

Protektivan učinak pentadekapeptida BPC 157 na cijeljenje oštećenja želuca, duodenuma, jetara i mozga uzrokovanih visokom dozom celekoksiba u štakora

Drmić, Ivan Domagoj

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:379838>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-01**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Domagoj Drmić

**Protektivan učinak pentadekapeptida
BPC 157 na cijeljenje oštećenja želuca,
duodenuma, jetara i mozga uzrokovanih
visokom dozom celekoksiba u štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivan Domagoj Drmić

**Protektivan učinak pentadekapeptida
BPC 157 na cijeljenje oštećenja želuca,
duodenuma, jetara i mozga uzrokovanih
visokom dozom celekoksiba u štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Rad je izrađen u laboratorijima Zavoda za farmakologiju i Zavoda za patologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof.dr.sc.Predrag Sikirić

SADRŽAJ

	Stranica
1. Uvod	1
1.1. BPC i Pentadekapeptid BPC 157	1
1.1.1. Lokalizacija RNA i proteina BPC-a za vrijeme razvoja ljudskog embrija	1
1.1.2. Farmakokinetika BPC-a 157	1
1.1.3. Pentadekapeptid BPC 157	4
1.2. Dosadašnje spoznaje o učinku BPC-a 157 na gastrointestinalni trakt	5
1.3. Dosadašnja istraživanja o povezanosti BPC-a 157 sa NO i COX sustavom	39
2. Hipoteza	43
3. Ciljevi rada	44
3.1. Opći cilj istraživanja	44
3.2. Specifični ciljevi istraživanja	44
4. Materijali i metode	45
5. Rezultati	49
6. Rasprava	68
7. Zaključak	72

8. Popis literature	73
9. Sažetak	86
10. Abstract	88
11. Kratka biografija autora	90

Popis oznaka i kratica

tj.t. – tjelesna težina

i.p. – intraperitonealno

p.o. – peroralno

i.g. – intragastrički

s.c. – potkožno

µg – mikrogram

kb – kilobaza, tisuću parova baza

F.O. – fiziološka otopina

LD – letalna doza

M.W. – molekularna težina

BPC 157 – Body Protective Compound 157, pentadekapeptid

NO – dušični oksid

NOS – enzim NO sintetaza

L-NAME – N^G - nitro-L-arginin metil ester, blokator NOS-a

L-arginin – NO prekursor

COX – enzim ciklooksigenaza

NSAIDs – nesteroidni protuupalni lijekovi

AST – aspartat transaminaza

ALT – alanin transaminaza

HPLC – visokotlačna tekuća kromatografija

1. Uvod

1.1. BPC i pentadekapeptid BPC 157

1.1.1. Lokalizacija RNA i proteina BPC-a za vrijeme razvoja ljudskog embrija

Analiza prostorne i vremenske distribucija BPC-a pomoću in situ hibridizacije i imunohistokemije na ljudskim embrijima od 6.-14. tjedna gestacije pokazala je da je u razdoblju od 6.-12. tjedna gestacije BPC bio eksprimiran u epitelu bronha razvijajućeg pluća (1). U 12. tjednu protein je također bio prisutan u epitelnim stanicama bronhalnih grana. Pozitivno bojanje bronhalnog epitela kroz promatrani period je dobiveno BPC poliklonalnim antitijelima. BPC je također bio eksprimiran u sluznici gastrointestinalnog trakta, bubregu i koži (1). Snažno bojanje na BPC protein je uočeno na crijevnom epitelu između 8. i 14. tjedna gestacije. U bubregu, BPC je bio eksprimiran na razini RNA u glomerulima u razvoju (1). Northern blot hibridizacija je otkrila 2 različita odsječka mRNA, jedan od 3 kb, a drugi od 1.8 kb. Visoke razine BPC mRNA nađene su u gastrointestinalnom epitelu odraslih (1). Ovi podaci sugeriraju da unatoč izolaciji BPC-a iz želučanog soka gdje vjerojatno primarno i djeluje, BPC može imati dodatne regulatorne uloge u funkciji ljudskih pluća, bubrega i kože.

1.1.2. Farmakokinetika BPC-a 157

Trinaest grupa od 3 štakora i 3 štakorice primilo je BPC 157 obilježen radioaktivnim tricijem (³H-BPC157) peroralno u dozi od 10 mg/kg (oko 70 RCi/kg) (1). Srednje vrijednosti radioaktivnosti u krvi i plazmi dobivene su ubijanjem životinja i skupljanjem

krvi u 13 vremenskih točaka nakon administracije radi analize razine radioaktivnosti u krvi i plazmi.

³H-BPC157 je brzo apsorbiran iz probavnog trakta. U intervalu između pola sata i 16 sati nakon administracije razina radioaktivnosti u plazmi ostala je gotovo nepromijenjena (10 µg/ml). Eliminacija iz cirkulacije između 24 i 168 sati pojavljuje se u skladu sa poluvremenom eliminacije ($t_{1/2}$) od oko 68 sati. Radioaktivnost se ravnomjerno rasporedila između plazme i krvnih stanica. Ekskrecija je većinom išla mokraćom (30 %), a manjim dijelom stolicom (12 %). Razine radioaktivnosti u tkivima nakon 168 sati korespondirale su sa 20-25% radioaktivnosti početne doze. Postotak doze (30-35%) koji je preostao izražava eliminarni dio, vjerojatno u obliku ³H₂O u izdahnutom zraku nakon prethodne metabolizacije i izmjene izotopa tricijem obilježenog BPC-a 157 sa tjelesnom vodom. Povišene razine koncentracije u tkivima nađene su sat vremena nakon administracije u stijenci želuca i tankog crijeva (2-3 puta u odnosu na koncentracije u plazmi), i u nešto manjem obimu, u plućima i pankreasu. U svim ostalim analiziranim tkivima i vremenskim točkama razine vrijednosti radijacije bile su slične plazmatskima.

Prosječna razina radioaktivnost u plazmi mužjaka bila je karakterizirana brзом apsorpcijom rezultirajući plazmatskom razinom od oko pola maksimalne koncentracije (C_{max}) u prvoj vremenskoj točki (15 minuta nakon administracije ³H-BPC157). Plazmatske koncentracije narasle su do razine platoa od oko 10.1 µg eq./ml, što je trajalo do najmanje 8 sati od administracije. U nastavljajućoj vremenskoj točki (16 sati) bio je opažen pad u plazmatskoj koncentraciji do vrijednosti 8.58 ± 0.42 µg eq./ml, sa postepenim daljnjim padom u idućim vremenskim točkama do konačne vrijednosti od 1.74 ± 0.21 µg eq./ml u zadnjoj vremenskoj točki (168 sati od administracije).

Poluvrijeme eliminacije radioaktivnosti iznosilo je 66 sati. Površina ispod plazmatske koncentracije (AUC) suprotstavljena ekstrapoliranoj krivulji do u beskonačnost bila je 988 $\mu\text{g eq./ml}$. Sličan farmakokinetički profil je dobiven i kod štakorica, premda su u svim vremenskim točkama plazmatske koncentracije bile nešto više nego kod mužjaka iste podskupine. To je dovelo većeg AUC-a nego kod mužjaka- 1058 $\mu\text{g eq./ml}$. Poluvrijeme eliminacije je iznosilo 69 sati. Ostali važniji farmakokinetički parametri plazmatske koncentracije (nekompartmanska analiza) sažeto su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1 – Važniji farmakokinetički parametri u štakorskoj plazmi (nekompartmanska analiza) nakon jednokratne peroralne aplikacije BPC-a 157 obilježenog radiokativnim tricijem (1)

Parametar	Jedinica	Mužjaci	Ženke	Mužjaci + Ženke
$t_{\max}$	sat	8	3	3
$C_{\max}$	$\mu\text{g eq./ml}$	10.36	10.90	10.53
AUC _n	$\text{h} \cdot \mu\text{g eq./ml}$	821	870	845
AUC	$\text{h} \cdot \mu\text{g eq./ml}$	988	1058	1023
$t_{1/2}$	sat	66	69	68
MRT	sat	91	94	93
F	-	1.1	1.2	1.2

Indeks biorasploživosti (F) izračunat je koristeći AUC podatke dobivene u farmakokinetičkim studijama kod intravenske primjene. Biorasploživost 110-120% je bila izračunata, te pokazuje potpunu apsorpciju BPC-a 157 iz probavnog trakta. Omjer radioaktivnosti krvi i plazme bio je blizu jedan u svim uzorcima, ukazujući na ravnomjernu distribuciju između plazme i krvnih stanica.

1.1.3. Pentadekapeptid BPC 157

Stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 je protuulkusni peptid, dio je sekvence ljudskog želučanog proteina BPC-a izoliranog iz želuca, i slobodno je topljiv u vodi pri neutralnom pH, kao i u fiziološkoj otopini (2,3,4). Stabilan je u ljudskom želučanom soku, pa mu se učinak nedvojbeno određuje budući da mu nisu potrebni nosači za siguran prolazak kroz želudac, te se daje sam. Do sada je dokazane sigurnosti primjene u kliničkim ispitivanjima za upalnu bolest crijeva (PL-10, PLD-116, PL 14736) i cijeljenje rana, kao i bez izvještaja o vlastitoj toksičnosti, LD1 nije dosegnut (2,3,4). BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W.1419), sintetiziran u kompaniji Diagen, iz Ljubljane (Republika Slovenija) je do sada najčešće korišten u istraživanjima, u različitim dozama (10 μ g, 10 ng, 10 pg/kg) i u različitim načinima primjene (i.p., i.g., p.o., lokalno, 1 ml/ μ g, /2ng kupka, u kapima za oči, kao krema u koncentraciji 1 μ g/g neutralne kreme). BPC 157 se je koristio kao 99%-tni čisti peptid (potvrđeno HPLC-om) dok je jedinu nečistoću činila 1-des-glipeptideaza (2,3,4). BPC 157 sa svojim snažnim protuulkusnim potencijalom protiv različitih ulcerogena predstavlja novi medijator Robert-ovog koncepta citoprotekcije (2).

1.2. Dosadašnje spoznaje o učinku BPC-a 157 na gastrointestinalni trakt

Učinak primjene pentadekapeptida BPC-a 157 (GEPPPGKPADDAGLV, M.W. 1419, PL-10, PLD-116, PL 14736) u različitim dozama do sada je bio istraživani u čitavom nizu različitih modela oštećenja gastrointestinalnog trakta kao i u raznim vrstama. Pojedinačni radovi su zbirno prikazani u tablicama ovisno o načinu i mjestu izazivanja lezija u probavnome traktu.

Tablica 2 – Korištenje BPC-a 157 u modelu parodontitisa (5)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
Parodontitis je izazvan ligaturom postavljenom oko donjeg lijevog prvog molara. 13.-og dana gingivomukozno tkivo oko molara je bilo uklonjeno sa obje strane. Upala je bila procjenjena tehnikom ekstravazacije Evansovog plavila iz plazme i histološki. Gubitak alveolarne kosti je bio analiziran pomoću mikroCT-a. Ref. 5	Štakori tretirani sa BPC-om 157 (jednom dnevno kroz 12 dana) ili vehikulumom.	Svrha rada je bila istražiti učinak BPC-a 157 na upalu i resorpciju kosti u modelu eksperimentalnog parodontitisa u štakora. Uz to je ispitivan akutni učinak BPC-a 157 na gingivalni protok krvi.	BPC 157 nema učinka na gingivomukozni protok krvi. 12.-to dnevna ligatura uzrokovala je značajno povećanje ekstravazacije Evansovog plavila u gingivomukoznom tkivu, histološke znakove upale i destrukciju alveolarne kosti. Terapija BPC-om 157 značajno reducira ekstravazaciju plazme, histološke poremećaje i resorpciju alveolarne kosti.

Tablica 3 – Korištenje BPC-a 157 u modelima ezofagealnih lezija (6-8)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
U štakora, nakon odstranjivanja želuca, ezofagus i jejunum su bili povezani terminolateralnom anastomozom. Ref. 6*	Počevši 24 sata nakon operacije, lijek je kontinuirano davan u vodi za piće, u volumenu 12, 5 mL/ štakoru dnevno, do eutanazije na kraju promatranog perioda, tj. 7., 14. i 28. dana nakon operacije. Utemeljeno na prijašnjim eksperimentima, doze BPC-a 157 od 125 µg ili 125 ng bile su dnevno izračunate po kg tj. težine.	Učinkovitost BPC-a 157 i drugih antiulkusnih agensa nazvanih "izravnim citoprotektorima" bila je dokazana u gastrektomiranih štakora kod kojih je primjenjen cisteamin 24 sata nakon operacije izazvavši lezije na duodenumu, a koji su bili žrtvovani 24 sata nakon aplikacije ulcerogena. Daljnji fokus bio je na mogućnosti da se ovaj učinak vidi tijekom produljenog perioda (1, 2, 4 tjedna) i u drugim dijelovima gastrointestinalnog trakta (tj. ezofagusu).	U prilog ovim početnim otkrićima, također uzimajući u obzir i gastrektomirane štakore slobodne od želučane kiseline kao idealni model za dugotrajne citoprotektivne studije, BPC157 je značajno umanjivao terminolateralni ezofagojeunealni anastomozni refluksni ezofagitis, također tijekom produljenog perioda. Dobiveni rezultati su potvrđeni s utvrđivanjem inflamatornih stanica. U odnosu na kontrolne vrijednosti, BPC 157-om tretirane životinje pokazuju manji broj mononukleara i polimorfonukleara u svim promatranim periodima.
Dvanest ili dvadeset mjeseci nakon inicijalnoga stimulusa (tuba ušivena unutar sfinktera kroz jedan tjedan i nakon toga spontano uklonjena s peristaltikom) štakori pokazuju prolongirani ezofagitis (konfluentne hemoragične i žute lezije, tanji epitel i površinski kornealni sloj sa poremećenom stratifikacijom); konstantno smanjen tlak u oba sfinktera (utvrđivano s vodenim	Za vrijeme ezofagitis pokusa BPC 157 je davan ili u 10 µg/ kg i.p., jedanput dnevno (zadnja aplikacija 24 sata prije utvrđivanja) ili alternativno, bio je davan u pijućoj vodi od 0.16 µg/ml (12 ml/štakor). Osim toga BPC 157 (10 µg/kg) ili fiziološka otopina (1ml/štakor, 5ml/kg) je davano direktno u želudac; utvrđivanje tlaka je učinjeno 5 min. nakon toga.	Kada je BPC 157 (10 µg/kg) davan direktno u želudac i učinak utvrđivan 5 min. nakon toga, učinak BPC-a je specifičan, budući da povećava tlak donjeg ezofagealnog sfinktera, a smanjuje tlak piloričnog sfinktera.	Tretman (BPC 157 je davan ili u 10 µg/kg, i.p., jedanput dnevno, zadnja aplikacija 24 sata prije utvrđivanja) odnosno alternativno, davan je kontinuirano u pijućoj vodi od 0.16 µg/ml (12ml/štakor) uklanjanja i (ezofagitis) makroskopski i mikroskopski u svakoj regiji i svakom ispitivanom periodu), te ii) popravlja tlak u oba sfinktera (cm H20).

manometrom povezanim na drenažni port Folijeovog katetera implantiranog u želudac ili kroz ezofagealnu ili duodenalnu inciziju); i ispad funkcije oba sfinktera donjeg ezofagealnog i piloričnog sfinktera. Ref. 7*			
Sedam ili četrnaest dana ili 12 mjeseci nakon ušivanja jedne tube u pilorički sfinkter (uklonjena peristaltikom 7. dana), štakori pokazuju prolongirani ezofagitis sa konstantno smanjim tlakom, ne samo u piloričnom nego i u donjem ezofagealnom sfinkteru, te ispad funkcije kod oba sfinktera. Ref. 8*	Za vrijeme ezofagitis-pokusa, želučani pentadekapeptid BPC 157 (PL 14736) je davan i.p. jedanput dnevno (10 µg/kg, 10 ng/kg, zadnja aplikacija 24 sata prije utvrđivanja) ili kontinuirano u pijućoj vodi od 0.16 µg/ml (12 ml/štakor), ili direktno u želudac 5 min. prije utvrđivanja tlaka (utvrđivano s vodenim manometrom povezan na drenažni port Folijeovog katetera implantiranog u želudac ili kroz ezofagealnu ili duodenalnu inciziju).	U normalnih štakora BPC 157 povećava tlak donjeg ezofagealnog sfinktera, ali smanjuje tlak piloričnog sfinktera.	BPC 157 tretman popravljiva i) ezofagitis (makroskopski i mikroskopski u svakoj regiji i svakom ispitivanom periodu), te ii) i popravljiva tlak u piloričnom sfinkteru; iii) popravljiva tlak u donjem ezofagealnom sfinkteru (cm H2O).

Ref. 6* Ova efikasnost je djelomično bila prisutna i kod ostalih antiulkusnih agensa, kolestiramina 2.5 mg, ranitidina 125 mg, sukralfata 725 mg (kontrola je dobivala 72,5 ml/kg tj. težine vode). Nakon ezofagitisa starog tjedan dana (mikroskopsko utvrđivanje), ali ne nakon 2 ili 4 tjedna, manje oštećenja sluznice je nađeno u štakora koji su pili ranitidin ili sukralfat u odnosu na kontrolu). Slična učinkovitost je nađena

kod kolestiramina. Presentacija upalnih stanica nije pokazala razliku u usporedbi s kontrolnim vrijednostima.

Ref. 7* Ranitidin, dan kao standardni agens i prateći isti protokol (50 mg/kg, i.p., jedanput dnevno; 0.83 mg/ml u pijućoj vodi; ili 50 mg/kg direktno u želudac), nije imao učinka.

Ref. 8* Ranitidin, dan prateći isti protokol (50 mg/kg, i.p., jedanput dnevno; 0.83 mg/ml u vodi za piće; ili 50 mg/kg izravno u želudac), nema učinka, ni u štakora s ezofagitisom, niti u normalnih štakora.

