

# Učinak pentadekapeptida BPC 157 u terapiji lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika izazvanih 96%-tnom otopinom alkohola u štakora

---

Bečejac, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:259251>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tomislav Bečejac**

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 u  
terapiji lezija jezika, jednjaka, želuca i  
dvanaesnika izazvanih 96%-tnom  
otopinom alkohola u štakora**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tomislav Bečejac**

**Učinak pentadekapeptida BPC 157 u  
terapiji lezija jezika, jednjaka, želuca i  
dvanaesnika izazvanih 96%-tnom  
otopinom alkohola u štakora**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u

ZAVODU ZA FARMAKOLOGIJU I ZAVODU ZA PATOLOGIJU  
MEDICINSKOG FAKULTETA SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

VODITELJ RADA:

Prof. dr. sc. Dinko Stančić-Rokotov, F.E.T.C.S.

Iskrenu zahvalnost na ukazanoj podršci, uloženom trudu, strpljivosti i svesrdnoj pomoći izražavam voditelju rada prof. dr. sc. Dinku Stančiću-Rokotovu, izvanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i prof. dr. sc. Predragu Sikiriću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, bez kojih ovaj znanstveni rad ne bi bio moguć.

Posebnu zahvalnost dugujem dr.sc. Vedranu Cesarcu zbog iznimne pomoći u izvođenju ovog znanstvenog istraživanja.

Posebna zahvala dr. Boži Radiću zbog opsežne statističke analize podataka i dr. Aniti Sever zbog patohistološke obrade preparata. Zahvalnost dugujem i cjelokupnom osoblju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog neizmjerne pomoći u radu sa laboratorijskim životinjama.

Svim kolegama sa Klinike za torakalnu kirurgiju „Jordanovac“ KBC-a Zagreb veliko hvala zbog ukazanog razumijevanja i pružene podrške prilikom provođenja ovog istraživanja.

**Ovu disertaciju posvećujem obitelji**

## Popis kratica

**kg - kilogram**

**g - gram**

**mg - miligram**

**µg, mcg - mikrogram**

**ng - nanogram**

**i.p. - intraperitonealno**

**p.o. - peroralno, na usta**

**i.g. - intragastrički**

**mm - milimetar**

**mm<sup>2</sup> - milimetar kvadratni**

**cm - centimetar**

**cm H<sub>2</sub>O - centimetar vode**

**ml - mililitar**

**min - minuta**

**h - sat**

**b.w. - body weight, tjelesna težina**

**tbl. - tablica**

**LD - letalna doza**

**DES - donji ezofagealni sfinkter**

**PS - pilorički sfinkter**

**BPC 157 - Body Protective Compound 157, pentadekapeptid**

**NOS - NO sintetaza**

**GI - gastrointestinalni**

**EGF - epidermalni faktor rasta**

**TRH - tireotropin-oslobađajući hormon**

**DMN - dorzalna motorna jezgra n. vagusa**

**PG - prostaglandini**

**SH - sulfhidrili**

**ET - endotelin**

**FDA - Food and drug association - Američka agencija za hranu i lijekove**

**CCK - kolekistokinin**

**COX - enzim ciklooksigenaza**

**CGRP - calcitonin gene related peptide, peptid povezan sa calcitonin genom**

**GRP - gastrin-releasing peptide, gastrin oslobađajući peptid**

**ASA - acidifirani aspirin**

**TL anastomoza - terminolateralna anastomoza**

**I/R - omjer ishemije i reperfuzije**

**NSAIL - nesteroidni antiinflamatorni lijekovi**

**F.O. - fiziološka otopina**

**AST - aspartat transaminaza**

**ALT - alanin transaminaza**

**L-NAME- $N^G$  - nitro-L-arginine methylester, kompetitivni inhibitor stvaranja endotelnog nitrid oksida (NO)**

**L-arginin-NO prekursor**

**EDRF - endotel derived releasing factor, čimbenik koji potječe iz endotela**

**CNS – središnji živčani sustav**

**MPTP - 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophyridine**

**S.D. – Standardna devijacija**



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I SVRHA RADA</b> .....	1
<b>1.1. Pentadekapeptid BPC 157</b> .....	5
1.1.1. Uvod.....	5
1.1.2. Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na različita tkiva i organske sustave.....	7
1.1.3. Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na gastrointestinalni sustav.....	10
1.1.4. Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje gastrokutane, kolokutane i ezofagokutane fistule.....	19
1.1.5. Alkoholna oštećenja i pentadekapeptid BPC 157.....	21
<b>1.2. NO-sustav</b> .....	23
<b>1.3. Citoprotekcija/adaptivna citoprotekcija</b> .....	26
1.3.1. BPC 157 i njegov citoprotektivni/adaptivno citoprotektivni učinak.....	41
<b>1.4. Konačna osnova za izradu doktorske disertacije</b> .....	47
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	49
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	52
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	54
<b>4.1. Životinje</b> .....	54
<b>4.2. Izvođenje istraživanja</b> .....	54
4.2.1. Agensi.....	54

4.2.2.	Eksperimentalni protokol.....	55
<b>4.3.</b>	<b>Vrednovanje učinka.....</b>	<b>58</b>
4.3.1.	Utvrđivanje vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričog sfinketera....	58
4.3.2.	Makroskopska analiza.....	59
4.3.3.	Histološka analiza.....	59
<b>4.4.</b>	<b>Statistička analiza.....</b>	<b>60</b>
<b>5.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.</b>	<b>Kontrola, alkohol per os.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.</b>	<b>Pentadekapeptid BPC 157, alkohol per os.....</b>	<b>61</b>
5.2.1.	Mikrogrami.....	61
5.2.2.	Nanogrami.....	62
<b>5.3.</b>	<b>L-arginin, alkohol per os.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4.</b>	<b>L-NAME, alkohol per os.....</b>	<b>62</b>
<b>5.5.</b>	<b>L-NAME i L-arginin, alkohol per os.....</b>	<b>63</b>
<b>5.6.</b>	<b>L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol per os.....</b>	<b>63</b>
<b>5.7.</b>	<b>L-NAME i pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol per os.....</b>	<b>63</b>
<b>5.8.</b>	<b>L-NAME, L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol per os.....</b>	<b>63</b>
<b>5.9.</b>	<b>Kontrola, alkohol i.g.....</b>	<b>64</b>
<b>5.10.</b>	<b>Pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol i.g.....</b>	<b>64</b>
<b>5.11.</b>	<b>Kontrola, alkohol per os+i.g.....</b>	<b>64</b>
<b>5.12.</b>	<b>Pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol per os+i.g.....</b>	<b>65</b>
<b>5.13.</b>	<b>L-arginin, alkohol per os+i.g.....</b>	<b>65</b>
<b>5.14.</b>	<b>L-NAME, alkohol per os+i.g.....</b>	<b>66</b>

5.15. L-NAME i L-arginin, alkohol per os+i.g.....	66
5.16. L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os+i.g.....	66
5.17. L-NAME i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os+i.g.....	67
5.18. L-NAME, L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os+i.g.....	67
5.19. Histološka analiza preparata.....	67
6. RASPRAVA.....	97
7. ZAKLJUČAK.....	112
8. KRATKI SADRŽAJ I NASLOV DISERTACIJE NA HRVATSKOM JEZIKU....	115
9. KRATKI SADRŽAJ I NASLOV DISERTACIJE NA ENGLLESKOM JEZIKU.....	118
10.POPIS LITERATURE.....	121
11.BIOGRAFIJA.....	147

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Kaustične lezije gornjeg gastrointestinalnog trakta uobičajeno imaju devastirajuće posljedice na ljudski organizam te predstavljaju važan medicinski i socioekonomski problem. Djeca najčešće ingestiraju kaustično sredstvo nesretnim slučajem i to obično u manjoj količini, dok odrasli ingestiraju veće količine i to najčešće namjerno prilikom pokušaja suicida. Kaustična sredstva možemo podijeliti na alkalna i na kisela; češća je ingestija alkalnih sredstava zbog nedostatka imedijatnih simptoma (kiseline izazivaju osjećaj peckanja u ustima); posljedice ingestije alkalnog sredstva su teže i gotovo uvijek vode u destrukciju jednjaka i njegovu dugotrajnu disfunkciju. Postoje akutna i kronična faza kaustične ozljede jednjaka; akutna faza je ovisna o težini i o lokalizaciji lezije, ovisi o vrsti sredstva u smislu alkalnog ili kiselinskog, agregatnom stanju sredstva (čvrsto ili tekuće stanje), količini i koncentraciji ingestiranog sredstva, količini rezidualne hrane u GI traktu te dužini trajanja kontakta između kaustičnog sredstva i tkiva GI trakta. Kronična faza se odnosi na posljedični razvoj striktura te poremećaj mehanizma gutanja. Alkalna sredstva čine likvefakcijsku nekrozu te duboko prodiru u tkivo koje dodiruju. Ingestija kiselina uzrokuje koagulacijsku nekrozu te formira esharu koja ograničava daljnji prodor u tkivo, a same ozljede su manje u odnosu na lužine. U ljudi sa korozivnim oštećenjima jednjaka 1000 puta je češća incidencija karcinoma u odnosu na opću populaciju [1, 2]. Današnja terapija se odnosi na neutralizaciju kaustičnog sredstva u akutnoj fazi unutar prvog sata. Alkalna sredstva se neutraliziraju obrađenim octom ili sokom od limuna dok se kiseline neutraliziraju mlijekom, bjelanjkom jajeta te antacidima. Izbjegavaju se emetici i natrijev-bikarbonat zbog mogućnosti perforacije jednjaka. Potrebna je nadoknada tekućina i elektrolita i.v.; bolesnik ne uzima ništa na usta, koriste se antibiotici intravenozno u prevenciji i liječenju sepse, inhibitori protonske pumpe; u slučaju akutne respiratorne

insuficijencije daju se steroidi u aerosolu, potrebno je liječenje u jedinicama intenzivnog liječenja uz mogućnost fiberoptičke intubacije. Jače ozljede jednjaka mogu iziskivati postavljanje stenta; ponekad je potrebno učiniti eksplorativnu laparoskopiju ili laparotomiju odnosno torakotomiju te učiniti jejunostomu za hranjenje ili postaviti centralni venski kateter. U slučaju potpune nekroze ili perforacije jednjaka odnosno želuca potrebna je hitna eksplorativna laparotomija/torakotomija te njihova resekcija zajedno sa zahvaćenim okolnim organima i tkivima uz cervikalnu ezofagostomiju i formiranje jejunostomije za hranjenje bolesnika. Terapija kronične faze odnosi se na liječenje posljedičnih striktura jednjaka, fistula te rekonstrukciju jednjaka. Provode se dilatacije jednjaka odnosno rekonstrukcija različitim kirurškim tehnikama kao što su formiranje supstituta jednjaka od želuca, interpozicija tankog crijeva, rekonstrukcija debelim crijevom i slično, ovisno o veličini i proširenosti lezija [1-4].

Iz navedenog se može zaključiti kako kaustične lezije cijelog GI trakta predstavljaju prvorazredan klinički problem povezan s često brojnim kirurškim procedurama, dugotrajnim liječenjem i visokim postotkom morbiditeta i mortaliteta bolesnika. Prema tome, u liječenju i sanaciji kaustičnih lezija gastrointestinalnog trakta postoji izraziti interes za iznalaženjem novih modaliteta liječenja i novih agensa u farmakoterapiji ovih životno ugrožavajućih stanja bolesnika. U eksperimentalnoj literaturi to su radovi koji služe u istraživanju „citoprotekcije“.

U eksperimentalnoj literaturi postoje objavljeni eksperimentalni modeli kojima se ispituju kaustične lezije GI trakta, ali općenito još uvijek nedostaju eksperimentalne studije koje bi proučavale problem moguće terapije kaustičnih lezija, kod peroralne primjene (jer se radovi poglavito odnose na direktnu primjenu na odgovarajući organ, primjerice instilacija direktno u želudac), te tako jednako nedostaju studije koje bi pokušale razjasniti praktičnu i teoretsku pozadinu njihovog cijeljenja.

U literaturi, međutim, postoje radovi kojima se dokazuje povoljni učinak pentadekapeptida BPC 157 na različite nokse kao i na procese cijeljenja [5, 6]. Jednako tako postoje radovi koji potvrđuju veliki značaj NO sustava u procesu cijeljenja [7], međutim, za sada nema radova kojima bi se ispitivao utjecaj BPC 157 i NO sustava na cijeljenje kaustičnih lezija gornjeg GI trakta, kao i njihove međusobne reakcije u tom procesu. Iz tog razloga bilo bi zanimljivo istražiti terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 u sprječavanju, umanjivanju i cijeljenju kaustičnih lezija gornjeg GI trakta te njegovu interakciju sa L-NAME (blokatorom NOS sustava), L-arginin-om (prekursorom NO sustava) i njihovim kombinacijama jer ti spojevi sudjeluju u učincima citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije.

Pojmove citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije prvi je definirao znanstvenik Andre Robert direktnom primjenom toksičnog sredstva u želudac. Pojam citoprotekcije je povezo sa činjenicom da određeni endogeni ili egzogeni agensi štite stanice od inicijalnog djelovanja nokse [8]. Adaptivna citoprotekcija definirana je kao fenomen kod kojeg ranija izloženost ili pretretman manjom noksom štiti stanice od kasnije izloženosti jačoj noksi [9]. Točan mehanizam djelovanja nije sa sigurnošću utvrđen, ali se objašnjava prevencijom ili redukcijom mikrovaskularne ozljede subepitelijalnih kapilara, održavanjem adekvatnog protoka krvi koji omogućava brzu restituciju epitela s ciljem popravka površinskog epitelijalnog defekta te gastroprotektivnim učinkom zbog aktivacije sluzničkog NO-a, prostaglandina PG, raznih faktora rasta GF (EGF, TGF $\alpha$ , bFGF, PDGF), poliamina PA te sulfhidrila [10]. Inicijalno su pojmovi citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije bili isključivo vezani za želudac kod direktne primjene toksičnog agensa u želudac. Kasnije se, kod primjene citoprotektivnih agensa, njihovo značenje širi na jetru, duodenum i kolon gdje se uspije dokazati njihovo djelomično ili potpuno djelovanje [11]. Nakon toga postavlja se kod direktne ozljede pitanje o postojanju citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije u ostatku GI

trakta, i međudjelovanja između želuca, duodenuma i rektuma. Do sada je pokazano kako BPC 157 ima dokazano citoprotektivno i adaptivno citoprotektivno djelovanje u alkoholnim lezijama želuca induciranim izravnom intragastričnom primjenom alkohola te kod endogenih malih iritansa na modelu gastrojejunoanastomoze [12], citoprotektivno djelovanje na jetru u paracetamolom, diklofenakom i ibuprofenom induciranim lezijama [13, 14] te kronično citoprotektivno djelovanje na gastične lezije kod štakora sa kroničnom ingestijom alkohola pomješanog s vodom za piće [15].

S obzirom na gore navedeno bilo bi zanimljivo provesti istraživanje koje bi utvrdilo da li BPC 157 djeluje citoprotektivno/adaptivno citoprotektivno kod životinja sa korozivnim lezijama cijelog gornjeg GI trakta i to onda kada su izazvane peroralnom primjenom, dakle jezik kao mjesto prvog djelovanja, te da li kao takav predstavlja jedno od mogućih farmakoloških rješenja ovog složenog procesa cijeljenja i prevencije ozljeda uzrokovanih namjernom ili slučajnom ingestijom različitih kaustičnih sredstava. S obzirom na dokazane interakcije između BPC 157 i NO sustava [16-20] bilo bi tom prilikom potrebno utvrditi i učinak L-NAME, L-arginina i njihovih međusobnih kombinacija sa pentadekapeptidom BPC 157 na efekte citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije te na očuvanje integriteta sluznice u gornjem GI traktu štakora na modelu korozivnih lezija.

U svakom slučaju, uvođenje citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije u interpretaciju korozivnih lezija jezika, jednjaka, želuca i duodenuma predstavlja vrlo složen problem. Zasad, naime, nema radova koji razmatraju korelacije između BPC 157, alkoholnih oštećenja gornjeg GI trakta izazvanih aplikacijom 96%-tnog alkohola izravno na jezik, fenomena citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije u akutnoj fazi kaustičkih oštećenja cijelog gornjeg GI trakta počevši sa jezikom te vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog (DES) i piloričkog sfinktera (PS).

## **1.1. PENTADEKAPEPTID BPC 157**

### **1.1.1. Uvod**

BPC 157 predstavlja stabilni želučani pentadekapeptid, peptid koji je dio sekvence proteina BPC izoliranog iz ljudskog želučanog soka, topiv je u vodi kod pH 7.0 jednako kao i u fiziološkoj otopini, peptid sa 99% (HPLC) čistoćom (1-des-Gly peptid kao nečistoća). Proizveden je od strane Diagena (Ljubljana, Slovenija, GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419., PL 14736). Radi se o antiulkusnom peptidergičkom agensu koji je stabilan u želučanom soku, učinkovit u cijeljenju različitih tkiva pri sistemske i topičke primjeni [5, 6, 21], djeluje sam, bez nosača [21], a do sada nije zabilježena njegova toksičnost (LD1 nije postignuta).

Suvremeno farmakološko shvaćanje peptida općenito odnosi se na njihovu ključnu ulogu u procesima cijeljenja i imunološkom sustavu. Veliki problem u eksperimentalnom radu sa peptidima prvenstveno predstavlja njihova nestabilnost i potreba za nosačem/nosačima bez kojih imaju slabu ili gotovo nikakvu aktivnost. Cijeli arsenal različitih nosača peptida proizvedenih od strane različitih proizvođača također predstavlja značajan problem u njihovoj jednoznačnosti s obzirom da redovito isti nosači proizvedeni u različitim istraživačkim ili komercijalnim tvrtkama imaju i različite karakteristike. Također postoji cijela plejada različitih nosača peptida, a s napretkom znanosti i tehnologije potpomognutim komercijalnim uspjehom i interesom svjedoci smo relativno brzom otkriću novih nosača peptida sa različitim karakteristikama. Nedovoljno je definirana aktivnost samih peptida, njihovo otpuštanje na mjestu djelovanja te je nemoguće utvrditi da li je pojedini učinak peptida djelo njega samog, njegovog nosača ili kombinacije pojedinih komponenti u peptid/nosač kompleksu.

Sve navedeno ograničava praktičnu i terapijsku primjenu peptida koja još nije dosegla svoj pretpostavljeni potencijal.



Kao što smo već spomenuli, pentadekapeptid BPC 157 je stabilan želučani peptid koji za svoje djelovanje ne treba nosač peptida, zbog čega se njegov učinak može pripisati isključivo njemu samome. S obzirom da je izoliran iz ljudskog želučanog soka pripada posebnoj kategoriji peptida iz gastrointestinalnog trakta te pokazuje iznimnu stabilnost i otpornost dok se peptidi kao što su EGF [22] ili TGF- $\beta$  [23] razgrađuju u vremenskom periodu od nekoliko minuta [23] i zahtjevaju primjenu nosača tvoreći na taj način kompleks peptid+nosač. Zbog toga je teško pripisati učinak samom peptidu, nosaču ili cijelom kompleksu kao što je već ranije spomenuto [24, 25]. Peptidi iz GI trakta moraju biti u mogućnosti podnijeti izrazito nepovoljne uvjete zbog širokog raspona pH vrijednosti (1-10), temperaturnih razlika (4-80°C), prisutnosti brojnih bakterija, virusa i proteolitičkih enzima te izrazito brzom izmjeni sluzničkog pokrova. Jednako tako, peptidi iz grupe peptida GI trakta mogli bi imati visok kapacitet cijeljenja, biti vrlo sigurnog profila, bez toksičnih fenomena, djelovati antibakterijski i protuvirusno te imati određeni biološki učinak na želučanu sluznicu. Valja spomenuti i njihovu mogućnost izolacije i sinteze te njihov povoljan učinak na ciljane tkiva/organe nakon sustavne ( i.p., i.v., i.g., i.m.) i topičke primjene na mjesto oštećenja. Pentadekapeptid BPC 157 predstavlja upravo takav želučani peptid koji je u potpunosti zadovoljio tražene kriterije, djeluje antiulkusno, siguran je u kliničkim istraživanjima za upalnu bolest crijeva i cijeljenje rana, stabilan u želučanom soku te bez poznate toksičnosti, a djeluje sam, bez nosača. Njegov učinak na različita oštećenja i organske lezije dokazan je prilikom izvođenja brojnih eksperimentalnih istraživanja preko postojećih farmakoloških modela in vivo i in vitro, a s obzirom da je postojan (za razliku od ostalih standardnih peptida) ne iznenađuje njegov pozitivni učinak u cijeljenju različitih tkiva nakon sistemske ili topičke primjene.

### **1.1.2 Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na različita tkiva i organske sustave**

Djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na udaljena tkiva i organe pripisuje se njegovoj interakciji sa drugim važnim sustavima za održavanje homeostaze u organizmu kao što su NO-sustav [16-20, 26], središnji dopaminergički sustav [27-34], GABA-ergički mehanizmi[35], nekolinergički i neadrenergički inhibitorni somatosenzorni sustav[5, 21] te na taj način otklanja poremećaje tih sustava.

BPC 157 je u kliničkim istraživanjima za upalnu bolest crijeva te ima učinak i pri liječenju komplikacija upalne bolesti crijeva [36-38], jednako kao i kod sindroma kratkog crijeva [39]. Dokazana mu je i djelotvornost pri cijeljenju rana [40-42], što je posebno bitno kod rana koje normalno jako slabo cijele kao što su opekline lezije želuca i teške opekline kože[40, 41, 43], transekcija tetive i mišića [44, 45], oštećenje perifernog živca (n. ischiadicus) [46] i kosti [47], pospješujući obnavljanje tetivnih struktura [48-50]. Učinkovitost mu je vidljiva i nakon sistemne [5, 28, 51], ali i nakon topičke primjene [40, 41, 43, 52-55] u smislu kreme što je jasno vidljivo čak i kod teško poremećenog stanja cijeljenja uz prisutnost sistemnih kortikosteroidnih poremećaja cijeljenja i imunosupresije [40]. Pentadekapeptid BPC 157 uspješno pomaže u cijeljenju intestinalnih anastomoza u štakora [56, 57], ima dokazanu ulogu u cijeljenju gastrokutanih [58] i kolokutanih fistula [17] te cervikalnih ezofagokutanih fistula [59]. Istraživanja su pokazala da pentadekapeptid BPC 157 nakon sijaladenektomije kontrolira funkciju žlijezda slinovnica te održava integritet GI sluznice [60]. Poznat je antiulkusni učinak BPC-a 157 [12-15, 18, 34, 40, 41, 61-67] koji je dokazan i na modelu želučanih ulceracija uzrokovanih NSAID-om [13, 14, 68]. Dokazano je njegovo snažno antiulkusno djelovanje u cijelom probavnom sustavu pri liječenju upalne bolesti crijeva [36-38]. Dokazan je čak i bolji učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje ulkusa od

standardne terapije [12, 34, 65, 69] te na cijeljenje drugih vrsta rana kada je apliciran lokalno ili sistemski [40-42]. Pokazalo se da BPC 157 kod crijevnih anastomoza poboljšava sve parametre cijeljenja rane [56], a mjesto anastomoze podnosi veće vrijednosti tlaka koje se približavaju normalnim vrijednostima [56]. Također BPC 157 poboljšava i sam proces epitelizacije [41]. Otkriveno je da PDGF-BB i BPC 157 imaju sličnu selektivnost stimulacije granuloznog tkiva i kod spužvastog granuloma i kod cijeljenja rana u db/db miševa [70]. Čini se ipak da BPC 157 aktivnije potiče ranu organizaciju kolagena [70]. Također potiče ekspresiju egr-1 te njegov represorni faktor rasta živaca 1-A vežući protein-2 (nab2) u nediferenciranim Caco-2 stanicama [70]. EGR-1 inducira proizvodnju citokina i faktora rasta i ranu tvorbu izvanstaničnog matriksa te na taj način nudi pojašnjenje pozitivnog učinka BPC 157 na cijeljenje rana [70]. BPC 157 poništava negativan učinak različitih NSAID pa tako i diklofenaka [14], utječe na učinak NO-sustava kojeg i modulira djelujući i na NO-agoniste i na NO sintetazu (NOS)-blokatore [17, 18-20, 71]. NO-sustav je važan kod očuvanja integriteta gastrointestinalne sluznice [18]. BPC 157 poništava alkoholom uzrokovana oštećenja jetre [72], želučane lezije kada je alkohol apliciran lokalno u želudac [12, 67] te potiče angiogenezu u procesu cijeljenja [42, 49, 73] čuvajući tako endotel [34] i prevenirajući pretjeranu ekspresiju endotelina [26]. Djelotvoran je i u cijeljenju mišića [44, 49, 52, 53, 74]. Pentadekapeptid BPC 157 apliciran direktno u lumen želuca smanjuje disfunkciju donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera što je dokazano na modelu prolongiranog ezofagitisa sa promjenama vrijednosti tlakova sfinktera. Na taj način smanjuje se regurgitacija gastroduodenalnog sadržaja u jednjak te se atenuira ezofagitis djelujući, između ostalog, i na sintezu prostaglandina [61, 62]. Apliciran sistemski, BPC 157 održava tlak oba sfinktera u vremenskom periodu od barem 24h [61, 62]. BPC 157 preokreće tijek kroničnog zatajenja srca izazvanog doksorubicinom [26] te antagonizira aritmije [16], smanjuje oštećenje endotela

srca [16, 26, 20], a djeluje i na ravnotežu krvnog tlaka odnosno ispravlja hipertenziju i hipotenziju. BPC 157 mogao bi biti i alkoholni antagonist: suprotstavlja se želučanim i jetrenim oštećenjima uzrokovanim akutnom i kroničnom zlouporabom alkohola, prevenira akutno trovanje te reducira posljedice apstinencijske krize pri kroničnom unosu alkohola [19, 67, 72, 75]. Smatra se i da BPC 157 djelujući mehanizmom citoprotekcije pruža protekciju od indometacinom [12, 65, 67, 68] ili aspirinom induciranih lezija [68]. Također je zaslužan za cijeljenje lezija želuca induciranih kroničnom ingestijom alkohola [15]. Još jedan dokaz protuupalnog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 odnosi se na smanjenje broja upalnih stanica [40, 41, 69] i smanjenje leukotrijena  $LTB_4$ , tromboksana  $TXB_2$  te mijeloperoksidaze MPO u serumu i upalom zahvaćenim tkivima [76, 77]. BPC 157 ima dokazano citoprotektivno i adaptivno citoprotektivno djelovanje u alkoholnim lezijama želuca induciranim izravnom intragastričnom primjenom alkohola te kod endogenih malih iritansa na modelu gastrojejuno anastomoze [12], citoprotektivno djelovanje na jetru u paracetamolom, diklofenakom i ibuprofenom induciranim lezijama [13, 14] te kronično citoprotektivno djelovanje na gastrične lezije kod štakora sa kroničnom ingestijom alkohola administriranim u vodi za piće [15]. BPC 157 smanjuje učinak morfija nakon akutne primjene [27]. Jednako tako proučava se i učinak ovog pentadekapeptida na poremećaje CNS-a pomoću bihevioralnih studija [78], poglavito fenomeni hipersenzitivnosti dopaminskih receptora izazvanih amfetaminom i posljedične primjene haloperidola [32], diazepamske tolerancije i apstinencije [35], fenomen stereotipskog amfetaminskog ponašanja [32, 79], neuroleptičke katalepsije [31], akutne alkoholne intoksikacije [19, 75] te serotonininskog sindroma [80], napominjući da ovaj peptid primjenjen periferno utječe na moždanu sintezu serotonina i povećanje njegovog otpuštanja u supstanciji nigri [81]. Također, BPC 157 pokazuje i snažan protektivni učinak na regurgitacijom izazvanu upalu pluća te ublažava želučane lezije u štakora sa plućnom lezijom

[82, 83]. Najnovija istraživanja ukazuju na njegov pozitivan učinak u zatvaranju traheotomijske rane na animalnom modelu [84].

Djelovanjem na ove složene fiziološke sustave (NO, dopaminergički, GABA, prostaglandinski, somatosenzorni neuronski sustav) [6] mogu se objasniti blagotvorni učinci ovog specifičnog pentadekapeptida BPC 157 koji vrlo vjerojatno djeluje u sklopu primarnog fiziološkog obrambenog sustava. BPC 157 sposoban je suprotstaviti se bilo hiperaktivnosti bilo inhibiciji gore navedenih sustava te tako poništiti njihov devastirajući učinak u smislu mnogih lezija različitih tkiva i organa.

### **1.1.3. Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na gastrointestinalni sustav**

Pentadekapeptid BPC 157 ima dokazani utjecaj na različite organske sustave, no s obzirom na temu ovog istraživačkog rada najvažniji je njegov utjecaj na gastrointestinalni sustav. Zapažen je njegov pozitivan učinak na cijeli gastrointestinalni sustav te se doima kako djeluje kao endogeni ligand bilo kojeg od procesa cijeljenja [5]. Pokazuje široki antiulkusni potencijal [36, 37], a provedena istraživanja se između ostalog odnose na njegovo djelovanje na peridontalno tkivo [85], tkivo jednjaka [61, 62, 69], želuca [12, 15, 18, 29-31, 33, 34, 40, 41, 58, 65, 67, 68, 83, 86-90], dvanaesnika [34, 60, 66, 87, 88] i crijeva [39, 56, 63, 66, 68, 76, 86]. S obzirom da se BPC 157 nalazi u slini i želučanom soku [5], da je stabilan te da mu ne treba nosač, može se administrirati u vodi za piće sa jednakim djelotvornim učinkom [5, 6, 28, 51]. Pentadekapeptid BPC 157 pokazuje širok raspon pozitivnih učinaka na sluznicu cijelog gastrointestinalnog sustava [12, 15, 17, 18, 29-31, 33, 34, 39-41, 56, 58, 60-63, 65-69, 76, 83, 85-90], na jetrene lezije [20, 72, 91, 92] i na lezije pankreasa [87]. Njegovo djelovanje

često je usmjereno na simultano cijeljenje različitih tkiva kao na primjer simultano cijeljenje crijeva i kože [17], što ne iznenađuje s obzirom da želučani ulkusi koji ne cijele imaju istu patologiju i nemogućnost cijeljenja kao i perzistentne kožne ulceracije [58]. Također treba uzeti u obzir širok raspon djelovanja ovog pentadekapeptida na različita tkiva unutar i izvan gastrointestinalnog sustava [5, 6, 28, 51] uključujući komplikacije kao što su artritis, kolangitis i očne lezije [93] te nastanak stres ulkusa kao posljedica različitih štetnih noksi izvan gastrointestinalnog sustava [5, 6, 28, 51]. Sve navedeno ide u prilog tvrdnji kako bi pentadekapeptid BPC 157 mogao biti uveden u terapijske postupnike radi liječenja oštećenja i poremećaja cijelog gastrointestinalnog trakta. Zbog svog sigurnog peptidnog profila, stabilnosti, dokazane netoksičnosti (LD1 nije postignuta), djelovanja bez potrebe za peptidnim nosačem, jednostavnosti primjene (bilo sistemski bilo topički) te dokazanim djelotvornim učincima na različita tkiva i organe eksperimentalnih životinja, predstavlja važan farmakološki agens u terapiji ili prevenciji djelovanja različitih noksi na visoko integrirani gastrointestinalni sustav te druge fiziološke sustave.

### **Usna šupljina**

Početak gastrointestinalnog sustava nalazi se u ustima i tu dolazi do prvog kontakta između domaćina i vanjskog okoliša, to je i prvo mjesto djelovanja nokse prilikom namjerne ili slučajne ingestije kaustičnog sredstva te je svakako potrebno istražiti da li se pojmovi citoprotekcije odnosno adaptivne citoprotekcije i pentadekapeptida BPC 157 odnose i na ovaj dio gornjeg GI trakta. Epitelne stanice usne šupljine služe kao dodirna površina organizma i tvari iz okoline djelujući ujedno i kao apsorpcijska površina i kao obrana protiv ingestiranih patogena. Usna šupljina vrvi bakterijama te je iznimno važna obrambena uloga domaćina kako bi se spriječilo kronično upalno stanje mekih i tvrdih potpornih tkiva zuba koje nastaje kao posljedica zaostajanja bakterija na površini zuba i dugim neposrednim kontaktom sa

mekim čestima u okolini zuba. Takvu upalnu reakciju predstavlja periodontitis koja je jedna od najčešćih i najraširenijih ljudskih bolesti [85]. Periodontitis može dovesti do propadanja okolnih struktura zuba odnosno vezivnog tkiva jednako kao i same alveolarne kosti, što može dovesti do gubitka zuba. Dokazano je pozitivno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na procese periodontitisa gdje je njegova kronična primjena dovela do snažnog protuupalnog učinka na periodontalna tkiva na modelu ligaturom uzrokovanog periodontitisa u štakora [85]. Njegova sistemska primjena značajno je reducirala ekstravazaciju plazme, histološke promjene i resorpciju alveolarne kosti iako nije došlo do promjene cirkulacije krvi u zdravoj gingivi [85]. S obzirom na navedeno, BPC 157 može predstavljati novi peptidni agens u liječenju periodontalne bolesti, a na gore navedeno njegovo djelovanje na usnu šupljinu, periodontalna tkiva i samu alveolarnu kost [85] upućuje i njegov prethodno dokazani angiogeni efekt u ubrzanom cijeljenju rane [5, 6, 28, 40, 51, 75], dokazano poboljšanje cijeljenja koštanih fraktura u štakora i segmentalnog defekta kosti u zečeva [47] te rezultati kliničkih studija o upalnoj bolesti crijeva [36-38].

### **Jednjak**

Jednjak predstavlja drugu veliku cjelinu gornjeg GI trakta koja je slijedeća na udaru ingestirane nokse. Osim kaustičnih oštećenja jednjaka opisanih u uvodnom dijelu, značajan dio patologije odnosi se na pojavu ezofagitisa kao posljedicu disfunkcije donjeg ezofagealnog sfinktera (DES) i piloričkog sfinktera (PS). Tako su provedena istraživanja ezofagitisa u ovisnosti o vrijednostima tlakova sfinktera i učinak pentadekapeptida BPC 157 u njegovoj atenuaciji na animalnom modelu. Privremeno postavljena cjevčica u područje DES-a ili PS-a uzrokuje dugotrajni ezofagitis sa poremećenom funkcijom sfinktera. Bitno je napomenuti kako disfunkcija samo piloričkog sfinktera dovodi do nižih vrijednosti tlakova i piloričkog, ali i donjeg ezofagealnog sfinktera. Također je bitno naglasiti različit učinak pentadekapeptida

BPC 157 na vrijednosti tlakova sfinktera u zdravom i bolesnom stanju gdje u prvom povisuje tlak donjeg ezofagealnog sfinktera i snižava vrijednosti tlakova piloričkog sfinktera dok kod ezofagitisa konzistentno povisuje vrijednosti tlakova sfinktera što govori u prilog kontrole sfinkterske povratne sprege i posljedično održavanje integriteta odgovarajućih tkiva i organa. Sva oštećenja su bila ublažena djelovanjem pentadekapeptida BPC 157 dok su kod primjene standardnih agensa oštećenja perzistirala [61, 62]. BPC 157 djeluje na specifični antirefluksni mehanizam i vrijednosti tlakova sfinktera u zdravih štakora koje vraća prema normalnim vrijednostima [61, 62]. Također, pentadekapeptid BPC 157 sudjeluje u inhibiciji razvoja ezofagitisa kod štakora sa ezofagojunoanastomozom [69], što još jednom potvrđuje njegov blagotvorni učinak na prevenciju ezofagitisa i na vrijednosti tlakova sfinktera. Najnovija istraživanja pokazuju kako je djelotvoran i u cijeljenju ezofagogastrične anastomoze [94].

