M. C. Lopez, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B.

Arnoldo, W. Xu, Y. Zhang, S. E. Calvano, G. P. McDonald-Smith, D. A. Schoenfeld, J. D. Storey, J. P. Cobb, H. S. Warren, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, S. F. Lowry, R. V. Maier, R. W. Davis i R. G. Tompkins (2011). "A genomic storm in critically injured humans." *J Exp Med* 208(13): 2581-2590.

Xu, J., X. Zhang, M. Monestier, N. L. Esmon i C. T. Esmon (2011). "Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury." *J Immunol* 187(5): 2626-2631.

Yan, X., B. Zeng, Y. Chai, C. Luo i X. Li (2008). "Improvement of blood flow, expression of nitric oxide, and vascular endothelial growth factor by low-energy shockwave therapy in random-pattern skin flap model." *Ann Plast Surg* 61(19034081): 646-653.

Yan, X., B. Zeng, Y. Chai, C. Luo i X. Li (2008). "Improvement of blood flow, expression of nitric oxide, and vascular endothelial growth factor by low-energy shockwave therapy in random-pattern skin flap model." *Ann Plast Surg* 61(6): 646-653.

Yip, H. K., L. T. Chang, C. K. Sun, A. A. Youssef, J. J. Sheu i C. J. Wang (2008). "Shock wave therapy applied to rat bone marrow-derived mononuclear cells enhances formation of cells stained positive for CD31 and vascular endothelial growth factor." *Circ J* 72(1): 150-156.

Yu, H. P., S. T. Pang i I. H. Chaudry (2013). "Hepatic gene expression patterns following trauma-hemorrhage: effect of posttreatment with estrogen." *Shock* 39(1): 77-82.

Zachary, I. i G. Gliki (2001). "Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family." *Cardiovasc Res* 49(3): 568-581.

Zaghiyan, K., S. Felder, G. Ovsepyan, Z. Murrell, T. Sokol, B. Moore i P. Fleshner (2013). "A prospective randomized controlled trial of sugared chewing gum on gastrointestinal recovery after major colorectal surgery in patients managed with early enteral feeding." *Dis Colon Rectum* 56(3): 328-335.

Zhang, N., Z. Fang, P. R. Contag, A. F. Purchio i D. B. West (2004). "Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse." *Blood* 103(2): 617-626.

Zhang, Q., Q. Chang, R. A. Cox, X. Gong i L. J. Gould (2008). "Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model." *J Invest Dermatol* 128(8): 2102-2112.

Zhou, Q., X. Q. Zhu, J. Zhang, Z. L. Xu, P. Lu i F. Wu (2008). "Changes in circulating immunosuppressive cytokine levels of cancer patients after high intensity focused ultrasound treatment." *Ultrasound Med Biol* 34(1): 81-87.

Zimpfer, D., S. Aharinejad, J. Holfeld, A. Thomas, J. Dumfarth, R. Rosenhek, M. Czerny, W. Schaden, M. Gmeiner, E. Wolner i M. Grimm (2009). "Direct epicardial shock wave therapy improves ventricular function and induces angiogenesis in ischemic heart failure." *J Thorac Cardiovasc Surg* 137(19327525): 963-970.

Zins, S. R., M. F. Amare, D. K. Tadaki, E. A. Elster i T. A. Davis (2010). "Comparative analysis of angiogenic gene expression in normal and impaired wound healing in diabetic mice: effects of extracorporeal shock wave therapy." *Angiogenesis* 13(4): 293-304.

Zittel, T. T., K. C. Lloyd, I. Rothenhofer, H. Wong, J. H. Walsh i H. E. Raybould (1998). "Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat." *Surgery* 123(5): 518-527.

Zittel, T. T., S. N. Reddy, V. Plourde i H. E. Raybould (1994). "Role of spinal afferents and calcitonin gene-related peptide in the postoperative gastric ileus in anesthetized rats." *Ann Surg* 219(1): 79-87.

Zittel, T. T., I. Rothenhofer, J. H. Meyer i H. E. Raybould (1994). "Small intestinal capsaicin-sensitive afferents mediate feedback inhibition of gastric emptying in rats." *Am J Physiol* 267(6 Pt 1): G1142-1145.

8. Dodatak

Biografija

Vlado Antonic

203 East Glendale Avenue, Apartment 4
Alexandria, VA, 22301
Phone: +1301-768-8750
E-mail: vladoantonic@gmail.com

EDUCATION

PhD program: University of Belgrade, Faculty of Biology, November 2007-Present
Area of specialization: Neurobiology with Neuroimmunobiology.
Anticipated Graduation 2013.