Tablica 4. – Korištenje BPC-a 157 u modelima želučanih lezija (9-30)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
48-satni stres izazvan obuzdavanjem, 96%-ni etanol intragastrički Ref. 9*	10 µg, 10 ng i.p., i.g.	Monastralsko plavilo, endotelna protekcija Duodenalni ulkusi	Protekcija želuca Endotelna protekcija Duodenalna protekcija
Ligacija žučnog voda, u štakora Ref. 10	10 µg, 10 ng i.p., i.g. kao profilaksa 1 sat prije ligacije žučnog voda, kao terapija jedanput dnevno počinjući 24 sata nakon ligacije (zadnja aplikacija 24 sata prije žrtvovanja).	Akutni pankreatitis Duodenalne lezije	Korisni učinci na pankreatitis, pozitivni utjecaj BPC 157 na razvoj želučanih i duodenalnih lezija u štakora s ligiranim žučnim vodom bilo u pretretmanu, bilo u posttretmanu.
96%-ni etanol i.g., u štakora 48- satni, u štakora Indometacin 30 mg/kg s.c., u štakora Ref. 11	10 µg, 10 ng i.p. pentadekapeptida BPC 157, na želučane lezije nastale u štakora izazvane 96%-nim etanolom, stresom izazvanim obuzdavanjem i	Kapsaicinski posebni učinak na senzorne neurone: visoka doza u odraslih (125 mg/kg sc, 3 mj. stari) ili primjena (50 mg/kg sc) u neonatalnih životinja (starosti od 7	Bez kapsaicina: BPC zaštićuje želučanu sluznicu od etanola, stresa i aplikacije indometacina; neurotoksična doza kapsaicina: negativni učinak kapsaicina na

	indometacinom. Moguće uključivanje senzornih neurona u zaštitnu aktivnost BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg i.p.) promatrano je sa kapsaicinom.	dana) uništava somatosenzorna vlakna, dok mala doza (0,5 mg/kg i.p.) aktivira otpuštanje neurotransmitora i protektivni učinak na sluznicu.	lezije uzrokovane stresom, etanolom ili indometacinom konzistentno pogađa zaštitnu aktivnost BPC-ja. BPC-protekcija je još uvijek evidentna u kapsaicinom tretiranih štakora (bilo da su odrasli ili novorođeni) u svim od ovih postupaka. Nakon neonatalnog tretmana kapsaicinom: kompletni izostanak BPC-protekcije je utvrđen kad je BPC bio primjenjen kao pojedinačni nanogramski protokol, ali je mukozna protekcija ponovno vraćena kada je ista doza davana dnevno. Kod ekscitatornih doza kapsaicina korisni učinak BPC 157 je također rastao.
48 satni test izazivanja stresa obuzdavanjem + fentolamin (10.0mg/kg ip), prazosin (0.5 mg/kg ip), johimbina (5.0 mg/kg ip), klonidin (0.1 mg/kg ip) (alfa-adrenergičko područje), propranolol (1.0 mg/kg ip), atenolol (20.0 mg/kg sc) (beta-adrenergičko područje), domperidon (5.0 mg/kg ip), i haloperidol (5.0 mg/kg ip) (periferni/centralni dopaminergički sustav). Ref. 12*	10 µg, 10 ng ip pentadekapeptid BPC 157, na želučane lezije stvorene u štakoru nakon 48 satnog izazivanja stresa obuzdavanjem, i učinak na alfa-adrenergičko područje, beta-adrenergičko područje, periferni /središnji dopaminski sustav.	Kompleksna protektivna interakcija bilo sa alfa adrenergičkim (npr. otpuštanje katekolamina) bilo sa dopaminergičkim (perifernim/centralnim) sustavima.	Jaka protekcija, utvrđena nakon ig i.p. primjene BPC-a 157, je potpuno uklonjena istovremeno primjenom fentolamina, klonidina i haloperidola dok nije konzistentno bila pogođena uporabom prazosina, johimbina ili domperidona. Atenolol je ukinuo protekciju kod i.p. primjene BPC-a 157, dok je propranolol specifično pogađao protekciju kod ig primjene BPC-a 157.
Potpuna gastrektomija je učinjena 24 h prije	Citoprotektivni učinak BPC-a 157 (10 µg ili	Kako bi se napravila pogodna okolina za	U zdravih štakora sa intaktnim želudcom,

ulcerogene procedure. Unatoč nedostatku želuca i želučane kiseline oštećujući učinak cisteamina (400mg/kg sc, žrtvovanje 24h nakon toga) je ispitivano u štakora. Ref. 13*	10 ng/kg i.p.) sat vremena prije aplikacije cisteamina.	citoprotektivne studije u kojoj ne bi bila prisutna želučana kiselina 24 sata prije davanja ulcerogena učinjena je gastrektomija. Bez želuca, uništavajući učinci cisteamina bili su uvjerljivo definirani kao neovisni o želučanoj kiselini (analogno alkoholnim želučanim lezijama). Stoga, visok "citoprotektivni kapacitet", očito neovisan o želučanoj kiselini, zajednički za sve testirane agense (BPC 157, cimetidin, ranitidin, omeprazol, bromokriptin i atropine) može biti jasno naglašen.	BPC 157 pokazao je snažni koristan učinak. Interesantno, kod gastrektomiziranih životinja, aplikacija BPC-a 157 prevenirala je razvoj teških duodenalnih lezija koje su inače bile opažene u kontrolnih gastrektomiranih štakora koji su primali cisteamin. Jednaki uništavajući učinak cisteamina i jednaki zaštitni učinak BPC-a 157 kod gastrektomiranih, kao i kod štakora sa intaktnim želudcom, čini se osobito relevantnim iz citoprotektivnog kuta gledanja.
U istraživanjima gastrointestinalnih lezija kod štakora uzrokovanih raznim agensima (indometacin (30 mg / kg s.c.), aspirin (400 mg / kg i .g.) i diklofenak (12,5 mg / kg i.g.)). Adjuvantni artritis, aplikacija Freundsovog adjuvansa (0.2 mL) (14 dana, 30 dana, 1 godina) u štakorski rep. Ref. 14	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.) davan istovremeno sa aspirinom i diklofenakom ili sat vremena prije aplikacije indometacina.	Učinak BPC-a 157 na lezije uzrokovane kroničnom upalom, poput adjuvantnog artritisa, gastrointestinalne lezije inducirane NSAIDs-ima bio je istraživao u štakora. Kod adjuvantnog artritisa BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.) bio je davan jednokratno (1 sat prije ili neposredno nakon aplikacije Freundsovog adjuvansa) ili jednom dnevno (od 0. do 14. dana, od 14. do 30. dana, od 14. do godine dana). Indometacinom	BPC 157 konzistentno smanjuje inače prominentne lezije u želuca kontrolnih štakora kao i lezije u tankom crijevu u indometacinskim grupama. U istraživanjima adjuvantnog artritisa razvoj lezija je bio značajno smanjen nakon samo jedne aplikacije BPC-a 157, što je još dodatno smanjeno kod štakora koji su bili dnevno tretirani sa BPC-om 157. Kao terapija kod već etabliranog adjuvantnog artritisa, njegovi korisni učinci konzistentno su se

		izazvane lezije u tankom crijevu.	pojavljivali već nakon dva tjedna tretmana i to je moglo biti jasno vidljivo i nakon godine dana od aplikacije.
Mješana populacija štakorskih želučanih mukoznih stanica bila je izolirana metodom koju je opisao Nagy (Gastroenterology (1994) 77, 433-443). Stanice su bile inkubirane 60 minuta sa citoprotektivnim lijekovima poput prostaciklina, histamina, pentagastrina i PL-10 substanci (sintetizirani dijelovi BPC-a). Na kraju inkubacije stanice su tretirane 15%-tnim etanolom kroz 5 minuta. Vijabilnost stanica testirana je pomoću Tripan blue ekskluzijskog testa i ispitivanja aktivnosti sukcinil dehidrogenaze. Ref. 15*	BPC 157 kao PL-10 supstance (PL IO.I.AK153 i PL IO.I.I4AK-2, 5 ng/mL-5 pg/mL, Pliva, Croatia) kroz 60 minuta u vodenoj kupki pri 37°C.	Svrha ove studije je utvrđivanje učinka protektivnih agensa u in vitro uvjetima bez ikakve centralne ili periferne inervacije.	PL-10 supstance signifikantno su zaštitile stanice od štete izazvane etanolom.
Mješana populacija štakorskih želučanih mukoznih stanica bila je izolirana metodom koju je opisao Nagy (Gastroenterology (1994) 77, 433-443). Standardizirana trajna stanična linija Sp2/0-Ag14 (CRL 1581) je stanična linija nesekretornog mišjeg	Stanice su bile inkubirane sa 5-50-500 ng/ml-5fig/ml dozama 4 PL-10 supstance kroz 60 minuta u mješajućoj vodenoj kupki pri 37°C. Nakon toga je 15%-tni etanol bio korišten kroz 5 minuta kao toksični agens. Na	Supstance PL-IO.I.I5AIZ-3 i PL IO.i.AKi4-2 mogu zaštititi svježe izolirane želučane mukozne stanice od alkoholne ozljede kod štakora. Nije uočena ikakva citoprotekcija na kultiviranim stanicama mišjeg mijeloma što sugerira	BPC 157 kao PL-10 supstance nisu bili toksični na svježe izolirane želučane mukozne stanice kod štakora niti za mišje mijelomske stanice; PL IO.I.AKi4-2 pokazao je učinak ovisan o dozi i vrlo signifikantni izravni citoprotektivni učinak u dozama od 50-500

mijeloma dobivena iz American Type Culture Collection –a (ATCC). Ref. 16	kraju 5-minutne inkubacije stanice su bile odvojene od supernatanta i nakon ispiranja ispitana je njihova vijabilnost pomoću Tripan blue ekskluzijskog testa i ispitivanja aktivnosti sukcinil dehidrogenaze.	da je ova stanična protekcija specifična za zdrave gastrointestinalne stanice.	ng/ml - 5 pg/ml na svježe izolirane želučane mukozne stanice u štakora. ED=50 ng/ml; PL IO.I.I5AR-3 pokazao je signifikantni izravni citoprotektivni učinak u dozi od 5 pg/ml na svježe izolirane želučane mukozne stanice u štakora; Ove supstance nisu bile učinkovite na kultiviranim mišjim mijelomskim stanicama.
96%-tni etanol i.g., L-NAME 5 mg/kg i.p./i.v. i/ili L-arginin 100 mg/kg i.p./i.v. u štakora. Ref. 17	U esejima želučanih lezija NO agensi bili su davani 5 minuta prije ozljede etanolom i medikacije BPC-om 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.).	In vitro, u homogenatima želučanog tkiva iz štakorske želučane mukoze, stvaranje NO-a. Studije ispitivanja krvnog tlaka, hipertenzije uzrokovane L-NAME-om; hipotenzije uzrokovane L-argininom.	U esejima želučanih lezija NO agensi bili su davani 5 minuta prije ozljede etanolom i medikacije BPC-om 157. Dan sam BPC 157 je imao antiulkusni učinak, kao i L-arginin, dok je L-NAME bila bez učinka. In vitro, BPC 157, dan u istoj dozi (100 µM) kao i L-arginin inducirao je usporedivo stvaranje NO-a. Učinak BPC-a 157 nije mogao biti inhibiran pomoću L-NAME čak i kada je L-NAME bila davana u deseterostruko većoj dozi (1000 µM prema 100 µM) od inače potrebne za inhibiciju učinka L-arginina. NO sinteza je bila usporena kod istovremene primjene BPC-a 157 i L-arginina. Kod istraživanja krvnog tlaka, u usporedbi sa L-argininom, BPC 157 (inače bez učinka na normalne bazalne vrijednosti) imao je

			dualan učinak (poremećen porast krvnog tlaka uzrokovan L-NAME-om , kada je davan profilaktički i snižavanje već povišenog krvnog tlaka uzrokovanog L-NAME-om, dan za vrijeme najvišeg porasta krvnog tlaka (tj. 10 minuta nakon aplikacije L-NAME)) i preventivni učinak (L-argininom inducirani umjereni pad vrijednosti krvnog tlaka bio je preveniran pretretmanom BPC-om 157). Kada je BPC 157 davan 10 minuta nakon aplikacije kombinacije L-NAME i L-arginina, što je dovelo do porasta vrijednosti krvnog tlaka, njegov ranije jasni učinak (uočen u štakora tretiranih L-NAME-om) je nestao.
Studije egzogenih iritansa (20%-tni ili 96%-tni etanol), egzogeno/egzogenih iritansa (20%-tni etanol dan sat vremena prije 96%-tnog etanola), endogenog iritansa (gastrojejunalna anastomoza kroz 24 sata) i endogeno/egzogenih iritansa (gastrojejunalna anastomoza kroz 24 sata prije aplikacije 96%-tnog etanola). Ref. 18*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.) davan bilo sat vremena prije kirurškog zahvata (studije endogenog iritansa) bilo istovremeno sa aplikacijom etanola (studije egzogenog, egzogeno/egzogenih i endogeno/egzogenih iritansa).	Bio je proučavan doprinos povišenih i normalnih vrijednosti endogenih iritansa i njihovo izazivanje manjih ozljeda u sklopu adaptivne citoprotekcije.	BPC 157 (10 µg ili 10 ng) (10 mg) imao je većinom adaptivnu citoprotektivnu aktivnost (studije endogeno/egzogenih iritansa) ili i citoprotektivnu i adaptivnu citoprotektivnu aktivnost (studije egzogeno/egzogenih iritansa).
Parkinsonogenički	BPC 157 (1.5 µg ili	BPC 157 snažno	Davan u svim

agensi, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) (30.0 mg/kg i.p., jednom dnevno, kroz 6 dana, i nakon 4.-og dana jednokratno 50.0 mg/kg i.p.) ili rezerpin (5.0 mg/kg i.p.) bili su aplicirani u miševa. Ref. 19	15.0 ng/kg) apliciran je 15 minuta prije ili alternativno 15 minuta nakon svake administracije MPTP-a. U istraživanjima rezerpina, BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.) davan je bilo 15 minuta prije rezerpina bilo kod već uspostavljene potpune katalepsije uzrokovane rezerpinom 24 sata poslije.	poboljšava MPTP-om oštećenu somatosenzornu orijentaciju i smanjuje hiperaktivnost induciranu MPTP-om, i što je još važnije MPTP-om uzrokovane motoričke poremećaje (tremor, akineziju i katalepsiju, inače vrlo uočljivu kod kontrolnih štakora), što vodi do gotovo kompletnog ukinuća inače redovito letalnog ishoda MPTP-om tretiranih kontrolnih životinja. Poput gore navedenog, u istraživanjima učinaka rezerpina, BPC 157 snažno je prevenirao razvoj inače vrlo prominentne katalepsije, a kad je davan 24 sata nakon rezerpina ukidao je već etabliranu katalepsiju. U dodatku, redukcija hipotermije uzrokovane rezerpinom (pretretman BPC-om 157) kao i obrat u daljnjem značajnom padu tjelesne temperature (posttretman BPC-om 157) bile su konzistentno opservirane.	navedenim dozama i načinima primjene BPC 157 snažno je umanjio želučane lezije u miševa, koje se inače redovito pojavljuju pri uporabi parkinsonogeničkog neurotoksina MPTP-a.
Katalepsija, somatosenzorna dezorijentacija Haloperidol (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg i.p.) i flufenazin (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 i 5.0 mg/kg, i.p.,	Pentadekapeptid BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg, i.p.) je koadministriran sa neuroleptikom.	Izražena katalepsija, inače konzistentno vidljiva u miševa tretiranih haloperidolom (0.625, 1.25, 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg, i.p.) i flufenazinom (0,3125,	Koadministracija BPC-a 157 (10 µg, 10 ng, 1.0 ng, 100 pg/kg i.p.) je kompletno inhibirala lezije koje se pojavljuju u štakora 24 sata nakon aplikacije haloperidola (5.0 mg/kg i.p.) (18 od

sulpirid (20, 40, 80 i 160 mg/kg, i.p.) ili klopazin (25, 50 i 100 mg/kg, i.p.) procjena 1.5, 3, 4.5, 6 i 7.5 sati nakon administracije u miševa Stvaranje ulkusa Haloperidol (5.0 mg/kg i.p.) procjena nakon 24 sata u štakora. Ref. 20		0,625, 1,25, 2,5 i 5,0 mg/kg, i.p.) 1.5, 3, 4.5, 6 i 7,5 sati nakon administracije istih, znatno je umanjena kada je pentadekapeptid BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg, i.p.) koadministriran sa neuroleptikom. Osim katepsije, koadministracija pentadekapeptida BPC-a 157 je umanjila somatosenzornu dezorijentaciju (u slučaju sulpirida i klopazina).	20 štakora u kontrolnoj skupini imalo je želučane lezije). Ova aktivnost udružena sa antagonizacijom haloperidolske katepsije u štakora (procijenjeno u 60 minutnim intervalima od prvog do petog sata nakon haloperidola), kad je BPC 157 davan u dozama od 10 µg/kg ili 10 ng/kg (niže doze nisu utjecale na katepsiju). Zbirno, ovi nalazi pokazuju da BPC 157 u potpunosti međudjeluje sa dopaminskim sustavom, centralno i periferno i da u najmanju ruku BPC 157 interferira sa nekim događajima uključenima u stvaranje katepsije i/ili ulkusa.
Haloperidol (5mg/kg i.p.) izaziva lezije kod svih štakora. Rezerpin (5mg/kg i.p.) također izaziva lezije. Ref. 21	BPC 157 (10µg ili 10ng/kg i.p.) istovremeno sa haloperidolom i/ ili rezerpinom.	Testirana je koadministracija rezerpina i haloperidola, depletora dopaminskih mjehurića sa dopaminskim antagonistom koji ima poznati ulcerogeni učinak, u štakora koji su bili žrtvovani 24 sata nakon administracije štetnih agensa.	BPC 157 evidentno prevenira bilo haloperidolske, bilo rezerpinske gastične lezije. Suočen sa potencijacijom štetnih učinaka kombinacije haloperidola i rezerpina na gastičku sluznicu, BPC 157 je zadržao svoje korisne učinke.
Muški NMRI Hannover miševi bili su žrtvovani 24 sata nakon aplikacije haloperidola (25mg/kg i.p., dan samostalno ili sa fiziološkom otopinom (haloperidol + fiziološka otopina) (i) ili u kombinaciji (ii, iii)).	BPC 157 (10 mg, 10 ng, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg), koadministriran (/kg i.p.) sa haloperidolom i fiziološkom otopinom; haloperidolom i domperidonom; haloperidolom i indometacinom.	Haloperidol (centralni dopaminski antagonist)-izaziva želučane lezije, davno opisan kao prikladan parnjak dopaminskom blokatoru cisteaminu koji izaziva duodenalne lezije. Kod gore navedenog,	Kod miševa koji su primili haloperidol i fiziološku otopinu, stvaranje lezija je bilo inhibirano sa istovremenom koadministracijom BPC-a 157 (10 µg, 10 ng, 10 pg, ali ne i 1 pg, 100 fg.