### **Želudac**

Želudac predstavlja mjesto porijekla ovog pentadekapeptida koji je savršeno prilagođen za djelovanje u takvim relativno nepovoljnim uvjetima s obzirom na široki raspona pH vrijednosti (1-10), temperaturne razlike (4-80°C), prisutnost brojnih bakterija, virusa i proteolitičkih enzima te izrazito brzu izmjenu sluzničkog pokrova želuca. Njegovo djelovanje nije ograničeno samo na pozitivan učinak cijeljenja želuca kao reakcije na jednu noksu već je u mnogo provedenih studija dokazano njegovo djelovanje kao reakcija na cijeli niz oštećenja uzrokovanih različitim noksama. Ovo djelovanje odnosi se kako na lokalni učinak na integritet sluznice tako i na sistemski učinak u interakciji sa različitim drugim sustavima. Već je spomenut dugotrajni utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na vrijednosti tlakova sfinktera odnosno njihovu kontrolu i oporavak, što posljedično dovodi do održanosti integriteta sluznice. Taj je efekt dokazan prilikom izravne aplikacije pentadekapeptida BPC 157 u želudac i događa se u kratkom vremenskom periodu, što može govoriti u prilog njegove



fiziološke uloge [61, 62]. BPC 157 se može suprotstaviti rezerpinskim, MPTP i haloperidolskim lezijama [29-31, 78] te time i na disfunkciju dopaminskog sustava s obzirom da se dokazalo kako BPC 157 djelomično utječe na supstanciju nigru s alpha-[14C]methyl-L-tryptophan (alpha-MTrp) autoradiografskom metodom [81]. Također je značajan njegov učinak na cijeljenje rana i želučanih ulkusa koji normalno ne cijele ili cijele otežano [5, 6, 28, 51] dokazanih na modelu štakora sa gastrokutanim fistulama. U tom istraživanju BPC 157 doveo je do cijeljenja i želučanih i kožnih lezija [58] što i nije tako neobično s obzirom da obje lezije imaju istu osnovnu patologiju i nesposobnost cijeljenja. Dokazan je i njegov učinak na sistemsku primjenu kortikosteroida gdje je BPC 157 u potpunosti poništio štetan učinak kortikosteroida, što je demonstrirano na modelu perzistentne gastrokutane fistule [58]. U teško opečenih životinja sa opsežnim želučanim ulkusima BPC 157 je uspio ublažiti imunosupresiju i sistemsko kortikosteroidno pogoršanje cijeljenja te je doveo do cijeljenja i kožnih i želučanih lezija. Značajna je i njegova citoprotektivna i adaptivno-citoprotektivna aktivnost [15, 18, 34, 67, 83] demonstrirana ne samo in vivo, nego i u in vitro studijama [89, 90]. Suprotstavlja se akutnim i kroničnim alkoholnim lezijama [15, 18, 34, 67, 83], ima snažan angiogeni potencijal [42, 49, 51, 73], suprotstavlja se alkoholnim oštećenjima endotela [34] i u mogućnosti je antagonizirati blokadu NO-sintetaze. Inducira otpuštanje NO te je rezistentan na L-NAME učinak koji bi mogao biti sličan i u ostalim tkivima [18]. Daljnje suprotstavljanje želučanim lezijama vidljivo je na primjeru lezija induciranih ligaturom pilorusa [65]. BPC 157 također antagonizira želučane lezije inducirane aloksanom jednako kao što dovodi i do cijeljenja kožnih ulkusa uzrokovanih istim agensom [54]. Njegovo suprotstavljaće djelovanje je također vidljivo i na primjeru NSAIL-om uzrokovanim lezijama [14], poremećajima PG [14, 68], kapsaicinskim lezijama [67] i poremećajima somatosenzornog neurona [67]. Antagonizira adjuvantni artritis u štakora [68] i kapsaicinom

inducirane nazalne lezije [95]. Već smo spomenuli lokalni i sistemski učinak BPC-a 157 uz interakciju sa drugim sustavima. Lokalni učinak je moguć prvenstveno zbog njegove stabilnosti u želučanom miljeu [5, 6, 51, 96], a odnosi se na njegov snažan angiogeni potencijal i formiranje novog granulacijskog tkiva koje je jače u odnosu na standardne H2-blokatore, omeprazol i sukralfat [73], citoprotektivni i adaptivno citoprotektivni učinak (BPC 157 i omeprazol) [12] te djelovanje na spremišta AMP-ADP-ATP u želučanoj sluznici koje regulira i oporavlja [97]. Djeluje i na želučane lezije inducirane hipoglikemijom i inzulinskim predoziranjem [86]. Iz svega gore navedenog razvidan je široki spektar mogućnosti djelovanja BPC-a 157 na različita tkiva i organe bilo lokalno, bilo sistemski uz napomenu da je njegovo djelovanje dokazano i u mikrogramskim i u nanogramskim dozama što može govoriti u prilog učinku neovisnom o dozi.

### **Duodenum**

Duodenum je slijedeće mjesto sa dokazanim djelovanjem pentadeka-peptida BPC 157. Na duodenalne lezije znatno utječu vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera jer ti sfinkteri izravno služe kao antirefluksni mehanizam i pomažu u održavanju integriteta sluznice. Na području želuca demonstrirani su raznovrsni modeli i oštećenja koja za posljedicu imaju izražene želučane lezije [12, 15, 18, 29-31, 33, 34, 40, 41, 58, 65, 67, 68, 83, 86-90] te lokalno i sistemsko djelovanje pentadeka-peptida BPC 157 u interakciji sa drugim sustavima [5, 6, 28, 51] kao što je već ranije spomenuto, što je bitno u procjeni njegovog terapijskog učinka. Kod duodenalnih ulkusa Szabov cisteaminski protokol nadvladava terapijske učinke antisekretornih agenasa [98]. BPC 157 pokazuje jasan i nedvosmislen pozitivan učinak na cisteaminsku duodenalu leziju, čak i u uvjetima nakon gastrektomije [88] i sijaladenektomije [60]. Na animalnom modelu duodenokutane fistule također je

demonstriran simultani učinak BPC-a 157 na cijeljenje defekata duodenuma i kože [99] baš kao što je prethodno opisano na modelu gastrokutane fistule u štakora [58].

### **Crijevo**

Značajni su blagotvorni učinci pentadekapeptida BPC 157 i u području crijeva gdje je BPC 157 i klinički testiran kod bolesnika sa upalnom bolesti crijeva (UBC) [5, 6, 28, 36, 37, 51]. Vrlo je učinkovit i u suprotstavljanju teškim komplikacijama UBC-a, a posebno se iskazao njegov učinak na cijeljenje crijevnih anastomoza [39, 56, 57] u smislu cijeljenja kolokoličnih [57], ileo-ilealnih [56] i jejun-ilealnih termino-terminalnih anastomoza [39]. Na modelu sindroma kratkog crijeva u štakora, a nakon masivne resekcije crijeva, BPC 157 dovodi do povećanja adaptivne sposobnosti ostatnog crijeva u svim slojevima crijevne stijenke, reducira postoperacijski gubitak na tjelesnoj masi i dovodi do povećanja tjelesne mase životinje komparabilne sa masom štakora koji imaju intaktno crijevo [39]. Prvotno je pokazano kako BPC 157 djeluje protuupalno na modelima akutne, subakutne i kronične upale [51] te kako reducira upalne medijatore čime dovodi do intestinalne protekcije [76], a djeluje i na povećanje funkcije imunoloških efektornih stanica [100]. U literaturi je opisan i novi model ulceroznog kolitisa inducirano cisteaminskom klizmom što predstavlja ekstenziju cisteaminske toksičnosti sa duodenalnih ulkusa na ulcerozni kolitis [63, 66]. Baš kao što je to slučaj kod duodenalnih ulkusa [98], jednako tako BPC 157 može antagonizirati lezije uzrokovan cisteaminskom klizmom na modelu ulceroznog kolitisa [63, 66]. To predstavlja jedan novi potencijalni terapijski oblik liječenja ulceroznog kolitisa, uz napomenu da BPC 157 može i dodatno prevenirati recidiv cisteaminskog kolitisa [63]. Što se tiče istaknutog učinka cijeljenja BPC-a 157 kod kolokutanih fistula, čini se da je njegovo djelovanje ovisno o NO sustavu [17] te predstavlja obećavajuće farmakološko sredstvo u cijeljenju kolokutanih fistula kod bolesnika sa ovom izrazito teškom bolesti. Kao dodatak već ranije spomenutom

učinku BPC-a 157 na cijeljenje više tkiva i organa istovremeno, takav fenomen prezentira se i kod defekata debelog crijeva u kombinaciji sa kožnim defektima na modelu kolokutanih fistula [17] što proizlazi iz činjenice o sposobnosti cijeljenja rane [5, 6, 28, 51] i cijeljenja ostalih crijevnih fistula općenito [17, 58, 99]. Nova istraživanja pokazuju kako se BPC 157 može suprotstaviti malim crijevnim ulkusima induciranim diklofenakom [14], a u tijeku je izrada eksperimentalne studije radi procjene djelovanja pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje rektovaginalne fistule te su utvrđeni pozitivni preliminarni učinci pentadekapeptida BPC 157. [101].

### **Jetra**

Istraživan je učinak BPC-a 157 na predoziranje diklofenakom, paracetamolom i ibuprofenom. Kod predoziranja paracetamolom dolazi do iznenadnog nastupa hepatičke encefalopatije sa pojavom generaliziranih konvulzija i oštećenja moždanog tkiva u štakora [91]. Pokazan je pozitivan učinak BPC-a 157 i protiv ranog razvoja paracetamolske lezije jednako kao i odgovarajući učinak u trenutku kada je djelovanje prekomjerne doze paracetamla bilo u uznapredovaloj fazi [91]. Kod ponavljane primjene diklofenaka u skupini štakora tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 vidljivo je značajno suprotstavljanje hepatičkoj encefalopatiji. To je dovelo do oporavka jetrene funkcije sa gotovo u potpunosti normaliziranim jetrenim enzimom ALT i značajno reduciranim serumskim vrijednostima AST-a. Vidljivo je i njegovo pozitivno djelovanje na moždani edem i gubitak neurona, uključujući sve pogođene regije kao i one sa najistaknutijim neuronskim lezijama u području cerebralnog korteksa i cerebelarne jezgre [14]. Sve je to za posljedicu imalo nedostatak sedacije i nesvjesnosti te redukciju teške hepatalne encefalopatije kod životinja u tretmanu BPC 157 [14]. Sličan je učinak pentadekapeptida BPC 157 na ibuprofenom induciranim oštećenjima i poremećajima gdje ovaj pentadekapeptid, primjenjen intraperitonealno ili u vodi za piće, dovodi do

antagonizirajućeg, povoljnog učinka na hepatičku encefalopatiju, želučane lezije, hepatomegaliju, povišene vrijednosti jetrenih enzima u serumu, tjelesnu težinu životinje i promjene u ponašanju životinje [13]. Sve navedeno upućuje kako BPC 157 može dovesti do ublažavanja svih lezija uzrokovanih kako diklofenakom i paracetamolom, tako i ostalim NSAID-ima [102]. Povrh toga, BPC 157 antagonizira povišene serumске vrijednosti AST-a, ALT-a i amilaza, hepatomegaliju, masnu jetru, raspad jetrenog glikogena sa posljedičnom dubokom hipoglikemijom i nastanak kalcijevih depozita nakon prekomjerne aplikacije inzulina [86]. Jednako tako se suprotstavlja djelovanju CCL4-, ligiranju žučovoda i jetrenim lezijama induciranim «restraint stresom» [92], a na modelu kronične primjene etanola vidljiv je učinak u smislu suprotstavljanja portalnoj hipertenziji, jetrenim i želučanim lezijama [72].

### **Gušterača**

Akutni ili kronični pankreatitis predstavlja jedno po život opasno stanje koje, unatoč agresivnom konzervativnom i/ili kirurškom liječenju, često završava smrtnim ishodom. Ovaj je medicinski problem proučavan na animalnom modelu gdje je akutni pankreatitis u štakora induciran ligaturom žučovoda [87]. BPC 157 je i kod ovog parenhimatoznog organa pokazao svoju učinkovitost kako u profilaktičkoj, tako i u terapijskoj primjeni [87]. Njegova djelotvornost je dodatno potvrđena na modelu akutnog pankreatitisa induciranog primjenom  $\text{CaCl}_2$  gdje je antipankreatični učinak bio udružen sa suprotstavljaćim učinkom na aritmije uzrokovane sa  $\text{CaCl}_2$  [103]. Predloženo je da BPC 157 kao stabilni želučani pentadekapeptid može pripadati skupini inkretina [87], skupini hormona probavnog sustava koji djeluju na oslobađanje inzulina iz beta-stanica Langerhansovih otočića te na otpuštanje glukagon-a iz alfa stanica Langerhansovih otočića gušterače. Mogući učinak BPC-a 157 u kontroli homeostaze inzulina pokazan je u istraživanju gdje je promatran učinak predoziranja inzulina na indukciju želučanih ulkusa, napadaje hipoglikemije, oštećenje neurona u cerebralnom

korteksu i hipokampusu, hepatomegaliju, masnu jetru, jetrene enzime (AST, ALT), serumske vrijednosti amilaza, razgradnju jetrenog glikogena sa hipoglikemijom te stvaranje kalcifikata u zidovima krvnih žila [86]. BPC 157 primjenjen intraperitonealno i intragastrički, pokazao se učinkovit u zaustavljanju kako formiranja želučanih ulkusa tako i svih poremećaja uzrokovanih inzulinom, uključujući i prevenciju ugibanja životinje. Životinje tretirane BPC-om 157 nisu umirale, uglavnom su bile bez napadaja hipoglikemije sa znatno višom koncentracijom glukoze u krvi (glikogen prisutan u hepatocitima), smanjena je bila patologija jetre (normalna težina jetre, manja pojava masne jetre), smanjene su bile vrijednosti AST-a i ALT-a te vrijednosti serumske amilaze, manje je bilo oštećenje neurona u mozgu i samo povremeno su bile prisutne manje želučane lezije, a nastajanje kalcifikata je također bilo manje u odnosu na kontrolnu skupinu što sve upućuje na značajnu ulogu BPC-a 157 u regulaciji inzulinskog djelovanja [86].

#### **1.1.4. Utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje gastrokutane, kolokutane i ezofagokutane fistule**

Provedena istraživanja na modelima gastrokutane [58] i kolokutane fistule [17] u štakora pokazuju kako BPC 157 pospješuje cijeljenje gastričnih i količkih ulkusa te simultano sudjeluje u cijeljenju kutanih lezija, što poboljšava cijeljenje gastrokutanih i kolokutanih fistula. Iako postoje rijetki raniji pokušaji primjene somatostatina [104], omeprazola [105] i oktreotida [106] bilo je potrebno dodatno razmotriti ulogu antiulkusne terapije u rješavanju perzistirajućih gastrokutanih fistula. Studija je dokazala učinkovitost antiulkusne terapije (pentadekapeptida BPC 157, omeprazola, ranitidina i atropina) u cijeljenju gastrokutane fistule nakon primjene kortikosteroidne terapije koja sama po sebi ima suprotan učinak na cijeljenje fistule [58]. Također, postoje i drugi radovi koji su pokazali kako primjena

standardnih antiulkusnih lijekova osim na cijeljenje želučanih ulkusa [107, 108] može istovremeno pokazati povoljan učinak i na cijeljenje kutanih lezija, čak i kod primjene kortikosteroidne terapije [109]. Pentadekapeptid BPC 157 može imati značajan učinak na cijeljenje gastričnog i kožnog defekta te same gastrokutane fistule. Što se tiče kolokutanih fistula u štakora, BPC 157 je učinkovit u njihovom cijeljenju pri čemu važnu ulogu ima NO sustav. U eksperimentu se radilo o perzistirajućim kolokutanim fistulama u štakora. BPC 157 je primjenjen na dva načina: ili u vodi za piće ili jednom dnevno intraperitonealno (i.p.). Primjenjen je sam ili u kombinaciji sa L-NAME i L-argininom te njihovim međusobnim kombinacijama [17]. Primjenjen je i Sulfasalazin i 6- $\alpha$ -metilprednizolon jednom dnevno intraperitonealno. Parenteralna i peroralna primjena BPC-a 157 dovela je do ubrzanog cijeljenja defekata i na kolonu i na koži uzrokujući na taj način zatvaranje kolokutane fistule što je potvrđeno makro/mikroskopski, biomehanički i funkcionalno [17]. Primjena L-NAME je dovela do daljnjeg pogoršanja nemogućnosti cijeljenja kolokutanih fistula, kože i lezija na samom kolonu. L-arginin je poboljšao cijeljenje samo u kombinaciji sa L-NAME (L-arginin+L-NAME), ali ne i sam (L-arginin). Pozitivan učinak pentadekapeptida BPC 157 nije se mijenjao niti u jednoj kombinaciji sa L-argininom i L-NAME. Sulfasalazin je bio umjereno uspješan u cijeljenju, dok je primjena kortikosteroida doprinijela pogoršanju cijeljenja. Ezofagokutane fistule promatrane su kroz model cervikalne ezofagokutane fistule u štakora (kožna lezija i ezofagealni defekt) u vremenskom periodu od četiri dana [59]. U terapijskoj primjeni bili su pentadekapeptid BPC 157 primjenjen peroralno i intraperitonealno, sam ili u kombinaciji sa L-argininom ili L-NAME te njihovim međusobnim kombinacijama. BPC 157 je doveo do ubrznja cijeljenja ezofagokutane fistule te je u potpunosti neutralizirao učinak L-NAME u skupinama L-NAME+BPC 157 i L-NAME+L-arginin+ BPC 157, ili u manjoj mjeri u kombinaciji sa L-argininom, a pokazao je djelovanje neovisno o načinu primjene (peroralno

ili intraperitonealno) te u mikrogramske i nanogramske doze što govori u prilog učinka neovisnom o dozi. Kod životinja tretiranih sa BPC-om 157 uočeno je ubrzano cijeljenje lezija, sa manjim curenjem na fistulu i bez ugibanja životinja u četvrtom danu te sa nestankom disfunkcije piloričkog i donjeg ezofagealnog sfinktera i praktički bez znakova ezofagitisa [59].

Najnovija istraživanja pokazuju djelotvornost pentadekapeptida BPC 157 i u cijeljenju rektovaginalnih fistula gdje je vidljivo cijeljenje i rektuma i vagine (sluznice, mišićnog sloja i seroze), unatoč stalnoj prisutnosti crijevne flore i stolice [101].

### **1.1.5 Alkoholna oštećenja i pentadekapeptid BPC 157**

Intragastričnim alkoholom inducirane akutne želučane hemoragijske lezije predstavljaju najčešće korišteni životinjski model općenito, izrazito pogodan za proučavanje fenomena citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije jer su alkoholne lezije «kiselina neovisne» lezije i kod kojih antisekretorne supstance kao H<sub>2</sub> antagonisti nemaju svoj učinak. Brojni su dokazani pozitivni učinci pentadekapeptida BPC 157 na prevenciju i umanjanje alkoholom induciranih lezija *in vivo* i *in vitro* [15, 18, 19, 34, 67, 72, 75, 83, 89]. BPC 157 ima izrazito jak protektivni učinak (i.p., i.g., odnosno u pijućoj vodi p.o. primjena) u prevenciji nastanka želučanih i jetrenih lezija uzrokovanih akutnom i kroničnom (ingestija 20%-tnog alkohola 13 dana) primjenom alkohola, sprječava akutnu alkoholnu intoksikaciju (sprječava brzo izazvanu i podržavanu anesteziju, hipotermiju, povećane vrijednosti alkohola u krvi, smrtnost) i to kada je apliciran prije ili nakon primjene alkohola, a otklanja i sindrom alkoholnog ustezanja odnosno apstinencijski sindrom [19, 75]. BPC 157 može služiti kao antagonist alkohola, a opisana je i njegova složena interakcija sa NO sustavom [19, 75]. Nadalje, BPC 157 sudjeluje



u interakciji sa NO sustavom (interakcija sa L-NAME i L-argininom) preko kojeg osim što atenuira 96%-tnim alkoholom inducirane želučane lezije (i.g. primjena), djeluje i na regulaciju poremećenih vrijednosti krvnog tlaka [18]. Djeluje zaštitno na sluznicu želuca i duodenuma prilikom intragastrične aplikacije 96%-tnog alkohola [34]. Pentadekapeptid BPC 157 dovodi do sprječavanja nastanka ili povlačenja već nastale portalne hipertenzije te sprječavanja jetrenog oštećenja na štakorskom modelu kronične ingestije alkohola [72]. Dokazano je kako ozljede pluća koje prethode kasnijoj aplikaciji 96%-tnog alkohola intragastrički dovode do pogoršanja alkoholnih želučanih lezija, a da BPC 157 ima protektivni učinak [83]. Također je opisana složena sinergistička interakcija blagotvornog učinka pentadekapeptida BPC 157 i peptidergičke, senzorne aferentne aktivnosti neurona na modelu želučanih lezija induciranih 96%-tnim alkoholom [67]. Kronično citoprotektivno djelovanje BPC-a 157 na prevenciju želučanih lezija, oštećenja jetre i prevenciju portalne hipertenzije dokazano je u pokusu kronične ingestije alkohola u vodi za piće na štakorskom modelu [15]. Učinak BPC-a 157 dokazan je i u *in vitro* istraživanju na modelu izoliranih mukoznih stanica štakorskog želuca koje su 1 h bile inkubirane sa BPC-om 157. Nakon toga je dodan 15%-tni alkohol u vremenskom trajanju od 15 min gdje je ovaj pentadekapeptid zaštitio stanice od alkoholom inducirano oštećenja, a zapravo se radilo o izravnoj staničnoj gastričnoj citoprotekciji [89].

## 1.2. NO-SUSTAV

Već je ranije spomenuto kako pentadekapeptid BPC 157 sudjeluje u interakciji sa NO sustavom. NO sustav ima esencijalnu važnost u mnogim različitim procesima, uključujući odlučujuću ulogu u procesu cijeljenja rana [7]. Za mnoge agense se pretpostavljalo kako su na neki način povezani sa NO sustavom, ali samo mali broj studija je doista promatrao utjecaj NO-prekursora, NOS-blokatora i učinak njihove kombinacije (NO-prekursor+NOS-blokator) zajedno sa testiranim agensom na cijeljenje različitih tkiva i organa. Za razliku od drugih agensa, BPC 157 je testiran upravo sa pažnjom usmjerenom na djelovanje NO sustava. Tako je ispitivan njegov učinak u interrekciji sa NO-prekursorom ili NOS-blokatorom zasebno, kao i s NO-prekursorom i NOS-blokatorom u kombinaciji. U brojnim je objavljenim člancima pokazano da u različitim vrstama tkiva i kod različitih životinjskih vrsta BPC 157 utječe na otpuštanje NO-a i može poništiti učinak i NOS-blokatora L-NAME i NO-prekursora L-arginina. Ova posebna interakcija BPC-a 157 i NO sustava može objasniti široki raspon blagotvornih učinaka dobivenih primjenom pentadekapeptida BPC 157 u različitim istraživanjima [5, 16, 18, 19, 20, 33, 34, 110].

Istraživanja su pokazala kako i u in vivo i u in vitro pokusima BPC 157 može nadvladati učinak L-NAME, kompetitivnog inhibitora endotelnog NO-a, što govori u prilog njegove posebne interakcije sa NO sustavom (blokadom sinteze kod primjene L-NAME i hiperstimulacijom kod primjene prekursora L-arginina.). Ove složene interakcije mogu se objasniti pretpostavkom da sredstva kao L-NAME inhibiraju NO sintetazu (NOS) u kompeticiji sa L-argininom te je jednako tako moguća kompeticija i sa BPC-om 157. Stvaranje NO bilo je smanjeno u kombinaciji pentadekapeptida BPC 157 i L-arginina iako kod samostalne odnosno pojedinačne primjene oba iniciraju sintezu NO-a. Pokus sa

akoholnim lezijama želuca i s krvnim tlakom [18] govori u prilog dodatne inhibicije aktivnosti BPC-a 157 kada je L-argininu dodan L-NAME vjerojatno zbog ograničene raspoloživosti NO-sintetaze. Sposobnost pentadekapeptida BPC 157 u induciranju sinteze NO-a nije bila inhibirana dodatkom L-NAME u čak pet ili deset puta većoj dozi od one potrebne za zaustavljanje učinka L-arginina što govori u prilog kako BPC 157 ipak ima nešto drugačiji učinak na NO od učinka L-arginina. Isto je dokazano na modelu supernatanta homogenata sluznice želuca štakora gdje BPC 157 ima učinak na stvaranje NO na izraženiji i/ili različit način u odnosu na L-arginin [18]. Na animalnom modelu pilića vršena su daljnja ispitivanja gdje su ascites ili plućna hipertenzija inducirani kroničnom primjenom L-NAME, što je prevenirano simultanom primjenom L-arginin-a i BPC 157 [20]. Na istom modelu promatrani su i fenomeni akutne i kronične toksičnosti gdje je L-NAME uzrokovao teška oštećenja različitih tkiva (miokard, jetra, slezena) dok je L-arginin predominantno uzrokovao kongestiju, edem i hemoragiju u različitim organima [20]. Učinak L-NAME je uspješno inhibiran aplikacijom L-arginina i BPC 157 uz napomenu da BPC 157 nije uzrokovao nikakvo oštećenje tkiva ili organa [20]. BPC 157 značajno prevenira pojavu lezija u različitim organima, a posebice je bitan u održavanju integriteta sluznice želuca. Učinak L-arginina kod alkohonih ozljeda štakora bio je u potpunosti inhibiran nakon primjene L-NAME dok je učinak BPC-a 157 nakon primjene L-NAME bio samo oslabljen [19]. Posebno je značajan fenomen da je djelovanje NO sintetaze i osnovno stvaranje NO-a značajno veće u području sluznice želuca u odnosu na druga tkiva kao što su jetra ili pluća [111]. S obzirom da je pentadekapeptid BPC 157 po svojim karakteristikama drugačiji od ostalih poznatih peptida te je izrazito stabilan u želučanom okruženju, može se objasniti njegova složena interakcija sa NO sustavom koji ima važnu signalnu ulogu u održavanju integriteta sluznice želuca i vrijednosti krvnog tlaka [18]. BPC 157 je također pokazao značajan profilaktički i terapijski

učinak u inhibiciji aritmija induciranih metildigoksinom, a dodatno je i u ovom istraživanju istražena interakcija sa NO sustavom [16]. Primjena L-NAME je dovela do pogoršanja metildigoksinom induciranih aritmija, L-arginin sam nije imao učinka dok je antagonizam L-NAME i BPC 157 doveo do sličnog učinka učinku samog BPC 157. Iz svega navedenog može se zaključiti kako digitalisom inducirane aritmije mogu biti spriječene ili im se može suprotstaviti primjenom pentadekapeptida BPC 157 i to uglavnom djelovanjem preko interakcije sa NO sustavom [16]. Značajnu ulogu u prevenciji alkoholom induciranih lezija želuca ima zaštita endotela jer endotel krvnih žila može modulirati tonus krvnih žila stvaranjem tvari koja je znana kao čimbenik porijeklom iz endotela (EDRF). BPC 157 štiti endotel [34] kod etanolom induciranih lezija želuca, a značajna je i njegova posebna citoprotektivna uloga [33]. In vivo je jasno vidljiv angiogenetski odgovor BPC 157 uključujući i povećanje broja pozitivnih vaskularnih elemenata VEGF, CD 34 i FVIII [5]. NO sustav je izuzetno bitan i u cijeljenju kolokutanih fistula na način koji je već prethodno detaljno objašnjen [17].

Nedavno su Sikirić i grupa autora sumirali poznate spoznaje o interakciji BPC-a 157 i NO sustava gdje je ponovno naglašeno sudjelovanje ovog pentadekapeptida u Moncadinom homeostatskom odgovoru cijeljenja preko NO sustava kao reakcije na ozljedu [110]. BPC 157 djeluje na oporavak vaskularnih struktura nakon gubitka vaskularnog integriteta te ovisno o okolnostima dovodi do reducirane pojave tromboze (model anastomoze abdominalne aorte) ili do redukcije krvarenja/trombocitopenije (modeli amputacije, heparin, varfarin, aspirin). Djeluje na cijeljenje različitih tkiva koja normalno ne cijele i to nakon akutnog i kroničnog djelovanja nokse, a stimulira i egr-1 i nab2 gene. U tom radu posebno je naglašeno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 na (i) želučanu sluznicu i njezinu protekciju prilikom alkoholnih oštećenja, stvaranje NO-a i regulaciju krvnog tlaka, (ii) akutnu i kroničnu intoksikaciju i

njezino povlačenje, (iii) kardiovaskularne poremećaje, kronično zatajenje srca, plućnu hipertenziju i aritmije, (iv) poremećaje izazvane hipokalemijom i hiperkalemijom, disfunkciju stanične membrane uzrokovanu kalijem te na (v) složeno cijeljenje kolokutanih i ezofagokutanih fistula [110].

### **1.3. CITOPROTEKCIJA/ADAPTIVNA CITOPROTEKCIJA**

Direktnom primjenom alkohola u želudac pojmove citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije prvi je definirao kanadski znanstvenik Andre Robert koji tvrdi da se pojam citoprotekcije odnosi na činjenicu da određeni endogeni ili egzogeni agensi štite stanice od inicijalnog djelovanja nokse [8]. Njegovo istraživanje temelji se na spoznaji gastrične citoprotekcije gdje dolazi do sprječavanja nastanka kemijskih (alkohol, lužina, hipertonične otopine) ili fizikalnih (termalnih) oštećenja pojačanom sintezom i otpuštanjem prostaglandina (PG) u dozi koja nije antisekretorna. Adaptivna citoprotekcija definirana je kao fenomen kod kojeg ranija izloženost ili pretretman manjom noksom (endogeni ili egzogeni faktori) štiti stanice od kasnije izloženosti jačoj noksi, a postoji određeni (minutni) period koji treba proteći da bi se taj učinak ostvario [9]. Dakle, zbog toga praznog perioda ne postoji preklapanje između citoprotekcije (prva noksa) i adaptivne citoprotekcije (druga ponovljena noksa). Točan mehanizam djelovanja je nepoznat iako se pokušava objasniti prevencijom ili redukcijom mikrovaskularne ozljede subepitelijalnih kapilara, održavanjem adekvatnog protoka krvi koji omogućava brzu restituciju epitela s ciljem popravka površinskog epitelijalnog defekta te gastroprotektivnim učinkom zbog aktivacije sluzničkog NO-a, prostaglandina PG, raznih faktora rasta GF (EGF, TGF $\alpha$ , bFGF, PDGF), poliamina PA te sulfhidrila [10]. Inicijalno su ti pojmovi bili isključivo vezani za želudac i započinjali su u želucu. Daljnjim istraživanjima

značenje ovih pojmova širi se sa želuca na jetru [13, 14, 91], duodenum i kolon [11] gdje se uspije dokazati njihovo djelomično ili potpuno postojanje. Nakon toga postavlja se pitanje o postojanju citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije u ostatku GI trakta, a posebice u njegovom gornjem dijelu koji prvi stradava prilikom ingestije kaustičnog sredstva. BPC 157 ima dokazano citoprotektivno i adaptivno citoprotektivno djelovanje u alkoholnim lezijama želuca induciranim izravnom intragastričnom primjenom alkohola te kod endogenih malih iritansa na modelu gastrojejuno anastomoze [12], citoprotektivno djelovanje na jetru u paracetamolom, diklofenakom i ibuprofenom induciranim lezijama [13, 14] te kronično citoprotektivno djelovanje na gastrične lezije kod štakora sa kroničnom ingestijom alkohola datim u vodi za piće [15].

Općenito je prihvaćeno kako nastanak lezija želučane sluznice jednako kao i protekcija želučane sluznice ovise o ravnoteži odnosno neravnoteži između postojećih agresivnih i obrambenih faktora želučane sluznice. Povećana sekrecija želučane kiseline i povećana produkcija pepsina smatrani su glavnim etiološkim faktorima za razvoj peptičkog ulkusa kod ljudi. Andre Robert i njegovi suradnici pronašli su novi način zaštite želučane sluznice od različitih sredstava kao što su HCl, NaOH, NaCl, alkohol ili termalne ozljede, koji se temelji na djelovanju malih doza prostaglandina (1-5 µg/kg datih i.g. ili s.c.) i to ispod minimalne antisekretorne doze odnosno u dozi u kojoj prostaglandini ne utječu na želučanu sekreciju u štakora (tzv. «antiulkusna doza».) Ovaj je fenomen prvi je puta predstavljen 1979.g. [8] i nazvan je gastrična citoprotekcija. Kasnije je dokazano kako se ovaj fenomen želučane citoprotekcije ne odnosi samo na prostaglandine već postoje i drugi agensi s istim ili sličnim učinkom kao što su cimetidin ili probantin u dozi koja nije antisekretorna [112, 113]. Brzozowski i suradnici spominju još neke takve agense: različiti faktori rasta, nitrid oksid (NO), peptid povezan sa kalcitonin genom (*CGRP*), neki crijevni hormoni kao što su gastrin i

kolecistokinin (CCK), leptin, grelin i gastrin-oslobađajući peptid (*GRP*) [10]. S obzirom da više agensa različite strukture imaju isti gastroprotektivni učinak, vjerojatno postoje neki zajednički endogeni mehanizmi zaslužni za njihov učinak (npr. hormoni i/ili antioksidansi sulfhidrili (SH)). Neka istraživanja su pokazala kako prostaglandinima ili cimetidinom izazvana prevencija hemoragijskih mukoznih lezija želuca u štakora uzrokovanih etanolom ovisi o endogenim glukokortikosteroidima. Prevencija oštećenja je, naime, izgubljena kod adrenalektomiranih štakora (ne i kod tireoidektomiranih niti kod ovariektomiranih životinja). Učinak adrenalektomije poništava se primjenom kortizona, ali ne i mineralokortikosteroida [114].

Kod direktne primjene alkohola u želudac daljnja istraživanja su pokazala kako površinske stanice sluznice želuca često nisu zaštićene djelovanjem citoprotektivnih sredstava iako je uvijek spriječen nastanak duboke hemoragijske nekroze [115]. Zbog toga su Szabo i Szelenyi [116] umjesto citoprotekcije (neke stanice ipak odumiru) predložili pojam organoprotekcije, gastroprotekcije odnosno vazoprotekcije zbog prevencije vaskularnog oštećenja endotelnih stanica [116, 117]. S obzirom da kod pretretmana štakora bilo kojim citoprotektivnim agensom površinske mukozne lezije uzrokovane etanolom ostaju nehemoragijske i ne dolazi do oštećenja subepitelijalnih vaskularnih endotelnih stanica, moguća je brza restitucija površinskog mukoznog defekta migracijom preživjelih epitelnih stanica iz želučanih jama, a koja je gotovo u potpunosti završena unutar jednog sata. Iz navedenog je vidljivo kako citoprotektivni agensi dovode do prevencije rane vaskularne ozljede i prevencije subsekventnog krvarenja, ali ne i do prevencije smrti tisuća epitelnih stanica na površini želučane sluznice. Želučana sluznica sposobna je oduprijeti se autodigestiji iako je izravno izložena brojnim agresivnim agensima kao što su HCl, pepsin, refluks žučnih soli, ljuta hrana,

mikroorganizmi, alkohol i drugi iritansi. Jasno je da je integritet želučane sluznice održan obrambenim mehanizmima koji djeluju protiv navedenih agresivnih faktora [113].

Najčešće korišteni životinjski model u dokazivanju i procjeni citoprotekcije odnosi se na model gdje su ingragastričkim alkoholom inducirane akutne želučane hemoragijske lezije koje predstavljaju lezije neovisne o kiselinu i kod kojih antisekretorne supstance kao H<sub>2</sub> antagonisti nemaju svoj učinak [8, 118]. Druga nekrotizirajuća sredstva korištena u indukciji gastričnih oštećenja bile su žučne soli, tauroholat, glikenodeoksilat, hipertonična urea, NaOH, HCl i kipuća voda [113]. Važnost prostaglandina i subskventne citoprotekcije kod ljudi prvi puta je istraživana 1981.g.. U toj studiji izravno su promatrani endoskopski i histološki parametri želučane i duodenalne sluznice zdravih dobrovoljaca kojima je kao pretretman lokalno putem endoskopa unesen 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> (1 μg/kg), a 15min nakon toga i 40%-tni alkohol u područje duodenuma i 60%-tni alkohol u područje želuca. Vršena je makroskopska i histološka analiza 15 i 30 min. nakon primjene alkohola te je dokazano kako pretretman sluznice sa PGE<sub>2</sub> dovodi do značajno manjeg oštećenja duodenalne i gastrične sluznice alkoholom, prvenstveno uz prevenciju pojave hemoragijskih erozija [119, 120]. U tijeku 1980. g. i 1981.g. dokazano je kako ovaj citoprotektivni učinak prostaglandina nije ograničen samo na epitelne stanice želuca nego je taj učinak primjećen i na hepatocitima gdje 16,16dmPGE<sub>2</sub> štiti jetru štakora od štetnog djelovanja više hepatotoksičnih agensa kao što su ugljikov-tetraklorid, alkohol, D-galaktosamin i drugi te pruža gotovo potpunu zaštitu svim hepatocitima [121-124]. Potom su u tijeku 1987.g. provedena daljnja istraživanja s posebnim osvrtom na strukturu i ultrastrukturu mukoznih stanica želuca prilikom efekta citoprotekcije kod alkoholom induciranih mukoznih lezija. Dodatno je promatrana i sluznička mikrocirkulacija [125, 126]. Pokazano je kako je mikrovaskulatura ljudske želučane sluznice meta djelovanja alkoholnog oštećenja jednako kao i protektivnog učinka prostaglandina i da



PG dovode do promjene u citoskeletnoj ultrastrukturi endotelnih stanica koje tako postaju otpornije prema alkoholnom oštećenju [126]. Ova protekcija endotelnih stanica i ključna uloga mikrovaskulature u očuvanju integriteta želučane sluznice prilikom djelovanja nokse u potpunosti potvrđuje i proširuje ranije predloženi koncept važne uloge vaskularnih faktora u gastroprotekciji [117, 127]. U tijeku 2002.g. dokazano je kako se PG u želučanoj sluznici mogu ponašati kao signalne molekule rasta što je dokazano na primjeru transaktivacije receptora za epidermalni faktor rasta sa prostaglandinom PGE<sub>2</sub> [113]. Na tragu ovih istraživanja FDA je 1988.g odobrila kliničku primjenu misoprostola (sintetski PGE<sub>1</sub> analog) u redukciji rizika za pojavu želučanih ulkusa kod bolesnika sa kroničnim uzimanjem NSAIL lijekova jer je to sredstvo u prethodno provednim istraživanjima pokazalo učinkovitu prevenciju nastanka želučanih ulkusa induciranih kroničnim uzimanjem NSAIL-a. To je pokazano kod bolesnika sa osteoartritisom na uzorku od 420 bolesnika [128].