M.S. in Molecular Biology and Physiology- September 2000. - May 2007
Area of specialization: Experimental Biomedicine, Grade Average: 9/10

RESEARCH EXPERIENCE:

1. Henry M Jackson Foundation for Advancement in Military Medicine, Combat

Wound Initiative Program, November 2008- present

Senior Research Associate, June 2011-present

Research Associate, May 2010 – June 2011

Laboratory Technician, November 2008 – April 2010

Methods of Expertise: RNA and DNA isolation, Qualitative Analysis of RNA/DNA, Quantification of RNA, cDNA Synthesis, qRT-PCR, Immunohistochemistry, Cloning, Hyperspectral Imaging, Meso Scale Discovery platforms, various animal surgical procedures.

Projects:

- Prospective, randomized, multi-center clinical trial “Prospective randomized Trial of Standard Wound Care versus Standard Wound Care plus Shockwave Therapy for Traumatic Wounds of Extremity”-IDE G060211

- Collaborative projects with University of Alabama, Birmingham “VAC instill treatment of Contaminated Femur Open Fracture”
- Collaborative project with University of Pittsburgh, “A Novel Model of Tissue Trauma Induced Gastrointestinal Dysmotility and Inflammation”
- Collaborative project with Armed Forces Institute of Pathology “Isolation and Sequencing of an Antibiotic Resistance Carrying Plasmid from a Combat Wound Related Bacterial Isolate”
- Collaborative project with Armed Forces Institute of Pathology “Molecular and Metabolic differentiation of Staphylococcus Epidermis isolates from Combat Wound related bacterial Isolate”
- Collaborative project with University of Pittsburgh, “Extracorporeal Shock Wave Therapy (ESWT) Prevents Peripheral Tissue Trauma-Induced Inflammation and Gastrointestinal Dysmotility, and Murine Post-operative Intestinal Inflammation and Ileus”

2. Military Medical Academy Belgrade, Institute for Medical Research, November 2007-November 2008

Volunteer Laboratory Technician,

Methods of Expertise: Basic principles of cell cultures, isolation of cells from lymphoid organs and peripheral blood, immunocytochemical staining (StPx, APAAP), flow cytometry technique (fluorescence), apoptosis techniques, ELISA, statistical analysis of the data

3. Sinisa Stankovic- Institute for Biological Research, June 2006- September 2008

PhD candidate- May 2007-September 2008

Volunteer Laboratory Technician- June 2006-May 2007

Methods of Expertise: Light microscopy, in vitro protein binding assay

Project: “Effect of magnetic field as ecophysiological factor on various biological systems and their possible application in biomedicine”,

4. **Geomagnetic Institute Grocka and Faculty of Mechanical Engineering**, University of Belgrade, May 2004- September 2006

Volunteer Laboratory Technician

Method of Expertise: Proton magnetometer GSM-19

Project: “*The methodology of measuring induced magnetization in various biomaterial samples*” (Experimental biomagnetic measurements)

PATTENT:

University of Pittsburgh Ref. No.: 02649 Title: REDUCTION OF THE INCIDENCE OR SEVERITY OF TRAUMA INDUCED COMPLICATIONS

Innovators: PhD Anthony Bauer (University of Pittsburgh); Colonel Alexander Stojadinovic (Walter Reed National Military Medical Center); **MS Vlado Antonic** (Henry M Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine), 2012

PRESENTATIONS OF FINDINGS:

1. **16th Congress of the International Society for Medical Shockwave Treatment**, Salzburg, Austria, June 2013, *Extracorporeal Shockwave Therapy Modulates Post-surgical Inflammation and Prevents Postoperative Ileus in Mouse Animal Model*, **Vlado Antonic**, Mina J. Izadjoo, Alexander Stojadinovic, Anthony J Bauer
2. **Digestive Disease Week Conference**, Orlando, FL, May 2013, *Extracorporeal Shock Wave Therapy Modulates Inflammation and Prevents Postoperative Ileus*, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Mina J. Izadjoo, Anthony J. Bauer
3. **USUHS Research Days**, May 2013. *Extracorporeal Shock Wave Therapy Modulates Inflammation and Prevents Gastrointestinal Ileus after Tissue Trauma and Postoperative Ileus*, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Mina J. Izadjoo, Anthony J. Bauer,
4. **Symposium for Advanced Wound Care**, Baltimore MD, September 2012. *Pigment Production in a White Phenotypic Variant of Staphylococcus aureus*, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Mina Izadjoo, M. Alavi.
5. **International Congress of Environmental Health**, Lisbon, Portugal, May-June 2012, *Effect of chronic exposure to alternating magnetic field (50 Hz, 0.5 mT) on the activity of*

serotonin receptors in the brain of rats, Branka Janac, **Vlado Antonic**, Gordana Tovilovic, Zlatko Prolic.