Podržavajući predominantnost centralnog dopaminskog učinka za indukciju želučanih lezija haloperidolom, koadministracija perifernog dopaminskog antagonista domperidona (5mg/kg i.p.) (haloperidol+domperidon) (ii) ili inhibitora sinteze prostaglandina, indometacina (10mg/kg s.c.) (haloperidol+indometacin) (iii) nije pogoršala lezije. Ref. 22*		doprinos blokadi centralnih /perifernih dopaminskih receptora kao i blokadi sinteze prostaglandina bit će evaluiran.	10 fg /kg i.p.); Kod miševa koji su istovremeno primili haloperidol i domperidon ranije učinkoviti bromokriptin, BPC 157 (10μg/kg) ili omeprazol (10 mg/kg) nisu umanjili želučane lezije. Učinak na blokadu sinteze prostaglandina: kod miševa tretiranih haloperidolom i indometacinom jedino je BPC 157 bio učinkovit.
Hemoragične lezije sluznice u želucu kod štakora inducirane intragastričkom aplikacijom 1ml 50 ili 75%-tnog etanola bile su pogoršane ranijim plućnim oštećenjem izazvanim intratrahealnom instilacijom nepirogene fiziološke otopine, HCl-a (pH 1.75) ili 50 satnom ekspozicijom 100%-tnom kisiku. Ref. 23*	Uzevši intratrahealnu instilaciju HCl-a kao početno vrijeme (0 sati), želučani pentadekapeptid, GEPPPGKPADDAGL, M.W.1419, kodiran kao BPC 157 (PL-10, PLD-116; 10 μg, 10 ng, 10 pg), ranitidin (10 mg), atropin (10 mg), omeprazol (10 mg), bili su davani [/kg, i.p.] (1) jednokratno, samo profilaktički [kao pretretman (na -1 sat), ili kao ko-tretman (na 0 sati)], ili samo terapijski (na +18 ili +24 sata); (2) opetovano, kombinirajući profilaktičko/terapijsko doziranje [(-1 sat)+(24 sata) ili	Štakori su primili intratrahealnu (i.t.) instilaciju HCl-om [1.5 ml/kg HCl (pH 1.75)] (plućne lezije) i intragastričnu instilaciju 96%-tnog etanola (želučane lezije; 1 ml/štakor, 24 sata nakon i.t. instilacije HCl-a), pa su bili žrtvovani sat vremena nakon aplikacije etanola. Osnovno, u štakorima sa ozljedom pluća nastupajuće želučane lezije uzrokovane etanolom bile su značajno pogoršane. Ovo pogoršanje ipak nije povratno utjecalo na razvoj plućnih lezija u daljnje opserviranom jednosatnom intervalu.	Općenito, BPC 157 štiti protiv želučanih lezija uzrokovanih alkoholom bez obzira na prisutnost plućnih ozljeda u svim korištenim dozama. Naravno, kombinirajući svoje profilaktičke i terapijske doze (na -1 sat/+24 sata, ili na 0/+24 sata) može povećati antiulkusni potencijal tako da učinak koji nije vidljiv već nakon jednokratne primjene, postane uočljiv pri ponavljanju terapije.

	(0)+(24 sata)], ili terapijsko/terapijsko doziranje [(18 sati)+(24 sata)].		
Ulcerogeni učinak kronične alkoholne administracije (3.03 g/kg ili 7.28 g/kg) u vodi za piće. Ref. 24*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p. ili i.g.) dan jednom dnevno (1) kroz deset dana prije davanja alkohola, (2) od početka pijenja alkohola do kraja ispitivanja, (3) kroz zadnji mjesec alkoholnog konzumiranja, 2 mjeseca nakon što je počela konzumacija alkohola. Procijenjene su želučane lezije na kraju trećeg mjeseca pijenja [(1), (2)] ili s obzirom na terapijski učinak premedikacije ili na kraju terapije.	Ulcerogeni učinak kronične alkoholne administracije u vodi za piće, stvaranje jetrenih lezija i portalne hipertenzije.	BPC 157 može prevenirati razvoj želučanih lezija ako je dan profilaktički prije ispijanja alkohola. Slično tome može smanjiti veličinu lezija u režimu davanja jednom dnevno kroz razdoblje pijenja alkohola. Važno, kad je dan terapijski može antagonizirati lezije želučane sluzinice, a koje su inače trajno prisutne u štakora koji piju alkohol.
Opekline, duboke djelomične debljine kože (1.5x1.5cm) pokrivaju 20 % ukupne površine tijela, a bile su napravljene na leđima miševa pod anestezijom pomoću kontroliranog spaljivanja (5 ili 7 sekundi) i želučane lezije bile su procijenjene 1,2,3,7,14 i 21 dan nakon ozljede. Ref. 25*	Aplikacija BPC-a 157 odmah po paljenju, i dalje jednom dnevno sve do 24 sata prije žrtvovanja. U početnim eksperimentima izloženost izravnom plamenu kroz 5 sekundi dok je BPC 157 bio davan u dozama od 10µg ili 10 ng/kg i.p. ili lokalno na opekotinu u obliku tankog sloja raznih BPC 157 krema (50µg, 5 µg, 500 ng, 50 ng ili 5 ng BPC-a 157 otopljenog u destiliranoj vodi i zamješano sa 50 g neutralne kreme) ili vehikulum kao tanki sloj kreme apliciran topikalno na opeklinu.	U oba eksperimenta svi parametri cijeljenja opekline bili su poboljšani kroz trajanje eksperimenta kod miševa tretiranih BPC-om 157 u kremi: zabilježeno je manje edema te se broj upalnih stanica smanjio.	Kroz čitav eksperimentalni period želučane lezije bile su kontinuirano opažane kod svih termički ozljeđenih miševa bez lokalne medikacije dok su iste bile konzistentno smanjene kod BPC 157 tretiranih životinja u svim dozama i načinima primjene.

Muški NMRI-Hannover miševi žrtvovani 1.-3., 7., 14. i 21. dana nakon paljenja 20%-tne površine leđa (otvoreni plamen kroz 7 sekundi primili su intraperitonealno (/kg) 6-alfa-metil-prednizolon (Depo-medrol 1.0 ili 10.0 mg ili jednaki volume fiziološke otopine (5 ml) jednom dnevno, prva aplikacija 30 minuta prije ozljede, a zadnja 24 sata nakon žrtvovanja. Ref. 26	Kreme BPC-a 157 (napravljene u količini od 1.0, 0.1, 0.01 µg. u destiliranoj vodi otopljenog BPC-a 157 /gramu kreme, bez prisutnosti nosača ili ili inhibitora peptidaza) bile su davane lokalno u tankom sloju odmah nakon intraperitonealne aplikacije kortikosteroida.	Procjena cijeljenja opekline Procjena reaktivnosti stanica slezene na ConA mitogen in vitro.	BPC 157 konzistentno unapređuje cijeljenje opekline (vidljivo mikroskopski i tenzimetrijski) i poboljšava kortikosteroidima ometeno cijeljenje opekline. Kod istraživanja učinka BPC-a 157 na želučane lezije izazvane opeklinama pokazalo se da BPC 157 ima vlastiti antiulkusni učinak te da potencira antiulkusni učinak opažen u miševa tretiranih 6-alfa-metil-prednizolonom. In vitro, pri procjeni stanica slezene životinje (žrtvovane nakon 3 tjedna) tretirane 6-alfa-metil-prednizolonom (1mg) pokazale su smanjenu reaktivnost na nitrogen u odnosu na kontrolne zdrave životinje dok je dodatkom BPC-a 157 (krema 1µg/g) stanična reaktivnost vraćena vrijednostima opaženima u normalnih, zdravih životinja.
Štakori su bili izgladnjivani ali sa slobodnim pristipom vodi kroz 24 sata nakon čega je dan BPC 157. 60 minuta kasnije ulkus je bio induciran injekcijom indometacina (33mg/kg). Štakori su bili žrtvovani nakon 12 sati. Štakori su bili izgladnjivani kroz 54 sata sa slobodnim	BPC 157 je davan (inicijalno jednokratno ili kontinuirano) štakorima i.g. ili i.m. prije (kod induciranog akutnog želučanog ulkusa) ili nakon (kod induciranog kroničnog želučanog ulkusa) aplikacije agensa koji induciraju ulkus.	Ispitati zaštitni učinak BPC-a 157 na akutne i kronične želučane ulkuse kod štakora i usporediti rezultate u terapiji ljudskih želučanih ulkusa pomoću različitih metoda administracije.	BPC 157, dan i.m. ili i.g., može smanjiti veličinu površine ulkusa i ubrzati cijeljenje već stvorenog ulkusa u različitim modelima. Štakori tretirani višim dozama BPC-a 157 (400 ng, 800 ng/kg i.p. i i.g.) pokazuju signifikantno manje lezije ($P < 0.01$ vs netretirani ili štakori koji su primili fiziološku otopinu), omjer inhibicije

pristupom vodi prije davanja BPC-a 157. Famotidine i fiziološka otopina su bili dani te je napravljena ligature pilorusa kirurškim putem 60 minuta poslije. Štakori su bili izgladnjivani dodatnih 18 sati i žrtvovani. U modelu kroničnog želučanog ulkusa želudac je bio prikazan pod anestezijom a što je slijedila injekcija 50 µl octene kiseline (300ml/l). Ispod korijona nakon što su štakori bili izgladnjivani, sa slobodnim pristupom vodi kroz 24 sata. Nakon injekcije acetata štakori su bili odmah tretirani BPC-om 157 dva puta dnevno kroz 12 dana. 12 sati nakon zadnjeg tretmana štakori su bili žrtvovani te su ispitivani debljina granulacije tkiva, žljezdana reepitelizacija i površina ulkusa. Reepitelizacija je bila odraz promjera preostalog ulkusa dok je debljina granulacijskog tkiva mjerena svakih 500 µm. Ref. 27*			stvaranja ulkusa varira od 45.7% do 65.6%, za sva mjerenja osim kod štakora tretiranih BPC-om 157 (400 ng/kg) u modelu ligature piloruda u kojem je smanjanje lezija iznosilo 54.2%. Kod i.m. administracije BPC-a 157 (800 ng/kg) u tri modela, omjeri inhibicije stvaranja ulkusa iznosili su 65.5%, 65.6% i 59.9%, što je bilo bolje nego kod famotidine (njegovi omjeri inhibicije stvaranja ulkusa u tim modelima iznosili su 60.8%, 57.2%, 34.3%). Kontinuirana aplikacija BPC-a 157 (u kroničnih želučanih ulkusa induciranih acetatom) može ubrzati ponovnu izgradnju žljezdanog epitela, kao i stvaranje granulacijskog tkiva ($P<0.05$ pri 200 ng/kg i $P<0.01$ pri 400 ng/kg i 800 ng/kg vs netretirana životinja ili životinja koja je primala fiziološku otopinu).
Stopa cijeljenja gastrokutane fistule kod štakora (promjer	BPC 157 [u vodi za piće (10 µg/kg) (12 ml/štakor/dan) ili i.p.	Ova studija se fokusirala na necijeće	Dan u vodi za piće ili i.p. čak i nakon prethodnog pogoršanja cijeljenja

želučanog defekta - 2mm, promjer kožnog defekta-3mm) potvrđuje makro/mikroskopski i biomehanički izravnu vezu između kožne rane i želučanog ulkusa. 6-alfa-metil-prednizolon (1mg/kg) [i.p. jednom dnevno prva aplikacija 30 min nakon kirurškog zahvata; zadnja aplikacija 24 sata prije žrtvovanja (na 1., 2., 3., 7., 14. i 21. postoperativni dan)]. Ref. 28*	(10 µg/kg, 10 ng/kg, 10 pg/kg)].	gastrokutane fistule kako bi otkrila mogu li standardni lijekovi koje koristimo za cijeljenje želučanih ulkusa imati isti učinak na kožne rane, te na pogoršanje cijeljenja uzrokovanog kortikosteroidima i da pokaže zašto peptide poput BPC-a pokazuju veliki cijeljeći učinak.	izazvanog 6-alfa-metil-prednizolonom, BPC 157 je promptno poboljšao cijeljenje sluznice želuca i kože, zatvaranje fistula, bez curenja čak i nakon intragastričke aplikacije vode (20ml). Standardni antiulkusni agensi, sa odgodom poboljšavaju prvo cijeljenje kože i zatim cijeljenje želučane sluznice no ne i curenje fistule (osim kod atropina).
Usredotočili smo se na želučane ulkuse inducirane prekomjernom dozom inzulina (250 i.j./kg i.p.) kao i na druge poremećaje koji su bili istovremeno izazvani u štakora, konvulzije (naposljetku letalne) teško oštećene neurone u malom mozgu i hipokampusu, hepatomegaliju, masnu jetru, povišene serumske vrijednosti AST-a, ALT-a i amilaza, slom u jetrenoj glikogenezi sa podležućim razvojem hipoglikemije i kalcifikacije. Ref. 29	BPC 157 (10 µg/kg) dan (i) i.p. ili (ii) i.g. odmah nakon inzulina.	Inzulinske konvulzije, (naposljetku letalne) teško oštećeni neuroni u malom mozgu i hipokampusu, hepatomegalija, masna jetra, povišene serumske vrijednosti AST-a, ALT-a i amilaza, slom u jetrenoj glikogenezi sa podležućim razvojem hipoglikemije i kalcifikacije. Depoziti kalcija su bili prisutni u stijenci krvnih žila, u hepatocitima okruženima krvnim žilama i nekad čak u jetrenom parenhimu, većinom kao linearno i samo sporadično kao granularno nakupljanje.	BPC 157, antiulkusni peptid, može uz suprotstavljanje stvaranju želučanog ulkusa konzistentno smanjivati sve poremećaje izazvane inzulinom, uključujući i letalni ishod. Štakori tretirani BPC-om 157 nisu pokazivali letalni ishod, bili su većinom bez hipoglikemijskih konvulzija sa značajno većim razinama glukoze u krvi (glikogen je i dalje bio prisutan u hepatocitima), pokazali su manje poremećaja u jetri (normalna težina jetre, manje masna jetra), smanjene vrijednosti ALT-a, AST-a i amilaza, značajno manje oštećene neurone u mozgu i samo ponekad male želučane lezije. Štakori

			tretirani BPC-om 157 pokazali su većinom samo točkastu prezentaciju kalcifikata.
Pokušali smo u potpunosti antagonizirati ekstenzivnu toksičnost uzrokovanu NSAIDs-ima (koristeći diklofenak kao prototip). Kombinirana gastrointestinalna, jetrena i moždana toksičnost inducirana diklofenakom (12.5mg/kg i.p. jednom dnevno kroz 3 dana u štakora). Ref. 30*	BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg) dan (i) i.p. odmah nakon diklofenaka ili (ii) peroralno u vodi za piće (0.16 µg/ml, 0.16 ng/ml).	Bez tretmana BPC-om 157, 3 sata nakon zadnje aplikacije diklofenaka mi smo se suočili s kompleksnim, štetnim učinkom diklofenaka, karakteriziranim ozbiljnim želučanim, intestinalnim i jetrenim lezijama, povišenim serumskim vrijednostima bilirubina, AST-a i ALT-a, povišenom težinom jetre, produljenim vremenom sedacije/nesvjesti (nakon bilo koje aplikacije diklofenaka) i konačno, hepatičkom encefalopatijom (edem mozga osobito prisutan u kori velikog mozga i malom mozgu, više u bijeloj nego u sivoj tvari, oštećenim crvenim neuronima, osobito u kori velikoga mozga i jezgrama malog mozga, Purkinjeovim stanicama i nešto rijeđe u neuronima hipokampusa).	BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg) je bio jako učinkovit kroz čitav eksperiment bilo davan (i) i.p. odmah nakon diklofenaka ili (ii) peroralno u vodi za piće (0.16 µg/ml, 0.16 ng/ml). Jako ekstenzivna antagonizacija toksičnosti diklofenaka postignuta BPC-om 157 (µg-/ng-doza, i.p., p.o.) može ohrabriti njegovu buduću upotrebu kao antidota kod toksičnosti uzrokovanoj diklofenakom i drugim NSAIDs-ima.

Ref. 9* Bromokriptin, amantadin, famotidin, cimetidin i somatostatin bili su neučinkoviti (stres izazvan obuzdavanjem), djelomični pozitivni učinak (u odnosu na uvjete tretmana) (etanol) dobiven je sa glukagonom, NPY-om i sekretinom dok CCK/26-30/ nije bio učinkovit.

Ref. 12* Kad adrenalin i bromokriptin dani istovremeno, opaženo je snažano smanjenje razvoja lezije. Međutim, primjenjeni odvojeno, samo adrenalin, ne i bromokriptin, ima zaštitni učinak.

Ref. 13* Kod gastrektomiziranih štakora nakon 24 sata referentni agensi [cimetidin (50), ranitidin (10), omeprazol (10), bromokriptin (10) i atropin (10) (mg / kg i.p. sat vremena prije cisteamina, žrtvovanje nakon idućih 24 sata] preveniraju duodenalne ulkuse kao što čine u normalnim štakorima. Jednak štetni učinak cisteamina i jednaki zaštitni učinak pentadekapeptida BPC-a 157 i referentnih agensa u gastrektomiranih i kod štakora s netaknutim želucem-- čini se osobito relevantno iz citoprotektivnog kuta gledanja.

Ref. 15* Prostaciklin, histamin i pentagastrin nemaju izravan citoprotektivan učinak na izolirane stanice.

Ref. 18* Atropin (10 mg/kg i.p.) i ranitidin (10 mg) imaju samo citoprotektivnu aktivnost (studije egzogenih iritansa), dok omeprazol (10 mg) ima uglavnom adaptivnu citoprotektivnu aktivnost (studije endogeno/egzogenih iritansa) ili i citoprotektivnu i adaptivnu citoprotektivnu aktivnost (studije egzogeno/egzogenih iritansa).

Ref. 20* Svi dopaminomimetici (bromokriptin 10 mg, apomorfin 1 mg, amfetamin 20 mg, /kg i.p.) jasno smanjuju inače konzistentne želučane lezije inducirane bilo haloperidolom bilo rezerpinom, no ne i lezije uzrokovane njihovom istovremenom aplikacijom. Ranitidin (10 mg), omeprazol (10 mg), atropin (10 mg), /kg i.p.) evidentno preveniraju želučane lezije uzrokovane bilo haloperidolom, bilo rezerpinom. Suočeni s potencijacijom štetnih učinaka koji prate istovremenu primjenu haloperidola i rezerpina, ovi agensi zadržavaju svoje korisne učinke, opažene u štakora koji su primili bilo haloperidol, bilo rezerpin.