Predloženi su brojni mehanizmi djelovanja citoprotekcije koji očitno nisu u vezi sa redukcijom sekrecije želučane kiseline, jer su po definiciji citoprotekcije doze prostaglandina i cimetidina bile ispod antisekretornih doza, dočim sulfhidrili (SH) i neke druge supstance uopće nemaju utjecaj na želučanu sekreciju kiseline ili ju čak i povećavaju [129]. Ovdje navodimo neke od tih predloženih mehanizama djelovanja.

- 1) *Povećanje sekrecije želučane sluzi djelovanjem prostaglandina*: porast u sekreciji želučane sluzi može imati važnu ulogu u zaštiti želučane sluznice od daljnjeg oštećenja jer nakon inicijalnog djelovanja nokse želučana sluz može stvoriti debeli pokrov iznad nadolazećih migrirajućih epitelnih stanica sa svrhom brze reepitelizacije. [112, 130, 131].
- 2) *Povećanje u sekreciji bikarbonata* se također spominje kao jedan od mogućih mehanizama citoprotekcije: Flemstrom je 1977.g. prvi dokazao postojanje sekrecije

bikarbonata iz područja fundusa i antruma želuca kao posljedicu metabolički ovisnih procesa i pasivne difuzije [132]. Stimulacija vagusa povećava sekreciju i kiseline i alkalija iako je sekrecija bikarbonata znatno manja u odnosu na kiselinu (5-10% maksimalne količine proizvedene kiseline) [133]. Komplementarno djelovanje bikarbonata i sluzi tvori tzv. mukozno-bikarbonatnu barijeru [134] što je dokazano i eksperimentalno sa pH senzitivnom mikroelektrodom te je nađen pH gradijent od lumena želuca do površine stanice. Kod duodenalnih ulkusa ovaj bikarbonatni sustav ne funkcionira adekvatno prilikom većeg nakupljanje kiseline [135]. Sumnju na adekvatno djelovanje ovog mehanizma izaziva činjenica kako neki prostaglandini uzrokuju porast u sekreciji bikarbonata [136] dok drugi citoprotektivni prostaglandini to ne čine [137].

- 3) *Pojačanje želučane mukozne barijere.* Mnoge su studije pokazale kako važnu ulogu u prvoj liniji obrane želuca ima površina epitelnih stanica sa karakterističnom intrinzičnom barijerom. Ovu gastričnu mukoznu barijeru prvi je opisao Davenport koji tvrdi kako su apikalna membrana i čvrsti spojevi između epitelnih stanica relativno nepropusni za vodikove ione djelujući tako kao fizička barijera koja utječe na difuziju kiseline [138]. Novije studije su pokazale postojanje površinskih aktivnih fosfolipida [139] koji tvore hidrofobnu ovojnica na luminalnoj površini želučanih epitelnih stanica i zadržavaju prolaz vodotopivih iona kao što je vodikov ion, jednako kao i apsorpciju vodotopivih štetnih kemijskih sredstava [140]. NSAID mogu ukloniti ovaj hidrofobni omotač i dovesti do disrupcije mukozne barijere. S druge strane, citoprotektivni agensi kao što su prostaglandini mogu dovesti do povećanja koncentracije površinski aktivnih fosfolipida [141].

- 4) *Izravna protekcija stanica prostaglandinima*. U ranijim radovima pokazano je da je to relativno ograničen mehanizam djelovanja s obzirom da je pretretman izoliranih želučanih epitelnih stanica prostaglandinima postigao samo 20-30%-tnu zaštitu protiv niskih koncentracija etanola (5-15%) dok visoke koncentracije toksičnog 75-100%-tnog alkohola, HCl-a ili NaOH inicijalno dovode do momentalnog otapanja membrane bilo koje stanice [142-144]. Kasnije su 2005.g. Brzozowski i suradnici u svom *in vitro* pokusu na modelu izoliranog žlijezdanog tkiva želuca štakora promatrali potencijalni protektivni učinak prostaglandina na indometacinom inducirane lezije. Zaključak ove studije je da indometacin može izazvati izravan citotoksični učinak na mukozne stanice želučanog žlijezdanog tkiva (što može biti smatrano kao esencijalni mehanizam koji dovodi do nekroze stanica), a da PGE<sub>2</sub> u *in vitro* uvjetima ima izravan protektivni učinak na mukozne stanice želuca štakora i to u odsutnosti vaskularnih, hormonalnih i neuralnih faktora. Doza prostaglandina dmPGE<sub>2</sub> koja dovodi do ovog optimalnog citoprotektivnog učinka je 1 µg/ml, dočim veće koncentracije PG-a (5-10 µg/ml) nisu dovele do daljnje citoprotekcije što govori u prilog postignutog maksimalnog praga djelovanja kod doze od 1 µg/ml [145].
- 5) *Smanjenje želučanog motiliteta*: eksperimentalne studije su pokazale da promjene u motilitetu želuca mogu imati značajnu ulogu u razvoju i prevenciji želučanih lezija [146]. Želučane lezije inducirane različitim nekrotizirajućim agensima imaju karakterističan izgled poput vrpce na vrhovima nabora želučane sluznice. S obzirom da se lezije uglavnom javljaju na mjestu pojačanog mehaničkog stresa, kompresija sluznice uzokovana želučanom hiperkontrakcijom vjerojatno pojačava razvoj nekroze i ulceracije epitela [146]. Formiranje mukoznih nabora u uskoj je povezanosti sa mišićnom aktivacijom, poglavito cirkularne muskulature želuca, i za pretpostaviti je

kako je smanjenjem motiliteta želuca moguće zaštititi sluznicu želuca. Smanjenje motiliteta želuca dovodi do izravnavanja mukoznih nabora čime se povećava površina sluznice koja je eksponirana djelovanju ulcerogena čime se pak smanjuje koncentracija iritansa koji djeluje na specifična mjesta sluznice želuca (vrhove ruga želuca). Djelovanje prostaglandina, stabilizatora mastocita i sulfhidrila također dovodi do smanjenja želučanog motiliteta što doprinosi njihovom citoprotektivnom učinku u štakora [147].

- 6) *Povećanje krvnog protoka kroz želučanu sluznicu*: kod eksperimentalnih gastričnih lezija važnu ulogu u patofiziologiji oštećenja ima vaskularna ozljeda subepitelijalnih kapilara sa povećanom vaskularnom permeabilnošću i cirkulatornom stazom. Ove promjene dovode do funkcionalnog pogoršanja želučane mikrocirkulacije odnosno do smanjenja krvnog protoka u sluznici želuca sa brojnim hemoragijskim erozijama. [148]. Provedeno je istraživanje krvnog protoka kroz sluznicu želuca kod anesteziranih štakora gdje se vidjelo kako nakon ekspozicije želuca 50-75%-tnom etanolu ili 0,6% HCL-u dolazi do usporavanja i konačno zaustavljanja krvnog protoka kroz sluznicu želuca u vremenskom periodu od 1-2 minute što je u skladu sa prethodno istraživanim oštećenjima endotela koja nastaju u vremenskom periodu od 1-3 minute [117, 148]. Kod životinja koje su bile u pretretmanu sa PG ili SH nikad nije zabilježeno zaustavljanje krvog protoka kroz želučanu sluznicu i nije došlo do nastanka hemoragijskih mukoznih lezija. Isto je potvrdio i istraživač Paul Guth koji je provodio funkcionalne studije mjereći krvni protok kroz želučanu sluznicu štakora (nije provodio morfološke studije u smislu verifikacije ranog oštećenja endotela) te je dokazao kako PG održavaju krvni protok kroz želučanu sluznicu štakora [149]. Povećanje protoka krvi u sluznici želuca ima zaštitini učinak na mukozne lezije [150],

a sluznička mikrocirkulacija je vrlo važna u održavanju oksigenacije i dostavi hranjivih nutrijenata. Pojačani protok krvi u sluznici želuca, također, osigurava razrjeđenje apsorbiranih nekrotizirajućih agensa u subepitelijalnim kapilarama. I ovaj mehanizam ima nekoliko kontroverzi, a odnose se na činjenicu da npr.  $\text{PGF}_2$  koji je vazokonstriktor utječe na želučanu citoprotekciju jednako kao i  $\text{PGE}_2$  koji je vazodilatator [8]. Drugi agensi, kao što su histamin i acetilkolin, dovode do povećanja krvnog protoka kroz želučanu sluznicu iako uzrokuju želučane ulkuse [151]. Kaptopril, koji je ACE inhibitor, povećava krvni protok kroz želučanu sluznicu [152], ali nema učinka na alkoholom inducirane želučane lezije [153] dok propranolol, neselektivni  $\beta$ -antagonist, smanjuje krvni protok kroz želučanu sluznicu i ima značajan gastroprotektivni učinak [154]. Ovaj predloženi mehanizam citoprotektivnog djelovanja ipak je najprihvaćeniji od svih te se čini kako endotelne stanice i krvni protok kroz želučanu sluznicu ipak služe kao glavna meta citoprotektivnog djelovanja. Opet se nameće pitanje kako dolazi do ovog vazoprotektivnog učinka, a odgovor na to pitanje nije u potpunosti jasan i čini se kako je višeznačan. Leukociti koji dolaze na mjesto inicijalnog djelovanja nokse i inicijalnog oštećenja otpuštaju slobodne radikale koji doprinose daljnjem povećanju oštećenja endotela [155, 156]. Oslobođanje vazokonstriktornog endotelina (ET) također doprinosi kemijski induciranom oštećenju endotela te ga je moguće spriječiti ET antagonistima [157]. Nadalje, sinteza NO-a [158, 159] i supstanci koje oslobađaju NO [160] također djeluje na gastroprotekciju kod alkoholom induciranih ili aspirinu-sličnim djelovanjem lijekova. Utjecaj NO sustava na citoprotekciju detaljno je objašnjen u prethodnom dijelu ove disertacije. ET/NO ravnoteža je važan mehanizam djelovanja citoprotekcije, ali ne objašnjava u potpunosti fenomen da endotelne stanice nisu oštećene nakon pretretmana želuca

gastroprotektivnim sredstvima. Objašnjenje ovog fenomena intenzivno se traži, a najnoviji rezultati govore u prilog tome kako su kultivirane endotelne stanice u in vitro istraživanju dva puta osjetljivije na etanol od kultiviranih epitelnih stanica [161, 162], a osjetljivije su na etanol i u odnosu na fibroblaste. Zbog toga važnu protektivnu ulogu imaju prostaglandini. Prostaglandini su medijatori upale i njihovo početno djelovanje odnosi se na povećanje vaskularne permeabilnosti što dovodi do dilucije i smanjenja perivaskularne koncentracije štetnog kemijskog agensa na nekoliko minuta. Time dolazi do odgađanja njegove apsorpcije sve dok protektivno pražnjenje želuca ne odstrani toksični agens iz želuca u duodenum [163]. Želučana sluz i bikarbonati također podupiru ovu intraluminalnu intragastričnu diluciju tvoreći na taj način histodilucijsku barijeru [164]. Ovo je do sada najvjerojatniji mehanizam djelovanja i može objasniti jako široki raspon prevencije štetnog djelovanja nokse i gastroprotekcije, uključujući i demonstrirani A. Robertov koncept adaptivne citoprotekcije gdje pretretman štakora blagim iritansom kao npr. 1ml razrijeđenog 20%-tnog alkohola, štiti sluznicu želuca od djelovanja koncentriranog apsolutnog alkohola. Jedina teorija koja se tiče ovog adaptivno-citoprotektivnog učinka odnosi se na već spomenutu stimulaciju sinteze i otpuštanja endogenih prostaglandina što uzrokuje opisanu vaskularnu fazu sa povećanjem mikrovaskularne permeabilnosti i blage upale. To je dokazano i na histaminskom modelu gdje niske doze apliciranog histamina, koji je sam po sebi glavni medijator u povećanoj vaskularnoj permeabilnosti u ranoj fazi inflamatornog odgovora, dovodi do blago povećane vaskularne permeabilnosti i stvaranja perivaskularnog edema. To ima učinak na prevenciju 75%-tnim alkoholom inducirane hemoragijske mukozne lezije [164]. Slično je dokazao i sam A. Robert u svojim eksperimentima gdje je viđeno da do

prostaglandinima induciranog citoprotektivnog učinka dolazi unatoč prodoru apsolutnog alkohola u sluznicu želuca [165] te da odgoda apsorpcije toksičnog agensa od samo nekoliko minuta zbog perivaskularne dilucije i pražnjenja želuca ima krucijalni učinak na tisuće površinskih epitelnih stanica želučane sluznice što znači razliku između života i smrti [163]. Zbog toga se gastričnu citoprotekciju može promatrati kao inicijalnu, endogenu, spontanu, blagu upalnu (kod adaptivne citoprotekcije) ili induciranu (prostaglandini ili druga citoprotektivna sredstva) samoobranu. Određena klinička istraživanja pokazala su da kod pretretiranih bolesnika sukralfatom do apsorpcije po želudac štetnih antiinflamatornih lijekova dolazi 3-5min kasnije nego kod onih bez pretretmana, što odgovara kritičnoj ranoj fazi kada vaskularna lezija može ili ne mora nastati [166].

#### 7) *Povećano otpuštanje endogenih medijatora želučane citoprotekcije*

- a) Prostaglandini: prostaglandini su bili prvi endogeni agensi koji su dovedeni u vezu sa želučanom citoprotekcijom [8]. Važnost endogenih prostaglandina u učinku na obranu sluznice želuca vidljiva je iz činjenice kako NSAIL uzrokuju oštećenja želučane sluznice. Njihovo gastroprotektivno djelovanje se prvenstveno odnosi na povećanje krvnog protoka kroz sluznicu želuca, međutim, predloženi su i drugi mehanizmi djelovanja kao što su dilucija nekrotizirajućih agensa pojačanom sekrecijom sluzi stimuliranom prostaglandinima [167], stimulacija bazalne sekrecije bikarbonata [168], povećanje koncentracije površinski aktivnih fosfolipida [141], stimulacija cAMP [169], stabilizacija lizosoma [170], smanjenje želučanog motiliteta i smanjenje želučanih nabora sluznice [146] te djelovanje mukoznih sulfhidrila [171]. Prostaglandini vjerojatno imaju i reparatornu funkciju djelovanjem na brzu rezoluciju oštećenog površinskog epitela [172]. Prostaglandini sudjeluju i u tzv. fenomenu

adaptivne citoprotekcije gdje prethodna ekspozicija želučane sluznice blagim iritansima štiti sluznicu od djelovanja jačih noksi [9].

- b) Sulfhidrili: Szabo sa grupom svojih suradnika opisuje kako aminokiseline L-cistein i metionin bogate sulfhidrilskim (SH) grupama jednako kao i lijekovi bogati sulfhidrilskim grupama štite štakore od alkoholom iduciranih želučanih lezija, dok se sredstva koja blokiraju djelovanje sulfhidrila suprotstavljaju citoprotektivnom učinku PGE<sub>2</sub> [171]. U tom radu oni predlažu endogene sulfhidrile kao jedne od medijatora citoprotekcije te navode različite mehanizme djelovanja. Endogeni sulfhidrili utječu na sintezu prostaglandina i aktivnost prostaglandinskih receptora [173]. Djeluju na mukoznu barijeru imajući učinak na permeabilnost stanične membrane ili produkciju slobodnih radikala [174]. S druge strane, Robert i suradnici govore o depleciji endogenih sulfhidrila koja je dovela do paradoksalnog gastroprotektivnog učinka [175].
- c) Epidermalni faktor rasta EGF: ovaj polipeptid koji je moćan inhibitor sekrecije želučane kiseline, nađen je u žlijezdama slinovnicama, ali i na drugim mjestima kao što su duodenalna sluznica i gušterača [176]. Postoje dokazi kako EGF ima gastrični citoprotektivni učinak u dozi koja nije antisekretorna [177]. Moguće je da je ovaj učinak povezan sa endogenim sulfhidrilima [174]. Dodatne studije su pokazale njegovu učinkovitost u prevenciji razvoja stres ulkusa i cijeljenju kroničnih dudenalnih ulkusa u štakora [129, 177].
- 8) *Odstranjenje slobodnih radikala.* Razmatrana je uloga slobodnih radikala (posebice superoksidovog slobodnog radikala) na ishemijska želučana oštećenja, no točan mehanizam djelovanja još nije razjašnjen. Slobodni radikali, vjerojatno, dovode do peroksidacije lipida i oštećenja intracelularnih komponenti stanica [178].



Antioksidansi kao što su vitamin E i selenij imaju dokazan protektivni učinak na sluznicu želuca kod stresom i kemijskim sredstvima induciranim lezijama [179, 180].

9) *Smanjenje otpuštanja endogenih medijatora želučane ozljede: vazoaktivnih amina i leukotriena.* Barem dio etanolom inducirano oštećenja mikrocirkulacije sluznice želuca potječe od oslobađanja endogenih medijatora. Sredstva koja stabiliziraju mastocite i antagonisti H<sub>1</sub> receptora smanjuju etanolom iducirane hemoragijske mukozne lezije [181]. Isti učinak je postignut u genetički modificiranim miševima koji nemaju mastocite [182]. Značajna je i uloga leukotriena u oštećenju želučane sluznice jer oni, kao endogeni medijatori, dovode do želučane vazokonstrikcije [183] i povećane vaskularne permeabilnosti [184]. Nakon ekspozicije sluznice želuca etanolu dolazi do povećanja mukozne razine leukotriena [185]. Dodatni dokaz njihovog djelovanja odnosi se na činjenicu da inhibicija sinteze LTC<sub>4</sub> i LTD<sub>4</sub> u želučanoj sluznici štiti od djelovanja nokse. I prostaglandini i leukotrieni nastaju od arahidonske kiseline i imaju suprotno djelovanje te je razumno za pretpostaviti kako je njihova ravnoteža krucijalna za održavanje integriteta sluznice želuca. Prema nekim istraživanjima smanjena sinteza leukotriena ima čak i veću važnost za integritet sluznice od povećane produkcije prostaglandina [186].

10) *Stimulacija staničnog rasta i popravka.* Već je spomenuto kako brza restitucija epitelnih stanica oštećene sluznice želuca nastaje migracijom stanica iz dubine želučanih jama i udubljenja što dovodi do oporavka denudirane bazalne lamine [187]. Nakon oštećenja sluznice želuca agensima kao što su alkohol, aspirin ili hipertonična otopina, do reepitelizacije dolazi jako brzo, u vremenskom periodu od oko 30min [188]. Intaktna bazalna lamina je neophodna za migraciju stanica tijekom procesa popravaka i cijeljenja. Integritet bazalne lamine je održan u mediju sa visokim pH

vrijednostima [189], dočim niske pH vrijednosti u lumenu (kiselo) dovode do prestanka reepitelizacije [190].

11) *Centralna modulacija gastroprotekcije*. Rana istraživanja iz 1970-tih i 1980-tih godina prošlog stoljeća pokazuju kako električna stimulacija n. vagusa dovodi do povećanja oslobađanja prostaglandina u štakorskom želucu što govori o živčanoj kontroli sinteze i otpuštanja endogenih želučanih prostaglandina [191]. Daljnja istraživanja dovela su do otkrića specifičnih neuropeptida zaslužnih za reguliranje želučane funkcije [192]. Jedan od tih neuropeptida je i tireotropin-oslobađajući hormon (TRH) koji se nalazi u moždanoj meduli i ima značajnu ulogu u stimulaciji vagalnog djelovanja na želudac. Ta se stimulacija odvija preko aktivacije TRH<sub>1</sub> receptora koji se nalazi u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa (DMN). Iz toga se jasno vidi gastroprotektivni potencijal mozga. Izveden je pokus u kojem je primjena sredstva RX-77368, stabilnog TRH agonista, injiciranog izravno u cisternu magnu u niskoj dozi (1,5 ng/štakor) koja ne utječe na želučanu sposobnost u sekreciji kiseline, dovela do prevencije hemoragijskih mukoznih lezija nakon aplikacije 60%-tnog alkohola (5ml/kg) [193]. Dodatno je dokazano kako izravna mikroinjekcija RX-77368 u dorzalnu motornu jezgru (DMN) vagusa provocira sličnu gastroprotekciju, dok njegova aplikacija izvan DMN nije imala navedeni učinak [194]. Ovaj učinak je doveden u vezu sa povećanom razinom PGE<sub>2</sub> u želučanoj submukozi u anestetiziranih štakora, a mogao je biti poništen primjenom indometacina [193, 195]. Vršena su daljnja istraživanja koja su pokazala kako centralna aplikacija analoga TRH dovodi do oslobađanja želučanih prostaglandina, ali da je taj učinak poništen kod vagotomiranih životinja i atropina, što dodatno govori u prilog kako u rezistenciji želučane sluznice na oštećenje važnu ulogu imaju TRH receptorom aktivirani vagusni kolinergični PGE<sub>2</sub> putevi djelovanja [193,

195, 196]. Moszik i Miller, neovisno jedan o drugome, dolaze do otkrića kako kod vagotomiranih štakora pretretman prostaglandinima ne dovodi do prevencije kemijski induciranih hemoragijskih mukoznih lezija [197, 198, 199]. Iz svega se može zaključiti kako endogeni TRH medijatori sudjeluju u medijaciji vagus-ovisne adaptivne gastroprotekcije te da blagi želučani iritansi štite mukozu želuca od jačih želučanih iritansa [200, 201]. Ova cefalička faza vagusne stimulacije želučane sekrecije preko aktivacije medularnog TRH uzrokuje o prostaglandinu ovisne zaštitne učinke želučane sluznice [202, 203]. Jednako tako, deficijencija ove cefaličke faze dovodi do veće osjetljivosti želučane sluznice na djelovanje agresivnih faktora, vjerojatno zbog nedostatka vagusom regulirane gastroprotekcije, uključujući i djelovanje PGE<sub>2</sub> [158]. Gyres i suradnici otkrivaju još neke neuropeptide sa sličnim djelovanjem kao što su nociceptin, nocistatin, β-endorfin, deltorfin ili stimulacija alfa-2-adrenoreceptora [204, 205]. Svi oni imaju gastroprotektivni učinak preko centralnog o vagusu i prostaglandinu ovisnog puta djelovanja. Vrlo je vjerojatno kako različiti neuralni putevi budu aktivirani različitim stanjima (cefalička faza, stres ili periferni senzorni stimulus koji dolazi do mozga), a sve u svrhu održavanja integriteta želučane sluznice preko centralno regulirane sinteze i otpuštanja želučanih prostaglandina [158]. Peter Holzer i Szolcsany-Moszik također daju doprinos ovoj neuralnoj komponenti želučane citoprotekcije. Oni su dokazali kako dugoročna primjena kapsaicina, koji uzrokuje desenzitizaciju, interferira sa PG induciranom gastroprotekcijom iako jednokratna primjena kapsaicina 30 min. prije aplikacije etalnola dovodi do smanjenja hemoragijskih mukoznih lezija želuca, vjerojatno po principu adaptivne citoprotekcije temeljene na teoriji blagih iritansa [206, 207].

### **1.3.1. BPC 157 i njegov citoprotektivni i adaptivno-citoprotektivni učinak**

Već smo spomenuli citoprotektivne i adaptivno-citoprotektivne učinke pentadekapeptida BPC 157 na različita tkiva i organe (na modelu alkoholnih lezija želuca induciranim izravnom intragastričnom primjenom alkohola te kod endogenih malih iritansa na modelu gastrojejuno-anastomoze [12], citoprotektivno djelovanje na jetru u paracetamolom, diklofenakom i ibuprofenom induciranim lezijama (NSAIL) [13, 14, 91] te kronično citoprotektivno djelovanje na gastrične lezije kod štakora sa kroničnom ingestijom alkohola davanim u vodi za piće [15]). Uočen je povoljan učinak pentadekapeptida BPC 157 na želučane i duodenalne lezije inducirane tzv. «restraint» stresom, cisteaminom i 96%-tnim etanolom u štakora [34] te njegova složena protektivna interakcija sa adrenergičnim i dopaminergičnim sustavom u protekciji mukoze želuca [33]. Sikirić i suradnici 1993.god. predlažu citoprotektivno odnosno organoprotektivno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 koji moguće ima i endogeni učinak na uklanjanje slobodnih radikala [51]. Dokazan je njegov citoprotektivni učinak kod gastrektomiranih štakora, posjeduje jaki angiogenetski potencijal koji je čak jači od učinka standardnih antiulkusnih sredstava, a dokazano mu je citoprotektivno i adaptivno citoprotektivno djelovanje usmjereno protiv različitih endogenih i egzogenih iritansa [208]. Kod gastrokutanih fistula BPC 157 učinkovito djeluje na smanjenje lezija i kože i želučanih lezija te dovodi do zatvaranja fistule, djeluje na cijeljenje ostalih fistula (kolokutane i ezofagokutane fistule), djeluje kao mali antiulkusni peptid u cijelom GI traktu, jetri, gušterači, učinkovit je u upalnoj bolesti crijeva i cijeljenju rana, uklanja ezofagitis i vraća vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera na normalne vrijednosti, a što je sve (uz još mnoge druge učinke) već prethodno spomenuto. Moszik i suradnici 1997.g. predlažu izravan mehanizam citoprotektivnog djelovanja PL-10 supstance (sintetizirani dio BPC-a) na

mukozne želučane stanice na *in vitro* modelu etanolom induciranih želučanih mukoznih lezija u izoliranim mukoznim želučanim stanicama štakora gdje ta supstanca ima značajan citoprotektivan učinak [89, 90]. Sikirić i suradnici 1999.god. istražuju učinak dugotrajne citoprotekcije nakon aplikacije pentadekapeptida BPC 157, ranitidina, sukralfata i kolestiramina na modelu refluksnog ezofagitisa u štakora [69]. S obzirom da se uspio dokazati izravni citoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157 u totalno gastrektomiranih štakora kod kojih je duodenum bio izložen djelovanju cisteamina 24h iza operacije te koji su bili žrtvovani 24h nakon aplikacije ulcerogene supstance, postavilo se pitanje da li je moguće vidjeti ovaj učinak u dužem vremenskom intervalu (1, 2 i 4 tjedna) i u drugim dijelovima GI trakta (npr. jednjak) što je dokazano u daljnjem istraživanju. Učinjena je totalna gastrektomija na štakorskom modelu te su jednjak i jejunum spojeni TL anastomozom. Životinje su eutanazirane nakon 7, 14 i 28 dana iza operacije kada je vršena makroskopska (postotak ulcerirane površine) i mikroskopska (regeneracija, hiperplazija, ulkusi, broj inflamatornih stanica-polimorfonukleara i mononukleara) analiza jednjaka. Aplikirani su BPC 157, kolestiramin, ranitidin i sukralfat putem vode za piće. Pentadekapeptid BPC 157 pokazao je učinak značajne atenuacije terminolateralnom ezofagojejunalnom anastomozom induciranog refluksnog ezofagitisa, a taj je citoprotektivni učinak trajao kroz duži vremenski period. Također je kod životinja tretiranih sa BPC 157 nađena manja količina polimorfonukleara i mononukleara u svim vremenskim intervalima. Kod životinja tretiranih ranitidinom i sukralfatom došlo je do pojave manjeg oštećenja sluznice jednjaka u vremenskom periodu od tjedan dana u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne i u vremenskim intervalima od 2 i 4 tjedna. Sličan učinak opisan je i za kolestiramin, dok je količina upalnih stanica kod sva tri zadnje navedena spoja bila istovjetna kontrolnoj skupini. Zaključak studije je bio da pentadekapeptid BPC 157 ima dugotrajni citoprotektivni učinak te da bi mogao imati značajnu ulogu u

liječenju rezistentnog refluksnog ezofagitisa [69]. Iste je godine od strane iste grupe istraživača predložen novi model citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije na štakorskom modelu temeljen na malim endogenim iritansima, antiulkusnim agensima i indometacinu [12]. A. Robert je također smatrao da prirodni endogeni mali iritansi (povećana sekrecija želučane kiseline, duodenalni refluks želučanog sadržaja, poremećen motilitet) mogu biti odgovorni za nastanak manjih lezija i dovesti tako do posljedičnog stvaranja adaptacije stanica, tkiva i organa na djelovanje jakih iritansa (tzv. endogena adaptivna citoprotekcija), iako neke studije pokazuju suprotan učinak [12]. Do pojave ovog novog modela učinak adaptivne citoprotekcije se temeljio isključivo na egzogenim iritansima te se u ovom istraživanju po prvi puta primjenjuje model endogenih iritansa. Formiranje gastro-jejunalne anastomoze dovodi do stvaranja malih, endogenim iritansom induciranih lezija nakon čega se primjenjuje drugi, mnogo jači iritans (npr. 96% alkohol), što je konzistentno sa temeljnom definicijom fenomena adaptivne citoprotekcije. Detaljno je istraženo nekoliko aspekata odnosa citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije i to: djelovanje samo endogenih faktora iritacije (gastrojejunoanastomoza), samo egzogenih iritansa (npr. 20% ili 96% alkohol), kombinacije endogenih i potom egzogenih iritansa (gastrojejunoanastomoza te nakon 24 h primjena 96%-tnog alkohol), kombinacije egzogeni pa potom jačih egzogenih iritansa (20% alkohol 1h prije primjene 96% alkohola). Pritom je istraženo djelovanje BPC 157, atropina, ranitidina, omeprazola te indometacina (inhibitora sinteze PG-a). U tom pokusu dokazano je kako neki agensi mogu biti samo citoprotektivni ili samo adaptivno citoprotektivni ili istovremeno i citoprotektivni i adaptivno citoprotektivni. BPC 157 i omeprazol su imali uglavnom adaptivno citoprotektivni učinak (kombinacija endogenog i egzogenog iritansa) ili oba učinka istovremeno (kombinacija egzogenog i egzogenog iritansa), dok su atropin i ranitidin imali samo citoprotektivni učinak (egzogeni iritansi) [12]. Već je ranije naglašeno

citoprotektivno djelovanje BPC-a 157 kod alkoholnih lezija želuca induciranim izravnom intragastričnom primjenom alkohola. Kronično citoprotektivno djelovanje BPC-a 157 dokazano je u pokusu kronične ingestije alkohola u vodi za piće na štakorskom modelu gdje je promatran učinak različitih agensa (BPC 157, ranitidin, propranolol, F.O.) na formiranje ili prevenciju nastanka želučanih lezija, jetrenih oštećenja i portalne hipertenzije [15]. Navedeni agensi su bili aplicirani u tri protokola: dani su 10 dana prije početka konzumacije alkohola, istovremeno sa početkom alkoholne konzumacije ili samo u zadnjem mjesecu konzumacije alkohola (prethodna dva mjeseca štakori su kronično konzumirali alkohol bez aplikacije testiranih supstanci). Rezultati su pokazali kako pentadekapeptid BPC 157, ranitidin i propranolol mogu djelovati profilaktički i spriječiti nastanak želučanih lezija kada su primjenjeni prije kronične konzumacije alkohola te da jednako tako atenuiraju pojavu lezija u primjeni jednom dnevno tijekom konzumacije alkohola, a dokazan im je i terapijski učinak prilikom primjene u zadnjem mjesecu konzumacije alkohola gdje dovode do antagoniziranja mukoznih lezija želuca u štakora [15].

Možda se jedan od najznačajniji preokreta u istraživanju citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije odnosio na ekstenziju ovih pojmova iz područja želuca na druge organe i tkiva. Već je spomenuto citoprotektivno djelovanje BPC-a 157 na jetru u paracetamolom, diklofenakom i ibuprofenom induciranim lezijama [13, 14, 91]. Ovdje BPC 157 dovodi do antagoniziranja štetnog učinka diklofenaka na GI sustav, jetru i mozak u smislu prevencije i smanjenja teških želučanih, intestinalnih i jetrenih lezija, povećane koncentracije bilirubina u krvi, povećanja jetrenih enzima AST-a i ALT-a u serumu, povećane težine jetre, prolongirane sedacije/nesvjesnosti i hepatičke encefalopatije praćene moždanim edemom i oštećenjem crvenih neurona [14]. BPC 157 antagonizira i štetan učinak paracetamola na jetru i pojavu hepatičke encefalopatije sa generaliziranom konvulzijom u štakora, i to bilo da je primjenjen

u ranoj (odmah nakon aplikacije paracetamola, profilaktičko djelovanje) ili u uznapredovaloj fazi djelovanja (3h nakon paracetamola, terapeutsko djelovanje). U navedenom pokusu BPC 157 pokazao je svoj klinički učinak u smislu profilaktičkog (nije bilo konvulzija), i terapijskog djelovanja (brzi nestanak konvulzija unutar 25min). Također su nađene povoljne mikroskopske (manje jetrenih i moždanih lezija) i biokemijske (vrijednosti jetrenih enzima i vrijednosti dušikovih spojeva) karakteristike, što BPC 157 čini snažnim antidotom protiv nastajanja opsežnih oštećenja uzrokovanih predoziranje paracetamolom [91]. Sličan je učinak pentadekapeptida BPC 157 na ibuprofenom induciranim oštećenjima i poremećajima gdje ovaj pentadekapeptid, primjenjen intraperitonealno ili u vodi za piće, dovodi do antagonizirajućeg, povoljnog učinka na hepatičku encefalopatiju, želučane lezije, hepatomegaliju, povišene vrijednosti jetrenih enzima u serumu, tjelesnu težinu životinje i promjene u ponašanju životinje [13] pa se može pretpostaviti njegov isti ili sličan učinak i na druge supstance iz NSAIL skupine lijekova. [102]. Još je jedno istraživanje fenomena adaptive citoprotekcije izrazito bitno, a na tragu je A. Robertove teorije «želučane memorije». Pretretman želučane sluznice određenim iritansom, npr. aspirinom, stvara tzv. želučanu memoriju te dovodi do posljedične zaštite sluznice želuca protiv nekrotizirajućeg agensa koja traje duže vrijeme npr. tjednima [209]. U ovom eksperimentu istražuju se izravni adaptivno-citoprotektivni učinci na želudac, duodenum i kolon te kako inicijalna lezija u jednom dijelu GI trakta utječe na stvaranje adaptivne citoprotekcije u drugom dijelu GI trakta. Za indukciju lezija korišteni su 25% i 96%-tni alkohol (želudac) te cisteamin u dvije doze (duodenum i kolon). U želucu pretretman slabijim alkoholom praćen kasnijom aplikacijom jačeg alkohola (tzv. želudac-želudac model) dovodi do smanjenja lezija želuca, efekt se pojavljuje nakon 1 sata i traje barem 14 dana. Slično, primjena cisteamina u dvije doze, prvo slabija kao pretretman te onda jača doza (tzv. duodenum-duodenum učinak) dovodi do smanjenja inače



jako izraženih duodenalnih ulkusa. Učinak se javlja nakon 2 sata i traje barem 14 dana. Potpuno suprotni učinak ima primjena cisteamina u dvije doze na kolon (tzv. kolon-kolon model) gdje intrarektalni pretretman kolona slabijom dozom cisteamina ne štiti debelo crijevo od pogubnog djelovanja jačeg iritansa odnosno veće doze cisteamina. Promatran je i adaptivno citoprotektivan učinak jednog dijela GI trakta na drugi. Na modelu želudac-duodenum (najprije 25% alkohol u želudac, a potom cisteamin u većoj dozi u duodenum) i modelu duodenum-želudac (najprije cisteamin u manjoj dozi u duodenum, a potom 96% alkohol u želudac) pokazano je kako pretretman želuca dovodi do smanjenja duodenalnih ulkusa, a jednako tako pretretman duodenuma dovodi do ublažavanja alkoholnih lezija želuca. U modelu želudac-kolon (najprije 25% alkohol u želudac, a potom cisteamin u većoj dozi u kolon) nakon pretretmana želuca blagim iritansom dolazi do prevencije teških cisteaminskih lezija kolona (efekt traje 2-24h) dok u modelu kolon-želudac (najprije cisteamin u manjoj dozi u kolon, a potom 96% alkohol u želudac) ne dolazi do inhibicije teških alkoholnih oštećenja želuca. Model duodenum-kolon (najprije cisteamin u manjoj dozi u duodenum, a potom cisteamin u većoj dozi u kolon) pokazuje da pretretman duodenuma malim iritansom štiti kolon od cisteaminom inducirano oštećenja, a učinak je prisutan 2 - 24h. Model kolon-duodenum (najprije cisteamin u manjoj dozi u kolon, a potom cisteamin u većoj dozi u duodenum) pokazuje da pretretman kolona manjom dozom cisteamina ne uzrokuje zaštitu duodenuma od cisteaminom induciranih lezija. Primjena indometacina prevenira navedene učinke. Stoga je realno za pretpostaviti kako su ti učinci ovisni o djelovanju prostaglandina (PG) dok Robertova „želučana memorija“ nije bila ovisna o prostaglandinima te zapravo predstavlja već ranije spomenutu endogenu adaptivnu citoprotekciju u želucu preko akumulacije blagih endogenih iritansa (npr. povećana sekrecija želučane kiseline, duodenalni refluks u želudac, poremećeni motilitet) [12]. Dokazan je citoprotektivni i adaptivno-

citoprotektivni učinak ne samo u želucu, nego i u drugim dijelovima GI trakta, a taj učinak traje duže (14 dana) u odnosu na inicijalna Robertova istraživanja [11]. Citoprotektivni i adaptivno-citoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157 na jednjak je već ranije spomenut. Sikiric i grupa autora 2010.g. objavljuju sintezu svih dotadašnjih spoznaja o citoprotekciji i adaptivnoj citoprotekciji i naglašavaju kako BPC 157 ima važnu ulogu esencijalnog endogenog medijatora protekcije uzrokovane i citoprotekcijom i adaptivnom citoprotekcijom [5]. U svakom slučaju realno je za pretpostaviti kako je želučana citoprotekcija vjerojatno multifaktorijalan fenomen.