6. **Digestive Disease Week Conference**, San Diego, CA, May 2012, *Extracorporeal Shock Wave Therapy Modulates Inflammation and Prevents Gastrointestinal Ileus after Tissue Trauma and Postoperative Ileus*, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Mina J. Izadjoo, Anthony J. Bauer
7. **American Society of Microbiology**, Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, Washington, DC, February 2012 *Control of Pigment Production in a White Phenotypic Variant of Staphylococcus Aureus*, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Mina J. Izadjoo, Mohammad Alavi.
8. **International Society for Medical Shockwave Treatment, 2nd Basic Research Meeting**, Innsbruck, Austria, January 2012, Keynote Lecture: *Anti-Inflammatory Effects*, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic
9. **14th Congress of the International Society for Medical Shockwave Treatment**, Kiel, Germany, June 2011, *Extracorporeal Shockwave Therapy Minimizes Necrosis and Promotes Tissue Revascularization by Stimulating Angiogenesis in an Ischemic Epigastric Flap Model*, Rainer Mittermayr, Joachim Hartinger, Alexandra Meinl, Sabine Pfeiffer, **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Wolfgang Schaden, Heinz Redl
10. **Digestive Disease Week Conference**, Chicago, IL, May 2011, *Peripheral Tissue Trauma Triggers an Inflammatory Response Causing Intestinal Microvascular Serum Leak Which Disrupts Gastrointestinal Motility*, Takeshi Tsukamoto, **Vlado Antonic**, David G. Binion, Mina J. Izadjoo, Hiroyuki Yokota, Hans-Christoph Pape, Alexander Stojadinovic, Anthony J. Bauer
11. **Translational to Clinical Regenerative Medicine Wound Care Conference**, Columbus, OH, April 2011, *Characterization of Bacterial Biofilms from Emerging Wound Infections*, Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Robert Burgess, **Vlado Antonic**, Mina Izadjoo, and Alexander Stojadinovic
12. **Society of Armed Forces Medical Laboratory Scientists Meeting**, San Diego, CA, March 2010. *An Overview of Combat Wound Initiative Efforts at Armed Forces Institute of Pathology*, Mina Izadjoo, Jose Centano, Mohammad Alavi, Thomas Shaak, Binxue

- Zhang, Lalaine Anova, **Vlado Antonic**, Kara Couch, COL Peter Weina and COL Alexander Stojadinovic. Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Robert Burgess
13. **Symposium for Advanced Wound Care**, Washington, DC, September 2009, *Isolation and Sequencing of an Antibiotic Resistance Carrying Plasmid from a Combat Wound Related Bacterial Isolate*, Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Robert Burgess, **Vlado Antonic**, Mina Izadjoo, and Alexander Stojadinovic
 14. **Chemical & Biological Defense Science & Technology Conference**, Dallas, TX, November 2009, *Isolation of an Antibiotic Resistance Carrying Plasmid from a Bacterial Isolate from a Combat Wound*, Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Robert Burgess, **Vlado Antonic**, Mina Izadjoo and Alexander Stojadinovic
 15. **Symposium for Advanced Wound Care**, Washington, DC, September 2009, *Characterization of War Wound Related Bacterial Isolates*, Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Schuyler Milton, **Vlado Antonic**, Mina Izadjoo, Alexander Stojadinovic
 16. **Symposium for Advanced Wound Care**, Washington, DC, September 2009, *Isolation and Sequencing of an Antibiotic Resistance Carrying Plasmid from a Combat Wound Related Bacterial Isolate*, Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Robert Burgess, **Vlado Antonic**, Mina Izadjoo, and Alexander Stojadinovic.
 17. **32nd International Natural and Mathematical Faculties Meeting**, Budva, Montenegro June 2005, *Experimental magnetic measurements of various biomaterial samples*, **Vlado Antonic**

PUBLICATIONS

1. **Vlado Antonic**, Takeshi Tsukamoto, Mina J. Izadjoo, Timothy R. Billiar, Alexander Stojadinovic, Anthony J. Bauer, *TLR4 and Therapeutic Extracorporeal Shockwave Therapy Modulation of Peripheral Tissue Trauma Induced Inflammation and Gastrointestinal Dysmotility*, **Neurogastroenterology and Motility, (In press) 2013**
2. **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Binxue Zhang, Mina J. Izadjoo, Mohammad Alavi, *Pseudomonas aeruginosa induces pigment production and enhances virulence in a white phenotypic variant of Staphylococcus aureus*, **Infection and Drug Resistance, 2013**