Ref. 22* Kod miševa koji su primili haloperidol i fiziološku otopinu razvoj lezija je bio inhibiran koadministracijom (/kg i.p.) bromokriptina (10 mg), omeprazola (10 mg, 100 mg, ali ne i 1 mg). Atropin (10, 100, 200 mg),pirenzepin (10, 100, 200 mg), mizoprostol (10, 100, 200 µg), pantoprazol (1, 10, 100 mg), lansoprazol (0.1, 1, 10 mg), cimetidin (10, 100, 200 mg) i ranitidin (10, 100, 200 mg) nisu bili učinkoviti. Kod miševa istovremeno tretiranih haloperidolom i domperidonom prethodno učinkovita terapija bromokriptinom i omeprazolom (10 mg) nije smanjila želučane lezije. Učinak blokade sinteze prostaglandina: kod miševa istovremeno tretiranih haloperidolom i indometacinom, ranije učinkoviti agensi bromokriptin ili omeprazol nisu bili aktivni.

Ref. 23* Uzimajući intratrachealnu HCl instilaciju kao vrijeme 0, ranitidin (10 mg), atropin (10 mg), omeprazol (10 mg), su dani [/ kg, i.p.] (1) jednom, samo profilaktički [kao pretretman (na -1 sat), ili kao kotretman (pri 0 sati)], ili samo terapijski (na +18 ili +24 sata); (2) opetovano, kombinirajući profilaktičko/terapijsko doziranje [(-1 sat) + (+ 24 sata) ili (0) + (+ 24 sata)], ili terapijsko/ terapijsko doziranje [(+18 sati) + (+ 24 sata)]. Općenito, antiulkusni agensi štite protiv želučanih lezija uzrokovanih alkoholom, bez obzira na prisutnost teške ozljede pluća, u svim korištenim dozama. Kombinirajući svoja profilaktička i terapijska doziranja (na -1 sat / + 24 sata, ili na 0 / + 24 sata) može povećati antiulkusni potencijal i učinak koji do sad nije bio viđen sa samo jednokratnom aplikacijom, postaje veći nakon ponovljenog tretmana.

Ref. 24* Ranitidin (10 mg/kg i.g.) i propranolol (10 mg/kg i.g.) jednom dnevno (1) tijekom 10 dana prije alkoholne konzumacije, (2) od početka pijenja alkohola do kraja studije, (3) tijekom zadnjeg mjeseca konzumiranja alkohola, 2 mjeseca nakon početka pijenja alkohola. Želučane lezije bile su procijenjene na kraju 3 mjeseca pijenja [(1), (2)], ili s obzirom na terapijski učinak medikacije ili na kraju terapije. Ranitidin i propranolol dani profilaktički prije pijenja alkohola mogu prevenirati razvoj

želučanih lezija. Isto tako, oni smanjuju veličinu lezija kad se daju jednom dnevno tijekom razdoblja pijenja. Važno je, dani terapijski, mogu antagonizirati inače trajno prisutne lezije u želučanoj mukozi štakora koji piju.

Ref. 25* U odnosu na kontrolne vrijednosti, u miševa tretiranih kremom sa srebrnim srebro sulfadiazinom samo je bilo povećano stvaranje kolagenih vlakana, kao dodatak smanjenjem broju upalnih stanica. U odnosu na kontrolne vrijednosti, kroz vrijeme eksperimenta, želučane lezije bile su kontinuirano prisutne kod svih termički ozlijeđenih miševa ostavljenih bez lokalne medikacije dok su iste lezije bile konzistentno smanjene tretmanom BPC-a 157 (dan i.p. u bilo kojoj dozi ili lokalno u bilo kojoj koncentraciji. Ostali tretmani (npr. lokalno liječenje srebro sulfadiazidnom kremom ili neutralnom kremom u miševa izloženih izravnom plamenu kroz 5 sekundi), dovode do slabog ako ikakvog smanjenja.

Ref. 27* Kad je BPC 157 bio administriran i.m. u dozi od 800 ng/kg u tri različita modela omjeri inhibicije stvaranja ulkusa bili su 65,5%, 65,6% i 59,9%, što je bilo bolje nego kod famotidina (njegova stope inhibicije bile su 60,8%, 57,2% i 34,3%).

Ref. 28* Standardni antiulkusni agensi, (ii) atropin (10 mg / kg), ranitidin (50 mg / kg) i omeprazol (50 mg / kg), [i.p., jednom dnevno, prva aplikacija 30 minuta nakon operacije; posljednja 24 sata prije žrtvovanja (na 1., 2., 3., 7., 14. i 21. postoperativni dan)], nakon odgode, najprije poboljšavaju cijeljenje kože pa zatim sluznice želuca, ali ne i curenje fistule (osim atropina).

Tablica 5 – Primjena BPC-a 157 u modelima duodenalnih lezija (9,10,13,31,32)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC-a 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
Cisteamin 400 mg/kg s.c., u štakora. Ref. 9*	BPC 157 10 µg, 10 ng i.p., i.g.	Monastralno plavilo, Protekcija endotela Želučani ulkusi	Protekcija endotela, duodenuma i želuca
Ligatura žučovoda, u štakora. Ref. 10	BPC 157 10 µg, 10 ng i.p., i.g. profilaktički sat vremena prije ligacije žučovoda, kao terapija jednom dnevno počevši 24 sata nakon ligacije žučovoda (zadnja aplikacija 24 sata prije žrtvovanja)	Akutni pankreatitis Želučane lezije	Korisni učinak na pankreatitis, pozitivni utjecaj BPC-a 157 na razvoj želučanih i duodenalnih lezija kod štakora kojima je ligiran žučovod u predtretmanskome i posttretmanskome načinu primjene.
Štetni učinci cisteamina (400 mg/kg s.c., smrt nakon 24 sata) u štakora koji nemaju želudac i želučanu kiselinu. Ref. 13*	BPC 157 10 µg, 10 ng i.p., profilaktički 1 sat prije cisteamina kod normalnih ili gastrektomiziranih štakora.	Nedostatak želuca i želučane kiseline postulira da su štetni učinci cisteamina neovisni o sekreciji želučane kiseline.	Jednak štetni učinak cisteamina kao i zaštitni učinak BPC-a 157 i referentnih agensa kod gastrektomiziranih i normalnih štakora; osobito važno iz citoprotektivnog kuta gledanja.
Izazivanje duodenalnih lezija cisteaminom u dozi od 400 mg/kg s.c., kroz 24 sata u štakora. Ref. 31*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg), i.p., i.g., i.r.	Prošireni specifični ulcerogeni učinak cisteamina, veza između cisteaminom uzrokovanih lezija kolona i duodenuma te procjena protekcije agensa od gornjeg prema donjem dijelu probavnog trakta; aplikacija cisteamina	BPC 157 inhibira cisteaminom izazvane duodenalne ulkuse, BPC 157 (10 µg/kg ili 10 ng/kg) i.p., i.g., i.r., inhibira cisteaminom izazvane lezije kolona (procijenjeno nakon 30, 60, 180 min, 24 sata, 48 sati, 72 sata). Cisteamin je bio davan u dozama

		200 mg/kg ili 400 mg/kg (8 cm od anusa, u volumenu 1ml/štakor).	200 ili 400 mg/kg i.r.
Mi smo testirali antiulkusne agense na modelu duodenalnih ulkusa izazvanih cisteaminom kod štakora. Agensi u dozi /kg i.p. istovremeno davani sa cisteaminom (400 mg/kg s.c.), nakon 24 sata žrtvovani su neoperirani štakori, gastrektomizirani štakori (24 sata ranije), akutno sialoadenektomirani štakori (24 sata ranije) i kronično sialoadenektomirani štakori (prije 3 tjedna). Ref. 32*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng) i.p.	Fokus je bio na žlijezde slinovnice u modelu cisteaminom izazvanog duodenalnog ulkusa i na različitim učincima antiulkusnih agensa na cisteaminom izazvanim duodenalnim ulkusom u sialoadenektomiranih, no ne i gastrektomiziranih štakora.	Ulcerogeneza: cisteaminom izazvani udodenalni ulkus je bio jednake ozbiljnosti i incidencije u normalnih, gastrektomiziranih, i akutno ili kronično sialadenektomiranih štakora. (ii) Antiulkusni učinak u normalnim uvjetima ili nakon gastrektomije: u normalnih ili gastrektomiziranih štakora svi testirani agensi, BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg) inhibirali su duodenalne ulkuse izazvane cisteaminom, djelujući kroz mehanizme neovisne o želučanoj kiselini. Nakon akutne ili kronične sialoadenektomije: jedino BPC 157 pokazuje protektivni učinak.

Ref. 9* Bromokriptin, amantadin, famotidin, cimetidin i somatostatin bili su neučinkoviti (stres izazvan obuzdavanjem), djelomični pozitivni učinak (u odnosu na uvjete tretmana) (etanol) dobiven je sa glukagonom, NPY-om i sekretinom dok

Ref. 13* Kod gastrektomiziranih štakora nakon 24 sata referentni agensi [cimetidin (50), ranitidin (10), omeprazol (10), bromokriptin (10) i atropin (10) (mg / kg i.p. sat vremena prije cisteamina, žrtvovanje nakon idućih 24 sata] preveniraju duodenalne ulkuse kao što čine u normalnim štakorima. Jednak štetni učinak cisteamina i jednaki zaštitni učinak pentadekapeptida BPC-a 157 i referentnih agensa u gastrektomiranih i kod štakora s netaknutim želucem- čini se osobito relevantno iz citoprotektivnog kuta gledanja.

Ref. 31* Lezije kolona izazvane cisteaminom bile su također umanjene standardnim antiulkusnim agensima (u dozama mg/kg), davanim i.p., i.g., i.r., poput ranitidina (10), cimetidina (50), omeprazola (10), atropina (10), zajedno sa metilprednizolonom (1), i sulfasalazinom (50, i.r.). Procijenjeno 30 min nakon aplikacije cisteamina (200 mg).

Standardne cisteaminom izazvane duodenalne lezije (procijenjeno 24 sata nakon s.c. aplikacije cisteamina (400 mg/kg)) bile su također smanjene aplikacijom ovih agensa (danih i.p. u istim dozama sat vremena prije cisteamina), sa izuzetkom sulfasalazina.

Ref. 32* Antiulkusni agensi pod normalnim uvjetima ili nakon gastrektomije: kod normalnih ili gastrektomiziranih štakora svi testirani agensi [BPC 157, ranitidin (10 mg), atropin (10 mg), omeprazol (10 mg) (/kg i.p.)] inhibirali su cisteaminom izazvane duodenalne ulkuse djelujući kroz mehanizme neovisne o želučanoj kiselini. Nakon akutne ili kronične sialadenektomije: ranitidin, omeprazol i atropin bili su potpuno neučinkoviti dok je BPC 157 sačuvao protektivni učinak.

Tablica 6 – Primjena BPC-a 157 u modelima intestinalnih lezija (14,30,33-37)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
Jednokratna intrakolonička administracija TNBS-a (50 mg/kg) u 50%-tnom etanolu. Ref. 33	Životinje su bile tretirane BPC-om 157 (referiranom kao BPC-15) u predtretmanu od sat vremena u idućim dozama: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 ili 10 nmol/kg i.p., ili u dozi 10 nmol/kg i.c. Životinje su bile žrtvovane 3 dana kasnije te su mjerene hiperemija i nekroza kolona analizom slika.	Jednokratna intrakolonička administracija TNBS-a otopljenog u etanolu inducira ozbiljna oštećenja kolona koja su karakterizirana područjima nekroze okruženima područjem akutne upale. Oštećenje je povezano sa visokom aktivnošću mijeloperoksidaze (MPO), što je uglavnom odraz neutrofilne infiltracije oštećenog tkiva.	Intraperitonealna primjena BPC-a-15, ovisno o dozi, signifikantno smanjuje razmjer oštećenja kolona izazvanog TNBS-om što je u korelaciji sa statistički signifikantnim smanjenjem aktivnosti MPO-a. U dozi od 10 nmol/kg i.c. administracija BPC-a-15 nije signifikantno smanjila ni oštećenje kolona niti porast aktivnosti MPO-a uzrokovan TNBS-om.
Lezije tankog crijeva izazvane indometacinom (30 mg/kg s.c.), u štakora Ref. 14	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.) dan istovremeno i/ili sat vremena prije indometacina.	Želučane lezije izazvane indometacinom (30 mg/kg s.c., aspirinom 400 mg/kg i.g.) i diklofenakom (12.5 mg/kg i.p.); istovremeno je bio istraživani učinak BPC-a 157 na lezije izazvane kroničnom upalom, kao kod adjuvantnog artritisa, i na gastrointestinalne lezije izazvane NSAIDs-ima. U istraživanjima adjuvantnog artritisa (aplikacija 0.2 ml Freundsovog adjuvansa u rep) (14 dana, 30 dana, 1 godina). BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg i.p.) davan je kao jednokratna	BPC 157 konzistentno smanjuje inače prominentne želučane lezije kod kontrolnih štakora kao i lezije tankog crijeva u štakora koji su primali indometacin. U istraživanju adjuvantnog artritisa razvoj lezija je bio značajno smanjen nakon jednokratne aplikacije BPC-a 157, a još više kod štakora dnevno treniranih s BPC-om 157. Kao terapija već etabliranog adjuvantnog artritisa njegov pozitivni učinak se pojavio već nakon 2 tjedna terapije što se jasno moglo vidjeti i nakon godinu dana.

		aplikacija (sat vremena prije ili neposredno nakon Freundsovog adjuvansa) ili jednom dnevno (od 0.-14. dana, 14.-30. dana, 14.dana-1.godine).	
Aplikacija cisteamina 200 mg/kg ili 400 mg/kg (8 cm od anusa, u volumenu 1ml/štakor) Ref. 34*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg) i.p., i.g., i.r.	Prošireni specifični ulcerogeni učinak cisteamina, povezanost između lezija duodenuma i kolona uzrokovana cisteaminom. Kao i proširenje protektivnih agensa iz gornjeg na donji dio probavnog trakta; Cisteamin 400 mg/kg s.c. inducira duodenalne lezije.	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg) i.p., i.g., i.r. inhibira ove cisteaminske lezije kolona (procjenjeno nakon 30 min, 60 min, 180 min, 24 sata, 48 sati, 72 sata nakon aplikacije cisteamina u dozama od 200 ili 400 mg/kg i.r.). BPC 157 inhibira duodenalne ulkuse izazvane cisteaminom.
Produljeni učinak cisteamina (400 mg/kg i.r.), u štakora Ref. 34*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg) i.p., i.g., i.r.	Zaustavljanje produljene cisteaminske ozljede kolona: davan kroz tjedan dana (jednom dnevno) počevši 1 mjesec nakon aplikacije cisteamina, kao i davan kroz 2 tjedna, jednom dnevno počevši nakon 3 mjeseca.	Redovito lezije kolona uzrokovane cisteaminom bile su značajno umanjene BPC-om 157. Učinak na recidivne lezije bio je također testiran. Ove cisteaminske lezije mogu se pojaviti ponovno nakon prestanka terapije (nakon prestanka terapije u trajanju 3 tjedna nakon što je ista prethodno davana 2 tjedna s početkom davanja 3 mjeseca nakon davanja cisteamina kod ženskih štakora) u sulfasalazinskoj grupi dok je kod štakora koji su primali BPC 157 (PL-10, PLD-116) ta pojavnost bila antagonizirana (lezije kolona izazvane cisteaminom bile su

			značajno smanjene).
Dehiscijencija ileoilealne anastomoze makroskopski, histološki i biomehanički (volumen [ml] ubrizgan kao infuzija kroz perfuzijski system (1ml/10s), i tlak [mmHg] potreban za indukciju propuštanja anastomoze [kateter povezan s komorom i monitorom 10 cm proksimalno od anastomoze]) na 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. i 14. dan. Ref. 35	BPC 157 (10 µg, 10 ng, 10 pg/kg i.p.) dan prvi put nakon kirurškog zahvata, a zadnji put 24 sata prije procjene ili žrtvovanja.	Izliječiti dehiscijenciju intestinalne anastomoze	Kroz čitav eksperiment obje više doze BPC-a 157 unaprijedile su sve parametre cijeljenja anastomoze (makroskopske, histološke i biomehaničke). BPC 157 ima koristan učinak na cijeljenje ileoilealne anastomoze kod štakora.
Perzistentna kolokutana fistula kod štakora (5 cm od anusa, defekt kolona 5 mm, defekt kože 5 mm); L-NAME (5 mg/kg), L-arginin (200 mg/kg) i njihove kombinacije. Ref. 36*	BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg) bio je apliciran (i) u vodi za piće sve do žrtvovanja životinja na 1., 3., 5., 7., 14., 21. i 28. postoperativni dan ili (ii) jednom dnevno i.p. (prva aplikacija 30 min nakon kirurškog zahvata, a zadnja 24 sata prije žrtvovanja) samostalno ili s L-NAME-om (5 mg/kg), L-argininom (200 mg/kg) i njihovim kombinacijama.	Usredotočili smo se na terapijski učinak BPC-a 157 i povezanost njegove aktivnosti s dušičnim oksidom (NO) kod perzistentne kolokutane fistule u štakora (5 cm od anusa, defekt kolona 5 mm, defekt kože 5 mm) uzimajući u obzir da se BPC 157 pokazao sigurnim za uporabu u kliničkim studijama za upalnu bolest crijeva (PL14736) i kao	BPC 157 primjenjen parenteralno ili peroralno ubrzava cijeljenje defekta kože i kolona, zatvaranje fistule, makroskopski, mikroskopski, biomehanički i funkcijski (fistula podnosi veći volumen vode prije curenja). L-NAME pogoršava cijeljenje kolokutanih fistula te rana kože i kolona. L-arginin je bio učinkovit jedino u grupama s ometenim stvaranjem