#### **1.4. KONAČNA OSNOVA ZA IZRADU DOKTORSKE DISERTACIJE**

Nova citoprotekcija/adaptivna citoprotekcija: peroralni 96%-tni alkohol i njegova uloga u rješavanju poremećaja u prehrani i unosu tekućina te održavanju integriteta sluznice.

BPC 157, L-arginin, L-NAME

U ovom istraživanju promatrali smo peroralnu primjenu nasuprot Robertove intragastrične primjene 96%-tnog alkohola na štakorskom modelu te neposredne učinke takve primjene u smislu imedijentne i preklapajuće prezentacije citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije i pojave minucioznih lezija na želucu nasuprot velikih postalkoholnih lezija želuca nastalih izravnom intragastričnom primjenom nokse. Značenje Robertove želučane citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije [8, 9, 210] do kojih dolazi nakon izravne primjene jedne ili više iznenadnih noksi te posljedični nastanak velikih lezija želuca moguće izrazito smanjenih nakon kraćeg slobodnog vremenskog perioda mjenenog u minutama (primjena intragastričnog blagog alkohola neposredno prije intragastrične primjene jakog alkohola, potrebno je nekoliko minuta do pojave protekcije) [8, 9, 210] može biti samo od sekundarnog značaja. Kod izravnog djelovanja nokse na želudac i posljedičnog nastanka lezija na želucu, Robertova želučana citoprotekcija/adaptivna citoprotekcija [8, 9, 210] zanemaruje uobičajeni peroralni način unosa štetnog agensa odnosno normalan put djelovanja nokse jednako kao što zanemaruje i uobičajeni način unosa hrane i tekućine. Na taj način nije istraženo postoji li još ranija odnosno još brža pojava citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije, kakva je uloga tih fenomena

na susjedna tkiva i na vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog sfinktera ( za koji je inače normalno utvrđeno kako su njegove vrijednosti značajno promijenjene djelovanjem alkohola) i piloričkog sfinktera.

Stoga, suprotno od pojave velikih post-alkoholnih želučanih lezija nastalih izravnom intragastričnom primjenom alkohola [8, 9, 210], komparabilno smo pretpostavili mogućnost pojave samo minucioznih lezija želuca nakon peroralne administracije jakog alkohola. Zbog toga smo se fokusirali na peroralnu administraciju 96%-tnog alkohola na štakorskom modelu i brzo odnosno gotovo neodgodivo postizanje praga protekcije kao i na pojavu posljedičnih procesa zaslužnih za očuvanje integriteta sluznice želuca. Do sada nije provedeno istraživanje u kojem bi se istražio učinak djelovanja štetnog agensa apliciranog izravno na jezik štakora gdje jezik služi kao primarno mjesto djelovanja nokse jednako kao što nije promatrana posljedična prezentacija lezija jednjaka, želuca i dvanaesnika te vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera. U provedenom istraživanju testirali smo pentadekapeptid BPC 157, blokator NOS-a, L-NAME i NOS-supstrat, L-arginin, same i/ili u međusobnoj kombinaciji [110] i to iz razloga jer su želučane lezije nakon intragastrične primjene jakog alkohola bile povezane sa funkcioniranjem NO sustava [18] zbog čega smo pretpostavili moguću povezanost između NO sustava i peroralne primjene 96%-tnog alkohola. Ovi dodatni agensi vezani uz NO sustav mogu blagotvorno djelovati na procese citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije ili im se mogu suprotstavljati što može imati izravne posljedice na neodgodivu pojavu protekcije želuca na regularnoj bazi. Bitno je naglasiti kako je pentadekapeptid BPC 157, kao već dokazani anti-ulkusni peptid, stabilan u želučanom soku čovjeka i ispitivan u kliničkim istraživanjima za ulcerozni kolitis i multiplu sklerozu, bez dokazane letalne doze (LD1 nije postignuta) [5, 21, 110, 211], a zbog svoje osobite citoprotektivne sluzničke aktivnosti [5, 12, 18, 34, 67], nedavno proglašen novim medijatorom Robertove citoprotekcije[5] te da dovodi do restitucije vrijednosti inače sniženih vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera [21] i da sudjeluje u interakciji sa NO sustavom [110].

I konačno, bazično gotovo trenutno postignuta citoprotekcija i adaptivna citoprotekcija na želucu, a nakon peroralne aplikacije 96%-tnog alkohola, dodatno je istraživana neposrednom primjenom 96%-tnog alkohola izravno intragastrički odmah nakon peroralne primjene jakog alkohola (kombinacija per os+i.g.).

## 2. HIPOTEZA

Temeljem ranije pokazanih učinaka pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje rana, fistula i crijevnih anastomoza, jednako kao i njegovog utjecaja na regulaciju NO sustava te na interakciju sa sintezom prostaglandina, citoprotekciju i adaptivnu citoprotekciju, hipoteze ovog istraživanja su slijedeće:

- 1) BPC 157, kao jedan od novih medijatora Robert-ove citoprotekcije, sam ili u kombinaciji sa L-NAME i L-arginin-om smanjuje ili u potpunosti sprječava nastanak korozivnih lezija cijelog gornjeg gastrointestinalnog trakta uzrokovanih djelovanjem nokse aplicirane izravno peroralno.
- 2) Primjena BPC-a 157 održava normalne vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera kod korozivnih lezija gornjeg GI trakta u štakora.
- 3) NO sustav je mehanizam uključen u procese prevencije ili smanjenja nastanka alkoholnih lezija gornjeg gastrointestinalnog trakta što se dokazuje primjenom stimulacije (prekursor L-arginin) i/ili blokade (L-NAME) NO sustava.
- 4) Djelovanje pentadekapeptida BPC 157 u interakciji je sa djelovanjem NO sustava prilikom prevencije ili smanjenja nastanka alkoholnih lezija gornjeg gastrointestinalnog trakta što se dokazuje primjenom BPC-a 157 kod blokade (L-NAME) i/ili stimulacije (L-arginin) NO sustava.
- 5) Pretretman gornjeg GI trakta štakora izravnom peroralnom primjenom 1 ml 96%-tnog alkohola štiti ostatak gornjeg GI trakta štakora od djelovanja druge nokse (1 ml 96%-tnog alkohola aplicirane izravno intragastrički) te dovodi do prevencije nastanka težih lezija odnosno oštećenja-adaptivna citoprotekcija.

- 6) Pentadekapeptid BPC 157 i/ili NO sustav sudjeluju u procesu adaptivne citoprotekcije na animalnom modelu zajedničke primjene dvije nokse peroralno i intragastrički.

S obzirom da u suvremenoj konzervativnoj terapiji korozivnih oštećenja gornjeg GI trakta nedostaju adekvatna farmakoterapijska sredstva te da ta vrsta oštećenja predstavljaju važan socio-ekonomski problem u suvremenom društvu, jasno je vidljiva potreba za pronalaženjem učinkovitijeg modela liječenja novim terapijskim sredstvima koja bi mogla prevenirati agresivno, mutilirajuće kirurško liječenje. Kako je već ranije dokazan protektivni i iscjeljujući učinak pentadekapeptida BPC 157 na gornji i donji gastrointestinalni sustav važno bi bilo utvrditi da li u modelu izravne aplikacije 96%-tnog alkohola u usnu šupljinu odnosno na jezik štakora, što najrealnije imitira prirodni put nastanka korozivnih oštećenja, stabilni antiulkusni želučani pentadekapeptid BPC 157, uz interakciju sa NO sustavom, dovodi do protektivnog učinka na sluznicu jezika, jednjaka, želuca i duodenuma u smislu prevencije ili smanjenja veličine lezija. Ranije dokazani učinak BPC-a 157 u cijeljenju različitih vrsta rana, želučanih i crijevnih ulkusa te njegovo citoprotektivno i adaptivno-citoprotektivno djelovanje podupire pretpostavku kako će BPC 157 u predloženom animalnom modelu biti učinkovit i u prevenciji i u cijeljenju korozivnih lezija cijelog gornjeg GI trakta. Također, s obzirom da je dokazan učinak pentadekapeptida BPC 157 na regulaciju vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera na štakorskom modelu, važno je vidjeti da li i u ovom istraživanju kod izravnog djelovanja nokse najprije na jezik, a potom i na ostatak gornjeg GI trakta BPC 157 ima isti ili sličan učinak. Na kraju, potrebno bi bilo utvrditi ulogu NO-sustava u gore opisanim procesima preko njegove stimulacije ili inhibicije te odnos pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava prilikom njegove blokade (L-NAME) ili stimulacije (L-arginin). Zajedničkom primjenom dvije nokse, peroralno i intragastrički, te simultanom primjenom

pentadekapeptida BPC 157 i/ili inhibitora odnosno stimulatora NO sustava važno bi bilo utvrditi postoji li na takvom animalnom modelu fenomen citoprotekcije odnosno adaptivne citoprotekcije.

### 3. CILJEVI RADA

#### OPĆI CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

- Dokazati da je pentadekapeptid BPC 157 učinkovit u terapiji, prevenciji i smanjenju nastanka korozivnih lezija cijelog gornjeg GI trakta u štakora i to kod peroralne, intragastrične i peroralne+intragastrične primjene nokse.
- Dokazati citoprotektivni i adaptivno citoprotektivni učinak BPC-a 157 u akutnoj fazi korozivnih ozljeda cijelog gornjeg GI trakta koji započinje s jezikom odnosno usnom šupljinom
- Ispitati interakciju pentadekapeptida BPC 157 sa NO sustavom kod korozivnih lezija gornjeg GI trakta u štakora.
- Verificirati utjecaj pentadekapeptida BPC 157 na funkciju donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera na predloženom animalnom modelu.
- Verificirati adaptivno citoprotektivni učinak kod zajedničke primjene dvije nokse, peroralno i intagastrički, te subsekventnu ulogu pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava.

#### SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

- Ispitati da li BPC 157 dovodi do smanjenja veličine odnosno površine korozivnih lezija jezika.
- Ispitati da li BPC 157 dovodi do smanjenja veličine odnosno površine korozivnih lezija jednjaka.

- Ispitati da li BPC 157 dovodi do smanjenja veličine odnosno površine korozivnih lezija želuca.
- Ispitati da li BPC 157 dovodi do smanjenja veličine odnosno površine korozivnih lezija dvanaesnika
- Ispitati na koji način BPC 157 regulira vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera
- Ispitati da li je eventualni učinak BPC 157 neovisan o dozi ( $\mu\text{g}/\text{ng}$ )
- Ispitati učinak kombinacije pentadekapeptida BPC 157, L-arginina i L-NAME odnosno NO sustava na veličinu korozivnih lezija gornjeg GI trakta
- Ispitati učinak zajedničke primjene dvije nokse, peroralno i intragastrički, te utjecaj pentadekapeptida BPC 157 i/ili NO sustava na smanjenje odnosno prevenciju nastanka korozivnih lezija cijelog gornjeg GI trakta u štakora



## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Životinje**

U provedenom istraživanju koristio se štakorski model korozivnih oštećenja organa gornjeg GI trakta izazvanih 96%-tnim alkoholom apliciranim (i) na usta/ jezik, (ii) intragastrički (putem orogastrične sonde) i (iii) u kombinaciji usta/jezik i intragastrički. Korišteni su mužjaci Albino Wistar štakora, tjelesne mase oko 200 g, držani u normalnim uvjetima, s najmanje 5 štakora po eksperimentalnoj grupi i vremenskom periodu. Životinje su nasumično raspoređene u svim pokusima, a istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **4.2. Izvođenje istraživanja**

#### **4.2.1. Agensi**

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419), (Diagen, Ljubljana, Republika Slovenija), otopljen u fiziološkoj otopini, korišten je u svim pokusima. Peptid BPC 157 je dio sekvence proteina BPC iz ljudskog želučanog soka te je u potpunosti topiv u vodi pri PH 7.0 i fiziološkoj otopini. Pripremljen je kao što je prije opisano [6, 21, 17, 28, 51, 58], sa 99% čistoćom pomoću visokotlačne kromatografije (HPLC), uz 1-des-Gly peptid kao nečistoćom. Korišteni su također L-NAME (Sigma, USA) i L-arginin (Sigma, USA). Korištene su doze pentadekapeptida BPC 157 od 10 µg/kg i 10 ng/kg te doze L-NAME od 5 mg/kg, L-arginin od 100 mg/kg i 0,9% NaCl 5ml/kg kao što je učinjeno u ranijim istraživanjima [12, 15, 59]. Dvije doze pentadekapeptida BPC 157 korištene su kako bi se

istražio o dozi ovisan ili o dozi neovisan učinak BPC-a 157 na različita tkiva i organske sustave.

#### **4.2.2. Eksperimentalni protokol**

U provedenom istraživanju korišten je animalni model korozivnih oštećenja organa gornjeg GI trakta izazvanih 96%-tnim alkoholom. Randomizacijom je podijeljeno po 5 štakora u svaku skupinu životinja za određeni vremenski period ispitivanja učinaka datih agensa (tablica br. 1). Svaka životinja je bila pojedinačno numerirana i smještena u zaseban vivarij nakon čega je podvrgnuta daljnjem istraživanju. Mužjacima Wistar Albino štakora, tjelesne mase oko 200 g, apliciran je 1 ml 96%-tnog alkohola izravno na jezik korištenjem injektora bez igle i spatulom sa otvorom u sredini kako bi se izbjegle ijatrogene ozljede jezika i usne šupljine. Odmah nakon aplikacije alkohola apliciran je po 1 ml otopljenog pentadekapeptida BPC 157 intraperitonealno u mikrogramskim ili nanogramskim dozama, sam ili u kombinacijama sa L-NAME i.p., L-arginin-om i.p. te L-NAME+L-arginin i.p., kao što je prikazano u tablici br.1. Također je istražen samostalni učinak L-NAME i.p., L-arginin-a i.p. te njihove kombinacije, L-NAME+L-arginin i.p., na prevenciju odnosno cijeljenje korozivnih lezija gornjeg GI trakta izazvanih peroralnom primjenom 1 ml 96%-tnog alkohola. Svi rezultati uspoređeni su sa kontrolnom skupinom životinja koja je primila adekvatan volumen 0,9% NaCl-a intraperitonealno. Istraživani vremenski periodi kod peroralne primjene 96%-tnog alkohola bili su 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h i 24 h.

Sumarni prikaz izgleda ovako:

- i) BPC 157 intraperitonealno (10 µg/kg/štakor, 10ng/kg/štakor)
- ii) L-NAME (5 mg/kg i.p.) i/ili L-arginin (100 mg/kg i.p.), sami ili u međusobnoj kombinaciji

iii) BPC 157 10 µg/kg/štakor intraperitonealno zajedno sa L-NAME (5 mg/kg i.p.) i/ili L-arginin-om (100 mg/kg i.p.)

iii) Kontrolna skupina 0,9% NaCl 5ml/kg i.p.

Vremenski interval	1 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	24 h
BPC 157 (µg) i.p.	5	5	5	5	5	5	5
BPC 157 (ng) i.p.	5	5	5	5	5	5	5
BPC 157 (µg) i.p. + L-arginin i.p.	5	5	5	5	5	5	5
BPC 157 (µg) i.p. + L-NAME i.p.	5	5	5	5	5	5	5
BPC 157 (µg) i.p. + L-NAME i.p. + L-arginin i.p.	5	5	5	5	5	5	5
0,9% NaCl i.p. + L-arginin i.p.	5	5	5	5	5	5	5
0,9% NaCl i.p. + L-NAME i.p.	5	5	5	5	5	5	5
0,9% NaCl i.p. + L-NAME i.p. + L-arginin i.p.	5	5	5	5	5	5	5
0,9% NaCl i.p.	5	5	5	5	5	5	5

**Tablica br. 1.** Sumarni prikaz skupina životinja i vremenskih perioda, peroralna primjena 96%-tnog alkohola.

Također, kod zasebnih životinja u vremenskom periodu od 1 sat apliciran je 1 ml 96%-tnog alkohol putem orogastrične sonde izravno u želudac te su određene veličine oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika kod kontrolne skupine životinja (1 ml 0,9% NaCl i.p.) i skupine životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 (1 ml BPC 157 u mikrogramskoj dozi) kao što je prikazano u tablici br. 2.

Vremenski interval	1 h
BPC 157 (μg) i.p.	5
0,9% NaCl i.p.	5

**Tablica br. 2.** Sumarni prikaz skupina životinja i vremenskih perioda, intragastrična primjena 96%-tnog alkohola.

Na dodatnim skupinama životinja u vremenskom periodu od 1 sat istražen je učinak adaptivne citoprotekcije primjenom 1 ml 96%-tnog alkohola najprije peroralno na usta/jezik te odmah nakon toga (cca. 30 sec.) 1 ml 96%-tnog alkohola putem orogastrične sonde izravno intragastrički i to u kontrolnoj, BPC 157 (μg), L-NAME, L-arginin, L-NAME+ L-arginin, BPC 157 (μg) + L-NAME; BPC 157 (μg) + L-arginin i BPC 157 (μg) + L-NAME + L-arginin skupinama životinja kao što je prikazano u tablici br. 3.

Vremenski interval	1 h
BPC 157 (μg) i.p.	5
BPC 157 (μg) i.p. + L-arginin i.p.	5
BPC 157 (μg) i.p. + L-NAME i.p.	5
BPC 157 (μg) i.p. + L-NAME i.p. + L-arginin i.p.	5
0,9% NaCl i.p. + L-arginin i.p.	5
0,9% NaCl i.p. + L-NAME i.p.	5
0,9% NaCl i.p. + L-NAME i.p. + L-arginin i.p.	5
0,9% NaCl i.p.	5

**Tablica br. 3.** Sumarni prikaz skupina životinja i vremenskih perioda, istovremena peroralna i intragastrična primjena 96%-tnog alkohola.

Nakon tretiranja, životinje su vraćene u vivarij, a hranu i vodu su dobivale slobodno. Tlakovi sfinktera (DES i PS) mjereni su u oćoj anesteziji induciranoj sa Ketamin-HCL 50 mg/kg i.p. + Xylazin-HCL 10 mg/kg i.p. što je inaće dostatno za 30 minuta opće anestezije u štakora. Anestezija je administrirana neposredno prije pristupanja mjeranju vrijednosti tlakova sfinktera (5 minuta prije), a trajala je sve dok se navedene vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i pilorićkog sfinktera nisu izmjerile i dok životinja nije ųrtvovana aplikacijom veće doze anestetika (5 ml Thiopental). ųrtvovanje životinja učinjeno je primjenom veće doze anestetika (Thiopental 5 ml) u skladu sa svim etićkim normama i naćelima te dozvolama dobivenim od nadleųnog etićkog povjerenstva i to u vremenskim periodima od 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h i 24 h prilikom peroralne primjene 96%-tnog alkohola; nakon 1 h kod intragastrićne primjene 96%-tnog alkohola putem orogastrićne sonde te nakon 1 h kod primjene 96%-tnog alkohola u kombinaciji peroralno i intragastrićki.

### **4.3. Vrednovanje ućinka**

#### **4.3.1. Utvrđivanje vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog (DES) i pilorićkog sfinktera (PS) prije ųrtvovanja životinja**

U zasebnoj skupini životinja, u skladu sa prethodno korištenom procedurom [61, 62] kako bi se direktno procjenio tlak donjeg ezofagealnog sfinktera i pilorićnog sfinktera, u dubokoj općoj anesteziji implantirao se Foleyev kateter sve do ųeluca, kroz usta (procjena tlaka donjeg ezofagealnog sfinktera) ili duodenalnu inciziju (procjena tlaka pilorićnog sfinktera) te je ućinjena manometrijska evaluacija (cm H<sub>2</sub>O) sa vodenim manometrom spojenim na drenaųni ulaz Foleyevog katetera. Vrijednosti od 68-76 cm H<sub>2</sub>O za donji ezofagealni sfinkter i 68-74 cm H<sub>2</sub>O za pilorićki sfinkter smatrane su normalnima kao ųto je prije odrećeno [61, 62].

Proksimalni kraj ezofagealne ili distalni kraj duodenalne incizije je bio ligiran kako bi se prevenirala regurgitacija.

Nakon žrtvovanja životinja, prepariranjem i evisceracijom cijelog preparata koji se sastoji od jezika sa dnom usne šupljine, jednjaka, želuca i duodenuma te nakon otvaranja duodenuma, želuca po njegovoj velikoj krivini i jednjaka po njegovoj uzdužnoj osi započeta su daljnja makroskopska mjerenja i histološka analiza.

#### **4.3.2. Makroskopska analiza**

Makroskopska analiza obuhvaćala je određivanje i mjerenje veličine odnosno površine lezija organa gornjeg GI trakta i to jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika s posebnim osvrtom na evaluaciju hiperemije, edema, ulkusa i aplaniranosti želučanih plika/ruga na način koji je opisan u ranijim radovima [12, 18]. Za verificiranje konačne veličine oštećenja bio je korišten precizni šestar i najveći promjer lezije izmjeren u mm iz čega je potom određena površina lezije u mm<sup>2</sup>. Odmah nakon evisceracije preparati su rašireni na stiropornoj podlozi i fiksirani pribadačama bez velike tenzije; promjene su dokumentirane digitalnim fotoaparatom (Olympus mju 300 digital) i mikrokamerom USB Digital Microscope 800x, color CMOS sensor, high speed DSP (16 bit), resolution 1280x960, SX digital zoom USB 2.0. compatible, China (mainland) te je potom odmah određena površina detektiranih lezija nakon čega su preparati fiksirani formalinom po već poznatom protokolu [34].

#### **4.3.3. Histološka analiza**

Neposredno nakon žrtvovanja životinja uzeti su uzorci tkiva jezika, jednjaka, želuca i duodenuma koji su potom fiksirani pribadačama za stiroporsku podlogu uz minimalnu tenziju i nakon toga fiksirani formalinom po već poznatom protokolu [34]; sa svake lokacije uzet je

uzorak sa najtežom lezijom kroz njezinu sredinu uključujući i rub. Slijedilo je rezanje parafinskih kocki na kliznom mikrotomu na debljinu od 4 mikrometra. Preparati su bojani hematoksilinom i eozinom. Uzorke su analizirali iskusni promatrači koji nisu bili upoznati s porijeklom materijala. U histološkoj analizi korišten je specijalni program ISSA (VAMSTEC Software Company, Zagreb, Hrvatska) [61, 62]. Vršila se histološka evaluacija promjena (erozija/ulkus), određivalo se prisutstvo ili odsutnost upalnih promjena tkiva odnosno upalnih stanica i karakter tkivnih defekata uočenih makroskopskom analizom (erozija/ulkus).

#### **4.4. Statistička analiza**

Za statističku obradu korišten je program STATISTICA 7.1 (StatSoft, Inc, Tulsa, USA). Podaci su bili testirani Kolmogorov-Smirnoff testom za procjenu distribucije podataka. U slučaju normalne distribucije, bio je primijenjen one-way ANOVA test sa Newman-Keuls post hoc testom, dok je u slučaju nenormalne distribucije, bio primijenjen Kruskal-Wallis test sa Mann-Whitney post hoc testom. Razina značajnosti bila je  $p < 0.05$ . Podaci su prikazani grafički.

## **5. REZULTATI**

### **5.1. Kontrola, alkohol per os**

U kontrolnoj skupini životinja došlo je do razvoja većih oštećenja jezika (slike 1, 18), jednjaka (slike 3, 19), želuca (slike 5, 20) i duodenuma (slike 7, 21). Jezik, jednjak i duodenum su se prezentirali sa ekstenzivnim crvenilom dok je na želucu vidljiva dodatna kongestija u njegovom cijelom glandularnom dijelu uz prisutnu očuvanu sluznicu, ulkusi nisu nađeni. Lezije su se prezentirale od samog početka i bile su prisutne sve do zadnjeg istraživanog vremenskog perioda odnosno do kraja pokusa. Baza jezika je slabije prokrvljena kod životinja iz kontrolne skupine životinja nego što je to slučaj kod BPC 157 životinja. Životinje su bile sedirane učinkom 96%-tnog alkohola sa značajno otežanim disanjem, a vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile niže od onih u normalnih štakora (slike 22, 23).

### **5.2. Pentadekapeptid BPC 157, alkohol per os**

#### **5.2.1. Pentadekapeptid BPC 157 (mikrogrami), alkohol per os**

U skupini životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157, mikrogramska doza, došlo je do razvoja značajno manjih oštećenja jezika (slike 2, 18), jednjaka (slike 4, 19), želuca (slike 6, 20) i duodenuma (slike 8, 21) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, baza jezika je bolje prokrvljena u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, životinje su bile živahnije u odnosu na kontrolu uz znakove normalnog disanja, a vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile znatno više u odnosu na kontrolnu skupinu (slike 22, 23). Navedeno vrijedi za sve istraživane vremenske periode počevši od prve minute.



### 5.2.2. Pentadekapeptid BPC 157 (nanogrami), alkohol per os

Pentadekapeptid BPC 157 u nanogramskim dozama ima sličan ili gotovo jednak učinak kao i mikrogramske doze BPC-a 157. Dolazi do pojave sličnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i duodenuma kao i kod mikrogramske doze (znatno manjih u odnosu na kontrolnu skupinu), životinje su bile slično aktivne kao i životinje tretirane mikrogramske doze BPC 157 uz znakove normalnog disanja, a vrijednosti tlakova DES-a i PS-a su bile znatno više u odnosu na kontrolnu skupinu (slike 18-23). Navedeno vrijedi za sve istraživane vremenske periode počevši od prve minute.

### 5.3. L-arginin, alkohol per os

L-arginin je doveo do pojave znatnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na pentadekapeptid BPC 157, jednakih ili nešto manjih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, životinje su bile u nešto blažem stanju sedacije u odnosu na kontrolu, a vrijednosti tlakova DES-a i PS-a su bile minimalno veće u odnosu na kontrolnu skupinu, ali znatno manje u odnosu na BPC 157 (slike 18-23).

### 5.4. L-NAME, alkohol per os

U skupini životinja tretiranih sa L-NAME došlo je do pojave ekstenzivnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika, sličnih ili minimalno većih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, životinje su bile duboko sedirane učinkom 96%-tnog alkohola, a vrijednosti donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile slične ili minimalno niže u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 18-23).

### **5.5. L-NAME+L-arginin, alkohol per os**

U skupini životinja tretiranih istovremenom kombinacijom L-NAME i L-arginina došlo je do razvoja teških oštećenja jezika, jednjaka, želuca i duodenuma usporedivih sa kontrolnom skupinom životinja, životinje su bile sedirane jednako kao i kod kontrolne skupine životinja, a vrijednosti DES-a i PS-a su bile vrlo slične vrijednostima tlakova sfinktera u kontrolnoj skupini (slike 18-23).

### **5.6. L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os**

U skupini životinja tretiranih L-arginin-om i BPC 157 došlo je do znatno manjeg nastanka oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolu skupinu i samostalnu primjenu L-arginin-a, a oštećenja su usporediva sa skupinom životinja tretiranih sa BPC 157 ( $\mu$ g i ng), životinje su se ponašale kao i grupa tretirana sa pentadekapeptidom BPC 157, a vrijednosti DES-a i PS-a su bile usporedive sa BPC 157 grupom životinja (slike 18-23).

### **5.7. L-NAME i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os**

U skupini životinja tretiranih kombinacijom L-NAME i pentadekapeptida BPC 157 došlo je do razvoja lezija sličnih onima u BPC 157 skupini ( $\mu$ g i ng) i L-arginin + BPC 157 grupi životinja, značajno manjih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, životinje su se ponašale slično životinjama iz BPC 157 grupe, a vrijednosti DES-a i PS-a bile su usporedive sa vrijednostima tlakova sfinktera BPC157 grupe životinja (slike 18-23).

### **5.8. L-NAME, L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os**

U skupini životinja tretiranih sa L-NAME, L-arginin i BPC 157 došlo je do razvoja lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika usporedivih sa onima iz skupine životinja tretiranih sa BPC 157 i njegovim kombinacijama sa L-arginin i/ili L-NAME, manjim u odnosu na kontrolnu

skupinu životinja, životinje su se ponašale slično životinjskim grupama tretiranim sa pentadekapeptidom BPC 157 i njegovim kombinacijama sa L-NAME i/ili L-arginin, a slične navedenim skupinama životinja bile su i vrijednosti tlakova DES-a i PS-a (slike 18-23).

### **5.9. Kontrola, alkohol i.g.**

U kontrolnoj skupini životinja kod intragastričke primjene alkohola putem orogastrične sonde došlo je do pojave jačeg oštećenja jezika (slika 24), jednjaka (slika 25), želuca (slike 9, 26) i duodenuma (slike 11, 27). Na želucu su vidljive ekstenzivne hemoragične ulceracije u njegovom cijelom glandularnom dijelu dok je na jeziku, jednjaku i duodenumu vidljiva ekstenzivna hiperemija odnosno crvenilo. Životinje su bile sedirane učinkom 96%-tnog alkohola sa značajno otežanim disanjem, a vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile niže od onih u normalnih štakora (slike 28, 29).

### **5.10. Pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol i.g.**

U skupini životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157, mikrogramska doza, došlo je do razvoja značajno manjih oštećenja jezika (slika 24), jednjaka (slika 25), želuca (slike 10, 26) i duodenuma (slike 12, 27) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, životinje su bile živahnije u odnosu na kontrolu uz znakove normalnog disanja, a vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile znatno više u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 28, 29).

### **5.11. Kontrola, alkohol per os+i.g.**

U kontrolnoj skupini životinja kod istovremene peroralne i intragastričke primjene alkohola putem orogastrične sonde došlo je do pojave jačeg oštećenja jezika (slika 30), jednjaka (slika

31), želuca (slike 13, 32) i duodenuma (slika 33). U usporedbi sa izravnom intragastričnom aplikacijom 96%-tnog alkohola, kod štakora koji su inicijalno tretirani sa peroralnim 96%-tnim alkoholom neposredno prije izravne intragastrične primjene 96%-tnog alkohola na želucu je vidljiva značajna atenuacija hemoragičnih ulceracija u njegovom cijelom glandularnom dijelu dok se na jeziku vidi slično, a na jednjaku i duodenumu manje ekstenzivno crvenilo. Životinje su bile sedirane učinkom 96%-tnog alkohola sa značajno otežanim disanjem, a vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile niže od onih u normalnih štakora (slike 34, 35).

#### **5.12. Pentadekapeptid BPC 157 µg, alkohol per os+i.g.**

U skupini životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157, mikrogramska doza, alkohol per os+i.g., došlo je do razvoja značajno manjih oštećenja jezika (slika 30), jednjaka (slika 31), želuca (slike 14, 32) i duodenuma (slika 33) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, životinje su bile živahnije u odnosu na životinje iz kontrole skupine uz znakove normalnog disanja, a vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile znatno više u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 34, 35).

#### **5.13. L-arginin, alkohol per os+i.g.**

L-arginin zajedno sa alkoholom per os+i.g. doveo je do pojave znatnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na životinje tretirane sa pentadekapeptidom BPC 157, iako nešto manjih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 30-33), životinje su bile u nešto blažem stanju sedacije u odnosu na kontrolu, a vrijednosti tlakova DES-a i PS-a su bile slične kontrolnoj skupini životinja odnosno niže u odnosu na BPC 157 skupinu životinja (slike 34, 35).

#### **5.14. L-NAME, alkohol per os+i.g.**

U skupini životinja tretiranih sa L-NAME i alkoholom per os+i.g. došlo je do pojave ekstenzivnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika, u pravilu nešto većih u odnosu na kontrolnu skupinu (slike 30-33), životinje su bile duboko sedirane učinkom 96%-tnog alkohola, a vrijednosti donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera su bile nešto niže u odnosu na kontrolnu skupinu (slike 34, 35).

#### **5.15. L-NAME i L-arginin, alkohol per os+i.g.**

U skupini životinja tretiranih istovremenom kombinacijom L-NAME i L-arginina te alkoholom per os+i.g. došlo je do razvoja teških oštećenja jezika, jednjaka, želuca i duodenuma, lezije jezika i jednjaka su bile manje u odnosu na kontrolnu skupinu dok su lezije želuca i dvanaesnika bile istovjetne kontrolnoj skupini ili nešto više (slike 30-33), životinje su bile sedirane jednako kao i kod kontrolne skupine životinja, a vrijednosti DES-a su bile nešto niže u odnosu na kontrolu (slika 34) dok su vrijednosti PS-a bile slične vrijednostima tlakova sfinktera u kontrolnoj skupini životinja (slika 35).

#### **5.16. L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os+i.g.**

U skupini životinja tretiranih L-arginin-om i BPC 157 te alkoholom per os+i.g. došlo je do znatno manjeg nastanka oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolu skupinu i samostalnu primjenu L-arginin-a, a oštećenja su usporediva sa skupinom životinja tretiranih sa BPC 157 (slike 30-33), životinje su se ponašale kao i grupa tretirana sa pentadekapeptidom BPC 157, a vrijednosti DES-a i PS-a su bile usporedive sa BPC 157 grupom, više od kontrolne skupine životinja (slike 34, 35).

#### **5.17. L-NAME i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os+i.g.**

U skupini životinja tretiranih kombinacijom L-NAME i pentadekapeptida BPC 157 te alkoholom per os+i.g. došlo do je do razvoja lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika manjih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 30-33), životinje su se ponašale slično BPC 157 grupi, a vrijednosti DES-a i PS-a su bile više u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 34, 35).

#### **5.18. L-NAME, L-arginin i pentadekapeptid BPC 157 $\mu$ g, alkohol per os+i.g.**

U skupini životinja tretiranih sa L-NAME, L-arginin i BPC 157 te alkoholom per os+i.g. došlo je do razvoja lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika znatno nižih u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 30-33), životinje su se ponašale slično grupama tretiranim sa pentadekapeptidom BPC 157 i njegovim kombinacijama sa L-NAME i/ili L-arginin, a vrijednosti tlakova DES-a i PS-a su bile više u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slike 34, 35).

#### **5.19. Histološka analiza preparata**

Intragastrična instilacija 96%-tnog alkohola [12]

Mikroskopska analiza pokazala je da je kod kontrolne skupine životinja došlo do pojave nekrotizirajućih areala koje su zahvaćale cijelu debljinu sluznice želuca. Viđeni su znakovi regeneracije na površini sluznice, ali nije došlo do restitucije epitela. Ova ekstenzivna destrukcija epitela također je potvrđena transmisijskim elektronskim mikroskopom. Mnoge superficijalne epitelne stanice pokazale su znakove različitih stadija degeneracije sa poremećenim organelama i pojačanom produkcijom sluzi. Kod životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 uzorak ozljeda se razlikovao od onoga prisutnog u kontrolnoj

skupini životinja. Površinski epitel je pokazivao znakove manjih oštećenja tijekom cijelog trajanja istraživanja i većina lezija nije se širila dalje od gornjeg dijela želučanih žlijezda. Također je zamjećena značajno manja kongestija i manja hemoragija. Viđena su i područja duboke nekroze kao i „submukozni ulkusi“ koji predstavljaju nekrotične areale pokrivena sa intaktnom sluznicom. Transmisijskim elektronskim mikroskopom također je utvrđeno kako je, unatoč određenim degenerativnim promjenama epitelnih stanica, kohezija stanica mnogo bolje očuvana nego u kontrolnoj skupini životinja. Ovi rezultati su dodatno potvrđeni skenirajućim elektronskim mikroskopom na kojem je verificirana ekscesivna denudacija bazalne membrane kod kontrolne skupine životinja, ali ne i kod životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157. Histološka analiza kod drugih doza primjenjenih agenasa bili su u potpunosti u korelaciji sa podacima dobivenim vizualnom opservacijom.

Primjena 96%-tnog alkohola per os

Na uzorcima jezika (2 sata) se u kontrolnih životinja može uočiti jače izražen edem strome i poprečno-prugastog mišića, dok se u obje skupine (kontrolnoj i tretiranoj pentadekapeptidom BPC 157) nalaze blage reaktivne promjene epitela te nejednoliko raspoređene, oskudne, nakupine polimorfonuklearnih upalnih stanica u površinskim dijelovima mišića. U ostalim organima histološki se ne nalazi bitnije razlike između kontrolne i tretirane skupine, a vidljive promjene očituju se u diskretnom edemu lamine proprije.

Nakon 24 sata na jeziku kontrolnih životinja vidljiv je izraženiji edem strome i poprečno-prugastog mišića, dok se u obje skupine životinja (kontrolna i tretirana pentadekapeptidom BPC 157 skupina životinja) vide blaže reaktivne promjene na površinskom epitelu. Također, rijetko, nejednoliko raspoređeno nakupljanje polimorfonuklearnih upalnih stanica vidljivo je u površinskom dijelu mišića u obje skupine životinja. U drugim organima (jednjak, želudac,

dvanaesnik) vidljiv je blagi edem lamine proprije, bez razlike između kontrolne i tretirane skupine životinja.