3. **Vlado Antonic**, Alexander Stojadinovic, Kent E. Kester, Peter J Weina, Bjoern LDM Brücher, Mladjan Protic, Itzak Avital, Mina J Izadjoo, *Significance of Infectious Agents in Colorectal Cancer Development*. **J Cancer 2013**
4. Rainer Mittermayr, **Vlado Antonic**, Joachim Hartinger, Hanna Kaufmann, Heinz Redl, Luc Téot, Alexander Stojadinovic, Wolfgang Schaden, *Extracorporeal Shockwave Therapy (ESWT) for Wound Healing: Technology, Mechanisms, and Clinical Efficacy*, **Wound Regeneration and Repair, 2012**
5. Julian Brañes, Hector Contreras, Pablo Cabello, **Vlado Antonic**, Leonardo Guiloff, Manuel Brañes, *Extracorporeal Shockwave Therapy (ESWT), Shoulder rotator cuff, Morphological Studies, Neo-vascularization, Neo-lymph Angiogenesis*, **Shoulder and Elbow, 2012**
6. Mohammad R. Alavi, **Vlado Antonic**, Adrien Ravizee, Peter J. Weina, Mina Izadjoo, Alexander Stojadinovic, *An Enterobacter Plasmid as a New Genetic Background for the Transposon Tn1331*, **Journal of Infection and Drug Resistance, 2011**
7. **Vlado Antonic**, Rainer Mittermayr, Wolfgang Schaden, Alexander Stojadinovic, *Evidence Supporting Extracorporeal Shock Wave Therapy for Acute and Chronic Soft Tissue Wounds*, **Wounds, 2011**
8. Takeshi Tsukamoto, **Vlado Antonic**, Ihab I. El Hajj, David G. Binion, Alexander Stojadinovic, Mina J. Izadjoo, Hiroyuki Yokota, Hans Christoph Pape, Anthony J. Bauer, *Novel Model of Peripheral Tissue Trauma Induced Inflammation and Gastrointestinal Dysmotility*, **Neurogastroenterology and Motility, 2011**
9. Rainer Mittermayr, Joachim Hartinger, **Vlado Antonic**, Alexandra Meinl, Sabine Pfeifer, Alexander Stojadinovic, Wolfgang Schaden, Heinz Redl, *Extracorporeal shock wave therapy minimizes necrosis and promotes tissue revascularization by stimulating angiogenesis in an ischemic epigastric flap model*, **Annals of Surgery, 2011**.
10. Mohammad Alavi, Adrien Ravizee, Robert Burgess, **Vlado Antonic**, Mina Izadjoo Alexander Stojadinovic, *Resistance Carrying Plasmid in a Traumatic Wound*, **Journal of Wound Care, 2010**

RELEATED EDUCATIONAL EXPERIENCE:

- M.S. Final Project: “Effect of Chronic Magnetic Field Exposure (50Hz, 0.5mT) on Central Serotonin Receptors Activity in Rats”, Exam Grade: 10/10
- Biomechanics Course, Faculty of Mechanical Engineering, University of Belgrade, 2005.
- Biophysics Course, Faculty of Biology, University of Belgrade, 2004 and 2005
- European Cooperation in Science and Technology - European Science Foundation / International Brain Research Organization training school “Neuroimaging and complementary techniques” Faculty of biology, Belgrade 2008.
- Practical Approach- Seminar, Good Laboratory Practice for Scientists and Staff, West Coast Quality Training Institute, Washington 2009.
- American Society for Investigative Pathology/ International Society for Biological and Environmental Repositories 2010 Summer Academy: Investigating the Pathogenesis of Disease Course

AWARDS

- Scholarship for PhD program: Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia

SCIENTIFIC ASSOCIATIONS MEMBERSHIPS

- Wound Healing Society: 2013- present
- International Society for Medical Shockwave Therapy: 2013 - present

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Владо (Никола) Антонић _____

број индекса _____ KA070005 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Процена ангиогених и анти-инфламаторних ефеката екстракорпоралне терапије звучним ударним таласима на анималном моделу исхемије кожних режњева

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01. Септембар 2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Владо (Никола) Антонић

Број индекса КА070005

Студијски програм Неуронауке, Неуробиологија са неуроимунологијом

Наслов рада Процена ангиогених и анти-инфламаторних ефеката екстракорпоралне терапије звучним ударним таласима на анималном моделу исхемије кожних режњева

Ментор Др Биљана Божић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет, Београд Србија

Др Александер Стојадиновић, професор, Uniformed Services University of Health Sciences, Бетезда, Мериленд, САД

Потписани/а Владо (Никола) Антонић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 01. Септембар 2013

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Процена ангиогених и анти-инфламаторних ефеката екстракорпоралне терапије звучним ударним таласима на анималном моделу исхемије кожных режњева

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 01. Септембар 2013.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.