		terapija intestinalne anastomoze.	NO-a (životinje su dobivale L-NAME i L-arginin istovremeno), ali ne i samostalno (životinje koje su primale samo L-arginin). Korisni učinci BPC-a 157 su ostali nepromjenjeni unatoč ometenom stvaranju NO-a (životinje koje su primale L-NAME i BPC 157) kao i pri davanju NO supstrata (životinje koje su primale L-arginin i BPC 157). BPC 157 je imao korisni učinak i kad je davan istovremeno zajedno s L-NAME-om i L-argininom.
Pratili smo kroz 4 tjedna štakore kod kojih se razvijao sindrom kratkog crijeva i progresivni gubitak težine nakon što smo prethodno napravili resekciju tankog crijeva od 4. ilealne arterije kranijalno od ileocekalne valvule do 5 cm ispod pilorusa. Ref. 37	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg) je davan u vodi za piće (12 ml po štakoru dnevno) ili i.p. (jednom dnevno prva aplikacija poslije kirurškog zahvata, a posljednja 24 sata prije žrtvovanja).	Postoperativno bila su vidljiva obilježja rastuće iscrpljenosti: trenutni gubitak tjelesne težine neovisno o visini resica, dvostruki porast u dubini krupta i četverostruki porast u mišićnoj debljini unutar prvog tjedna, prekomjerna dilatacija ileuma i jejunuma i njihov međusobno poremećen odnos.	Kontinuirano dobivanje na težini do iznad preoperativnih vrijednosti bilo je opaženo u štakora koji su primili BPC 157 peroralno ili parenteralno, dok su visina resica, dubina krupti i mišićna debljina [unutrašnji (kružni) mišićni sloj] također narasli 7., 14., 21. i 28. dana. Uz to štakori tretirani BPC-om 157 nisu pokazali različite promjere ileuma i jejunuma, omjer između jejunuma i ileuma ostao je sačuvan dok je porasla otpornost anastomoze na pucanje. Kao zaključak BPC 157 može biti koristan u terapiji sindroma kratkog crijeva.
Pokušali smo u potpunosti atagonizirati ekstenzivnu	BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg) dan (i) i.p. odmah nakon diklofenaka ili (ii)	Bez tretmana BPC-om 157, 3 sata nakon zadnje aplikacije diklofenaka suočili	BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg) je bio jako učinkovit kroz čitav eksperiment, bilo davan

toksičnost uzrokovanu NSAIDs-ima (koristeći diklofenak kao prototip). Kombinirana gastrointestinal na, jetrena i moždana toksičnost inducirana diklofenakom (12.5mg/kg i.p. jednom dnevno kroz 3 dana u štakora). Ref. 30	peroralno u vodi za piće (0.16 µg/ml, 0.16 ng/ml).	smo se s kompleksnim, štetnim učinkom diklofenaka, karakteriziranim ozbiljnim želučanim, intestinalnim i jetrenim lezijama, povišenim serumskim vrijednostima bilirubina, AST-a i ALT-a, povišenom težinom jetre, produljenim vremenom sedacije/nesvjesti (nakon bilo koje aplikacije diklofenaka) i konačno, hepatičkom encefalopatijom (edem mozga osobito prisutan u kori velikog mozga i malom mozgu, više u bijeloj nego u sivoj tvari, oštećenim crvenim neuronima, osobito u kori velikoga mozga i jezgrama malog mozga, Purkinjeovim stanicama i nešto rijeđe u neuronima hipokampusa).	(i) i.p. odmah nakon diklofenaka ili (ii) peroralno u vodi za piće (0.16 µg/ml, 0.16 ng/ml). Jako ekstenzivna antagonizacija toksičnosti diklofenaka postignuta BPC-om 157 (µg-/ng-doza, i.p., p.o.) može ohrabriti njegovu buduću upotrebu kao antidota kod toksičnosti uzrokovanoj diklofenakom i drugim NSAIDs-ima.
--	--	--	--

Ref. 31* Lezije kolona izazvane cisteaminom bile su također umanjene standardnim antiulkusnim agensima (u dozama mg/kg), davanim i.p., i.g., i.r., poput ranitidina (10), cimetidina (50), omeprazola (10), atropina (10), zajedno sa metilprednizolonom (1), i sulfasalazinom (50, i.r.). Procijenjeno 30 minuta nakon aplikacije cisteamina (200 mg). Standardne cisteaminom izazvane duodenalne lezije (procijenjeno 24 sata nakon s.c. aplikacije cisteamina (400 mg/kg)) bile su također smanjene aplikacijom ovih agensa (danih i.p. u istim dozama sat vremena prije cisteamina), sa izuzetkom sulfasalazina.

Ref. 34* Redovito lezije kolona uzrokovane cisteaminom bile su značajno smanjene ranitidinom (10), omeprazolom (10), atropinom (10), metilprednizolonom (1), sulfasalazinom (50; mg/kg). Specifično mjesec dana ili 3 mjeseca nakon inicijalnog davanja cisteamina (400 mg/kg i.r.) ženskim štakorima, terapija [BPC 157 (PL-10, PLD-, ranitidin, omeprazol, atropin, metilprednizolon, sulfasalazin (i.p.)) je smanjila produljenu ozljedu kolona: davanje jednom dnevno kroz tjedan dana s početkom mjesec dana nakon davanja cisteamina, kao i davanje kroz 2 tjedna jednom dnevno počevši 3 mjeseca nakon davanja cisteamina. Učinak na recidivne lezije je također bio testiran. One se mogu ponovno pojaviti nakon prestanka terapije (nakon prestanka terapije kroz 3 tjedna na kraju dvotjednog režima davanja kod ženskih štakora koji su primili cisteamin prije 3 mjeseca) u sulfasalazinskoj grupi.

Ref. 36* Sulfasalazin (50 mg/kg) i 6-alfa-metilprednizolon (1 mg/kg) bili su davani jednom dnevno i.p. BPC 157 ubrzava, dan parenteralno ili peroralno, cijeljenje defekta kolona i kože, vodeći do zatvaranja fistule što je potvrđeno makroskopski, mikroskopski, biomehanički i funkcionalno (fistula podnosi veći volumen vode prije curenja). L-NAME pogoršava cijeljenje kolokutanih fistula, rana kože i kolona (grupe koje su primale L-NAME). L-arginin je bio učinkovit s ometenim stvaranjem NO-a (grupe koje su istovremeno primale L-NAME i L-arginin), ali ne i samostalno (grupe koje su primale L-arginin). Sulfasalazin je bio umjereno učinkovit dok su kortikosteroidi čak imali pogoršavajući učinak.

Tablica 7 – Primjena BPC-a 157 u modelima jetrenih lezija (29,30,38-41)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
Podvezivanje žučovoda i hepaticke arterije kroz 24 sata, stres izazvan obuzdavanjem kroz 48 sati, tretman CCl₄ (1 ml/kg i.p., žrtvovanje nakon 48 sati), u štakora Ref. 38*	BPC 157 (10 µg ili 10ng/kg i.g., i.p.)	Rezultati laboratorijskih testova za bilirubin, SGOT, SGPT su bili u potpunoj korelaciji s makroskopskim i mikroskopskim nalazima.	BPC 157 administriran i.g. ili i.p. signifikantno je spriječio razvoj jetrenih nekroza ili masnih promjena kod štakora koji su bili podvrgnuti ligaturi hepaticke arterije i žučovoda kroz 24 sata, štakorima koji su bili podvrgnuti stresu izazvanim 48 satnim obuzdavanjem, štakorima koji su bili tretirani s CCl₄ (1 ml/kg i.p., žrtvovani nakon 48 sati).
L-NAME (50, 100, 150 mg/kg) i L-arginin (100 mg/kg), i njihove kombinacije (L-NAME + BPC 157; L-NAME + L-arginin) jednokratno; 5 tjedana s L-NAME-om (10 mg/kg), s L-argininom (100 mg/kg), BPC-om 157 (10 µg/kg) i njihove kombinacije	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg) samostalno ili u kombinaciji s L-NAME-om i/ili L-argininom.	Aplikacija L-NAME-a izaziva sindrom plućne hipertenzije (PHS) u pilića, što se prevenira istovremenom aplikacijom L-arginina i BPC-a 157.	Patohistološka ispitivanja akutne i kronične toksičnosti otkrila su da L-NAME izaziva ozbiljna tkivna oštećenja (nekroza stanica miokarda i jetre, nekroza limfnih stanica u slezeni) dok L-arginin izaziva predominantno kongestiju, edem i hemoragiju u svim organima. Svi ti učinci su bili prevenirani BPC-om 157.

(L-NAME + BPC 157; L-arginin + BPC 157; L-NAME + L-arginin) i.p., u pilića. Ref. 39			
Izravna procjena portalne hipertenzije (mmHg) u portalnoj veni, kao i procjena jetrenih lezija induciranih alkoholom u dozi od 7.28 g/kg u vodi za piće kroz 3 mjeseca, u štakora Ref. 40*	BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg, i.p., i.g.) davan jednom dnevno kroz čitav period od 3 mjeseca (1) ili samo zadnji mjesec (2) (zadnja aplikacija 24 sata prije žrtvovanja).	Slične lezije bile su kod štakora koji su pili alkohol kroz 2 ili 3 mjeseca u dozi 7.28 g/kg/dnevno. Bili su vidljivi i profilaktički i terapijski učinci. Nakon razdoblja od 2 ili 3 mjeseca svi štakori koji su tretirani fiziološkom otopinom i.g. ili i.p. alkohol je konzistentno inducirao signifikantni rast vrijednosti tlaka u portalnoj veni iznad vrijednosti u normalnih životinja. Uz to povećana površina (µm ²) i povećana zakrivljenost (µm) hepatocita ili hepatocitnih jezgara, uznapredovala steatoza, povećana težina jetre, sve zajedno dodatno povišuju portalni tlak u kontrolnih životinja.	U štakora koji su primili BPC 157 ili propranolol inače povišeni portalni tlak bio je smanjen do vrijednosti opaženih kod zdravih štakora. Neki poremećaji su bili potpuno eliminirani (nimalo različiti od zdravih štakora, npr. portalni tlak, zakrivljenost i površina hepatocita, težina jetre), dok su drugi bili značajno smanjeni (vrijednosti su bile manje nego u kontrolnih životinja, no veće nego kod zdravih štakora, npr. zakrivljenost i površina hepatičkih jezgara). Kao sažetak, unatoč kroničnom pijenju alkohola BPC 157 može prevenirati razvoj portalne hipertenzije kao i ukloniti već etabliranu portalnu hipertenziju zajedno s povezanim jetrenim poremećajima.
Usredotočili smo se na želučane ulkuse inducirane prekomjernom dozom inzulina (250 i.j./kg i.p.)	BPC 157 (10 µg/kg) dan (i) i.p. ili (ii) i.g. odmah nakon inzulina.	Inzulinske konvulzije, (naposljetku letalne) teško oštećeni neuroni u malom mozgu i hipokampusu, hepatomegalija, masna jetra, povišene serumske vrijednosti AST-a, ALT-a i	BPC 157, antiulkusni peptid, može uz suprotstavljanje stvaranju želučanog ulkusa konzistentno smanjivati sve poremećaje izazvane inzulinom, uključujući i letalni ishod. Štakori tretirani BPC-om 157 nisu

kao i na druge poremećaje koji su bili istovremeno izazvani u štakora, konvulzije (naposljetku letalne) teško oštećene neurone u malom mozgu i hipokampus u, hepatomegaliju, masnu jetru, povišene serumske vrijednosti AST-a, ALT-a i amilaza, slom u jetrenoj glikogenezi sa podležućim razvojem hipoglikemije i kalcifikacije. Ref. 29		amilaza, slom u jetrenoj glikogenezi sa podležućim razvojem hipoglikemije i kalcifikacije. Depoziti kalcija bili su prisutni u stijenci krvnih žila, u hepatocitima okruženima krvnim žilama i nekad čak u jetrenom parenhimu, većinom kao linearno i samo sporadično kao granularno nakupljanje.	pokazivali letalni ishod, bili su većinom bez hipoglikemijskih konvulzija sa značajno većim razinama glukoze u krvi (glikogen je i dalje bio prisutan u hepatocitima), pokazali su manje poremećaja u jetri (normalna težina jetre, manje masna jetra), smanjene vrijednosti ALT-a, AST-a i amilaza, značajno manje oštećene neurone u mozgu i samo ponekad male želučane lezije. Štakori tretirani BPC-om 157 pokazali su većinom samo točkastu prezentaciju kalcifikata.
Istražujemo osobit aspekt iznenadne pojave kod prekomjerne doze paracetamola (5 g/kg i.p.): brzo inducirana progresivna hepatička encefalopatija	BPC 157 (10 µg, 10 ng, 10 pg/kg i.p., i.g.) dan odmah nakon paracetamola, profilaktički ili terapijski 3 sata nakon administracije paracetamola.	25 min nakon aplikacije paracetamola dolazi do porasta serumskih vrijednosti AST-a, ALT-a i amonijaka prethodeći jetrenim lezijama, dok u nekoliko moždanih regija postaje vidljivo značajno oštećenje povezano s generaliziranim konvulzijama. Kroz	BPC 157 (10 µg, 10 ng, 10 pg/kg i.p., i.g.) bio je učinkovit (µg, ng) protiv toksičnosti izazvane paracetamolom, dan profilaktički, odmah nakon paracetamola ili terapijski 3 sata nakon aplikacije paracetamola. BPC 157 je pokazao suprotstavljajući klinički učinak (nije bilo konvulzija kod profilaktičke aplikacije) (ili su konvulzije brzo nestale

a s generaliziranim konvulzijama u štakora. Ref. 41		idućih 5 sati konvulzija i nakon toga, dolazi do porasta oštećenja mozga, jetre i porasta vrijednosti jetrenih enzima i amonijaka, osobito u razdoblju 3-24 sata nakon aplikacije paracetamola.	(terapijski učinak unutar 25 min)), mikroskopski (značajno manje lezije jetre i mozga) i biokemijski (serumske razine vrijednosti enzima i amonijaka bile su smanjene). Oboje, profilaktički i terapijski korisni učinci (i.p. i i.g.) jasno impliciraju da je BPC 157 (μg, ng) vrlo učinkoviti paracetamolski antidot čak i kod uznapredovalih oštećenja uzrokovanih aplikacijom prekomjerne doze paracetamola.
Pokušali smo u potpunosti antagonizirati i ekstenzivnu toksičnost uzrokovanu NSAIDs-ima (koristeći diklofenak kao prototip). Kombinirana gastrointestinalna, jetrena i moždana toksičnost inducirana diklofenakom (12.5mg/kg i.p. jednom dnevno kroz 3 dana), u štakora. Ref. 30	BPC 157 (10 $\mu\text{g/kg}$, 10 ng/kg) dan (i) i.p. odmah nakon diklofenaka ili (ii) peroralno u vodi za piće (0.16 $\mu\text{g/ml}$, 0.16 ng/ml).	Bez tretmana BPC-om 157, 3 sata nakon zadnje aplikacije diklofenaka suočili smo se s kompleksnim, štetnim učinkom diklofenaka, karakteriziranim ozbiljnim želučanim, intestinalnim i jetrenim lezijama, povišenim serumskim vrijednostima bilirubina, AST-a i ALT-a, povišenom težinom jetre, produljenim vremenom sedacije/nesvjesti (nakon bilo koje aplikacije diklofenaka) i konačno, hepatičkom encefalopatijom (edem mozga osobito prisutan u kori velikog mozga i malom mozgu, više u bijeloj nego u sivoj tvari, oštećenim crvenim neuronima, osobito u kori velikoga mozga i jezgrama malog	BPC 157 (10 $\mu\text{g/kg}$, 10 ng/kg) bio je jako učinkovit kroz čitav eksperiment, bilo davan (i) i.p. odmah nakon diklofenaka ili (ii) peroralno u vodi za piće (0.16 $\mu\text{g/ml}$, 0.16 ng/ml). Jako ekstenzivna antagonizacija toksičnosti diklofenaka postignuta BPC-om 157 (μg-ng-doza, i.p., p.o.) može ohrabriti njegovu buduću upotrebu kao antidota kod toksičnosti uzrokovanoj diklofenakom i drugim NSAIDs-ima.

		mozga, Purkinjeovim stanicama i nešto rijeđe u neuronima hipokampusa).	
--	--	--	--

Ref. 38* Referentni agensi (bromokriptin, amantadine i somatostatin) u različitim eksperimentalnim modelima jetrene ozljede kod štakora (ligatura hepatičke arterije i žučovoda kroz 24 sata, stres izazvan obuzdavanjem kroz 48 sati, tretman CCl₄ (1ml/kg i.p., žrtvovanje nakon 48 sati)) imali su maleni ili nikakav protektivni učinak.

Ref. 40* Štakori koji su primili propranolol inače povišeni portalni tlak bio je reducirao do vrijednosti vidljivih u normalnih zdravih štakora. Neki poremećaji bili su potpuno eliminirani (nerazličiti od zdravih štakora, npr. portalni tlak, zakrivljenost i površina hepatocita, težina jetre) dok su drugi bili značajno smanjeni (vrijednosti manje od onih u pijućih kontrola, no ipak veće nego u zdravih štakora, npr. zakrivljenost i površina hepatičkih jezgara). S druge strane, aplikacija ranitidina smanjila je samo razvoj steatoze.

Tablica 8 – Primjena BPC-a 157 u modelu lezije gušterače (10)

Metode i vrste životinja	Doziranje BPC 157/kg	Ostali utvrđeni učinci	Glavni rezultat
Akutni pankreatitis izazvan ligaturom žučovoda kod štakora Ref. 10	10 µg, 10 ng i.p., i.g., profilaktički 1 sat prije ligacije žučovoda, terapijski jednom dnevno počevši 24 sata nakon ligacije (zadnja aplikacija 24 sata prije žrtvovanja).	Želučane i duodenalne lezije	Korisni učinak na akutni pankreatitis, pozitivni utjecaj BPC-a 157 na razvoj želučanih i duodenalnih lezija kod štakora s ligaturom žučovoda u predtretmanu i posttretmanu.

1.3. Dosadašnja istraživanja o povezanosti BPC-a 157 sa NO i COX sustavom

Stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 i nesteroidni protuupalni lijekovi

Učinak je nedavno prikazan u revijalnom radu (42) i referiran u nizu nedavno objavljenih radova (14,18,30,41,43,44). Stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 antiulkusni je peptidergički agens, koji je pokazao svoj učinak u kliničkim studijama za upalnu bolest crijeva (PL-10, PLD-116, PL 14736) i cijeljenje rana, stabilnost u ljudskom želučanom soku i netoksičnost (4). Nedavno smo pokazali da je BPC 157 antidot protiv nesteroidnih protuupalnih lijekova (30,41-43). Fokusirali smo se na korisne učinke BPC 157 na želučane (4,14,24,29,30,40,41,43), duodenalne (14,30,41,43), intestinalne (14,30,41,43), jetrene (29,30,38,40,41,43) i moždane ozljede (29,30,41,43,45), adjuvantni artritis (14), bol (46), hiper/hipotermiju (47), formiranje opstruktivnog tromba i trombolizu (48), funkcioniranje krvnih žila (49), kao i na njegovo suprostavljanje produljenom krvarenju i trombocitopeniji nakon aplikacije različitih antikoagulanasa i antitrombocitnih agensa (44). BPC 157 također poboljšava cijeljenje rana (4,14,18,24,29,30,35,36,38,40,41,43,44,50-54). Argumenti za aktivnost BPC 157 kao antidota sadržani su u njegovom očitom suprostavljajućem učinku na razne nuspojave izazvane uporabom različitih nesteroidnih protuupalnih lijekova (14,18,30,41-44). Takvu raznolikost korisnih učinaka, u sličnom rasponu, do sada ne pokazuje niti jedan drugi agens. Za razliku od nesteroidnih protuupalnih lijekova BPC 157 siguran je za uporabu (nema izvještaja o njegovoj toksičnosti, ni LD1 nije mogla biti dosegnuta) i svi su njegovi učinci bili postignuti korištenjem mikrogramske ili

nanogramske doze, parenteralnom ili peroralnom primjenom (4,14,18,24,29,30,35,36,38,40-55).