Slike 1 i 2: Karakterističan makroskopski izgled oštećenja jezika kod životinja iz kontrolne skupine životinja (slika 1) i skupine životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (slika 2) nakon 24 h, peroralna primjena 96%-tnog alkohola. Tretirane životinje sa BPC 157 nemaju ili imaju tek neznatna oštećenja jezika dok kontrolna skupina životinja ima izražena oštećenja jezika sa vidljivim edematoznim i hiperemičnim arealima i oštećenjima. Baza jezika je slabije prokrvljena kod životinja iz kontrolne skupine nego što je to slučaj kod BPC 157 životinja.

Kontrola



Slika 1

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Slika 2



Slike 3 i 4: Karakterističan prikaz oštećenja jednjaka u kontrolnoj i sa BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ) tretiranoj skupini životinja, peroralna primjena 96%-tnog alkohola, nakon 24 h. Kontrolna skupina životinja (slika 3) i tretirana skupina životinja sa BPC 157 (slika 4) nakon 24h. Životinje tretirane sa pentadekapeptidom BPC 157 nemaju ezofagitisa ili imaju tek naznačen edem sluznice dok kontrolna skupina životinja ima veća oštećenja jednjaka sa brojnim hiperemičnim lezijama.

Kontrola



Slika 3

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Slika 4

Slike 5 i 6: Karakterističan prikaz oštećenja želuca u životinja kontrolne skupine (slika 5) i skupine životinja tretiranih sa BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (slika 6) nakon 24h, peroralna primjena 96%-tnog alkohola. Životinje tretirane sa BPC-om 157 imaju znatno manja oštećenja u odnosu na kontrolu kod koje je lezijom zahvaćena veća površina želuca, plike/ruge su aplanirane, a vidljivo je i crvenilo u smislu hiperemije. Želučani ulkusi nisu nađeni.

Kontrola



Slika 5

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Slika 6

Slike 7 i 8: Karakterističan prikaz oštećenja dvanaesnika kod životinja iz kontrolne skupine (slika 7) i životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (slika 8), peroralna primjena 96%-tnog alkohola, 24 h. BPC 157 grupa životinja ima minimalna oštećenja dvanaesnika dok su u kontrolnoj skupini životinja vidljive veće hiperemične i ponegdje djelomično hemoragične lezije sa koalescentnim žučkastim područjima oštećenja.

Kontrola

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Slika 7

Slika 8

Slike 9 i 10: Karakterističan prikaz oštećenja želuca kod intragastrične primjene 96%-tnog alkohola u kontrolnoj skupini (slika 9) i skupini životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (slika 10), vremenski period 1 h. Vidljiva je značajna razlika u jačini oštećenja kontrolne skupine i skupine životinja tretirane sa pentadekapeptidom BPC 157 gdje su oštećenja značajno manja. Evidentirani su hemoragični želučani ulkusi.

Kontrola



Slika 9

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Slika 10

Slike 11 i 12: Karakterističan prikaz oštećenja dvanaesnika kod intragastrične primjene 96%-tnog alkohola u kontrolnoj skupini (slika 11) i skupini životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (slika 12), vremenski period 1 h. Vidljiva je značajna razlika u jačini oštećenja kontrolne skupine i skupine životinja tretirane sa pentadekapeptidom BPC 157 gdje su oštećenja značajno manja.

Kontrola



Slika 11

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Slika 12

Slike 13 i 14: Karakterističan prikaz oštećenja želuca kod peroralne i intragastrične primjene 96%-tnog alkohola u kontrolnoj skupini (slika 13) i skupini životinja tretiranih sa pentadekapeptidom BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (slika 14), vremenski period 1 h. Vidljiva je značajna razlika u jačini oštećenja kontrolne skupine i skupine životinja tretirane sa pentadekapeptidom BPC 157 gdje su oštećenja značajno manja.

Kontrola



Slika 13

BPC 157,  $\mu\text{g}$



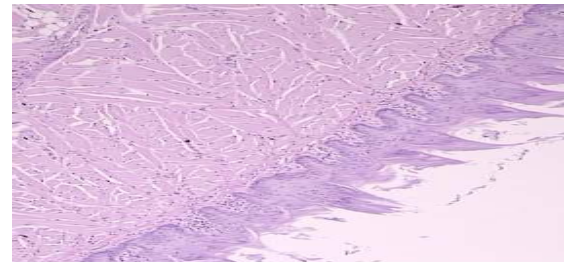
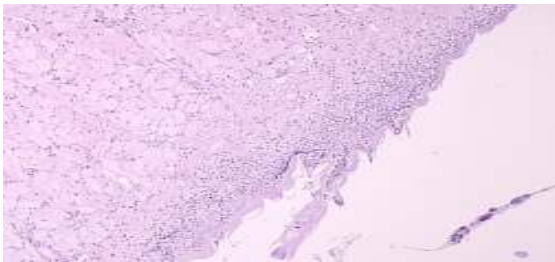
Slika 14

Slika 15: Karakterističan histološki prikaz preparata, alkohol per os.

Na uzorcima tkiva iz područja korijena jezika kontrolnih životinja (24h) vidljivo je stanjenje površinskog epitela sa žarišnim nakupinama upalnih polimorfonuklearnih stanica subepitelno te područjima krvarenja i edemom mišićnog sloja (A). Kod životinja tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ), (24h) na području korijena jezika nalazi se očuvani površinski epitel, manja žarišta polimorfonuklearnih upalnih stanica i manji edem mišićnog sloja (B). Slične histološke promjene uočene su na distalnom dijelu jednjaka (C, D) te proksimalnom dijelu duodenuma (E, F) gdje se nalaze nakupine polimorfonuklearnih upalnih stanica kod kontrolnih životinja dok se manji broj upalnih stanica nalazi kod tretiranih životinja.

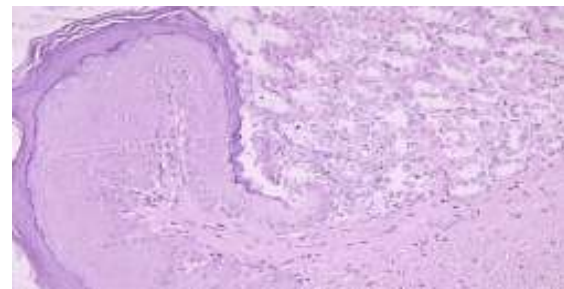
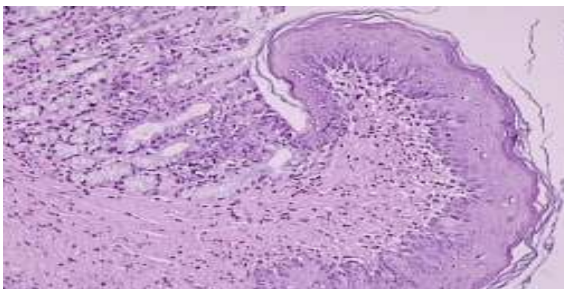
Kontrola

BPC 157,  $\mu\text{g}$



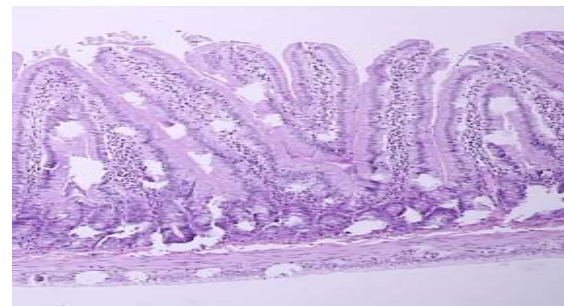
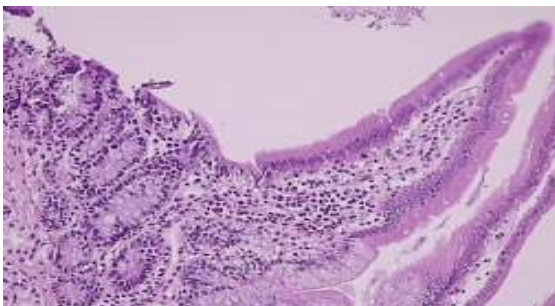
10 x, A

10 x, B



20 x, C

20 x, D



10 x, E

20 x, F

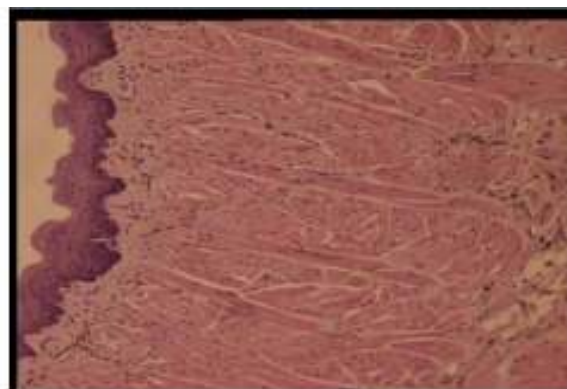
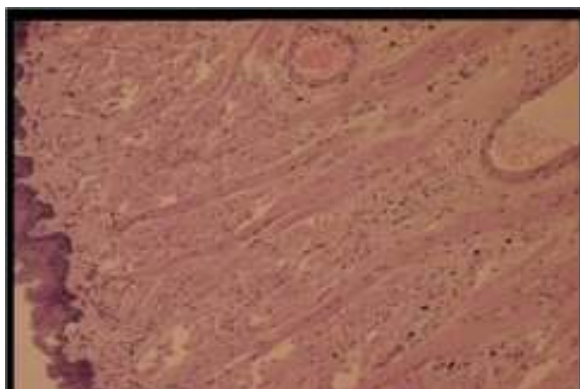
Slika 16: Karakterističan histološki prikaz preparata, alkohol per os.

Jezik štakora, vremenski period od 2 sata, kontrola i pentadekapeptid BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ).

Na uzorcima jezika se u kontrolnih životinja može uočiti jače izražen edem strome i poprečno prugastog mišića, dok se u obje skupine (kontrolnoj i tretiranoj) nalaze blage reaktivne promjene epitela te nejednoliko raspoređene, oskudne, nakupine polimorfonuklearnih upalnih stanica u površinskim dijelovima mišića.

Kontrola

BPC 157,  $\mu\text{g}$



Bojenje HE, originalno povećanje objektiv x10.



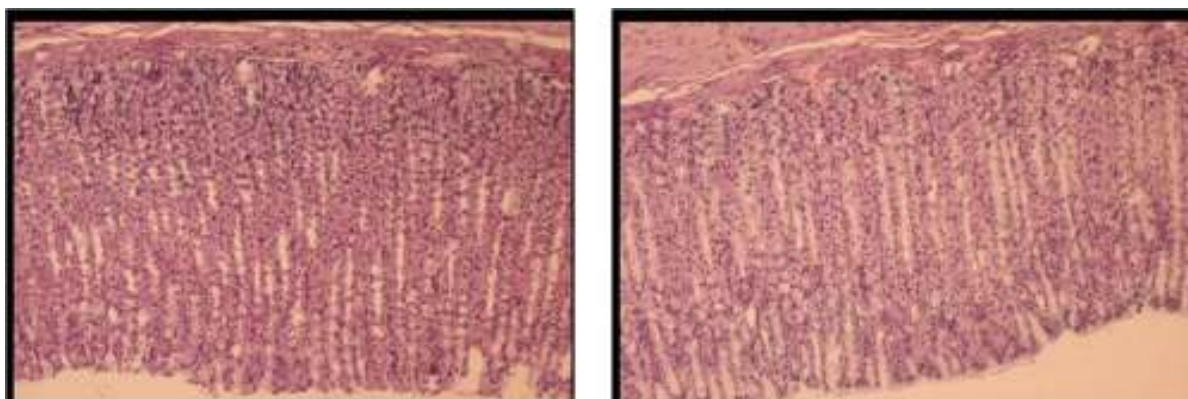
Slika 17: Karakterističan histološki prikaz preparata, alkohol per os.

Želudac štakora, vremenski period od 2 sata, kontrola i pentadekapeptid BPC 157 ( $\mu\text{g}$ ).

Histološki se ne nalazi bitnije razlike između kontrolne i tretirane skupine, a vidljive promjene očituju se u diskretnom edemu lamine proprije.

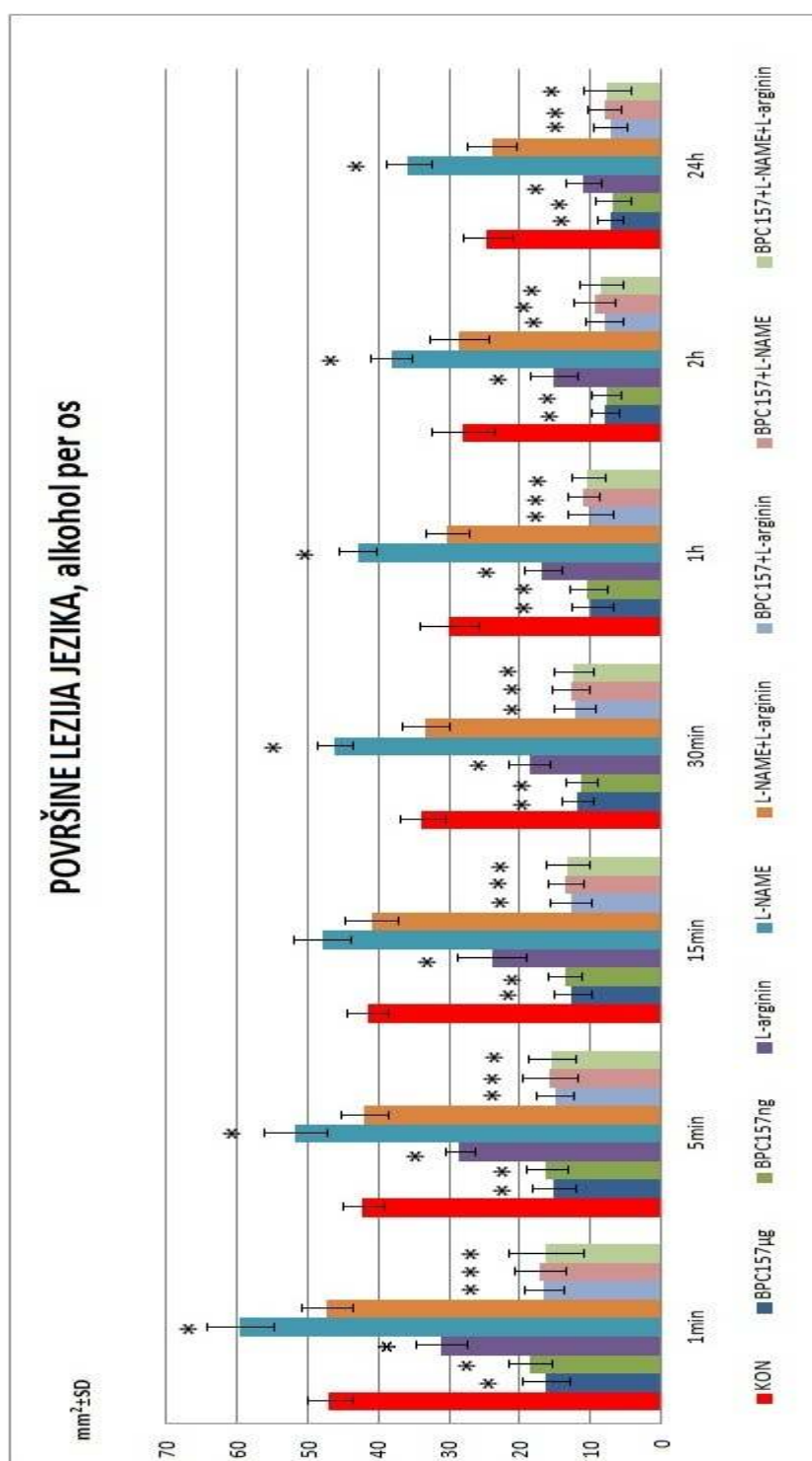
Kontrola

BPC 157,  $\mu\text{g}$

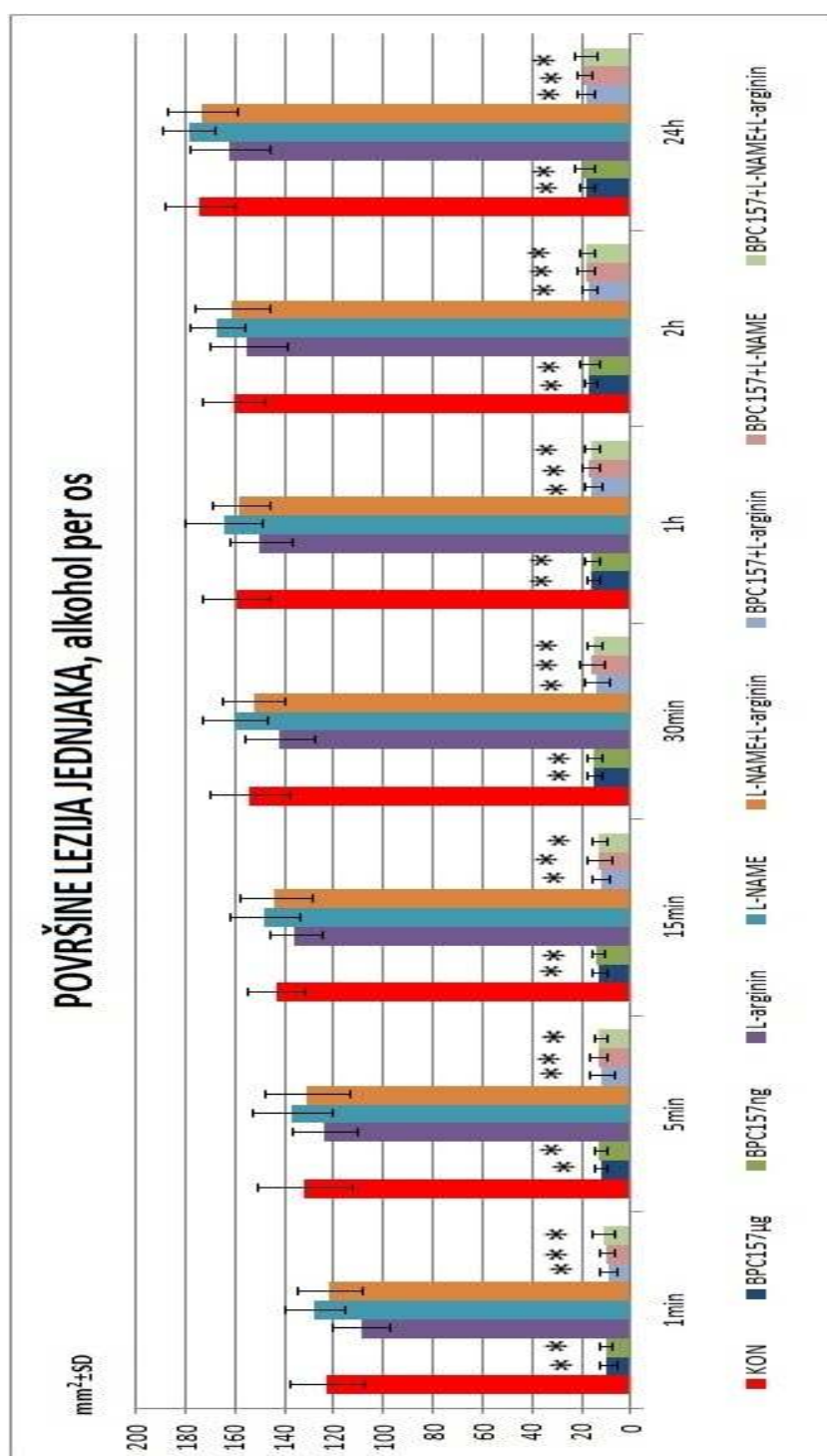


Bojenje HE, originalno povećanje objektiv x10.

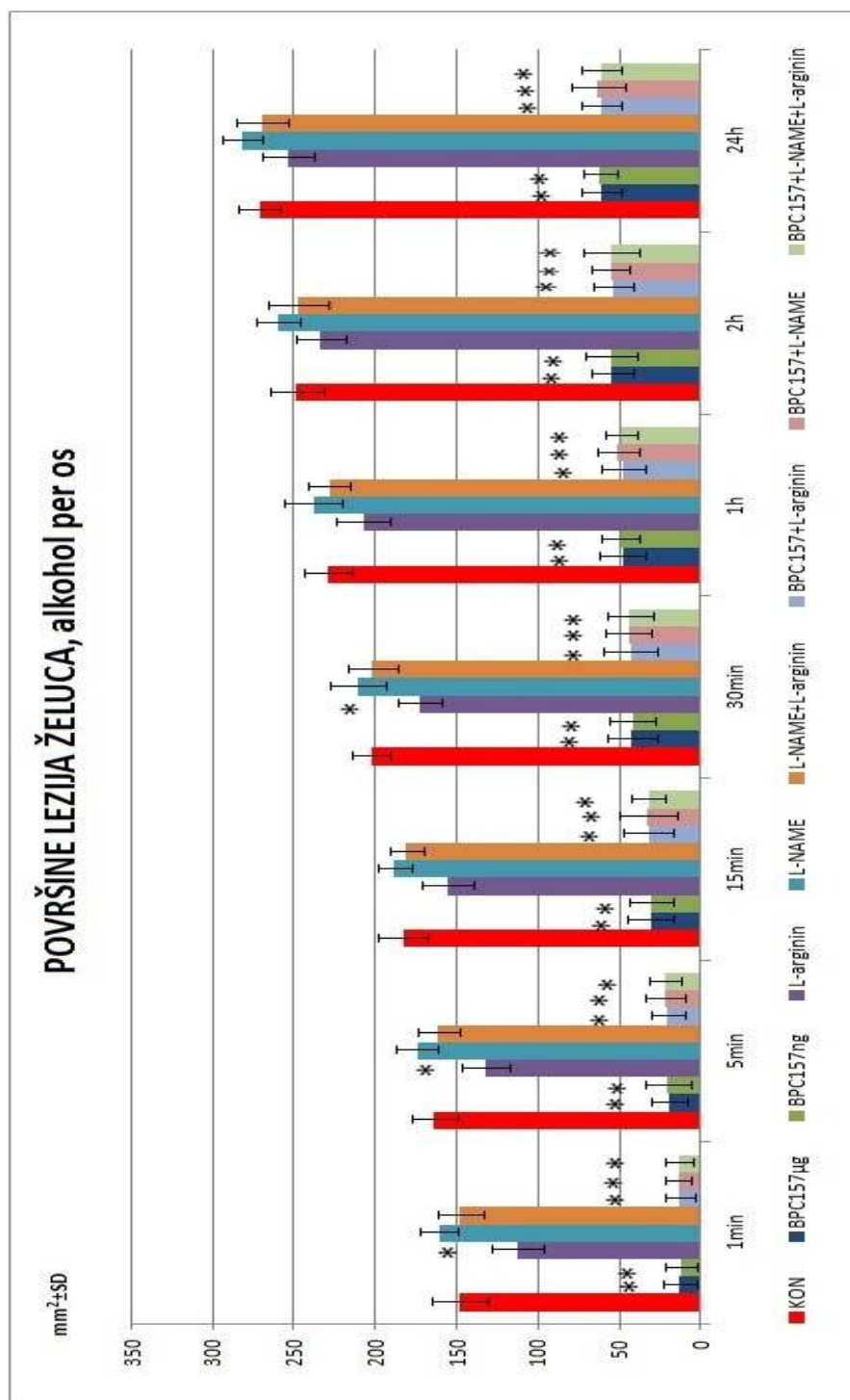
Slika 18: alkohol per os; prikaz distribucije lezija jezika u testiranim vremenskim intervalima, kontrola, BPC 157 mikrogrami, BPC 157 nanogrami, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+ L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



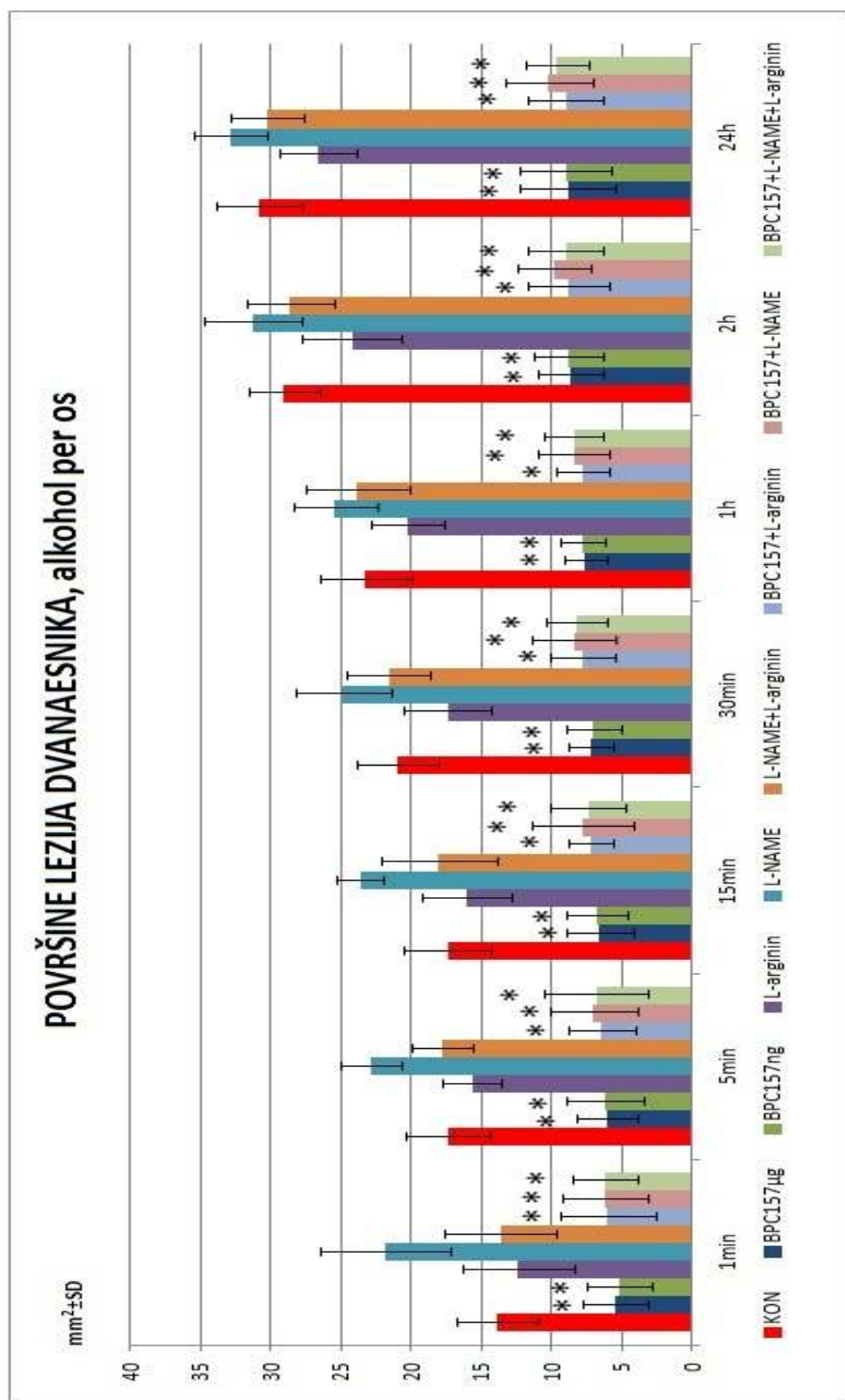
Slika 19: alkohol per os; prikaz distribucije lezija jednjaka u testiranim vremenskim intervalima, kontrola, BPC 157 mikrogrami, BPC 157 nanogrami, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



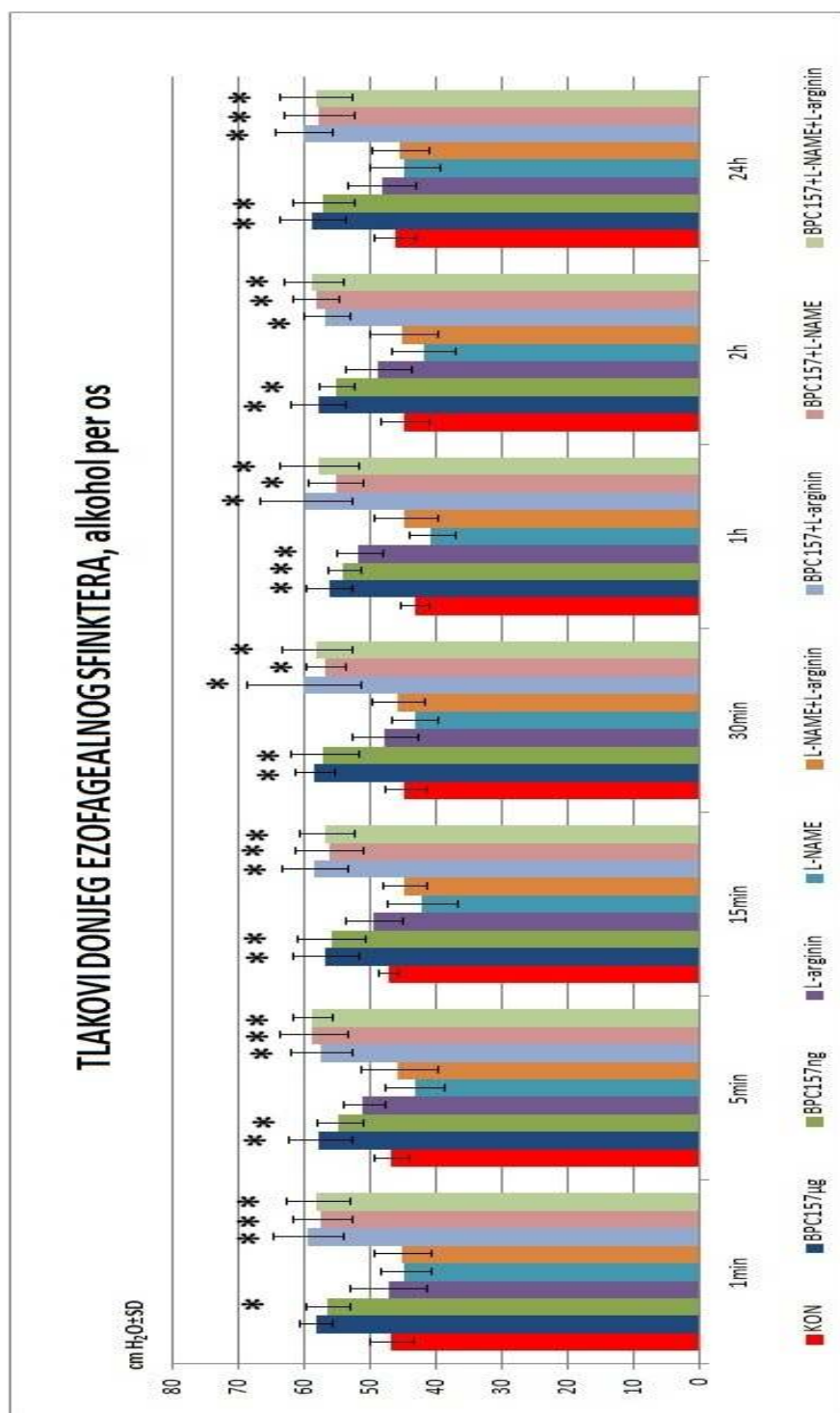
Slika 20: alkohol per os; prikaz distribucije lezija želuca u testiranim vremenskim intervalima, kontrola, BPC 157 mikrogrami, BPC 157 nanogrami, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



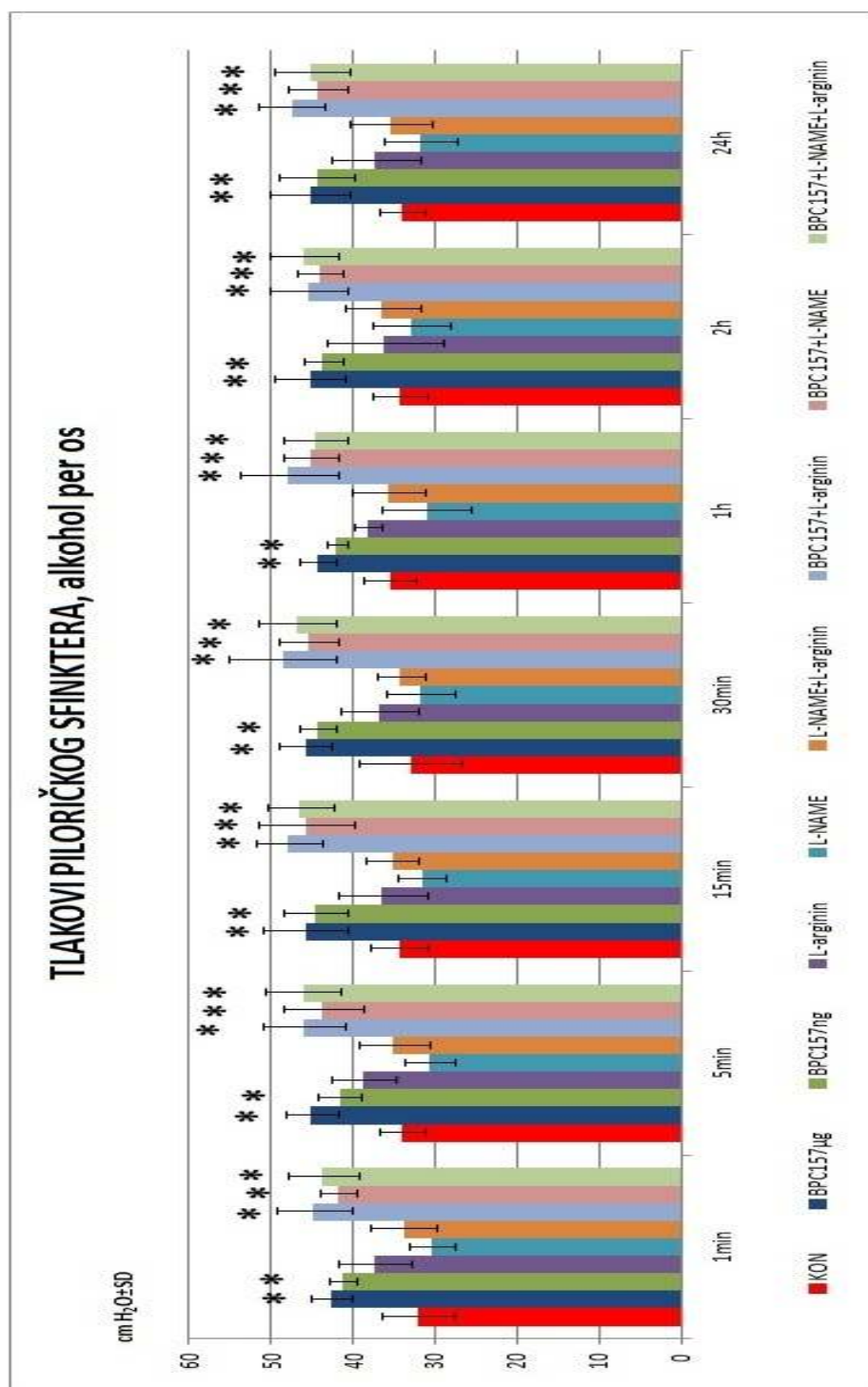
Slika 21: alkohol per os; prikaz distribucije lezija dvanaesnika u testiranim vremenskim intervalima, kontrola, BPC 157 mikrogrami, BPC 157 nanogrami, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



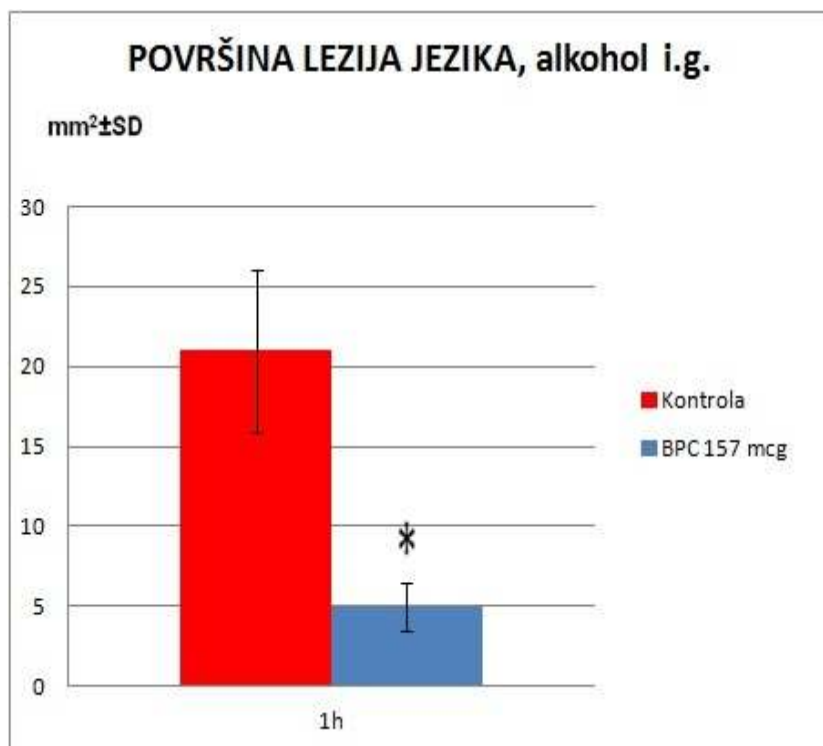
Slika 22: alkohol per os; prikaz distribucije vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog sfinktera (DES) u testiranim vremenskim intervalima, kontrola, BPC 157 mikrogrami, BPC 157 nanogrami, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, cm H<sub>2</sub>O. \* p<0.05.



Slika 23: alkohol per os; prikaz distribucije vrijednosti tlakova piloričkog sfinktera (PS) u testiranim vremenskim intervalima, kontrola, BPC 157 mikrogrami, BPC 157 nanogrami, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, cm H<sub>2</sub>O. \* p<0.05.

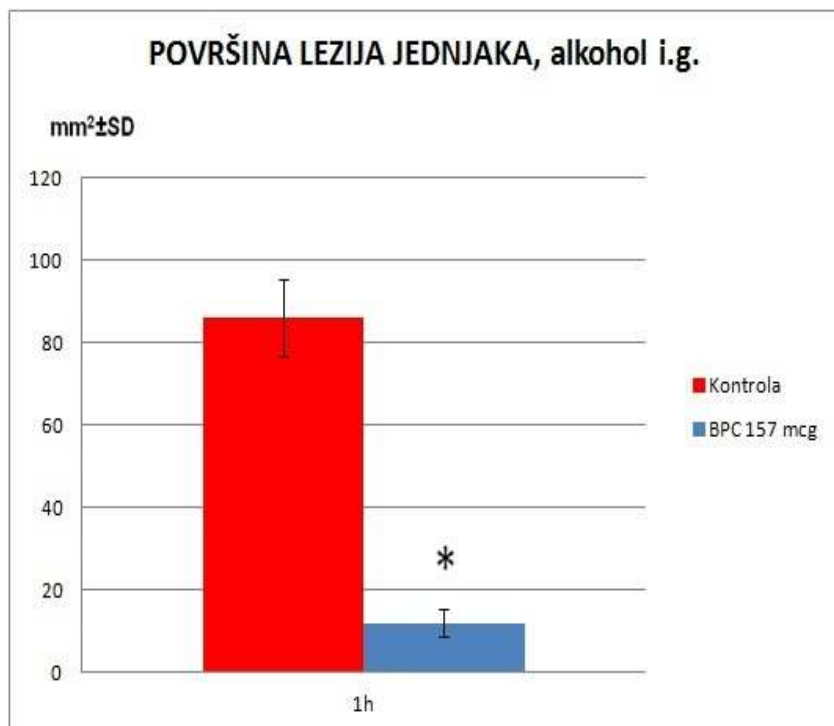


Slika 24: alkohol i.g.; prikaz distribucije lezija jezika u testiranom vremenskom intervalu, kontrola i BPC 157 $\mu$ g. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.

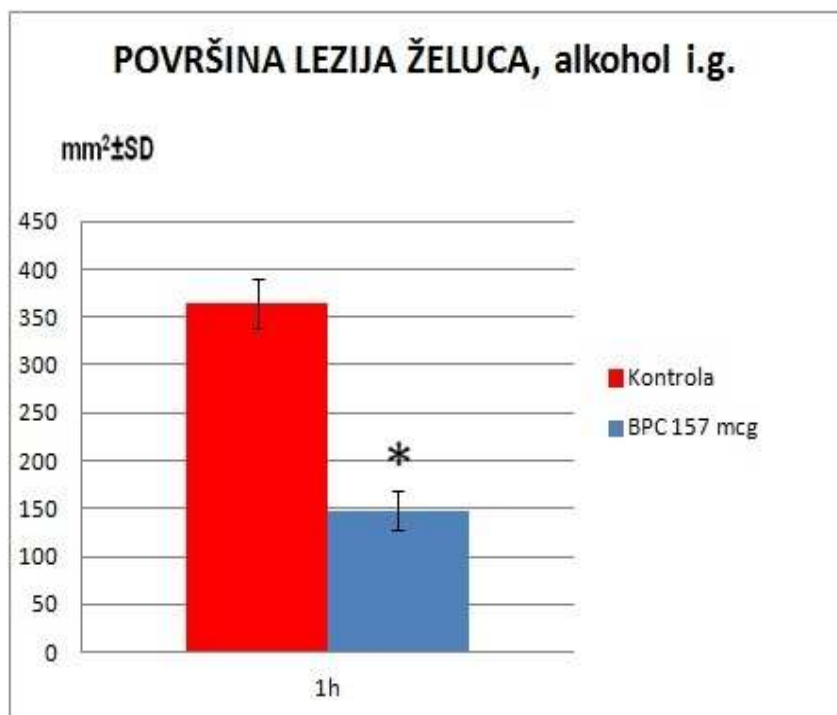




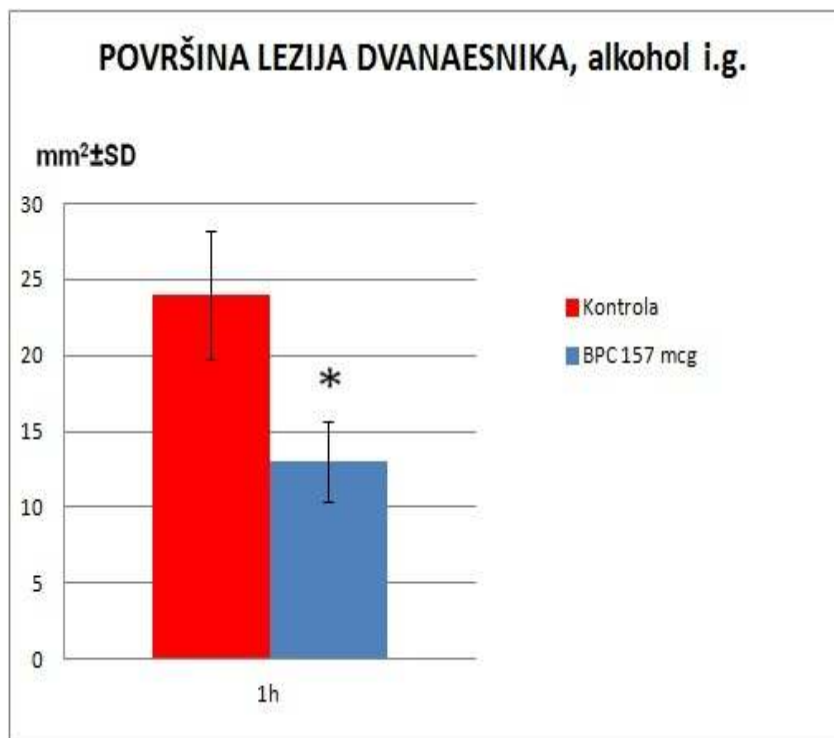
Slika 25: alkohol i.g.; prikaz distribucije lezija jednjaka u testiranom vremenskom intervalu, kontrola i BPC 157 $\mu$ g. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



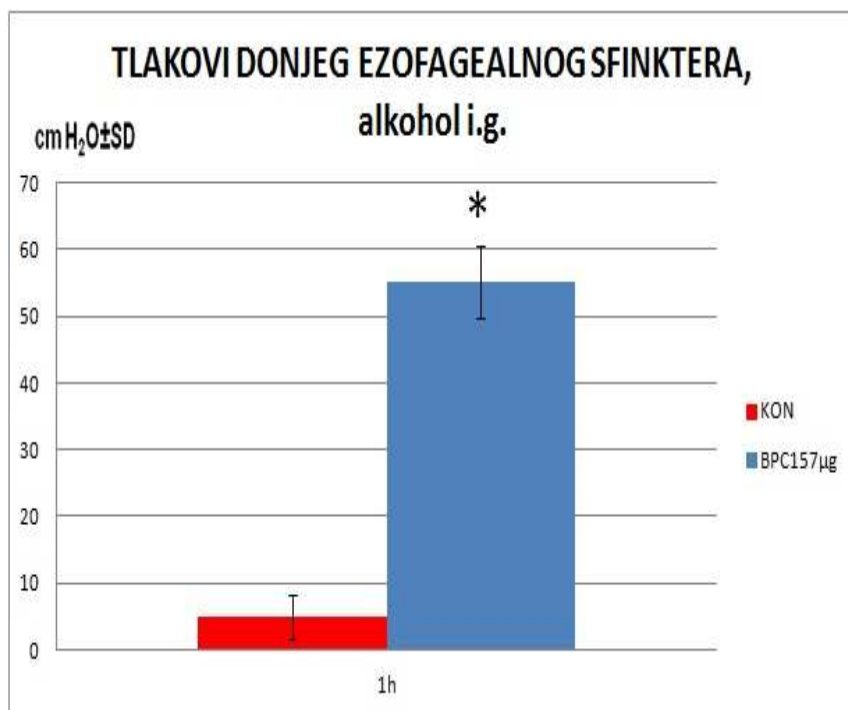
Slika 26: alkohol i.g.; prikaz distribucije lezija želuca u testiranom vremenskom intervalu, kontrola i BPC 157 $\mu$ g. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



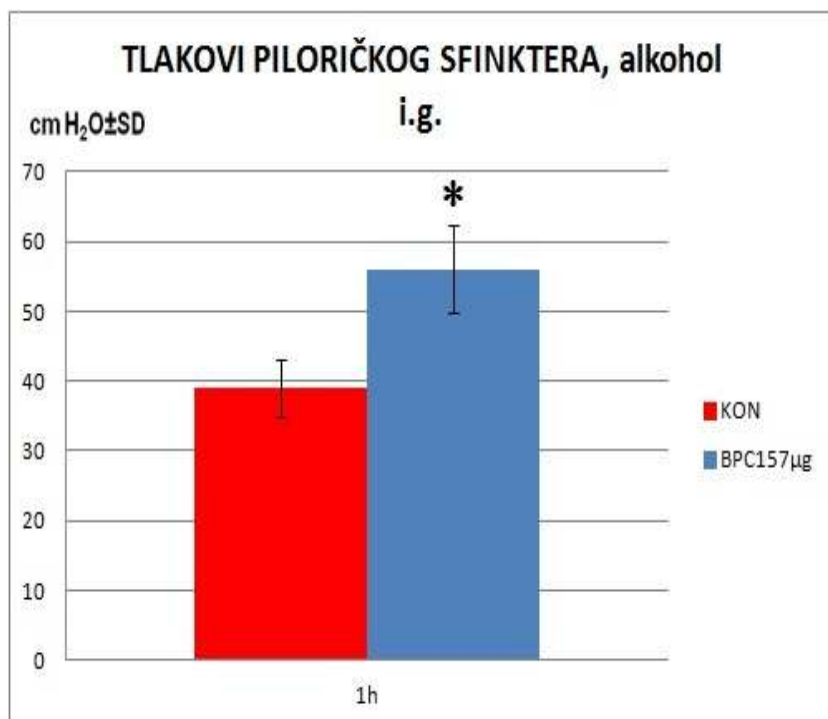
Slika 27: alkohol i.g.; prikaz distribucije lezija dvanaesnika u testiranom vremenskom intervalu, kontrola i BPC 157 $\mu$ g. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



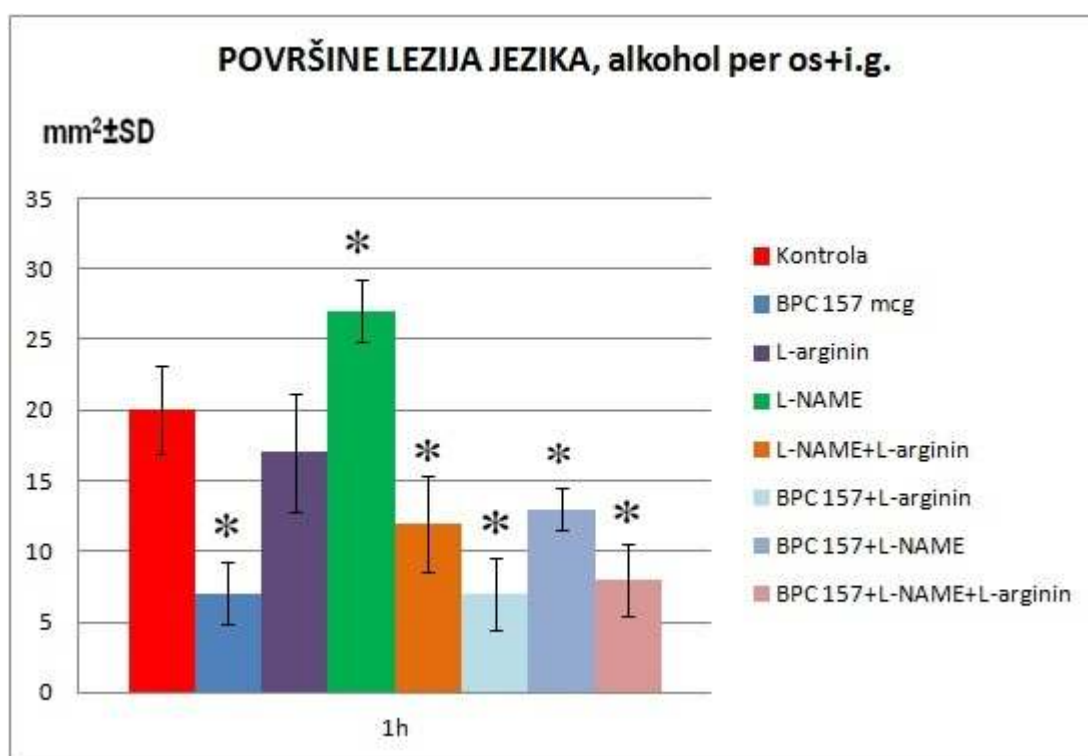
Slika 28: alkohol i.g.; prikaz distribucije vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog sfinktera u testiranom vremenskom intervalu, kontrola i BPC 157 $\mu$ g. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, cm H<sub>2</sub>O. \* p<0.05.



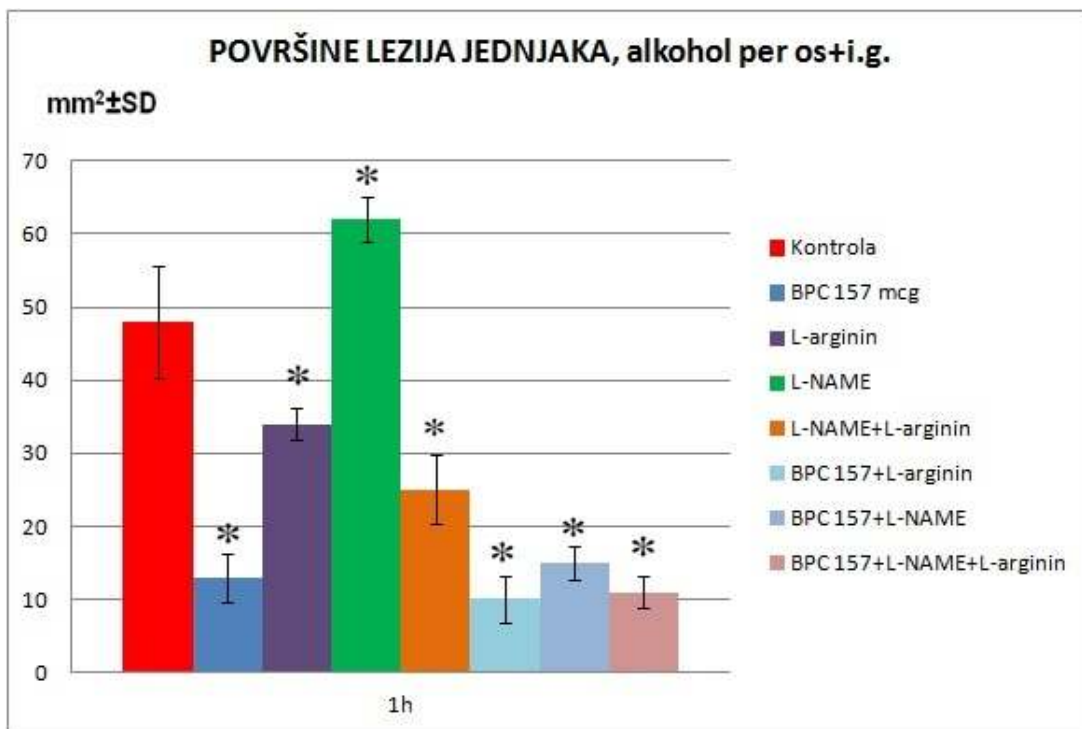
Slika 29: alkohol i.g.; prikaz distribucije vrijednosti tlakova piloričkog sfinktera u testiranom vremenskom intervalu, kontrola i BPC 157 $\mu$ g. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, cm H<sub>2</sub>O. \* p<0.05.



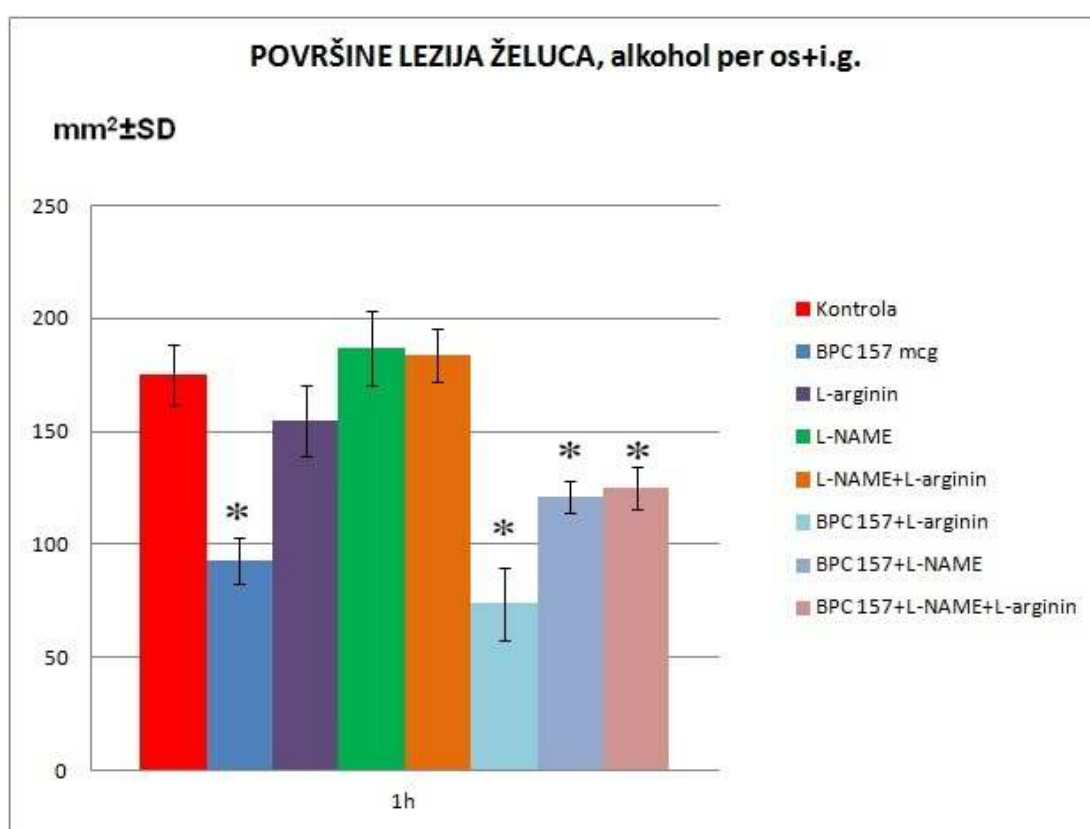
Slika 30: alkohol per os+i.g.; prikaz distribucije lezija jezika u testiranom vremenskom intervalu, kontrola, BPC 157 $\mu$ g, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



Slika 31: alkohol per os+i.g.; prikaz distribucije lezija jednjaka u testiranom vremenskom intervalu, kontrola, BPC 157 $\mu$ g, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.

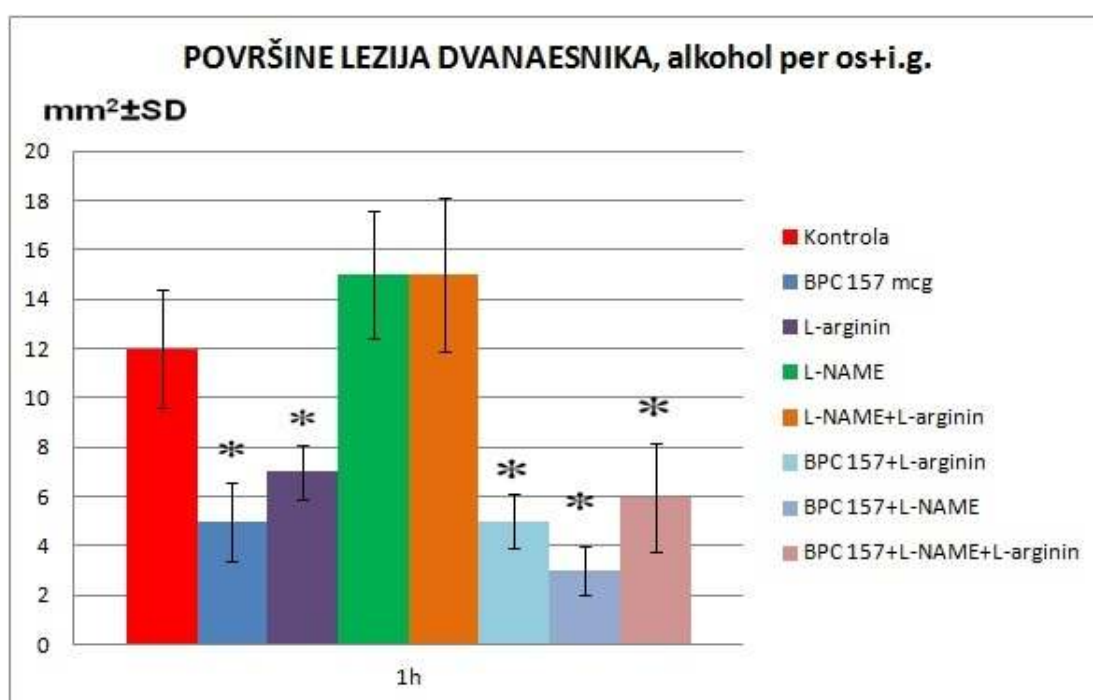


Slika 32: alkohol per os+i.g.; prikaz distribucije lezija želuca u testiranom vremenskom intervalu, kontrola, BPC 157 $\mu$ g, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.

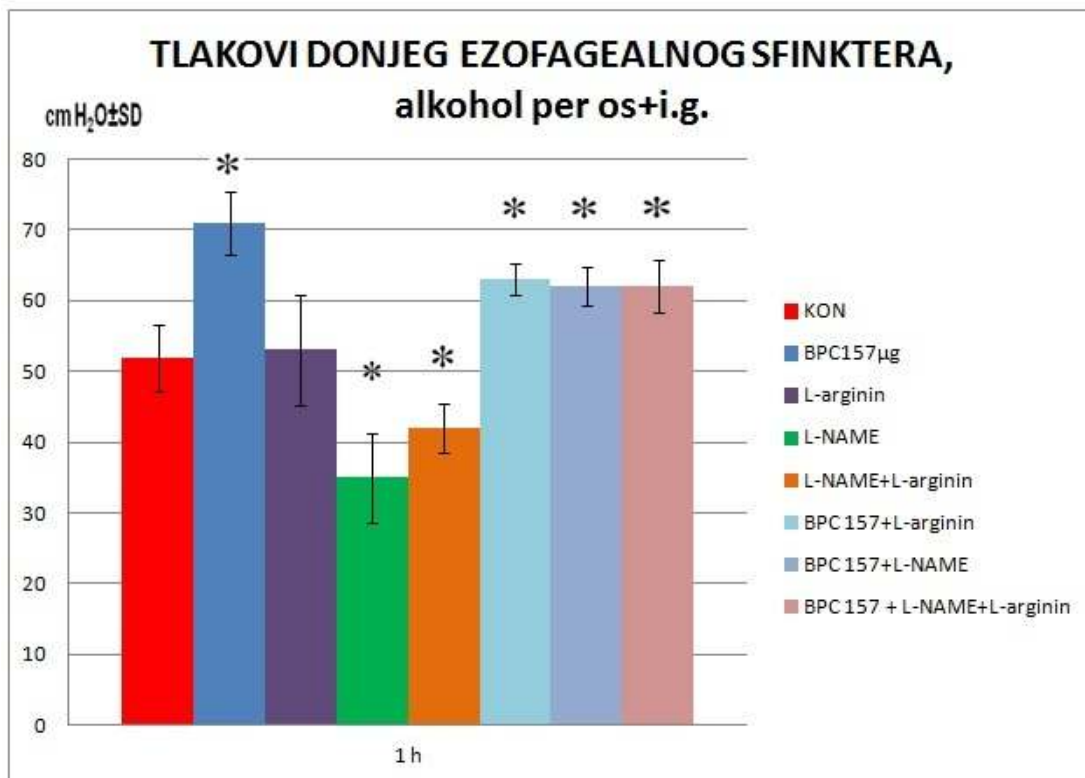




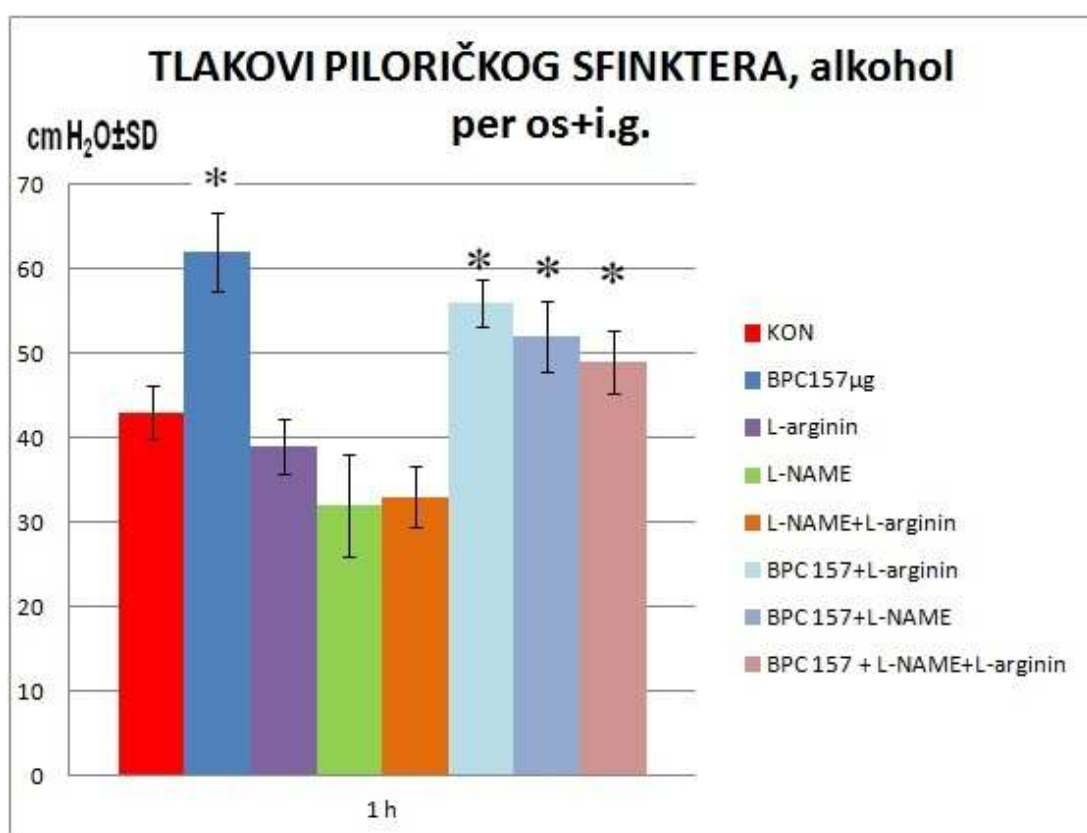
Slika 33: alkohol per os+i.g.; prikaz distribucije lezija dvanaesnika u testiranom vremenskom intervalu, kontrola, BPC 157 $\mu$ g, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, mm<sup>2</sup>. \* p<0.05.



Slika 34: alkohol per os+i.g.; prikaz distribucije vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog sfinktera u testiranom vremenskom intervalu, kontrola, BPC 157 $\mu$ g, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, cm H<sub>2</sub>O. \* p<0.05.



Slika 35: alkohol per os+i.g.; prikaz distribucije vrijednosti tlakova piloričkog sfinktera u testiranom vremenskom intervalu, kontrola, BPC 157 $\mu$ g, L-arginin, L-NAME, L-NAME+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-arginin, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME, BPC 157 $\mu$ g+L-NAME+L-arginin. Srednja vrijednost  $\pm$  SD, cm H<sub>2</sub>O. \* p<0.05.



## 6. RASPRAVA

Korozivne lezije gornjeg gastrointestinalnog trakta uobičajeno imaju devastirajuće posljedice na ljudski organizam i kvalitetu života te predstavljaju važan medicinski i socioekonomski problem. Bolesnici su podvrgnuti dugotrajnom i često slabo uspješnom liječenju koje najčešće završava sa teškim i mutilirajućim operativnim zahvatom/zahvatima i doživotnim tegobama od strane GI trakta u smislu disfagije, bolova retrosternalno ili intraabdominalno, promjenama u procesu svakodnevnog hranjenja, gubitka na tjelesnoj težini, a česte su i perioperativne komplikacije, dehiscence anastomoza, infekcije rane i slično. S obzirom da nedostaju adekvatna farmakoterapijska sredstva za rješavanje ovog problema, prijeko su potrebna daljnja znanstvena istraživanja sa ciljem pronalaženja takvog sredstva koje bi bilo sigurno u svojoj primjeni i djelotvorno u atenuaciji korozivnih oštećenja te prevenciji većih i jačih oštećenja u cijelom gastrointestinalnom sustavu. Pentadekapeptid BPC 157 predstavlja jedan potentan peptid koji je po svojim karakteristikama drugačiji od drugih peptida, za njegovo djelovanje nije potreban nosač, prepoznat je kao osnovni protektivni čimbenik u slini i želučanom soku [28, 51, 60, 96], a izrazito je siguran (letalna doza nije postignuta) i stabilan (stabilan u želučanom soku duže od 24h) [23] za razliku od standardnih peptidnih faktora rasta (npr. h-EGF i h-TGF u ljudskom želučanom soku) koji se vrlo brzo razgrađuju [23]. Već su ranije navedeni njegovi brojni učinci na cijeljenje različitih lezija i njegova interakcija sa brojnim sustavima u organizmu, dokazana je djelotvornost pentadekapeptida BPC 157 u studijama o upalnoj bolesti crijeva, studijama o uspješnom suzbijanju ezofagitisa, poremećajima sfinkterske funkcije, gastrointestinalnim i kožnim ulkusima, gastrokutanim, kolokutanim i ezofagokutanim fistulama u štakora [5, 17, 39, 58, 59, 61, 62]. Posebno je zanimljiva njegova interakcija sa NO sustavom koji ima dokazanu ulogu u procesu cijeljenja

[7]. Istraživanja su pokazala kako BPC 157 može i u in vivo i u in vitro pokusima nadvladati učinak L-NAME, kompetitivnog inhibitora endotelnog NO-a. To govori u prilog njegove posebne interakcije sa NO sustavom koja dovodi do izražene regresije pogoršanja uzrokovanog primjenom L-NAME i posljedičnom blokadom NO-sustava. Interakcija pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava dokazana je, inače, na nekoliko životinjskih modela i kod različitih životinjskih vrsti [5, 16-20, 26, 110]. Želja nam je također bila istražiti citoprotektivni/adaptivno citoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157 na gornji gastrointestinalni trakt štakora kao skroman doprinos daljnjoj razradi ovih fenomena, a u čast A. Robertu koji ih je prvi otkrio i definirao te ponudio zanimljiva objašnjenja u prevenciji oštećenja i cijeljenju lezija različitih tkiva i organa. Prethodno su ti učinci do kojih dovodi primjena pentadekapeptida BPC 157 bili dokazani na modelu alkoholnih lezija želuca induciranih izravnom intragastričnom primjenom alkohola [12], kod endogenih malih iritansa na modelu gastrojejuno anastomoze [12], dokazano je njegovo citoprotektivno djelovanje na jetru u paracetamolom, diklofenakom i ibuprofenom induciranim lezijama (NSAIL) [13, 14, 91] te kronično citoprotektivno djelovanje na gastrične lezije kod štakora sa kroničnom ingestijom alkohola administriranim u vodi za piće [15]. Uočen je povoljan učinak pentadekapeptida BPC 157 na želučane i duodenalne lezije inducirane tzv. «restraint» stresom, cisteaminom i intragastričkom primjenom 96%-tnog etanola u štakora [34] te njegova složena protektivna interakcija sa adrenergičnim i dopaminergičnim sustavom u protekciji sluznice želuca [33]. Dokazan je njegov citoprotektivni učinak kod gastrektomiranih štakora, posjeduje jaki angiogenetski potencijal koji je čak jači od učinka standardnih antiulkusnih sredstava, a dokazano mu je citoprotektivno i adaptivno citoprotektivno djelovanje usmjereno protiv različitih endogenih i egzogenih iritansa [12]. U ranijim istraživanjima dokazan je citoprotektivni odnosno organoprotektivni učinak

pentadekapeptida BPC 157 koji moguće ima i endogeni učinak na uklanjanje slobodnih radikala [51], a BPC 157 posjeduje i izravan mehanizam citoprotekcije na mukozne želučane stanice na *in vitro* modelu etanolom induciranih želučanih lezija [89, 90]. Značajnu ulogu u prevenciji alkoholom induciranih lezija želuca ima zaštita endotela jer endotel krvnih žila može modulirati tonus krvnih žila stvaranjem tvari koja je znana kao čimbenik porijeklom iz endotela (EDRF), a BPC 157 štiti endotel od etanolom induciranih lezija želuca [34]. Posljedično navedenom, pretpostavka je da pentadekapeptid BPC 157, između ostalog, djeluje i putem povećanja krvnog protoka kroz želučanu sluznicu što dovodi do zaštitnog učinka na mukozne lezije [34], a sluznička mikrocirkulacija je vrlo važna u održavanju oksigenacije i dostavi hranjivih nutijenata. Pojačani protok krvi u sluznici želuca, također, osigurava razrjeđenje apsorbiranih nekrotizirajućih agenasa u subepitelijalnim kapilarama. In vivo je jasno vidljiv angiogenetski odgovor BPC-a 157 uključujući i povećanje broja pozitivnih vaskularnih elemenata VEGF, CD 34 i FVIII [5].

Tu je bitan i tzv. ET/NO omjer odnosno ravnoteža između oslobađanja vazokonstriktornog endotelina (ET) i NO sustava. Sve to može dovesti do povećanja vaskularne permeabilnosti i do dilucije odnosno smanjenja perivaskularne koncentracije štetnog kemijskog agensa na nekoliko minuta čime dolazi do odgađanja njegove apsorpcije [163] sve dok protektivno pražnjenje želuca ne odstrani toksični agens iz organizma. Želučana sluznica i bikarbonati također podupiru ovu intraluminalnu intragastričnu dilucijsku teoriju tvoreći na taj način histodilucijsku membranu [164]. Pokazano je kako je mikrovaskulatura ljudske želučane sluznice meta djelovanja alkoholnog oštećenja i kako citoprotektivna sredstva dovode do promjene u citoskeletnoj ultrastrukturi endotelnih stanica te da one tako postaju otpornije prema alkoholnom oštećenju [126]. Ova protekcija endotelnih stanica i ključna uloga mikrovaskulature u očuvanju integriteta želučane sluznice prilikom djelovanja noxe u

potpunosti potvrđuje i proširuje ranije predloženi koncept važne uloge vaskularnih faktora u gastroprotekciji [113, 117, 127]. S obzirom da kod pretretmana štakora bilo kojim citoprotektivnim agensom etanolom-inducirane površinske mukozne lezije želuca ostaju nehemoragijske i ne dolazi do oštećenja subepitelijalnih vaskularnih endotelnih stanica, moguća je brza restitucija površinskog mukoznog defekta migracijom preživjelih epitelnih stanica iz želučanih jama. Iz navedenog je vidljivo kako citoprotektivni agensi dovode do prevencije rane vaskularne ozljede i prevencije subsekventnog krvarenja. Pentadekapeptid BPC 157 mogao bi svoj pozitivan učinak temeljiti i na gore opisanom mehanizmu, a taj učinak ne mora biti ograničen samo na želudac nego može biti vidljiv i u drugim dijelovima GI trakta. Baš iz tog razloga postavili smo prije navedenu hipotezu kako bi BPC 157 mogao imati zaštitni učinak na sve organe gornjeg GI trakta štiteći ih od korozivnih oštećenja izazivanjem citoprotektivnog i adaptivno citoprotektivnog učinka te regulirajući vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera uz pretpostavku da je njegovo djelovanje povezano sa djelovanjem NO sustava.