Stabilni želučani pentadekapeptid BPC 157 i NO-sustav

Učinak je nedavno prikazan u revijalnom radu (55) i referiran u nizu relativno nedavno objavljenih radova (35,36,50). Povezanost BPC 157 i sustava dušičnog oksida osobito je vidljiva u njegovoj participaciji u Moncadinom homeostatskom cijelećem odgovoru NO-sustava na ozljedu (održan vaskularni integritet, kontrolirana trombocitna aktivnost) (56). Izrijeckom, cijeleći učinak BPC 157 utječe na sve događaje nakon gubitka vaskularnog integriteta: ovisno o uvjetima, BPC 157 smanjuje bilo trombozu (anastomoza abdominalne aorte) bilo krvarenje/trombocitopeniju (amputacija, heparin, varfarin, aspirin) (44). BPC 157 konzistentno unaprjeđuje cijeljenje kod serije različitih modela ozljeda, akutnih i kroničnih, čak i kod različitih tkiva koja inače spontano ne cijele nakon teških ozljeda (4,14,18,24,29,30,35,36,38,40,41,43,44,50-54). BPC 157 također stimulira ekspresiju *egr-1* i *NAB2* gena (57,58). Hipoteza da BPC 157 (radi činjenice da se stvara u želučanoj sluznici, uz svo značenje sintetaze NO-a i bazalno većeg stvaranja NO-a u želučanoj sluznici u usporedbi sa drugim tkivima (59)) pokazuje generalni kompetitivni učinak prema L- argininu i njegovim analozima (npr. L-NAME) i da to ima određeno fiziološko značenje (na stvaranje NO-a) (17,60), kasnije praktički podržava njegove korisne učinke ilustrirajući uzajamne odnose BPC 157 i sustava NO-a (s L-NAME/L-argininom, pojedinačno ili zajedno) u (i) zaštiti želučane sluznice i zaštiti sluznice nakon alkoholne lezije citoprotekcijom (9,11,17), stvaranjem NO-a (17,60) i regulacijom krvnog tlaka (17); u (ii) akutnoj/kroničnoj alkoholnoj intoksikaciji i

sindromu ustezanja (61,62); u (iii) kardiovaskularnim poremećajima, kroničnom zatajenju srca, plućnoj hipertenziji i aritmijama (39,63,64); u (iv) poremećajima nakon hipokalijemije i hiperkalijemije kao i u disfunkciji stanične membrane izazvane kalijem (65,66); i konačno u (v) kompleksnom poremećaju cijeljenja, kao kod cijeljenja ezofagokutane (50) i kolokutane fistule (36). Ipak još nije utvrđeno kako ovaj modulirajući učinak BPC 157-a na NO-sustav, osobito u specifičnom učinku na kodirajući gen za sintezu endotelne sintetaze NO-a (50) pretvoriti u poboljšanje njegovog kliničkog učinka.

NO-sustav i COX-enzimi

Mnogi fiziološki i patološki procesi u organizmu ovise o biosintezi i učincima NO-a i prostaglandina (67). Enzimi NO-sintetaza (NOS) i ciklooksigenaza (COX) prisutni su u dvije glavne forme: konstitutivnoj i inducibilnoj. I dok se za prvu formu vežu poželjni učinci, poput gastroprotekcije (konstitutivni COX-1 učinak) i vazodilatacijski učinak (konstitutivni NOS učinak), učinci druge, tj. inducibilne forme vidljivi su u različitim patološkim procesima (67,68). Biosinteze NO-a i prostaglandina slične su i odvijaju se u istim tkivima i organima što je potvrđeno mnogim pokusima (različiti modeli upale i septičkog šoka uzrokovanog endotoksinima) i opisano u radovima (69). U mnogim se radovima iznose pretpostavke o mogućem učinku NO u regulaciji sinteze prostaglandina, ali taj mogući mehanizam nije u potpunosti razjašnjen zbog kompleksnosti oksidoredukcijskih učinaka NO radikala ($\text{NO}^{\cdot}$) (69-71). Kasniji radovi pokazuju da aspirin i indometacin (NSAID, neselektivni inhibitori COX enzima) značajno reduciraju učinkovitost NOS-a, kroz što je vidljiv i obrnut učinak (72).

Celekoksib

Mali broj radova pokazuje da celekoksib izaziva lezije želučane sluznice (73-75); nasuprot tomu do sada je u literaturi prikazan kao hepatoprotektivni agens (76-78). Učinak celekoksiba na mozak dvojak je. Protektivan jest za lezije striatuma izazvane MPTP-om i za katatoniju izazvanu raznim lijekovima (79), kod konvulzija izazvanih pentilentetrazolom (80). A agravirajući jest kod konvulzija i lezija hipokampusa izazvanih kainaičnom kiselinom (81). Mali broj radova ispituje njegove učinke u interakciji sa sustavom dušičnog oksida (81-84), poglavito isključivo temeljem učinka inhibitora NOS-a (L-NAME). Visoke doze celekoksiba predviđene u disertaciji do sada nisu korištene niti su ispitivane istovremenom primjenom NOS-blokatora (L-NAME) i NOS-supstrata (L-arginina), a pretpostavljamo da bi izazvale toksičnost gastrointestinalnog trakta, jetre i mozga - sličnu onoj koja se nalazila kod neselektivnih protuupalnih agensa (30,41-43) i bila je posredovana NO-sustavom (55).

2. HIPOTEZA

BPC 157 inhibirat će negativne učinke selektivnog protuupalnog lijeka, celekoksiba primijenjenog u visokim dozama, kao što antagonizira negativne učinke neselektivnih protuupalnih lijekova (paracetamol, ibuprofen, diklofenak, aspirin i indometacin) i taj je učinak posredovan preko NO-sustava, što se pokazuje dodatnom primjenom L-NAME i/ili L-arginina.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj istraživanja bio je utvrđivanje toksičnosti celekoksiba i njeno suzbijanje pomoću BPC-a 157.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Kvantificirati veličinu lezija sluznica želuca i duodenuma izazvanih aplikacijom celekoksiba nakon 24 i 48 sati.
2. Analizirati makroskopski i mikroskopski promjene na sluznici želuca i duodenuma, jetri i mozgu nakon 24 i 48 sati.
3. Izmjeriti razinu jetrenih enzima (AST, ALT) i ostalih parametara (ukupni bilirubin, amonijak) iz seruma nakon 24 i 48 sati.
4. Utvrditi učinak L-NAME (5mg/kg) i/ili L-arginina nakon 24 i 48 sata i kvantificirati veličinu lezija sluznica želuca i duodenuma, analizirati makroskopski i mikroskopski promjene na jetri i mozgu, izmjeriti razinu jetrenih enzima (AST, ALT) i ostalih parametara (ukupni bilirubin, amonijak) iz seruma.
5. Utvrditi zajednički učinak BPC-a 157 (u dozi sa najboljim učinkom iz prethodnih pokusa) i L-NAME i/ili L-arginina nakon 24 i 48 sati i kvantificirati veličinu lezija sluznica želuca i duodenuma, analizirati makroskopski i mikroskopski promjene na jetri i mozgu, izmjeriti razinu jetrenih enzima (AST, ALT) i ostalih parametara (ukupni bilirubin, amonijak) iz seruma.

4. Materijali i metode

Pokus je rađen na ženjkama laboratorijskih štakora soja Wistar, tjelesne mase 220-250 grama, dobi 8-12 tjedana, koje su uzgojene u nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. Registracije HR-POK-007). Svaka skupina se je sastojala od 7 štakorica. Sve štakorice su nakon prihvata iz uzgojne nastambe prošle 7 dana prilagodbe na nove uvjete gdje su im biti ponuđena hrana i voda ad libitum, uz obogaćenje prostora kaveza do početka pokusa.

Sve ispitivane agense štakorice su primile jednokratno, intraperitonealno. Celekoksib je primijenjivan u dozi od 1g/kg tjelesne mase (tj.t.) intraperitonealno. Neposredno nakon celekoksiba primijenili su se BPC 157 (10 µg/kg ili 10 ng/kg), L-NAME (5 mg/kg), L-arginin (100mg/kg), samostalno i/ili zajedno, dočim je istovremeno kontrola primala jednaki volumen fiziološke otopine (5ml/kg) intraperitonealno. Ukupno je korišteno 126 životinja (18 skupina), prikazano u Tablici 9.

Tablica 9 – protokol pokusa po skupinama

Naziv skupine	Tretman (jednokratni)	Vrijeme žrtvovanja	Broj životinja
Kontrola 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + 1 mL 0.9% NaCl i.p.	24h	7 Wistar ♀
Kontrola 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + 1 mL 0.9% NaCl i.p.	48h	7
BPC 157 µg 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	24h	7
BPC 157 µg 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	48h	7
BPC 157 ng 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 ng/kg tj.t. i.p.	24h	7
BPC 157 ng 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 ng/kg tj.t. i.p.	48h	7

L-NAME 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p.	24h	7
L-NAME 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p.	48h	7
L-NAME + BPC 157 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	24h	7
L-NAME + BPC 157 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	48h	7
L-arginin 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p.	24h	7
L-arginin 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p.	48h	7
L-arginin + BPC 157 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	24h	7
L-arginin + BPC 157 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	48h	7
L-arginin + L-NAME 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p.	24h	7
L-arginin + L-NAME 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p.	48h	7
L-arginin + L-NAME + BPC 157 24h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	24h	7
L-arginin + L-NAME + BPC 157 48h	celekoksib 1 g/kg tj.t. i.p. + L-arginin 100 mg/kg tj.t. i.p. + L-NAME 5 mg/kg tj.t. i.p. + BPC 157 10 µg/kg tj.t. i.p.	48h	7

Štakorice su bile žrtvovane 24 ili 48 sati od početka pokusa (čitava skupina). Neposredno pred žrtvovanje štakorice su bile sedirane diazepamom (5 mg/kg tj.t.) (Krka d.d., Novo Mesto, Slovenija) te im je izvađena krv za daljnje pretrage (određivanje vrijednosti amonijaka, AST-a, ALT-a (IU/L) i ukupnog bilirubina (µmol/L), te je u roku sat vremena centrifugirana u trajanju od 15 minuta pri 3000 rpm. Svi testovi su rađeni sa Olympus AU2700 uređajem sa originalnim reagensima (Olympus Diagnostica, Lismeehan, Ireland) (30,41,43). Žrtvovanje je izvršeno neposredno

nakon vađenja krvi, giljotinom, radi uzimanja mozga za daljnje analize. Nakon žrtvovanja uzeti su još želudac, duodenum i jetra za daljnju analizu. Veličina želučanih i duodenalnih lezija bila je procijenjena makroskopski (suma najdužih promjera lezija). Jetre su bile vagane. Nakon toga su izuzeta sva tkiva, osim mozga (mozak je ulagan u puferiranu otopinu 10%-tnog formalina (pH 7.4)), i ulagana u puferiranu otopinu 4%-tnog formalina (pH 7.4), a lešine su neškodljivo uklonjene (HR-POK-007). Nakon fiksacije u formalinu, uzorci tkiva su narezani i patohistološki verificirani na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (30,41,43).

Histološka analiza

Uzorci želuca i duodenuma uzimani su prilikom žrtvovanja, te su rastegnuti preko stiropora i ulagani u puferiranu otopinu 4%-tnog formalina (pH 7.4) odmah po uzimanju iz netom žrtvovanje životinje, gdje su ostali iduća 24 h. Uzorci su se nakon 24 sata razrezali, dehidrirali, te uklopili u tekući parafin, te se je cijela parafinska kocka sa odabranim tkivom dalje izrezala. Uzorci su izrezani na debljinu od 5 µm, te su bojani na hemalaun-eozin. Mikroskopiranje je provodio nepristrani patolog, kome nije bilo poznato kojoj skupini pripada uzorak kojeg mikroskopira (30,43).

Jetra se također uzimala prilikom žrtvovanja, bila je izvagana te se je ulagala u puferiranu otopinu 4%-tnog formalina (pH 7.4). Nakon 24 sata bila je razrezana, te su se odabrani uzorci dehidrirali, pa zatim uklopili u tekući parafin, nakon čega se cijela parafinska kocka dalje izrezivala na debljinu od 5 µm, te bojala na hemalaun-eozin. Mikroskopiranje je provodio nepristrani patolog, kome nije bilo poznato kojoj skupini pripada uzorak kojega mikroskopira. Skoriralo se je pojavljivanje mikrovezikularne steatoze od 1—3: 1 — manje od 20% hepatocita pokazuje mikrovezikularnu

steatozu, 2— od 20–60% hepatocita pokazuje mikrovezikularnu steatozu, 3 — više od 60% hepatocita pokazuje mikrovezikularnu steatozu (30,41,43). Parenhimalna nekroza je bila skorirana semikvantitativno: 0 — nema promjena, 1 — minimalne promjene, 2 — umjerene promjene, 3 — maksimalne primjene (30,41,43).

Mozak je uziman prilikom žrtvovanja, te je ulagan u puferiranu otopinu 10%-tnog formalina (pH 7.4). Nakon 48 sati fiksacije rezan je konsektivnim koronarnim rezovima debljine 5 μ m, te bojan hemalaun-eozinom. Procjena je rađena sukladno postupku u prethodnim radovima (30,41,43): Intenzitet i distribucija moždanih lezija (balonizirani ili crveni neuroni), edem mozga i cijanoza bili su evaluirani semikvantitativno: 0 nema promjena; 0–3, edem (1 — slab difuzni i/ili perifokalni; 2 — umjeren; i 3 — jak i generaliziran); 0–4, balonizirani ili crveni neuroni (1 — do 5%; 2 — 5–30%; 3 — 30–50%; i 4 — više od 50%) (30,41,43).

Statistička analiza

Za obradu podataka korišten je program Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) Kod normalne distribucije rezultata, koristila se je parametrijska statistika analize varijance te post hoc Bonferonni/Dunnov test. U slučaju nenormalne distribucije koristila se je neparametrijska statistika i Kruskal-Wallis test, zatim post hoc Mann-Whitney U test. Analize frekvencija radila se je pomoću χ^2 i/ili Fischer exact testa. Podaci su prezentirani tablično i grafički kao, minimum, medium, maksimum (min/med/max) te srednja vrijednost +/- standardna devijacija (SD). Vrijednosti $p < 0.05$ smatrane su statistički signifikantnim.

5. REZULTATI

ŽELUČANE I DUODENALNE LEZIJE

Kod lezija izazvanih celekoksibom lezije postoje samo na želucu, a duodenum je bez lezija. Benefitni učinak se vidi kod primjene BPC-a 157 i L-arginina, a ulcerogeni kod primjene L-NAME. Benefitni učinak BPC 157 se vidi u obje doze, μg i mg -protokola, i nakon 24h i nakon 48 h, i kod životinja koje su uz BPC 157 primile L-arginin i/ili L-NAME (BPC 157+L-arginin; BPC 157+L-NAME; BPC 157+L-NAME + L-arginin) (Slika 1-6, Tablica 10).

L-arginin je pokazao benefitni učinak tek nakon 48h. S istovremenom primjenom BPC 157 benefitni učinak se javlja već nakon 24h. Ulcerogeni učinak L-NAME istovremena L-arginina primjena smanjuje do razine kontrole (L-NAME+L-arginin). Dodatna primjena BPC 157 dodatno smanjuje lezije ispod razine kontrole (BPC 157+L-NAME + L-arginin).

L-NAME pokazuje isto tako ulcerogeni učinak na 48h. Tada istovremena primjenjena antagonizira benefitni učinak L-arginina i dovodi lezije do razine kontrole (L-NAME+L-arginin). Primjena BPC 157 je bila rezistentna na istovremenu primjenu L-NAME, i kod 24h i kod 48h (BPC 157+L-NAME).

Tablica 10. Makroskopska analiza želučanih lezija, suma najdužih promjera lezija (srednja vrijednost $\pm$ SD, mm) kod životinja 24 i 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.). BPC 157 (10 μ g/kg, 10 ng/kg), L-NAME (5 mg/kg), L-arginin (100 mg/kg) su bili aplicirani zasebno i/ili u kombinaciji dok su kontrolne životinje primile jednaki volumen 0,9% otopine NaCl (5 ml/kg i.p.).

*P<0.05, najmanje u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

Skupina	suma najdužih promjera želučanih lezija (srednja vrijednost $\pm$ SD, mm)
Kontrola 24h	10 $\pm$ 2
Kontrola 48h	17 $\pm$ 3.5
BPC 157 μ g 24h	0 $\pm$ 0*
BPC 157 μ g 48h	7.5 $\pm$ 2.8*
BPC 157 ng 24h	2 $\pm$ 0.8*
BPC 157 ng 48h	4 $\pm$ 1.2*
L-NAME 24h	13 $\pm$ 2
L-NAME 48h	30 $\pm$ 5*
L-NAME + BPC 157 24h	2 $\pm$ 1*
L-NAME + BPC 157 48h	4 $\pm$ 2*
L-arginin 24h	7 $\pm$ 1.5
L-arginin 48h	5 $\pm$ 1*
L-arginin + BPC 157 24h	1 $\pm$ 0.5*
L-arginin + BPC 157 48h	2.5 $\pm$ 0.8*
L-arginin + L-NAME 24h	8 $\pm$ 2
L-arginin + L-NAME 48h	10 $\pm$ 3*
L-arginin + L-NAME + BPC 157 24h	1 $\pm$ 0.5*
L-arginin + L-NAME + BPC 157 48h	2.5 $\pm$ 0.6*



Slika 1. Makroskopski prikaz želučanih lezija kod životinja 24 sata nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.), želudac (gore lijevo, kontrola (+0.9% otopina NaCl (5 ml/kg i.p.)); gore desno, BPC 157 nanogrami (+10 ng/kg i.p.); dolje, BPC 157 mikrogrami (+10 µg/kg i.p.)).