U prije provedenim istraživanjima detaljno je istražen međuođnos između djelovanja stabilnog gastričnog pentadekapeptida BPC 157 i pojave fenomena citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije te subsekventnih posljedica, i to kod klasične intragastrične instilacije jakog alkohola na štakorskom modelu [5, 12, 18, 34, 67]. U ovoj studiji i provedenom istraživanju dolazi do neodgodive pojave citoprotekcije/ adaptivne citoprotekcije, noksa je aplicirana izravno na jezik štakora, dolazi do gutanja štetnog agensa i njegovog normalnog „fiziološkog“ prolaska kroz gornji gastrointestinalni trakt štakora što posljedično dovodi do prilagodbe organa na nadolazeću noksu. Ovaj se koncept znatno razlikuje od tradicionalnog Robertovog poimanja želučane citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije kod izravne intragastrične instilacije alkohola [8, 9, 210]. Peroralna aplikacija jakog alkohola i održan integritet sluznice

želuca u kontradikciji je sa izravnom intragastričkom instilacijom jakog alkohola i pojavom velikih želučanih ulceracija [8, 9, 210]. U ovom istraživanju uočeno je prirodno preklapanje citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije koje nastupaju odmah i neodgodivo, bez slobodnog vremenskog intervala potrebnog za nastanak navedenih fenomena, a jezik je primarno mjesto djelovanja nokse što najvjernije odgovara prirodnom putu djelovanja štetnog agensa. U usporedbi sa intragastričnom instilacijom jakog alkohola prilikom čega dolazi do induciranja velikih želučanih ulceracija, kod peroralne primjene jakog alkohola dolazi do pojave širokih, ali minucioznih lezija jednaka, želuca i dvanaesnika sa intaktnom sluznicom. Isto se događa i u kombinaciji peroralne i neposredno nakon toga intragastrične instilacije jakog alkohola prilikom čega ne dolazi do nastanka velikih želučanih lezija.

Peroralnom administracijom jakog alkohola putem pijenja brzo se dostiže prag protekcije koji je dovoljan za suficijentno održavanje integriteta sluznice želuca što je u ovom istraživanju i verificirano, a što nije slučaj kod izravne intragastrične administracije jakog alkohola. Pojačano održavanje integriteta sluznice želuca prisutno je i u slučaju kada je sluznica želuca suočena sa primjenom slijedećeg štetnog agensa putem instilacije nekrotizirajućeg agensa izravno u želudac putem plastične orogastrične sonde; i tu se vidi značajna regresija i smanjenje lezija (peroralna administracija+intragastrična administracija jakog alkohola).

Navedeno označava izrazito specifičan proces i, kako je ranije demonstrirano, isključuje moguću diluciju alkohola kao razlog za atenuaciju nastanka lezija što je dodatno dokazano na štakorskom modelu prilikom uskraćivanja ili slobodnog pristupa životinja hrani. Između te dvije skupine životinja nije nađena razlika uz napomenu da gladovanje samo po sebi može imati vlastiti ulcerogeni potencijal [212, 213]. Također, za razliku od bazično „nepripremljenog želuca“ u studijama A. Roberta i prisutnosti velikih lezija [8, 9, 210], ova



opisana atenuacija lezija govori u prilog činjenici da je želudac uvijek spreman i alarmiran za adekvatan odgovor na djelovanje nokse.

Dodatno je istražena funkcija donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera. Vrijednosti tlakova sfinktera koje su niže od normalnih, sa praktički očuvanom želučanom sluznicom kod peroralne primjene jakog alkohola u odnosu su sa još jačim padom vrijednosti tlakova sfinktera (posebice vrijednosti tlaka donjeg ezofagealnog sfinktera koji je sam po sebi beznačajan) i širokim/dubokim oštećenjima sluznice želuca kod intragastričke primjene jakog alkohola. Kod peroralne i odmah potom intragastričke primjene jakog alkohola, atenuiran je pad vrijednosti tlakova sfinktera što je u skladu sa već opisanom atenuacijom lezija. Vrlo vjerojatno, opisan pad vrijednosti tlakova odnosno funkcije sfinktera može imati određenu kontributivnu ulogu u prezentaciji alkoholnih lezija i njihovoj propagaciji (npr. propagacija alkoholnih lezija kod intragastričke instilacije jakog alkohola iz želuca preko jednjaka pa sve do jezika ili pak iz želuca u dvanaesnik) na što posebno treba obratiti pozornost u budućim (želučanim) citoprotektivnim i adaptivno citoprotektivnim studijama. S druge strane, nedostatak velikih i ekstenzivnih oštećenja odnosno prezentacija minornih lezija npr. na jednjaku ili dvanaesniku govori u prilog brze prilagodbe ovih organa kada oni nisu odmah odnosno inicijalno izloženi djelovanju nokse.

Neobična stabilnost pentadekapeptida BPC 157 (bez degradacije u ljudskom želučanom soku kroz 24h) [5, 12, 18, 21, 34, 59, 67, 110, 211] i njegovi određeni važni učinci [5, 12, 18, 21, 34, 59, 67, 110, 211] mogli bi biti posebno indikativni u kontekstu produžene citoprotektivne/adaptivno citoprotektivne aktivnosti. Njegova učinkovitost je evidentirana u prevenciji odnosno smanjenju različitih lezija gastrointestinalnog sustava [21], verificiran je njegov utjecaj na NO sustav te na agoniste odnosno antagoniste NO sustava što je dokazano na različitim modelima i različitim životinjskim vrstama [110], ima utjecaj na somatosenzorne

neurone [67], poznat mu je utjecaj na oporavak funkcije sfinktera i održavanje vrijednosti tlakova sfinktera, opisan mu je učinak na funkciju žlijezda slinovnica [21, 60], oporavak AMP-ADP-ATP sustava [97], utjecaj na zaštitu endotela [34], utjecaj na endotelin [26], utjecaj na promociju angiogeneze [214] i na druge periferne [72] i centralne [75] alkoholom uzrokovane poremećaje, inače važne za funkciju citoprotektivnog peptida preko „crijevo-mozak“ osovine. Primjerice, kod izravne primjene pentadekapeptida BPC 157 u želudac, on odmah dovodi do oporavka poremećenih vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera na štakorskom modelu, čak i nakon 12-20 mjeseci od pojave ezofagitisa, koji u međuvremenu nije liječen [21, 59]. Kod periferne primjene pentadekapeptida BPC 157, zajedno sa svojim antiulkusnim učinkom suprotstavlja se posljedicama poremećenog centralnog dopaminergičnog sustava (blokada receptora) [31], te djeluje na substantiu nigru (npr. inducira otpuštanje serotonina) [81]. Terapeutski potencijal pentadekapeptida BPC 157 kao citoprotektivnog agensa također je viđen u njegovoj sposobnosti da dovodi do cijeljenja različitih rana, čak i kod teško imunološki kompromitiranih životinja (npr. kod sistemske primjene kortikosteroida) [58, 59, 40]. Zajedno sa gore opisanim pronalascima sve navedeno može govoriti u prilog važne zaštitne uloge pentadekapeptida BPC 157 te da on zapravo predstavlja prirodni faktor zaštite od štetnog djelovanja i to u želučanom soku sa posebnim učinkom odnosno funkcijom preko fenomena citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije.

Proširenje studija koje proučavaju NO sustav, inače limitiranih na oslabljeno generiranje NO-a, i istraživanje utjecaja ovih neispitanih fenomena kod peroralne primjene jakog alkohola i to u uvjetima oslabljenog generiranja NO-a kao i u uvjetima primjene NO supstrata, zajedno sa primjenom želučanog pentadekapeptida, čini se kao logičan korak, posebice s obzirom na izrazitu važnost NO sustava kao esencijalnog signalnog sustava u gastrointestinalnom traktu (blagotvorni učinak za L-arginin, ulcerogeni učinak kod generiranja inhibitora NO sustava

[215, 216]) jednako kao i važnost NO sustava kod citoprotektivne i adaptivno citoprotektivne aktivnosti koje se javljaju nakon intragastrične instilacije jakog alkohola [18]. Velike želučane lezije nastale nakon izravne intragastrične primjene jakog alkohola predstavljene su kao maksimalni, gotovo potpuni krah NO sustava (npr. dodatna NOS blokada (L-NAME) nije dovodila do daljnjeg pogoršanja opisanih želučanih lezija, ali je također primjećeno kako L-NAME antagonizira blagotvorni učinak L-arginina) [18]. Kod peroralne primjene jakog alkohola vidljiv je međutim prirodni učinak L-NAME i dodatni učinak NOS blokatora. Zbog toga se opisana prezentacija L-NAME i L-arginina može interpretirati kao nepotpuni krah NO sustava koji je još moguće dodatno stimulirati sa posljedičnim blagotvornim učinkom (L-arginin) ili dodatno blokirati i dovesti do dodatnog pogoršanja (L-NAME). Funkcija sfinktera, međutim, u oba slučaja ostaje oslabljena.

Svi navedeni učinci na kraju su modulirani primjenom stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 (uz dodatno bolje antagoniziranje blokade NOS-a u odnosu na L-arginin [110]), efektivno je postignut viši stupanj odnosno prag zaštite, a funkcija i vrijednosti tlakova sfinktera su bili barem djelomično popravljani odnosno vraćeni u prvobitno stanje. U studijama u kojima je korišten supernatant homogenata sluznice želuca štakora pentadekapeptid BPC 157 je imao učinak na generiranje NO-a koji je bio više izražen i/ili drugačiji od učinka L-arginina [18, 59, 110].

Zaključno, kao dodatak Robertovoj citoprotekciji/adaptivnoj citoprotekciji koje se javljaju kao posljedica izravne ozljede (ili ozljeda) želuca štakora štetnim agensom [8, 9, 210], u ovom istraživanju prezentirani su novi dokazi koji upućuju na činjenicu da primjena stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157, L-arginina i L-NAME te uloga NO sustava imaju značajan utjecaj na reguliranje djelovanja peroralno primjenjenog jakog alkohola. Vrlo vjerojatno, navedeno se može shvatiti kao prirodni inicirajući prototip višeg praga protekcije

do kojeg dolazi odmah i neodgodivo, uz prisutnost preklapanja citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije zajedno sa utjecajem na funkciju i vrijednosti tlakova sfinktera te kontinuiranim održavanjem integriteta sluznice želuca koje je stalno aktivno i prisutno.

Istraživanje je pokazalo kako BPC 157 posjeduje citoprotektivni učinak na različita tkiva i organe gornjeg GI trakta u štakora te dovodi do atenuacije korozivnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika isto kao i do reguliranja vrijednosti tlakova oba sfinktera (DES i PS). Jednako tako ima i adaptivno citoprotektivno djelovanje te se čini da pentadekapeptid BPC 157, zajedno sa prekondicioniranjem životinje aplikacijom nokse izravno na jezik (jedan organ) dovodi do smanjene osjetljivosti drugih organa i tkiva na daljnju ozljedu (npr. alkohol per os i lezije želuca-površinske lezije u smislu edema i hiperemije, nedostatak hemoragijskih lezija i ulkusa), fenomen sličan opisivanoj Robertovoj «želučanoj memoriji» odnosno tzv. gastričnoj adaptaciji (pretretman želučane sluznice određenim iritansom stvara tzv. želučanu memoriju te dovodi do posljedične zaštite sluznice želuca od nekrotizirajućeg agensa koja traje duže vrijeme). Navedeno je konzistentno i sa sličnim učincima adaptivne citoprotekcije na štakorskom modelu, a temeljenim na malim endogenim iritansima, antiulkusnim agensima i indometacinu [12] te na efektu adaptivne citoprotekciji na relaciji želudac-duodenum-kolon gdje inicijalna lezija u jednom dijelu GI trakta može dovesti do stvaranja adaptivne citoprotekcije u drugom dijelu GI trakta kako je opisano ranije [11]. Simultanom primjenom BPC-a 157 i.p. i djelovanjem nokse na jezik dolazi do pojačane refrakternosti jednjaka, želuca i dvanaesnika na djelovanje korozivnog medija, a sličan protektivni učinak na želudac i dvanaesnik se može vidjeti u simultanom djelovanju pentadekapeptida BPC 157 i.p. i nokse na jezik i jednjak prilikom daljnje propagacije korozivnog sredstva kroz gornji GI trakt štakora. Isto vrijedi i za zaštitni učinak na dvanaesnik djelovanjem pentadekapeptida BPC 157 i.p. i korozivnog sredstva na jezik, jednjak i želudac prilikom njegove normalne pasaže

nakon ingestije. Sličan je učinak simultane primjene pentadekapeptida BPC 157 i.p. i 96%-tnog alkohola per os preko korozivnih oštećenja jednjaka, želuca i dvanaesnika na prevenciju i smanjenje površine lezija na jeziku gdje je vidljivo kako s vremenom dolazi do smanjivanja oštećenja jezika. Taj je učinak vidljiv i u kombinaciji djelovanja nokse, pentadekapeptida BPC 157 i.p. i njegove kombinacije sa L-NAME i/ili L-arginin i.p. Pentadekapeptid BPC 157 u mikrogramske i nanogramske dozama, sam ili u kombinaciji sa L-NAME i/ili L-arginin i uz djelovanje nokse na jedan organ, dovodi do prevencije nastanka većih oštećenja drugih involviranih tkiva i organa, postupnog smanjenja površine oštećenja na jeziku te smanjene progresije nastanka lezija na jednjaku, želucu i dvanaesniku kroz ispitivani vremenski period djelovanja i to značajno manjih lezija u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Učinak djelovanja same nokse (96%-tni alkohol) na jezik i posljedična adaptivna citoprotekcija drugih organa u kontrolnoj (netretiranoj) životinjskoj skupini također je verificirana gdje se pokazalo kako alkohol primjenjen per os dovodi do nastanka manjih lezija želuca u odnosu na lezije nastale izravnom intragastričnom primjenom apsolutnog alkohola putem orogastrične sonde, lezije su drugačijeg karaktera te se prezentiraju edemom i hiperemijom za razliku od lezija kod izravne intragastričke primjene alkohola putem orogastrične sonde gdje su lezije na želucu izrazito hemoragične, duboke (hemoragični ulkusi) i zahvaćaju veliku površinu želuca. Lezije duodenuma odnosno oštećenje dvanaesnika bilo je slično kod intragastričke i peroralne primjene 96%-tnog alkohola. Još jednom naglašavamo kako pentadekapeptid BPC 157 može dovesti do izravnog citoprotektivnog, ali i do adaptivno citoprotektivnog zaštitnog učinka. Stoga ovdje postuliramo nove pojme modificirane «lingvalne», «ezofagealne» «gastrične» i «duodenalne memorije» odnosno «lingvalne», «ezofagealne», «gastrične» i «duodenalne adaptivne sposobnosti» koji se odnose na činjenicu da prekondicioniranje jednog životinjskog organa (npr. jezika) djelovanjem korozivnog sredstva (per os) uz primjenu pentadekapeptida

BPC 157 i njegovu interakciju sa NO sustavom, dovodi do «pamćenja» odnosno spremnosti drugih organa da protektivno odgovore na izloženost i štetno djelovanje nokse, što dovodi do pojave adaptivne citoprotekcije sa posljedičnom potpunom prevencijom pojave oštećenja ili razvojem manjih lezija tkiva i organa. Sve navedeno konzistentno je sa dobivenim rezultatima ovog istraživanja.

U kontrolnoj skupini životinja koje su primile alkohol per os došlo je do pojave većih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika sa makroskopski vidljivim crvenilom i hematinskim lezijama duž veće površine, jednjak je bio hiperemičan, želudac je imao veće lezije u smislu crvenila, edema, aplaniranih plika i ruka dok ulkusne promjene nisu nađene. Vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog (DES) i piloričkog (PS) sfinktera bile su niske u svim istraživanim vremenskim intervalima (niže od normalnih vrijednosti), a klinički su životinje bile sedirane učinkom 96%-tnog alkohola. Histološki nalaz je konzistentan sa makroskopskim. Pentadekapeptid BPC 157 doveo je do pojave manjih oštećenja navedenih organa u komparaciji sa kontrolnom skupinom životinja, lezije jezika tretiranih životinja bile su manje, sa manje upalnih stanica dokazanih histološkom analizom tkiva. Jednjak tretiranih životinja bio je manje oštećen u odnosu na kontrolu, želudac je također bio manje oštećen, lezije su bile manje površine u smislu lokaliziranog crvenila, ulkusi nisu nađeni. Dvanaesnik je također bio manje oštećen u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Posebno je važan učinak pentadekapeptida BPC 157 na vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinketa koje su bile znatno više u odnosu na kontrolnu skupinu što je subsekventno dovelo do manjeg oštećenja drugih organa (te više vrijednosti DES-a i PS-a evidentirane su u svim istraživanim vremenskim intervalima). I konačno, same životinje su bile živahnije i lakše su disale. Pentadekapeptid BPC 157 u nanogramskim dozama pokazao je istu učinkovitost kao i mikrogramske doze sa približno sličnim površinama lezija gornjeg GI trakta, vrijednostima

tlakova oba sfinktera (DES i PS) i ponašanjem životinja. Iz navedenog se može vidjeti tzv. «doza neovisan» učinak pentadekapeptida BPC 157 na prevenciju i cijeljenje tkiva kod alkoholnih korozivnih oštećenja organa gornjeg GI trakta štakora. U daljnjem istraživanju pokušali smo testirati već spomenuti NO sustav na način da smo primjenili njegov prekursor (L-arginin), blokator NOS-a (L-NAME) i njihovu kombinaciju sa ciljem promatranja njihove međusobne interakcije. U skupinama životinja tretiranim sa L-NAME, alkohol per os, došlo je do pojave ekstenzivnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika i to sličnih ili minimalno većih u odnosu na kontrolnu skupinu, evidentiran je značajan ezofagitis, životinje su teško disale i bile sedirane učinkom 96%-tnog alkohola, a vrijednosti tlakova sfinktera su u svim vremenskim intervalima bile slične ili minimalno niže u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Iz navedenog se vidi kako blokada NO-sustava inhibicijom NO-sintetaze dovodi do pojave težih oštećenja i dodatnog pada vrijednosti tlakova sfinktera u odnosu na životinje koje su bile izložene samo djelovanju nokse. Izuzetno je bio zanimljiv učinak L-arginina, prekursora NO sustava. U skupini životinja tretiranih sa i.p. primjenom L-arginin-a, alkohol per os, došlo je do pojave sličnih ili nešto manjih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, iako signifikantno većih u odnosu na životinje tretirane sa pentadekapeptidom BPC 157 i njegovim kombinacijama sa L-NAME i/ili L-arginin i.p. Životinje se bile nešto blaže sedirane u odnosu na kontrolnu skupinu, a vrijednosti tlakova sfinktera su bile minimalno veće u usporedbi sa kontrolom, ali znatno manje u odnosu na pentadekapeptid BPC 157 u mikrogramskim i nanogramskim dozama. Iz navedenog se može vidjeti relativno blagotvoran učinak L-arginina koji kao prekursor sinteze NO-a djeluje na cijeljenje i prevenciju težih oštećenja GI organa preko NO sustava, iako znatno lošije od pentadekapeptida BPC 157. Kombinacija L-NAME i L-arginina, alkohol per os, dovela je do pojave teških oštećenja usporedivih sa kontrolnom skupinom, a iz čega je

vidljivo da se primjena L-arginina suprotstavlja pogoršavanju koje je bilo inducirano sa L-NAME te da su vrijednosti tlakova sfinktera bile nešto više u odnosu na L-NAME. Zanimljivo je bilo istražiti kako pentadekapeptid BPC 157 djeluje na prekursor odnosno blokator NO sustava i do kakvog učinka dovodi njihovo zajedničko djelovanje. Bitno je reći da su oštećenja organa u sve tri skupine životinja (L-arginin+BPC 157, L-NAME+BPC 157 i L-NAME+L-arginin+BPC 157) i u svim istraživanim vremenskim intervalima, alkohol per os, međusobno bila približno slična i slična sa samostalnom primjenom pentadekapeptida BPC 157 u mikrogramske i nanogramske dozama. Slično je bilo ponašanje životinja u kavezima nakon aplikacije 96%-tnog alkohola i administriranja testiranih sredstava, a slične su bile i vrijednosti tlakova sfinktera (DES i PS). Kombinacija pentadekapeptid BPC 157 i L-arginin dovela je do pojačavanja inače blagog pozitivnog učinka L-arginin-a primjenjenog samostalno te su oštećenja nastala u njihovoj kombinaciji bila znatno manja u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, L-NAME, L-NAME+L-arginin i L-arginin u samostalnoj primjeni, životinje su se ponašale kao i one tretirane sa BPC 157, a vrijednosti tlakova sfinktera su bile usporedive sa BPC 157 skupinom. Pentadekapeptid BPC 157 dovodi do potpunog suzbijanja učinka L-NAME kada je primjenjen zajedno u kombinaciji sa L-NAME ili L-NAME+L-arginin. Oštećenja su značajno manja od onih uzrokovanih kod kontrolne skupine životinja, L-NAME, L-NAME+L-arginina ili L-arginina u samostalnoj primjeni, lezije su slične onima u samostalnoj BPC 157 skupini (mikrogramske i nanogramske doze) i skupini BPC 157+L-arginin, životinje su se slično ponašale kao u BPC 157 grupi, a vrijednosti tlakova DES-a i PS-a bile su usporedive sa BPC 157 skupinom životinja. Iz svega navednog vidi se kako je pentadekapeptid BPC 157 u mogućnosti pojačati blagotvorni učinak L-arginina u prevenciji i cijeljenju oštećenja tkiva gornjeg GI trakta uz povećanje vrijednosti tlakova sfinktera te da BPC 157 u potpunosti prevenira pogubni učinak L-NAME, a u



kombinaciji sa L-NAME+L-arginin također ima jak učinak na smanjenje oštećenja organa gornjeg GI trakta i povećanje vrijednosti tlakova sfinktera na modelu korozivnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanesnika u štakora u istraživanim vremenskim intervalima, alkohol primjenjen per os. Sve to jasno ukazuje na činjenicu da se moduliranjem NO sustava sa opisanim djelovanjem BPC-a 157 na ovom modelu korozivnih oštećenja može izazvati blagotvorni učinak u cijeljenju i prevenciji nastanka teških korozivnih oštećenja. Važno je napomenuti kako se ovaj citoprotektivni/adaptivno citoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157 javlja već u prvoj minuti nakon ingestije 96%-tnog alkohola dakle gotovo odmah, za razliku od Robertove intragastrične adaptivne citoprotekcije koja se javljala nešto kasnije. Dodatno je istražen adaptivno citoprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157 kod simultane primjene 96%-tnog alkohola per os i i.g, a učinak je promatran u vremenskom periodu od jedan sat. Istraživanje je pokazalo kako istovremena primjena dvije nokse također dovodi do smanjenja površine lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolnu skupinu peroralnog unosa alkohola uz napomenu da je karakter lezija različit (npr. hemoragijske lezije želuca vs. edem i hiperemija kod per os primjene alkohola). Životinje kod kojih je uz simultanu primjenu dvije nokse per os i i.g. apliciran BPC 157 i.p. u mikrogramskoj dozi pokazao je značajno manji nastanak lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolnu skupinu (dvije nokse, per os i i.g.). U usporedbi sa intragastričnom primjenom apsolutnog alkohola, životinje koje su primile dvije nokse (96%-tni alkohol per os i i.g.) imale su slične lezije jezika, ali značajno manje lezije jednjaka, želuca i dvanaesnika. Kombinacija dvije nokse (96%-tni alkohol per os i i.g.) i pentadekapeptida BPC 157 dovele su do pojave manjih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (96%-tni alkohol per os i i.g.).

Provedeno istraživanje dokazalo je važnu ulogu i učinkovitost BPC-a 157 u regulaciji vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera te njegovu važnu ulogu u cijeljenju i prevenciji većih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika jednako kao i njegovu interakciju sa NO sustavom i to počevši gotovo odmah nakon incijalnog djelovanja nokse što ga čini novim medijatorom citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije te zasigurno ima svoje mjesto u budućoj terapijskoj primjeni kod teškog rezistentnog refluksnog ezofagitisa i teških korozivnih oštećenja svih organa gornjeg GI trakta.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Pentadekapeptid BPC 157 uspješno djeluje u prevenciji razvoja teških korozivnih oštećenja i smanjenju veličine odnosno površine korozivnih lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika na štakorskom modelu korozivnih oštećenja izazvanih peroralnom primjenom 96%-tnog alkohola izravno na jezik/dno usne šupljine, intragastričkom primjenom i u simultanoj primjeni dvije nokse (96%-tni alkohol per os i i.g.) u čemu se očituje njegov pozitivan terapijski učinak.

2. Pentadekapeptid BPC 157 na animalnom modelu i u akutnoj fazi korozivnih oštećenja gornjeg GI trakta dovodi do pojave citoprotektivnog i adaptivno citoprotektivnog učinka na jeziku, jednjaku, želucu i dvanaesniku, i to kod peroralne i intragastričke primjene nokse te kod simultane primjene dvije nokse (alkohol per os+i.g.). Taj je učinak kod peroralne primjene 96%-tnog alkohola vidljiv gotovo odmah odnosno već u prvoj minuti nakon djelovanja nokse i primjene pentadekapeptida BPC 157 i.p.

3. Pentadekapeptid BPC 157 u štakora sa alkoholnim oštećenjima gornjeg GI trakta povećava vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog sfinktera (DES) i piloričkog sfinktera (PS) čije su vrijednosti veće u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, bez obzira na mjesto inicijalnog djelovanje nokse (peroralno, intragastrički) ili djelovanje dvije nokse simultano (per os i i.g.).

4. Pozitivno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 postiže se bez obzira na primijenjenu dozu (mikrogrami ili nanogrami), što znači da BPC 157 ima o dozi neovisan učinak u izazivanju fenomena citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije smanjujući korozivna oštećenja svih

organa gornjeg GI trakta u njihovoj akutnoj fazi uz regulaciju vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog (DES) i piloričkog sfinktera (PS).

5. NO-sustav, za koji je već ranije pokazano da ima ključnu ulogu u procesu cijeljenja, ima važnu ulogu i u procesu protekcije, smanjenju i cijeljenju alkoholnih oštećenja jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika. To je pokazano stimulacijom NO sustava primjenom L-arginin-a (minimalni blagotvorni učinak), dok blokada NO sustava primjenom L-NAME dovodi do pojave težih oštećenja organa gornjeg GI trakta i nižih vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog (DES) i piloričkog sfinktera (PS) (minimalni agravirajući učinak) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Primjena L-arginin-a suprotstavlja se povećanom oštećenju nastalom primjenom L-NAME pa tako kombinacija L-NAME i L-arginin-a dovodi do pojave oštećenja usporedivih sa kontrolnom skupinom životinja.

6. Pentadekapeptid BPC 157 je uključen u mehanizam djelovanja NO-sustava u procesima citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije u akutnoj fazi kaustičnih oštećenja organa gornjeg GI trakta. To je pokazano primjenom pentadekapeptida BPC 157 prilikom blokade odnosno stimulacije NO sustava s L-NAME odnosno L-arginin-om i njihovim zajedničkim učinkom prilikom istovremene primjene.

7. Pentadekapeptid BPC 157 u mogućnosti je pojačati inače minimalni blagotvorni učinak L-arginin-a na prevenciju i cijeljenje teških oštećenja tkiva/organa gornjeg GI trakta uz povećanje vrijednosti tlakova sfinktera. Nadalje, u potpunosti prevenira pogubni učinak L-NAME, a u kombinaciji sa L-NAME + L-arginin ima jači učinak na smanjenje oštećenja

organa gornjeg GI trakta i povećanje vrijednosti tlakova sfinktera u usporedbi sa zajedničkom primjenom L-NAME i/ili L-arginin-a bez primjene pentadekapeptida BPC 157.

8. Primjena dvije nokse (per os i i.g.) dovodi do smanjenja površine lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika u odnosu na kontrolnu skupinu peroralnog unosa alkohola uz napomenu da je karakter lezija različit (npr. hemoragijske lezije želuca vs. edem i hiperemija kod per os primjene alkohola).

9. Pentadekapeptid BPC 157 u mikrogramskoj dozi kod simultane primjene dvije nokse (per os i i.g.) pokazao je pozitivan učinak na smanjenje veličine lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika i vrijednosti tlakova sfinktera u odnosu na kontrolnu skupinu (dvije nokse per os i i.g.).

10. Primjena dvije nokse (alkohol per os i i.g.) uzrokuje slične lezije jezika, ali značajno manje lezije jednjaka, želuca i dvanaesnika u usporedbi sa intragastričnom primjenom 96%-tnog alkohola.

11. Verificirana je uključenost NO sustava, samog i/ili u kombinaciji sa pentadekapeptidom BPC 157, pri pojavi lezija jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika te regulaciji vrijednosti tlakova sfinktera na modelu akutnog korozivnog oštećenja gornjeg GI trakta u štakora uzrokovanog simultanom primjenom dvije nokse (96%-tni alkohol per os i i.g.).

## **8. KRATKI SADRŽAJ I NASLOV DISERTACIJE NA HRVATSKOM JEZIKU**

### **UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 U TERAPIJI LEZIJA JEZIKA, JEDNJAKA, ŽELUCA I DVANAESNIKA IZAZVANIH 96%-TNOM OTOPINOM ALKOHOLA U ŠTAKORA**

Nova citoprotekcija/adaptivna citoprotekcija: peroralni 96%-tni alkohol i njegova uloga u rješavanju poremećaja u prehrani i unosu tekućina te održavanju integriteta sluznice. BPC

157, L-arginin, L-NAME

Korozivne lezije gornjeg gastrointestinalnog trakta imaju devastirajuće posljedice na ljudski organizam i kvalitetu života te predstavljaju važan medicinski i socioekonomski problem. S obzirom da nedostaju adekvatna farmakoterapijska sredstva za rješavanje ovog prvorazrednog kliničkog problema, prijeko su potrebna daljnja znanstvena istraživanja sa ciljem pronalaženja takvog sredstva koje bi bilo sigurno u svojoj primjeni i djelotvorno u atenuaciji korozivnih oštećenja te prevenciji većih i jačih oštećenja u cijelom gastrointestinalnom sustavu. Kao takav, u ovom je istraživanju predložen pentadekapeptid BPC 157 koji predstavlja jedan potentan peptid sa karakteristikama drugačijim od drugih peptida, za njegovo djelovanje nije potreban nosač, prepoznat je kao osnovni protektivni čimbenik u slini i želučanom soku, a izrazito je siguran (letalna doza nije postignuta) i stabilan (stabilan u želučanom soku duže od 24h). Već su ranije dokazani njegovi brojni učinci na cijeljenje različitih lezija i njegova interakcija sa brojnim sustavima u organizmu. Dokazan je i njegov citoprotektivan/adaptivno citoprotektivan učinak na različita tkiva i organe. U ovom istraživanju ispitana je uloga

pentadekapeptida BPC 157 i NO sustava, samog ili u kombinaciji sa pentadekapeptidom BPC 157, u prevenciji i cijeljenju teških oštećenja organa gornjeg GI trakta.

**Uvod:** U ovom istraživanju suprotstavili smo učinak peroralne primjene nasuprot učinka Robertove izravne intragastrične primjene 96 %-tnog alkohola na štakorskom modelu te smo promatrali posljedice u smislu neposredne i preklapajuće prezentacije citoprotekcije/adaptivne citoprotekcije te malih lezija na želucu u usporedbi sa inače velikim lezijama na želucu kod izravne intragastrične primjene nokse.

**Materijali i metode:** 96 %-tni alkohol primjenjivan je na slijedeći način: (i) peroralno (1 ml/štakor izravno na jezik, žrtvovanje životinja nakon 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h i 24 h), jezik je promatran kao primarno mjesto djelovanja nokse, a posljedično su promatrane i promjene na jednjaku, želucu i dvanaesniku, što do sada još nije učinjeno; (ii) intragastrički (1 ml/štakor, žrtvovanje nakon 1h; (iii) peroralno 1 ml/štakor te odmah nakon toga intragastrički 1 ml/štakor (žrtvovanje nakon 1 h). Određivala se površina lezija ( $\text{mm}^2$ ) i vrijednosti tlakova donjeg ezofagealnog i piloričkog sfinktera ( $\text{cmH}_2\text{O}$ ). Testirali smo slijedeća sredstva (/kg intraperitonealno odmah nakon primjene 96 %-tnog alkohola): stabilni gastrični pentadekapeptid BPC 157 10  $\mu\text{g}$ , 10 ng, NOS-blokator L-NAME, 5 mg, L-arginin, NOS-supstrat, 100 mg, primjenjivanih samostalno ili u kombinaciji.

**Rezultati:** 96 %-tni alkohol doveo je do stvaranja: (i) peroralno, 1 min-24 h, široke ali minuciozne lezije jezika, jednjaka, želuca i dvanaesnika sa intaktnom mukoznom barijerom i značajno nižim vrijednostima tlakova sfinktera; (ii) intragastrički, ekstenzivne ulceracije želuca, široko crvenilo jezika, jednjaka i duodenuma, još izraženiji pad vrijednosti tlakova sfinktera posebice donjeg ezofagealnog tlaka sfinktera; (iii) peroralno i intragastrički u kombinaciji, male želučane lezije, manje crvenilo jezika, jednjaka i dvanaesnika, atenuacija pada vrijednosti tlakova sfinktera odgovara atenuaciji veličina lezija. Dodatni jaki pozitivni

učinak na održavanje integriteta sluznice dogodio se kod primjene pentadekapeptida BPC 157 uključujući održavanje odnosno barem parcijalnu prevenciju smanjenja vrijednosti tlakova sfinktera, blagi pozitivni učinak L-arginina (protekcija) te negativni učinak L-NAME (agracija) što govori u prilog uključenosti NO sustava u opisanu regulaciju, bez utjecaja na vrijednosti tlakova sfinktera.

**Zaključak:** Učinci citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije na modelu peroralne primjene 96 %-tnog alkohola uz primjenu pentadekapeptida BPC 157 i djelovanje na NO sustav mogu pomoći u rješavanju poremećaja i navika u prehrani i unosu tekućina te u održavanju integriteta sluznice uključujući atenuaciju korozivnih oštećenja cijelog gornjeg GI trakta.

**Ključne riječi:** pentadekapeptid BPC 157/NO sustav/ citoprotekcija/ adaptivna citoprotekcija

Pristupnik: Tomislav Bečejac, dr. med.

Mentor: Prof.dr.sc. Dinko Stančić-Rokotov, F.E.T.C.S.

Godina obrane doktorske disertacije: 2015.



## **9. KRATKI SADRŽAJ I NASLOV DISERTACIJE NA ENGLESKOM JEZIKU**

### **THE EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 IN THE THERAPY OF LESIONS OF THE TONGUE, ESOPHAGUS, STOMACH AND DUODENUM CAUSED BY 96% ALCOHOL IN RAT**

New cytoprotection/adaptive cytoprotection: peroral strong alcohol in rat to resolve the regular eating/drinking habits and mucosa maintenance. BPC 157, L-arginine, L-NAME.

Corrosive lesions of the upper gastrointestinal tract have devastating consequences on human organism and the quality of life in general which means that they represent a very important medical and socio-economical problem. Since there are no adequate pharmacotherapeutical means in dealing with this first class clinical problem, new experiments are necessary in order to discover a new peptide which is safe and successful in prevention and attenuation of massive corrosive lesions of the whole upper GI tract. In this experiment we present pentadecapeptide BPC 157 as a new potent peptide with different characteristics when compared with other peptides (it doesn't need carrier, it was recognized as a basic protective compound in saliva and gastric juice, it's completely safe with no known lethal dose and extremely stable (ie. in gastric juice more than 24h). The effects of BPC 157 on healing different lesions and it's interaction with many systems in the organism have been proven earlier, as well as the cytoprotective/adaptive cytoprotective effect of BPC 157 on different tissues and organs. We investigated the role of pentadecapeptide BPC 157 and NO system, alone or in combination with pentadecapeptide BPC 157, in prevention and healing of severe upper GI tract organ damage.

**Background.** We reveal the peroral versus Robert's intragastric strong alcohol in rats, and the consequences thereof, the immediate presentation of overlapping cytoprotection/adaptive cytoprotection, only the minute lesions in the stomach instead the huge post-alcohol stomach lesions.

**Methods.** We challenged the strong 96 %-ethanol: (i) perorally (1 ml/rat at the tongue, sacrifice at the 1 min, 5 min, 15 min, 30 min; 1 h, 2 h and 24 h), the tongue as the first target, and subsequent esophagus, stomach and duodenum presentation, so far not tested; (ii) intragastrically (1 ml/rat, sacrifice at 1 h); perorally 1ml/rat, and immediately after intragastrically, 1 ml/rat, (sacrifice at 1 h); lesions area (mm<sup>2</sup>) and lower esophageal and pyloric sphincter pressure (cmH<sub>2</sub>O) assessment. Tested agents (/kg intraperitoneally immediately after alcohol) were: stable gastric pentadecapeptide BPC 157 10 µg, 10 ng, NOS-blocker L-NAME, 5 mg, L-arginine, NOS-substrate, 100 mg, applied alone and/or together.

**Results.** 96 %- alcohol induced: (i) perorally, 1 min-24 h, widespread, but only minute lesions on the tongue, esophagus, stomach and duodenum with intact mucosa, but markedly fallen sphincter pressures; (ii) intragastrically, the extensive stomach ulcerations, widespread tongue, esophagus, duodenum redness; further fallen sphincter pressures, particularly failed lower esophageal sphincter; (iii) perorally, and then immediately intragastrically, only small stomach lesions, less tongue, esophagus, duodenum redness; the attenuated sphincter pressures drop resembles the attenuated lesions. The additional strong mucosal beneficial effect appeared with BPC 157 including at least partially rescued sphincter pressures, the slight effect with L-arginine (protection) and with L-NAME (aggravation) (and thereby, the NO-system involvement) however not involving change in sphincter pressures.

**Conclusion.** These effects and the peroral strong alcohol model combined with the use of pentadecapeptide BPC 157 and NO system may resolve the regular eating/drinking habits and mucosa maintenance together with attenuation of the corrosive lesions of the upper gastrointestinal tract.