Slika 2. Makroskopski prikaz želučanih lezija kod životinja 24 sata nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.), želudac (gore lijevo, L-arginin (+L-arginin (100 mg/kg i.p.)); gore desno, L-NAME (+L-NAME (5 mg/kg i.p.)); dolje, L-arginin + L-NAME (+L-arginin (100 mg/kg i.p.) + L-NAME (5 mg/kg i.p.))).



Slika 3. Makroskopski prikaz želučanih lezija kod životinja 24 sata nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.), želudac (gore lijevo, L-arginin + BPC 157 (+L-arginin (100 mg/kg i.p.) + BPC 157 (10 µg/kg i.p))); gore desno, L-NAME + BPC 157 (+L-NAME (5 mg/kg i.p.) + BPC 157 (10 µg/kg i.p))); dolje, L-arginin + L-NAME + BPC 157 (+L-arginin (100 mg/kg i.p.) + L-NAME (5 mg/kg i.p.)+BPC 157 (10 µg/kg i.p))).



Slika 4. Makroskopski prikaz želučanih lezija kod životinja 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.), želudac (gore lijevo, kontrola (+0.9% otopina NaCl (5 ml/kg i.p.)); gore desno, BPC 157 nanogrami (+10 ng/kg i.p.); dolje, BPC 157 mikrogrami (+10 µg/kg i.p.)).



Slika 5. Makroskopski prikaz želučanih lezija kod životinja 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.), želudac (gore lijevo, L-arginin (+L-arginin (100 mg/kg i.p.))); gore desno, L-NAME (+L-NAME (5 mg/kg i.p.)); dolje, L-arginin + L-NAME (+L-arginin (100 mg/kg i.p.) + L-NAME (5 mg/kg i.p.))).



Slika 6. Makroskopski prikaz želučanih lezija kod životinja 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.), želudac (gore lijevo, L-arginin + BPC 157 (+L-arginin (100 mg/kg i.p.) + BPC 157 (10 µg/kg i.p.)); gore desno, L-NAME + BPC 157 (+L-NAME (5 mg/kg i.p.) + BPC 157 (10 µg/kg i.p.)); dolje, L-arginin + L-NAME + BPC 157 (+L-arginin (100 mg/kg i.p.) + L-NAME (5 mg/kg i.p.)+BPC 157 (10 µg/kg i.p.))).

JETRENE LEZIJE

Uz želučane lezije, celekoksib izaziva i jetrene lezije (Tablica 11, Slika 7-10), te povišene vrijednosti ALT-a i AST-a (Tablica 12). Bilirubin i amonijak se nalaze u razini normalnih vrijednosti, te nisu posebno prikazani.

Kod jetrenih lezija izazvanih celekoksibom, benefitni učinak se vidi kod primjene BPC-a 157 i L-arginina, dok samostalno primjenjena L-NAME ne pokazuje dodatni agrvirajući učinak.

Benefitni učinak BPC-a 157 vidi se u obje doze, µg i ng-protokola, bilo nakon 24 ili 48 sati, i kod životinja koje su uz BPC 157 primile L-arginin i/ili L-NAME (BPC 157+L-arginin; BPC 157+L-NAME; BPC 157+L-NAME + L-arginin).

L-arginin je pokazao benefitni učinak u oba termina, i nakon 24 i nakon 48 sati, za razliku od želučanih lezija. S istovremnom primjenom BPC-a 157 benefitni učinak se javlja jednako već nakon 24h. Istovremena primjena L-NAME uklanja benefitni učinak L-arginina na 48 sati (L-NAME+L-arginin). Dodatna primjena BPC-a 157 dodatno smanjuje lezije ispod razine onih u kontrolnih životinja (BPC 157+L-NAME + L-arginin).

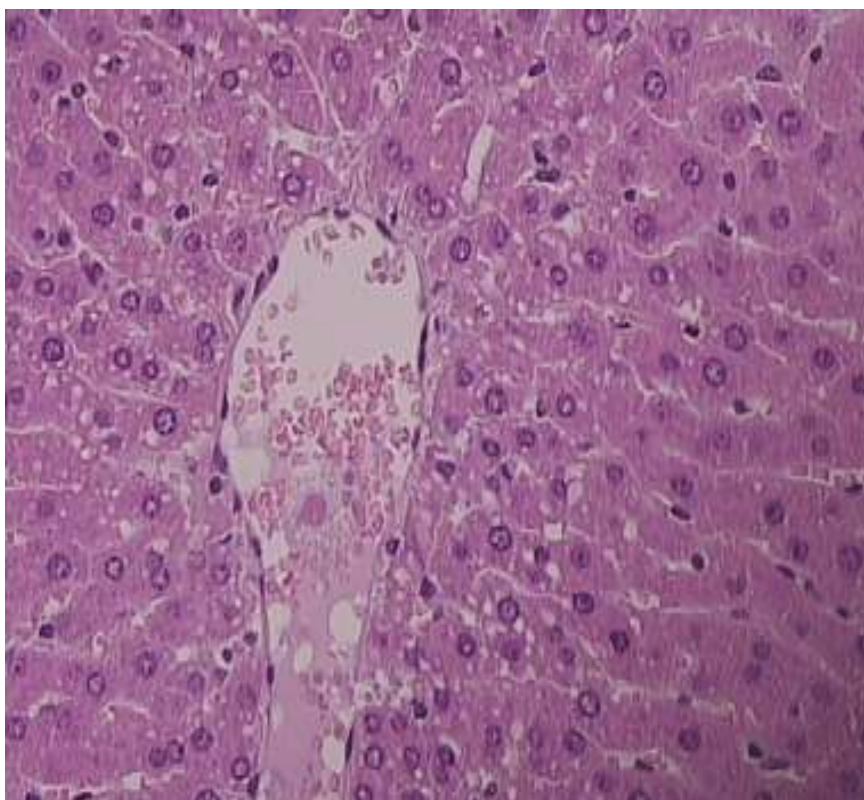
L-NAME ne pokazuje učinak kod samostalne primjene. Na 48h istovremena primjenjena s L-argininom (L-NAME + L-arginin) antagonizira benefitni učinak L-arginina i dovodi lezije do razine kontrole. Učinak BPC-a 157 ostao je rezistentan na istovremenu primjenu L-NAME, i nakon 24 sata i nakon 48 sati (BPC 157+L-NAME).

Tablica 11. Lezije jetre, nekroza, steatoza, kongestija, skorirani 0-3 (min/med/max), kod životinja 24 i 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.). BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg), L-NAME (5 mg/kg), L-arginin (100 mg/kg) su bili aplicirani zasebno i/ili u kombinaciji dok su kontrolne životinje primile jednaki volumen 0,9% otopine NaCl (5 ml/kg i.p.). *P<0.05, najmanje u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

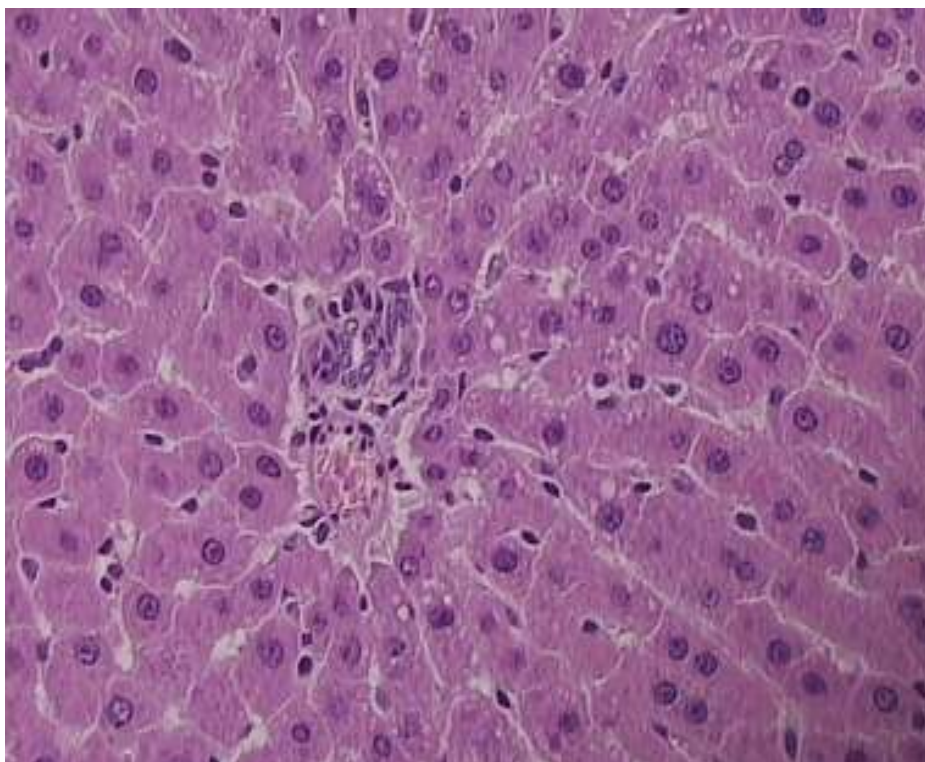
Skupina	Steatoza	Kongestija	Nekroza
Kontrola 24h	2/2/3	2/2/3	2/2/3
Kontrola 48h	2/3/3	2/2/3	2/2/3
BPC 157 µg 24h	1/1/1*	1/1/2*	1/1/1*
BPC 157 µg 48h	1/1/1*	1/1/2*	1/1/1*
BPC 157 ng 24h	1/1/1*	1/1/2*	1/1/1*
BPC 157 ng 48h	1/1/2*	1/1/2*	1/1/1*
L-NAME 24h	2/3/3	2/2/3	2/2/3
L-NAME 48h	3/3/3	2/3/3	2/2/3
L-NAME + BPC 157 24h	1/1/1*	1/2/2*	1/1/1*
L-NAME + BPC 157 48h	1/1/2*	1/2/2*	1/1/1*
L-arginin 24h	1/2/2*	1/2/2*	1/2/2*
L-arginin 48h	1/2/2*	1/2/2*	1/2/2*
L-arginin + BPC 157 24h	1/1/1*	1/1/1*	1/1/1*
L-arginin + BPC 157 48h	1/1/2*	1/1/1*	1/1/1*
L-arginin + L-NAME 24h	1/2/2*	1/2/2*	1/2/2*
L-arginin + L-NAME 48h	2/2/2	2/2/3	2/2/2
L-arginin + L-NAME + BPC 157 24h	1/1/2*	1/1/2*	1/1/1*
L-arginin + L-NAME + BPC 157 48h	1/1/2*	1/1/2*	1/1/1*
Jetreni skor: 1 <20%, 2 20-60%, 3 >60% u 10 VPVP (40x)			

Tablica 12. Vrijednosti jetrenih enzima (srednja vrijednost $\pm$ SD, IU/L) kod životinja 24 i 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.). BPC 157 (10 μ g/kg, 10 ng/kg), L-NAME (5 mg/kg), L-arginin (100 mg/kg) su bili aplicirani zasebno i/ili u kombinaciji dok su kontrolne životinje primile jednaki volumen 0,9% otopine NaCl (5 ml/kg i.p.). *P<0.05, najmanje u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

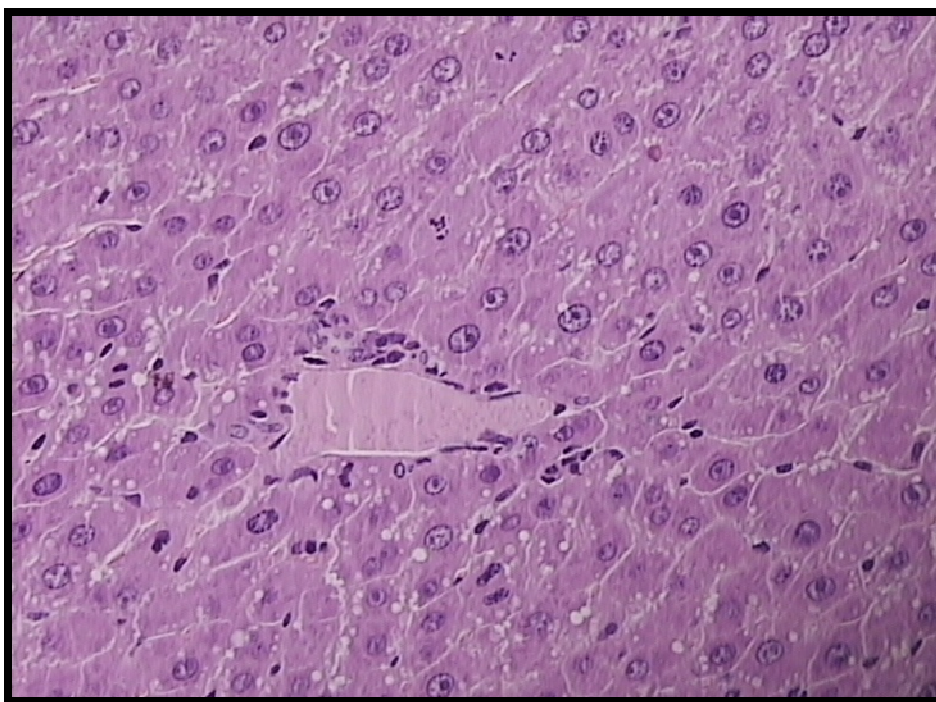
Skupina	Aspartat transaminaza (IU/L)	Alanin transaminaza (IU/L)
Kontrola 24h	352 $\pm$ 12	75 $\pm$ 8
Kontrola 48h	356 $\pm$ 18	84 $\pm$ 9
BPC 157 μ g 24h	138 $\pm$ 14*	41 $\pm$ 11*
BPC 157 μ g 48h	63 $\pm$ 12*	35 $\pm$ 12*
BPC 157 ng 24h	154 $\pm$ 13*	45 $\pm$ 8*
BPC 157 ng 48h	72 $\pm$ 19*	40 $\pm$ 7*
L-NAME 24h	375 $\pm$ 11	86 $\pm$ 12
L-NAME 48h	400 $\pm$ 12	80 $\pm$ 10
L-NAME + BPC 157 24h	170 $\pm$ 15*	69 $\pm$ 9*
L-NAME + BPC 157 48h	150 $\pm$ 12*	55 $\pm$ 13*
L-arginin 24h	315 $\pm$ 14*	68 $\pm$ 14*
L-arginin 48h	300 $\pm$ 21*	65 $\pm$ 10*
L-arginin + BPC 157 24h	165 $\pm$ 25*	55 $\pm$ 8*
L-arginin + BPC 157 48h	160 $\pm$ 18*	45 $\pm$ 8*
L-arginin + L-NAME 24h	293 $\pm$ 17*	68 $\pm$ 9*
L-arginin + L-NAME 48h	270 $\pm$ 15*	73 $\pm$ 11*
L-arginin + L-NAME + BPC 157 24h	167 $\pm$ 11*	57 $\pm$ 10*
L-arginin + L-NAME + BPC 157 48h	176 $\pm$ 14*	57 $\pm$ 8*



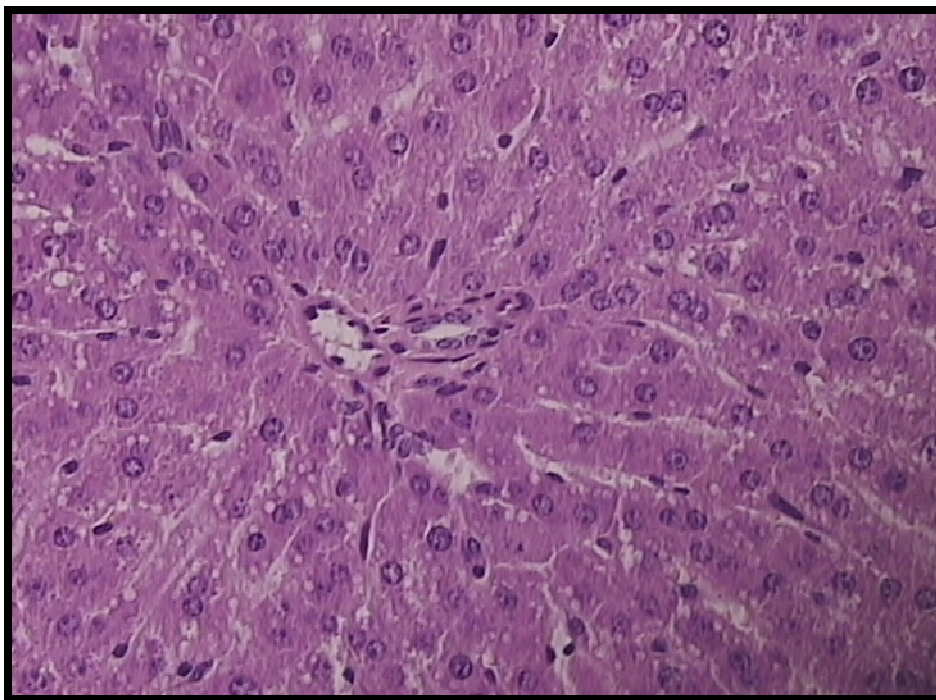
Slika 7. 24 sata nakon tretmana celekoksibom (1 g/kg i.p.) kod kontrolnih životinja vidljiva je mirovezikularna i makrovezikularna steatoza u više od 60% jetrenog parenhima. Sinusoide su dilatirane, nekroza se ne nalazi (HE x40).



Slika 8. 24 sata nakon tretmana celekoksibom (1 g/kg i.p.) kod životinja tretiranih BPC-om 157 vidljiva je mjestimična mikrovezikularna steatoza u više od 20% jetrenog parenhima. Sinusoide su jednako dilatirane, a nekroza se ne nalazi (HE x40).



Slika 9. 48 sati nakon tretmana celekoksibom (1 g/kg i.p.) kod kontrolnih životinja vidljiva je mirovezikularna i makrovezikularna steatoza u više od 60% jetrenog parenhima. Sinusoide su dilatirane, a nalazi se i pokoja piecemeal nekroza u pojedinim portalnim prostorima (HE x40).



Slika 10. 48 sati nakon tretmana celekoksibom (1 g/kg i.p.) kod životinja tretiranih BPC-om 157 vidljiva je mjestimična mikrovezikularna steatoza u više od 20% jetrenog parenhima. Sinusoide su jednako dilatirane, a nekroza se ne nalazi (HE x40).

MOŽDANE LEZIJE

Uz želučane i jetrene lezije, celekoksib izaziva i promjene na mozgu, kao što se vidi u Purkinjeovim stanicama i cerebralnom korteksu (Slika 11, Slika 12, Tablica 13).

Kod moždanih lezija izazvanih celekoksibom, benefitni učinak se vidi kod primjene BPC-a 157 i L-arginina, dok sama primjena L-NAME ne pokazuje dodatni aggravirajući učinak.