**Key words:** pentadecapeptide BPC 157/NO system/ cytoprotection/ adaptive cytoprotection

PhD. candidate: Tomislav Bečejac, M.D.

Mentor: Dinko Stančić-Rokotov, M.D., PhD., professor, F.E.T.C.S.

Year of publication: 2015.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Sabiston DC, Townsend CM, Beauchamp RD et al. Sabiston Textbook of Surgery. The Biological Basis of Modern Surgical Practice, 18th Edition; Canada: Saunders Elsevier: 2008.
2. Kochhar R, Sethy PK, Kochhar S, Nagi B, Gupta NM. Corrosive induced carcinoma of esophagus: report of three patients and review of literature. J Gastroenterol Hepatol. 2006 Apr;21(4):777-80.
3. Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z i sur. Kirurgija, 1. izd. Zagreb: Medicinska biblioteka, Naklada Ljevak: 2007.
4. Mattos GM, Lopes DD, Mamede RC, Ricz H, Mello-Filho FV, Neto JB. Effects of time of contact and concentration of caustic agent on generation of injuries. Laryngoscope. 2006 Mar;116(3):456-60.
5. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L et al. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. Curr Pharm Des. 2010;16(10):1224-34. Review.
6. Sikiric P. The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). Inflammopharmacology. 1999;7(1):1-14.
7. Frank S, Madlener M, Pfeilschifter J, Werner S. Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor- synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. J Invest Dermatol 1998;111:1058–64.
8. Robert A. Cytoprotection by prostaglandins. Gastroenterology 1979; 77: 761-767.

9. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Hanchar AJ. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am J Physiol.* 1983 Jul;245(1):G113-21.
10. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation, *J Physiol Pharmacol.* 2005 Sep;56(suppl 5):33-55
11. Mise S, Tonkic A, Pesutic V et al. The presentation and organization of adaptive cytoprotection in the rat stomach, duodenum, and colon. Dedicated to Andre Robert the founder of the concept of cytoprotection and adaptive cytoprotection. *Med Sci Monit.* 2006 Apr;12(4):BR146-53.
12. Sikiric P, Seiwerth S, Deskovic S et al. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *Eur J Pharmacol.* 1999 Jan 1;364(1): 23-31.
13. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K et al. Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 Sep 30;667(1-3):322-9.
14. Ilic S, Drmic D, Franjic S et al. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci.* 2011 Mar 14;88(11-12):535-42.
15. Prkacin I, Aralica G, Perovic D et al. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6): 295-301.

16. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M et al. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept.* 2009 Aug 7;156(1-3):83-9. Epub 2009 May 22.
17. Klicek R, Sever M, Radic B et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci.* 2008 Sep;108(1):7-17.
18. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol.* 1997 Jul 30;332(1):23-33.
19. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z et al. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med Sci Monit.* 2006 Jan;12(1):BR36-45. Epub 2005 Dec 19.
20. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B et al. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris.* 1997 May-Oct;91(3-5):139-49.
21. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R et al. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157: Novel Therapy in Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des.* 2011 May 6. [Epub ahead of print]
22. Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PK, Majka J, Dembinski A. Role of salivary glands and epidermal growth factor (EGF) in gastric secretion and mucosal integrity in rats exposed to stress. *Regul Pept.* 1991 Feb 1;32(2):203–15.
23. Veljaca M, Chan K, Guglietta A. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-15 in human gastric juice. *Gastroenterology.* 1995;108:A761.

24. Urist MR. The first three decades of bone morphogenetic protein. *Osteologie*. 1996;4:207–233.
25. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, D'Amico TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- $\beta$ . *Science*. 1987;237:1333–1336.
26. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci*. 2004 May;95(1):19-26.
27. Boban Blagaic A, Turcic P, Blagaic V et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 counteracts morphine-induced analgesia in mice. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:177-81.
28. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. *Inflammopharmacology*. 2006 Dec;14(5-6):214-21. Review.
29. Bilic I, Zoricic I, Anic T et al. Haloperidol-stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC 157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. *Life Sci*. 2001 Mar 9;68(16):1905-12.
30. Sikiric P, Separovic J, Buljat G et al. Gastric mucosal lesions induced by complete dopamine system failure in rats. The effects of dopamine agents, ranitidine, atropine, omeprazole and pentadecapeptide BPC 157. *J Physiol Paris*. 2000 Mar-Apr;94(2):105-10.

31. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R et al. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol.* 1999 Aug 20;379(1):19-31.
32. Jelovac N, Sikirić P, Rucman R et al. A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol Psychiatry.* 1998 Apr 1;43(7):511-9.
33. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S et al. Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. *Dig Dis Sci.* 1997 Mar;42(3):661-71.
34. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et al. The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H<sub>2</sub> receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci.* 1994;54(5):PL63-8.
35. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R et al. The effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on development of tolerance and physical dependence following repeated administration of diazepam. *Chin J Physiol.* 1999 Sep 30;42(3):171-9.
36. Veljaca M, Pavic Sladoljev D, Mildner B et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL 14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut.* 2003;51(suppl 3):A309
37. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M et al. A multicenter, randomized, double blind, placebo controlled phase II study of PL 14736 enema in treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2005;128:A584



38. Veljaca M, Krnic Z, Brajsa K et al. The development of PL 14736 for treatment of inflammatory bowel disease. In: IUPHAR-GI Section Symposium, Honolulu, Hawaii, July 13–15, 2002. O-32.
39. Sever M, Klicek R, Radic B et al. Gastric Pentadecapeptide BPC 157 and Short Bowel syndrome in Rats. *Dig Dis Sci* 2009 Oct;54(10):2070-83.
40. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S et al. Corticosteroids-impairment healing and gastric pentadecapeptide BPC 157 creams in burned mice. *Burns*. 2003 Jun;29(4):323–34.
41. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns*. 2001 Dec;27(8):817–27.
42. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z et al. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris*. 1997 May- Oct;91(3-5):173-8.
43. Bilic M, Bumber Z, Blagaic AB, Batelja L, Seiwerth S, Sikiric P. The stable gastric pentadecapeptide BPC 157, given locally, improves CO<sub>2</sub> laser healing in mice. *Burns*. 2005 May;31(3):310-5. Epub 2005 Jan 20.
44. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T et al. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res*. 2006 May;24(5):1109-17.
45. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthop Res*. 2003 Nov;21(6):976-83.
46. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B et al. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept*. 2010 Feb 25;160(1-3):33-41. Epub 2009 Nov 10.

47. Sebecic B, Nikolić V, Sikirić P et al. Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC-157, on the healing of segmental bone defect in rabbits: a comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone*. 1999 Mar;24(3):195-202.
48. Chang CH, Tsai WC, Lin MS, Hsu YH, Pang JH. The promoting effect of pentadecapeptide BPC 157 on tendon healing involves tendon outgrowth, cell survival, and cell migration. *J Appl Physiol*. 2011 Mar;110(3):774-80. Epub 2010 Oct 28.
49. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwerth S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:191-6.
50. Krivic A, Majerovic M, Jelic I, Seiwerth S, Sikiric P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. *Inflamm Res*. 2008 May;57(5):205-10.
51. Sikirić P, Petek M, Rucman R et al. A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. *J Physiol Paris*. 1993;87(5):313-27. Review.
52. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L et al. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res*. 2010 Sep;28(9):1155-61.
53. Pevec D, Novinscak T, Brcic L et al. Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med Sci Monit*. 2010 Feb 26;16(3):BR81-88.
54. Seveljević-Jaran D, Cuzić S, Dominis-Kramarić M et al. Accelerated healing of excisional skin wounds by PL 14736 in alloxan-hyperglycemic rats. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(5):266-74. Epub 2006 Jun 16.

55. Lazić R, Gabrić N, Dekaris I, Bosnar D, Boban-Blagaić A, Sikirić P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 promotes corneal epithelial defects healing in rats. *Coll Antropol.* 2005 Jun;29(1):321-5.
56. Vuksic T., Zoricic I, Brcic L et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, Pliva, Croatia) heals ileoileal-anastomosis in rat. *Surg Today.* 2007;37(9):768-77
57. Zoricic I, Sikiric P, Seiwerth S. Pentadecapeptide BPC 157 beneficially influences the healing of colon-colon anastomoses in rats. In: *Cell injury and protection in the gastrointestinal tract. From basic sciences to clinical perspectives 1996.* Mozsik G, Nagy L, Par A, Rainsford KD, editors. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1997:249–58.
58. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I et al. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig Dis Sci.* 2009 Jan;54(1):46-56.
59. Cesarec V, Becejac T, Misic M et al. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy, *Eur J Pharmacol.* 2013 Feb 15; 701 (1-3): 203-12. Epub 2012 Dec 7.
60. Bedekovic V, Mise S, Anic T et al. Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacol.* 2003 Sep 5;477(1):73-80.
61. Dobric I, Drvis P, Petrovic I et al. Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2007 May;104(1):7-18.

62. Petrovic I, Dobric I, Drvis P et al. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in rat and therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Pharmacol Sci.* 2006 Nov;102(3):269–77.
63. Sikiric P, Seiwerth S, Aralica G et al. Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):283-8.
64. Petek M, Sikiric P, Anic T et al. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates gastric lesions induced by alloxan in rats and mice. *J Physiol Paris.* 1999 Dec;93(6):501-4.
65. Xue XC, Wu YJ, Gao MT et al. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol.* 2004 Apr 1;10(7):1032-6.
66. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et al. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6):261-70
67. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et al. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. *Dig Dis Sci.* 1996 Aug;41(8):1604-14.
68. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et al. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris.* 1997 May-Oct;91(3-5):113–22.
69. Sikiric P, Jadrijevic S, Seiwerth S et al. Long-lasting cytoprotection after pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, sucralfate or cholestyramine application in reflux oesophagitis in rats. *J Physiol Paris.* 1999 Dec;93(6):467–77.

70. Ivetic Tkalcevic I, Cuzic S, Brajsa K et al. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol.* 2007 Sep 10;570(1-3):212-21.
71. Turkovic B, Sikiric P, Seiwerth S et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology.* 2004;126:A287.
72. Prkacin I, Separovic J, Aralica G et al. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *J Physiol Paris.* 2001 Jan-Dec;95(1-6): 315-24
73. Sikiric P, Separovic J, Anic T et al. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H<sub>2</sub>-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris.* 1999 Dec;93(6):479–85.
74. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today.* 2008;38(8):716-25.
75. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur J Pharmacol.* 2004 Sep 24;499(3):285-90.
76. Veljaca M, Lesch CA, Pillana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Jan;272(1):417–22
77. Veljaca M, Lesch CA, Sanchez B, Low J, Guglietta A. Protection of BPC-15 on TNBS-induced colitis in rats: possible mechanisms of action. *Gastroenterology.* 1995;108:936.

78. Sikiric P, Marovic A, Matoz W et al. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Physiol Paris*. 1999 Dec;93(6):505-12.
79. Sikiric P, Jelovac N, Jelovac-Gjeldum A et al. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates chronic amphetamine-induced behavior disturbances. *Acta Pharmacol Sin*. 2002 May; 23(5):412-22.
80. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *Eur J Pharmacol*. 2005 Apr 11;512(2-3):173-9.
81. Tohyama Y, Sikirić P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Sci*. 2004 Dec 3;76(3):345-57.
82. Stancic-Rokotov D, Slobodnjak Z, Aralica J et al. Lung lesions and anti-ulcer agents beneficial effect: anti-ulcer agents pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, omeprazole and atropine ameliorate lung lesion in rats. *J Physiol Paris*. 2001 Jan-Dec;95(1-6):303-8.
83. Stancic-Rokotov D, Sikiric P, Seiwerth S et al. Ethanol gastric lesion aggravated by lung injury in rat. Therapy effect of antiulcer agents. *J Physiol Paris*. 2001 Jan-Dec;95(1-6):289-93.
84. Madzarac G, Hirsl D, Becejac T et al. BPC 157 fistula-healing effect closes tracheotomy wound in rats; 21st United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany October 12-16, 2013 Venue: ICC Berlin
85. Keremi B, Lohinai Z, Komora P et al. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:115-22.

86. Ilic S, Brcic I, Mester M et al. Over-dose insulin and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Attenuated gastric ulcers, seizures, brain lesions, hepatomegaly, fatty liver, breakdown of liver glycogen, profound hypoglycemia and calcification in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60 Suppl 7:107-14.
87. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z et al. Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig Dis Sci.* 1996 Jul;41(7):1518-26.
88. Sikirić P, Mikus D, Seiwerth S et al. Pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, bromocriptine, and atropine effect in cysteamine lesions in totally gastrectomized rats: a model for cytoprotective studies. *Dig Dis Sci* 1997;42:1029-37.
89. Bódis B, Karádi O, Nagy L, Dohoczky C, Kolega M, Mózsik G. Direct cellular effects of some mediators, hormones and growth factor-like agents on denervated (isolated) rat gastric mucosal cells. *J Physiol Paris* 1997;91:183-7.
90. Bódis B, Karádi O, Németh P, Dohoczky C, Kolega M, Mózsik G. Evidence for direct cellular protective effect of PL-10 substances (synthesized parts of body protection compound, BPC) and their specificity to gastric mucosal cells. *Life Sci* 1997;61:PL 243-8
91. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K et al. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol.* 2010 Apr;61(2):241-50.
92. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et al. Hepatoprotective effect of BPC 157, a 15-amino acid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl<sub>4</sub> administration. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci.* 1993;53(18):PL291-6.

93. Morrison G, Headon B, Gibson P. Update in inflammatory bowel disease. *Aust Fam Physician* 2009;38:956-961.
94. Djakovic Z, Madzarac G, Hirsl D et al. Pentadecapeptide BPC 157 in the esophagogastric anastomosis healing process in rat model, Special IUPHAR GI Section-Zagreb, Medical Faculty, University of Zagreb, Croatia, October 17-19, 2013.
95. Kalogjera L, Ries M, Baudoin T, Ferencic Z, Trotic R, Pegan B. Dose-dependent protective effect of BPC 157 on capsaicin-induced rhinitis in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254 Suppl 1:S9-11.
96. Wood JD. The first nobel prize for integrated systems physiology: Ivan Petrovich Pavlov, 1904. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 326-30.
97. Mozsik G, Sikiric P, Seiwerth S. Pentadecapeptide BPC 157 (PLD116, PL14736, Pliva) influences ATP energy system and antagonizes 0.6 M HCl- and 96 % ethanol-gastric lesion in rat. *Digestion* 2006; 73 (Suppl. 2): 41.
98. Szabo S, Neumeyer JL. Dopamine agonists and antagonists in duodenal ulcer disease. In: Kaiser C, Kebebian W, Eds. *Symposium Series*. Washington: ACS American Chemical Society Publications 1983; 224: 175-96.
99. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in esophageal, gastric and duodenal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60, Suppl 2:87.
100. Orsolcic N, Seiwerth S, Sikiric P. BPC 157 enhances function of immunological effector cells in mice. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60 Suppl2:69.
101. Baric M. The effect of pentadecapeptide BPC 157 on healing of rectovaginal fistulas in rats, PhD day, University of Zagreb, School of Medicine, 2012.
102. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R et al. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157, *Curr Pharm Des.* 2013; 19(1):76-83



103. Barisic I, Radic B, Klicek R et al. Prolonged severe hypercalcemia induces an acute pancreatitis in rats, and shortening of QT interval and prolongation of PQ interval. The effect of the therapy with stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL14736). *J Physiol Pharmacol* 2009; 60, Suppl 2: 8.
104. Di Costanzo J, Cano N, Martin J et al. Treatment of external gastrointestinal fistulas by a combination of total parenteral nutrition and somatostatin. *J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11:465-470
105. Deruyter L, Van Blerk M, Cadie`re GB, De Graef J, Willems G Treatment of high-output gastric fistulas with omeprazole. *Hepatogastroenterology* 1991; 38 (Suppl 1):83-86
106. Paran H, Neufeld D, Kaplan O, Klausner J, Freund U Octreotide for treatment of postoperative alimentary tract fistulas. *World J Surg* 1995; 19:430-433
107. Misiewicz JJ Future trends in the management of peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 1985; Suppl 146:175-184
108. Szabo S, Vincze A Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *J Physiol (Paris)* 2000; 94:77-81
109. Christensen S, Riis A, Nørgaard M et al. Perforated peptic ulcer: use of pre-admission oral glucocorticoids and 30-day mortality. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:45-52
110. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R. et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation, *Curr. Pharm Des.* 2013 Jun 10. [Epub ahead of print]
111. Whittle BJR, Boughton-Smith NK, Moncada S. Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator nitric oxide in gastric mucosa. *Ann NY Acad Sci* 1992; 664: 126-39.
112. Robert A, Leung FW, Guth PH. Morphological and functional gastric cytoprotection by prostaglandin in rats receiving absolute ethanol orally. *Gut.* 1992 Apr;33(4):444-51.

113. Szabo S, Tache Y, Tarnawski A The «Gastric Cytoprotection» Concept of Andre Robert and the Origins of a New Series of International Symposia, eds: Filaretova LP, Takeuchi K: Cell/Tissue injury and Cytoprotection/Organoprotection in the Gastrointestinal Tract: Mechanisms, Prevention and Treatment. Front Gastrointest Res. Basel, Karger, 2012, vol 30, pp 1-23
114. Szabo S, Gallagher G, Horner HC et al. Role of the adrenal cortex in gastric mucosal protection by prostaglandins, sulfhydryls and cimetidine in the rat. *Gastroenterology* 1983;85:1384– 1390.
115. Lacy ER, Ito S. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroenterology* 1982; 83: 619-25.
116. Szabo S, Szelenyi I. Cytoprotection in gastrointestinal pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8: 149-54.
117. Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J: Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 1985;88:228– 236.
118. Konturek SJ, Mach T, Konturek JW, Bogdal J, Stachura J. Comparison of sucralfate and ranitidine in gastroprotection against alcohol in humans. *Am J Med* 1989; (Suppl) 6 AS; 55-59.
119. Tarnawski A, Stachura J, Ivey KJ, Mach T, Bogdal J, Klimczyk B: Ethanol-induced duodenal lesions in man. Protective effect of prostaglandin. *Prostaglandins* 1981;21(suppl):147– 153.

120. Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Klimczyk B, Mach T, Bogdal J: Prostaglandin protection of the human gastric mucosa against alcohol-induced injury. Endoscopic, histologic, and functional assessment. *Scand J Gastroenterol* 1986;21:165–169.
121. Stachura J, Tarnawski A, Szczudrawa J, Mach T, Bogdal J, Kirchmayer S: Histochemistry of cytoprotection of the rat liver. *Folia Histochem Cytochem* 1980;18:225–226.
122. Tarnawski A, Stachura J, Szczudrawa J, Bigaj M, Mach T: Cytoprotection of the liver by prostaglandins; in Van Maercke YMF, Van Moer EMJ, Pelckmans PAR (eds): *Stomach Diseases – Current Status*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1981, pp 55– 58.
123. Szczudrawa J, Klimczyk B: Prostaglandin protection of carbon tetrachloride- induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology* 1981;81:211– 217.
124. Ruwart MJ, Rush BD, Friedle N, Stachura J, Tarnawski A: 16, 16-dimethyl PGE<sub>2</sub> protection against ANIT-induced experimental cholangitis in rats. *Hepatology* 1984;4:658– 660.
125. Tarnawski A, Stachura J, Hollander D, Sarfeh IJ, Bogdal J: Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandin protection of the human gastric mucosa. Focus on the mucosal microvessels. *J Clin Gastroenterol* 1988;10:535– 545.
126. Tarnawski A, Stachura J, Gergely H, Hollander D: Microvascular endothelium – a major target for alcohol injury of the human gastric mucosa. Histochemical and ultrastructural study. *J Clin Gastroenterol* 1988;10:S53– S64.
127. Trier JS, Szabo S, Allan CH: Ethanol- induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin F<sub>2</sub> beta and cysteamine. *Gastroenterology* 1987;92:13–22.

128. Graham DY, Agrawal NM, Roth SH: Prevention of NSAID- induced gastric ulcer with misoprostol: Multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 1988;ii:1277– 80.
129. Rosa S, Diniz D'Souza, Vishwanath G. Dhume: Gastric cytoprotection, Review Article *Indian J Physiol Pharmacol* 1991; 35(2):88-98.
130. Morris GP, Harding PK, Wallace JL. A functional model for extracellular gastric mucus in the rat. *Virchows Arch B*1984; 46: 239-51.
131. Ito S, Lacy ER. Morphology of rat gastric mucosal damage, defense and restitution in the presence of luminal ethanol. *Gastroenterology* 1985; 88: 250-60.
132. Flemstrom G. Gastric secretion of bicarbonate. In: Johnson RL, Christensen J, Grossman MJ, Jacobson ED, Schultz SO. eds. *Physiology of the GI tract*, Vol i, New York: Raven Press, 1983; 603-14.
133. Allen A, Garner A. Progress report - Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut* 1980; 21: 249-62.
134. Rees WOW, Turnberg LA. Mechanisms of gastric mucosal protection: a role for the "mucus-bicarbonate" barrier. *Clin Sci* 1982; 62: 343-48.
135. Isenberg JI, Selling JA, Hogan DL, Koss MA. Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1987; 316: 374-79. ,
136. Bolton JP, Palmer D, Cohen MM. Stimulation of mucus and non-parietal cell secretion by the E<sub>2</sub> prostaglandins. *Am J Dig Dis* 1978; 17: 219-99.
137. Shea-Donahue PT, Nompleggi D, Myers L, Dubois A. A comparison of the effects of prostacyclin and the 15 (S), 15 methyl analogues of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> on gastric parietal and non-parietal secretion. *Dig Dis Sci* 1982; 27: 17-22.

138. Davenport HW, Warner HA, Code CF. Functional significance of gastric mucosal barrier to sodium. *Gastroenterology* 1964; 47; 142-52.
139. Hills BA, Butler BD, Lichtenberger LM. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am J Physiol* 1983; 244 (Gastrointest.Liver Physiol 7): G 561-68.
140. Lichtenberger LM, Graziani LA, Dial EJ, Butler BD, Hills BA: Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection. *Science* 1983;219:1327–1329.
141. Lichtenberger LM, Richards JE, Hills BA. Effect of 16, 16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> on surface hydrophobicity of aspirin-treated canine gastric mucosa. *Gastroenterology* 1985;88: 308-14.
142. Tarnawski A, Brzozowski T, Sarfeh IJ et al. Prostaglandin protection of human isolated gastric glands against indomethacin and alcohol injury. Evidence for direct cellular action of prostaglandin. *J Clin Invest* 1988;81:1081– 1089.
143. Terano A, Ota S, Mach T et al. Prostaglandin protects against taurocholate-induced damage to rat gastric mucosal cell culture. *Gastroenterology* 1987;92:669– 677.
144. Nagy L, Morales RE, Beinborn M, Vattay P, Szabo S: Investigation of gastroprotective compounds at subcellular level in isolated gastric mucosal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1201– G1208.
145. Brzozowski T, Tarnawski D, Hollander S et al. Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isoated gastric glands against indomethacin injury, *Journal of Physiology and pharmacology* 2005, 56, Supp 5, 75-88
146. Mersereau WA, Hinchey EJ. Role of gastric mucosal folds in formation of focal ulcers in the rat. *Surgery* 1982; 91: 150-55.

147. Takeuchi K, Nobuhara Y. Inhibition of gastric motor activity of 16, 16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub>. A possible explanation of cytoprotection. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1181-88.
148. Pihan G, Majzoubi D, Haudenschild C, Trier JS, Szabo S. Early microcirculatory stasis in acute gastric mucosal injury in the rat and prevention by 16, 16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> or sodium thiosulfate. *Gastroenterology* 1986; 91: 1415-1426.
149. Leung FW, Robert A, Guth PH: Gastric mucosal blood flow in rats after administration of 16, 16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> at a cytoprotective dose. *Gastroenterology* 1985;88:1948– 1953.
150. McGreavy JM, Moody FG. Protection of gastric mucosa against aspirin-induced erosions by enhanced blood flow. *Surg Forum* 1977; 28: 357-59.
151. Jacobson ED. The circulation of the stomach. *Gastroenterology* 1965; 48: 85-110.
152. Saxena PR, Bolt GR. Haemodynamic profiles of vasodilators in experimental hypertension. *Trends in Pharmacal Sci* 1986; 7: 501-4.
153. Bhounsule SA, Pereira IS, Hede SS, Diniz D'Souza RS. Effect of captopril on oxyphenbutazone and ethanol-induced gastric lesions in the rat. *European J Pharmacol* 1990; 177: 87-90.
154. Bhandare PN, D'Souza RD, Mainker A, Dhume VG. Protective effect of propranolol on ethanol-induced gastric lesions in mice. *European J Pharmacol* 1990; 191: 167-72.
155. Kvietys PR, Twohig B, Danzell J, Specian RD: Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology* 1990;98:909– 920.

156. Pihan G, Regillo C, Szabo S: Free radical and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987;32:1395– 1401.
157. Morales RE, Johnson BR, Szabo S: Endothelin induces vascular and mucosal lesions, enhances the injury by HCl/ethanol, and the antibody exerts gastroprotection. *FASEB J* 1992;6:2354– 2360.
158. Tache Y: Brainstem neuropeptides and vagal protection of the gastric mucosal against injury: role of prostaglandins, nitric oxide and calcitonin-gene related peptide in capsaicin afferents. *Curr Med Chem* 2012;19:35– 42.
159. Lambrecht N, Burchert M, Respondek M, Muller KM, Peskaar BM: Role of calcitonin-gene related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin. *Gastroenterology* 1993;104:1371– 1380.
160. Wallace JL, Del Soldato P: The therapeutic potential of NO- NSAIDs. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17:11– 20.
161. Szabo S, Zetter BR, Tobias J, Pihan G, Raza A: Protection by prostaglandins (PG) and sulfhydryls (SH) against ethanol-induced endothelial injury in vitro and in vivo. *Gastroenterology* 1987;92:A381.
162. Szabo S, Pihan G, Spill WF, Zetter BR: Cellular approach to cytoprotection: conditional or no protection by prostaglandins (PG) and sulfhydryls (SH) against ethanol- or HCl-induced injury to isolated mucous, parietal and chief cells and cultured endothelial cells. *Gastroenterology* 1988;94:A451.
163. Pihan G, Szabo S: 16, 16-dmPGE<sub>2</sub> and thiosulfate decrease gastric mucosal penetration of hypertonic NaCl and increase net transmucosal water flux. *Gastroenterology* 1988;94:A354.

164. Dupuy D, Kronague JF, Jones AG, Szabo S: Gastric mucosal protection may be mediated through increases in vascular permeability which create a histodilutional barrier. *Gastroenterology* 1988;94: A615.
165. Robert A, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Sinha AJ, Thornburgh BA: Cytoprotection by prostaglandin occurs in spite of penetration of absolute ethanol into the gastric mucosa. *Gastroenterology* 1985; 88:328–333.
166. Korman MG, Bolin TD, Szabo S, Hunt RH, Marks IN, Glise H: Sucralfate: the Bangkok review. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9:412– 415.
167. Johansson C, Kollberg B. Stimulation of intragastrically administered E<sub>2</sub> prostaglandin of human gastric mucus output. *EurJ Clin Inv* 1979; 9: 229-32.
168. Smeeton L, Hurst B, Allen A, Garner A. Gastric and duodenal bicarbonate transport in vivo; influence of prostaglandins. *Am J Physiol* 1983; 245: G 751-59.
169. Simon B, Kather H. Prostaglandin sensitive adenylate cyclase in human gastric mucosa. *Pharmacology* 1979, 19: 96-103.
170. Ferguson WW, Edmonds AW, Starling JR, Wangensteen SL. Protective effect of PGE<sub>1</sub> on lysosomal enzyme release in serotonin-induced gastric ulceration. *Ann Surg* 1973; 177: 648-54.
171. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 1981; 214: 200-2.
172. Hawkey CJ, Rampton DS. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease or treatment? *Gastroenterology* 1985; 89: 1162-68.
173. Szabo S, Trier IS. Pathogenesis of acute gastric mucosal injury. Sulfhydryls as a protector, adrenal cortex as a modulator and vascular endothelium as target. In: Allen A,



- Flemstrom C. Garner A. Silen W. Turnberg LA. eds. Mechanisms of mucosal protection in the upper gastrointestinal tract, New York: Raven Press 1984; 287-93.
174. Szabo S. Peptides, sulfhydryls and glucocorticoids in mucosal defense - coincidence or connection? *Gastroenterology* 1984; 87: 228-29.
175. Robert A. Eberle D. Kaplowitz N. Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. *Am. Physiol* 1984; 247: G296-304. *Indian J Physiol Pharmacol* 1991; 35(2)
176. Konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Warzecha Z, Konturek PK, Yanaihara N. Interaction of growth hormone releasing factor and somatostatin on ulcer healing and epidermal growth factor. *Digestion* 1988; 41: 121-28.
177. Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P, Nexø E. Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection. *Gastroenterology* 1984; 87: 103-8.
178. Ito H, Guth P. Role of oxygen derived free radicals in haemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88: 1162-67.
179. Tariq M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective effect of Vit E. *Res Commun Chem Pathol* 1988; 60: 87-96.
180. Szabo S. Role of radicals in aspirin-induced gastric mucosal lesions. Abstract, 3rd Inter Science World Conference on inflammation, Monte-Carlo (Principality of Monaco), March 15-18, 1989, 414.
181. Bose R, Brown A, Szabo S. Histochemical and pharmacological studies related to mast cells with ethanol-induced erosions. *Fed Proc* 1985; 44: 733.
182. Galli J, Wershil BK, Bose R, Walker PA, Szabo S. Ethanol-induced acute gastric injury in mast cell-deficient and congenic normal mice: evidence that mast cells can augment the area of damage. *Am. Pathol* 1987; 128: 131-40.

183. Whittle BJR, Oren-Wolman N, Guth PH. Gastric vasoconstrictor actions of leukotrienes C<sub>4</sub>, PGF<sub>2</sub> and thromboxane mimetic U-46619 on rat submucosal microcirculation in vivo. *Am J Physiol* 1985; 248: G 580-86.
184. Hua HY, Dahlen SE, Lundberg JM, Hammerstroem S, Hedqvist P. Leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, and E<sub>4</sub> cause widespread and extensive plasma extravasation in the guinea pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1985; 330: 136-41.
185. Peskar BM, Lange K, Hoppe U, Peskar BA. Ethanol stimulates formation of leucotrienes C<sub>4</sub> in rat gastric mucosa. *Prostaglandins* 1986; 31: 283-92.
186. Peskar BM, Lange K. Role of leukotriene C<sub>4</sub> in gastric protection by sulfhydryl modulating agents and metals in the rat. *Gastroenterology* 1987; 92: 1573.
187. Svanes K, Ito S, Takeuchi K, Silen W. Restitution of the surface epithelium of in vitro frog mucosa after damage with hyperosmolar sodium chloride. *Gastroenterology* 1982; 82:1409-26.
188. Rutten MY, Ito S. Morphology and electrophysiology of guinea pig gastric mucosal repair in vitro. *Am J Physiol* 1983; 244: G 171-82. *Indian J Physiol Pharmacol* 1991; 35(2)
189. Morris GP, Wallace JL. The roles of ethanol and of acid in the production of gastric erosions in rats. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1981; 38: 23-28.
190. Silen W. Gastric mucosal defense and repair. In: Johnson IR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2nd ed. New York: Raven Press 1987; 1055-69.
191. Singh J: Prostaglandin release from rat stomach following vagal stimulation or administration of acetylcholine. *Eur J Immunol* 1980;65:39– 48.
192. Tache Y, Vale W, Rivier J, Brown M: Brain regulation of gastric secretion: influence of neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5515– 5519

193. Yoneda M, Tache Y: Central thyrotropin-releasing factor analog prevents ethanol-induced gastric damage through prostaglandins in rats. *Gastroenterology* 1992;102:1568–1574.
194. Kato K, Yang H, Tache Y: Low doses of TRH analogue act in the dorsal motor nucleus to induce gastric protection in rats. *Am J Physiol* 1995;269: R1301– R1307.
195. Yoneda M, Tache Y: Vagal regulation of gastric prostaglandin E<sub>2</sub> release by central TRH in rats. *Am J Physiol* 1993;264:G231– G236.
196. Kato K, Yang H, Tache Y: Role of prostaglandins and calcitonin gene-related peptide in central vagal cholinergic-dependent protection against gastric injury in urethane-anesthetized rats. *Digestion* 1996;57:322– 327.
197. Miller T. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms *Am J Physiol* 1983; 245: G601-623
198. Mozsik Gy, Kiraly A, Garamszegi M et al. Failure of prostacyclin, b-carotene, atropine and cimetidine to produce gastric cyto- and general mucosal protection in surgically vagotomized rats. *Life Sci* 1991;49:1383– 1389.
199. Mozsik Gy: Gastric cytoprotection 30 years after its discovery by Andre Robert: a personal perspective. *Inflammopharmacology* 2010;18:209– 221.
200. Kaneko H, Kaunitz J, Tache Y: Vagal mechanisms underlying gastric protection induced by chemical activation of the raphe pallidus in rats. *Am J Physiol* 1998;275:G1056– G1062.
201. Kaneko H, Kato K, Ohning G, Tache Y: Medullary thyrotropin-releasing hormone mediates vagal-dependent adaptive gastric protection induced by mild acid in rats. *Gastroenterology* 1995;109:861–865.

202. Martinez V, Barrachina MD, Ohning G, Tache Y: Cephalic phase of acid secretion involves activation of medullary TRH receptor subtype 1 in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283: G1310– G1319.
203. Tache Y, Yang H, Miampamba M, Martinez V, Yuan PQ: Role of brainstem TRH/TRH- R1 receptors in the vagal gastric cholinergic response to various stimuli including sham-feeding. *Auton Neurosci* 2006;125:42– 52.
204. Gyires K, Mullner K, Ronai AZ: Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defense in the rat. *J Physiol (Paris)* 2001;95:189– 196.22 Szabo · Tache Tarnawski
205. Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Minorics R, Falkay G, Matyus P: Analysis of the role of central and peripheral alpha2- adrenoreceptor subtypes in gastric mucosal defense in the rat. *Neurochem Int* 2007;51:289– 296.
206. Holzer P: Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43:144– 202.
207. Szolcsanyi J, Bartho L: Impaired defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin-desensitised rat; in Mozsik Gy, Hanninen D, Javor T (eds): *Gastrointestinal Defense Mechanisms*. Pergamon, Oxford, 1981, pp 39– 51.
208. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Naturally occurring peptides for gastroprotection: Stable gastric pentadecapeptide BPC 157, 13th international conference on GI research and ulcer research-book of abstracts, *Journal of physiology and pharmacology*, Vol 60, supplement 2, august 2009
209. Robert A, Lancaster C, Olafsson AS et al: Gastric adaptation to the ulcerogenic effect of aspirin. *Exp Clin Gastroenterol*, 1991; 1:73-81

210. Robert A. Cytoprotection and adaptive cytoprotection. In: Nelis GF, Boeve J, Misiewicz JJ, Eds., Peptic Ulcer Disease: Basic and Clinical Aspects. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 297–316. 1985.
211. Klicek R, Kolenc D, Suran J et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. *J Physiol Pharmacol*. 2013 Oct;64(5):597-612.
212. Hung CR, Neu SL. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *J Nutr*. 1997 Apr;127(4):630-6
213. Haider S, Naqvi F, Tabassum S et al. Preventive effects of curcumin against drug- and starvation-induced gastric erosions in rats. *Sci Pharm*. 2013 Jun;81(2):549-58.
214. Seiwert S, Brcic L, Vuletic LB et al. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des*. 2014;20(7):1121-5.
215. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.
216. Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Moncada S. Nitric oxide mediates rat mucosal vasodilatation induced by intragastric capsaicin. *Eur J Pharmacol*. 1992 Aug 6;218(2-3):339-41

## 11. BIOGRAFIJA

Rođen sam 1982. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Vladimir Nazor u Zagrebu pohađao sam od 1989.-1997. godine. Od 1997.-2001. godine pohađao sam matematičko-prirodoslovnu XV gimnaziju u Zagrebu (MIOC), a od 2001.-2007. godine Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te sam diplomirao u srpnju 2007. g. Pipravnički staž u trajanju od jedne godine odradio sam u KBC Sestre Milosrdnice od 10. mj. 2007.-10. mj. 2008. g. Stručni ispit pri ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi položio sam 2008. g. Od kraja 2008. g. do kraja 2009. g. radio sam kao liječnik na Klinici za torakalnu kirurgiju „Jordanovac“, a u siječnju 2010. g. započeo sam na istoj Klinici specijalizaciju iz opće kirurgije koju sam završio u 06. mj. 2014. g. te stekao zvanje specijalista opće kirurgije. Od 05. mj 2009. g. krenuo sam sa eksperimentalnim radom na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, rad na polju eksperimentalne farmakologije. U 10. mj. 2010. g. upisao sam poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, tema eksperimentalna farmakologija gornjeg gastrointestinalnog trakta. Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog torakalnog društva Toraks i Hrvatske udruge za rane, aktivno se služim engleskim i njemačkim jezikom te imam položenu Europsku računalnu ECDL diplomu. U slobodno vrijeme bavim se sviranjem gitare, skijanjem, voćarstvom i vinogradarstvom te daljnjim usavršavanjem engleskog i njemačkog jezika.