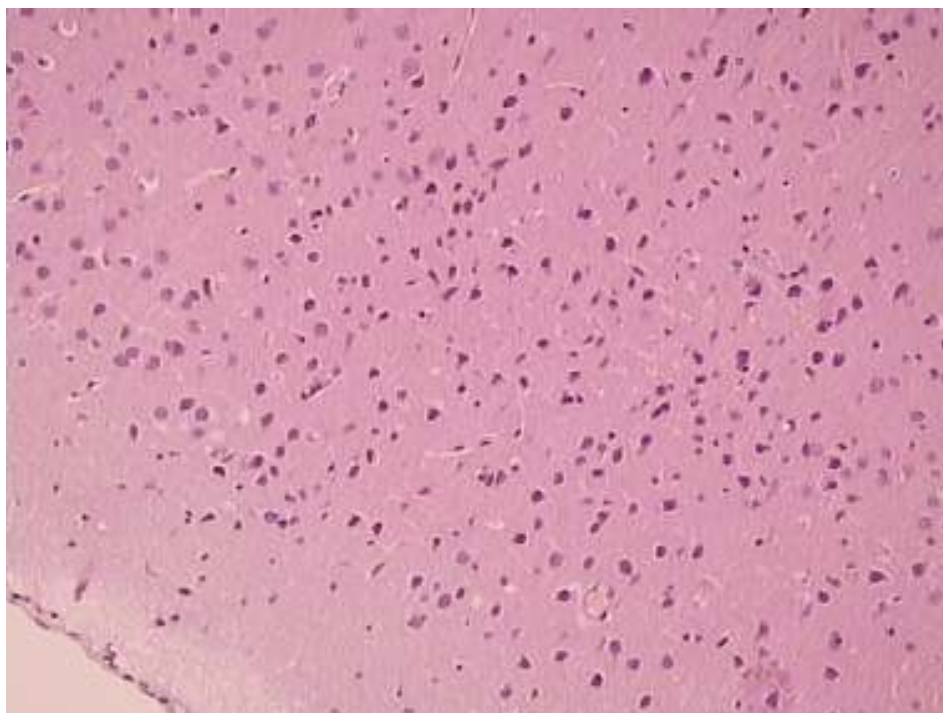
Benefitni učinak BPC-a 157 se vidi u obje doze, μg i ng -protokola, i nakon 24 i nakon 48 sati, i kod životinja koje su uz BPC 157 primile L-arginin i/ili L-NAME (BPC 157+L-arginin; BPC 157+L-NAME; BPC 157+L-NAME + L-arginin).

L-arginin je pokazao benefitni učinak i nakon 24 i nakon 48 sati za razliku od želučanih lezija. S istovremnom primjenom BPC-a 157 benefitni učinak se javlja jednako već nakon 24h. Istovremena primjena L-NAME uklanja benefitni učinak L-arginina i na 24 i na 48 sati (L-NAME+L-arginin). Dodatna primjena BPC-a 157 dodatno smanjuje lezije ispod razine onih kod kontrolnih životinja (BPC 157+L-NAME + L-arginin).

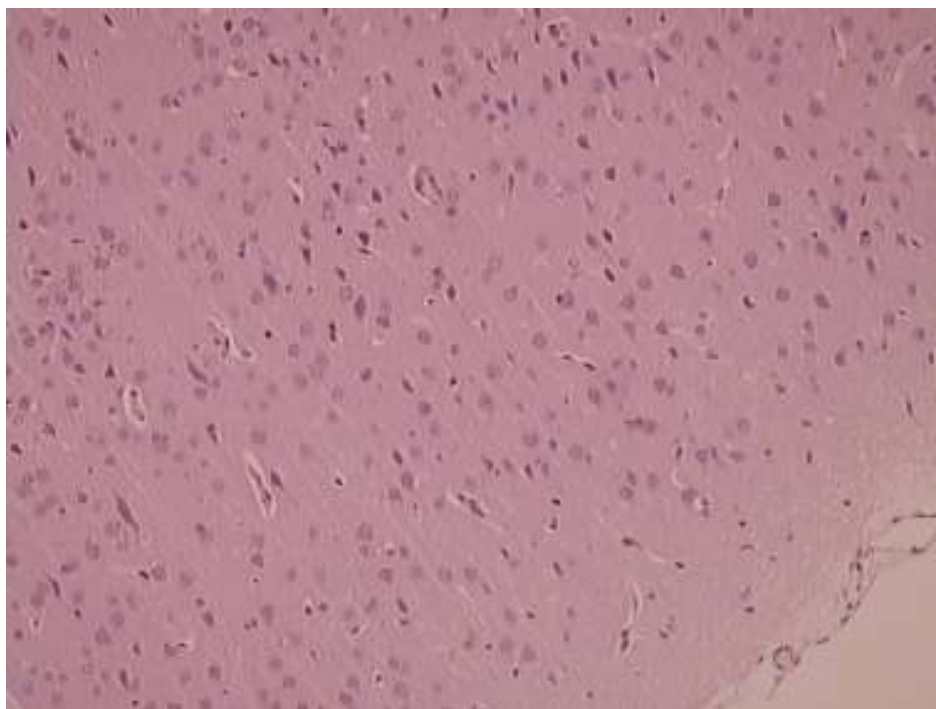
L-NAME ne pokazuje učinak kod samostalne primjene. Na 24 i 48 sati istovremena primjenjena antagonizira benefitni učinak L-arginina i dovodi lezije do razine onih kod kontrolnih životinja (L-NAME+L-arginin). Učinak BPC-a 157 bio je rezistentan na istovremenu primjenu L-NAME, i nakon 24 i nakon 48 sati (BPC 157+L-NAME).

Tablica 14. Moždane lezije, moždani skor 0-4 (min/med/max), skor edema mozga 0-3 (min/med/max), kod životinja 24 i 48 sati nakon apliciranja celekoksiba (1g/kg i.p.). BPC 157 (10 µg/kg, 10 ng/kg), L-NAME (5 mg/kg), L-arginin (100 mg/kg) su bili aplicirani zasebno i/ili u kombinaciji dok su kontrolne životinje primile jednaki volumen 0,9% otopine NaCl (5 ml/kg i.p.). *P<0.05, najmanje u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

Mozak Skupina	Purkinjeove stanice (crveni neuroni)	Cerebralni korteks (crveni neuroni)	Edem mozga
Kontrola 24h	2/2/2	2/2/2	0/0/0
Kontrola 48h	2/2/3	2/2/3	0/0/0
BPC 157 µg 24h	0/0/0*	0/1/1*	0/0/0
BPC 157 µg 48h	0/1/1*	0/1/1*	0/0/0
BPC 157 ng 24h	0/1/1*	0/1/1*	0/0/0
BPC 157 ng 48h	0/1/1*	1/1/1*	0/0/0
L-NAME 24h	2/2/3	2/2/3	0/0/0
L-NAME 48h	2/3/3	2/3/3	0/0/0
L-NAME + BPC 157 24h	1/1/1*	1/1/2*	0/0/0
L-NAME + BPC 157 48h	1/1/2*	1/1/2*	0/0/0
L-arginin 24h	1/2/2	1/2/2	
L-arginin 48h	1/2/2*	1/2/2*	0/0/0
L-arginin + BPC 157 24h	0/1/1*	0/1/1*	0/0/0
L-arginin + BPC 157 48h	1/1/2*	0/1/1*	0/0/0
L-arginin + L-NAME 24h	2/2/2	2/2/2	0/0/0
L-arginin + L-NAME 48h	2/2/2	2/2/2	0/0/0
L-arginin + L-NAME + BPC 157 24h	1/1/2*	1/1/1*	0/0/0
L-arginin + L- NAME + BPC 157 48h	1/1/2*	1/1/1*	0/0/0
Moždani skor 0-4, balonizirani ili crveni neuroni (1: < 5% crveni neuroni, 2: 5-30% crveni neuroni, 3: 30-50% crveni neuroni, 4: > 50% crveni neuroni Skor edema mozga 0-3, edem (0: nema edema, 1: slab difuzni i/ili perifokalni, 2: umjeren, 3: jak i generaliziran)			



Slika 11. Cerebralni korteks 48 sati nakon tretmana celekoksibom (1 g/kg i.p.) kod kontrolnih životinja (HE x20).



Slika 12. Cerebralni korteks 48 sati nakon tretmana celekoksibom (1 g/kg i.p.) kod životinja tretiranih BPC-om 157 (HE x20).

6. RASPRAVA

Uz terapiju s BPC-om 157 (poznatom po inhibiciji gastrointestinalne, jetrene i moždane toksičnosti izazvane neselektivnim NSAIDs-ima) (42) i L-argininom (koji čak osnažuje učinke indometacina) (85), a dok oba inhibiraju učinke L-NAME, utvrdili smo oštećenja želuca, jetre i mozga izazvane celekoksibom. Također, uzimajući u obzir različita, čak i suprotna stajališta iznesena u radovima sa celekoksibom (73-84) i agensima NO sustava (55), pokušali smo razložiti punu kompleksnost tih lezija nakon primjene velike doze celekoksiba; pogoršanje (koje oponaša pokušaj ublažavanja boli (tj. COX-2 inhibiciju selektivnim NSAID-om) i NOS-blokatora (L-NAME) ili NOS-supstrata, zajedno sa mogućim terapijskim uspjehom te mehanizme iza svih tih fenomena.

U suštini, ovdje se opisani sindrom u celekoksibom tretiranih štakora (brzonastupajuća oštećenja probavnog trakta, jetre i mozga u štakora) preklapa se sa ishodima prethodnih istraživanja neselektivnih NSAIDs-a (30,41-43) i s obzirom na administraciju pentadekapeptida BPC 157, proširuje i generalizira već utvrđeni akutni i dugotrajni terapijski učinak (30,41-43). Posebno s obzirom na suprostavljanju toksičnosti izazvanoj NSAIDs-ima (42) utvrđen je koristan učinak BPC-a 157 na sindrom izazvan predoziranjem celekoksibom te je sada definiran i neselektivnim COX-1 i COX 2 blokatorima, diklofenakom i ibuprofenom (30,43), selektivnim COX-2 blokatorom, celekoksibom i selektivnim COX-3-blokatorom, paracetamolom (41).

Opaženo je veće pogoršanje u duljem vremenskom intervalu (48 sati) kada je i to kada je celekoksib administriran samostalno ili zajedno sa L-NAME. To pogoršanje je bilo zaustavljeno istovremnom primjenom stabilnog pentadekapeptida BPC-a 157 i nešto manje uz istovremnu primjenu L-arginina, što vjerojatno otkriva usporedne osobine između inhibicije COX-2 i NOS-a (85) i ulogu NO-sustava u oštećenjima

gastrointestinalnog trakta (55) i jetre, hepatičkoj encefalopatiji (55) i sindromu izazvanog celekoksibom.

L-arginin je samostalno uglavnom manje aktivan, no dosljedno je aktivniji kada se daje zajedno s L-NAME-om (dakle, protiv L-NAME) što predstavlja traženi dokaz o uključenosti NO-sustava (55,59) (to do sada nije bilo ispitivano). Razmatrajući stabilni pentadekapeptid BPC 157, posebice u odnosu prema NO sustavu (17,39,50,55,62-66) kao i prethodne radove BPC-a 157 sa NSAIDs-ima (14,30,41-44), nailazimo na materijalizaciju istoga u mnogim modelima i u različitim vrstama. Dakle, možemo raspravljati o korisnom učinku BPC 157, njegovoj ulozi kod u međudodnosu istovremene inhibicije COX-2 i NOS-a, kroz čitavo trajanje eksperimenta. S obzirom na redoviti porast pogoršanja u razdoblju od 48 sati u odnosu na 24 sata, korisni učinak bio je stalno prisutan u svim povećavajućim negativnim okolnostima pri aplikacijama celekosiba i L-NAME, kao i u svim skupinama tretiranih BPC-om 157. Kao i u slučaju skromnijeg smanjenja lezija pri aplikaciji NOS-supstrata L-arginina, a time i uz korisnu ulogu NO sustava kroz L-arginin, dosljedno pojavljivanje terapijskog poboljšanja nakon primjene BPC-a 157 znači da se na isti način unaprijeđuje i validira korisni učinak i značaj NO-a, kod akutnim, a protekom vremena sve većih ozljeda izazvanih aplikacijom celekoksiba i L-NAME.

Osnovno, nakon aplikacije celekoksiba, primijetili smo vulnerabilnost središnjeg živčanog sustava, teške cerebralne i hipokampalne lezije (sličnim onima viđenim u štakora tretiranih diklofenakom, ibuprofenom i paracetamolom) (30,41,43). Očito intenziviranje lezije bilo je u štakora koji su dodatno primali L-NAME. Dosljedno s progresijom tih središnjih poremećaja, periferno, u probavnom sustavu i jetri, makroskopska i mikroskopska prezentacija (nekroze) bila je pogoršana u štakora koji su primali istovremeno L-NAME i celekoksib. Isto tako, smanjenje perifernih lezija je

bilo praćeno smanjenjem središnjih lezija u štakora tretiranih BPC-om 157 (više) i L-argininom (manje).

Dakle, u tijeku događaja nakon aplikacije celekosiba, predlažemo periferni i središnji učinak, istodobno manipuliran u oba smjera modulacijom aktivnosti NO-sustava-pogoršanje (L-NAME) u odnosu na osobito poboljšanje (BPC 157, L-arginin). Vjerojatno je da, s obzirom na usporednost između inhibicije COX-2 i NOS-inhibicije (85), u štakora tretiranih celekoksibom, celekoksib uzrokuje povećanu inhibiciju COX-2 i NOS-a (85), što dovodi do sloma NOS-sustava (85) i nepoželjnih posljedica koje se pojavljuju zajedno i možda kao doprinositelji porasta lezija u štakora koji su primali istovremeno L-NAME i celekoksib.

To bi moglo objasniti određen i ograničeniji odgovor L-arginina te jači i širi učinak BPC –a 157. Primjerice, dobiveni dokazi na želučanoj sluznici nakon 24 sata (štakori koji su istovremno primali celekoksib, L-NAME i L-arginin jednako prezentiraju sve lezije kao i oni koji su primali samo celekoksib) znače da L-arginin više inhibira pogoršanje izazvano L-NAME-om, dok je uglavnom manje aktivan protiv celekoksiba. Suprotno, BPC 157 je konzistentno jednako učinkovit u svim okolnostima, kod celekoksiba kao i kod istovremne primjene celekoksiba i L-NAME. Svi celekoksibom tretirani štakori pokazuju znatno niže vrijednosti lezija ako su primili i BPC 157. Međutim, u skladu s prethodnim učincima, učinak BPC-a 157 nije bio potenciran istovremnom primjenom L-arginina. To objašnjava raniji dokaz da se BPC 157 može suprotstaviti toksičnosti različitih NSAIDs-a (42) i neutralizirati učinke L-NAME uspješnije od L-arginina (55) i otvara mogućnost da BPC 157 i L-arginin služe za dva odvojena puta NO-sustava (42,55).

Nadalje, manje gastrointestinalne lezije (shvaćene kao rješenje neuspjeha u cijeljenju rana i popratno oštećenje probavnog sustava), a zatim manje lezije jetre i mozga,

jetre i mozga, također bi mogle biti liječene BPC-om 157. S obzirom na cijeljenje mukoze BPC-om 157, činjenica je da BPC 157 konzistentno unaprijeđuje cijeljenje, ne samo u cijeljenju crijeva nakon anastomoze u modelu kratkog crijeva (3,4,37), već i nakon različitih teških ozljeda u različitim tkivima koje inače spontano ne cijele (1,51-53). BPC 157 stimulira i Egr-1 gen i njegov korepresor nab2 (57), te su BPC 157 i NAB2 moguće dio mehanizma povratne sprege koji služi za regulaciju Egr-1 posredovanu transkripciju gena, stvaranje citokina i faktora rasta te formiranje ranog izvanstaničnog matriksa (kolagen) i krvnih žila (57). Osim lezija izazvanih neselektivnim NSAIDs-ima (42) kao i lezija izazvanih celekoksibom, istovremenim davanjem celekoksiba i L-NAME, BPC 157 bi mogao prevenirati i smanjiti razna gastrointestinalna, jetrena i moždana oštećenja, što je nedavno objavljeno (42).

Konačno, s obzirom na prezentaciju BPC 157 štakora tretiranih celekoksibom za razliku od kontrolnih životinja i s obzirom na njegov učinak na NSAIDs-e i Robert-ovu citoprotekciju (2) koja nužno zahtjeva blokadu COX-1 i COX-2 (2), mi možemo istaknuti značenje BPC-a 157 za citoprotekciju i značenje COX i NOS inhibicije za citoprotekciju u želucu (42,55).

Sada, uz činjenicu da što su manje gastrointestinalne lezije, manje toksina može prodrijeti u jetru i mozak (42,55), ovaj citoprotektivni učinak bi trebao biti proširen sa želuca na jetrene i moždane lezije, shvaćene zajedno kako bi se naglasila blokada COX-a i NOS-a (a osobito COX-2 celekoksibom sa ili bez L-NAME-om) i suprotstavljajući učinak BPC-a 157 za cijeli sindrom oštećenja probavnog trakta, jetre i mozga. Osim suprotstavljanju sindromu oštećenja probavnog trakta, jetre i mozga s NSAIDs-ima (42) i blokadi NOS-a (55), postoje dokazi da BPC 157 također antagonizira posebice sva oštećenja želuca, jetre i mozga, uključujući i napade izazvane predoziranjem inzulinom (29).

7. ZAKLJUČAK

Zaključno, BPC 157 može pružiti specifični terapijski učinak ublažavanja lezija želuca, jetre i mozga izazvanih selektivnim i neselektivnim NSAIDs-ima te razmotriti svrsishodnost i rizike aplikacije NSAIDs-a nakon operacije, posebice imajući u vidu sudjelovanje NO-sustava.

8. Popis literature

1. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, et al. BPC 157 and standard angiogenic growth factors. Gastrointestinal tract healing, lessons from tendon, ligament, muscle and bone healing. *J Physiol Pharmacol* 2015; (in press).
2. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, 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.
3. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 2011;17(16):1612-32.
4. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Focus on ulcerative colitis: stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Med Chem* 2012;19(1):126-32.
5. Keremi B, Lohinai Z, Komora P, Duhaj S, Borsi K, Jobbagy-Ovari G, et al. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:115-22.
6. Sikiric P, Jadrijevic S, Seiwerth S, Sosa T, Deskovic S, Perovic D, et al. Long-lasting cytoprotection after pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, sucralfate or cholestyramine application in reflux oesophagitis in rats. *J Physiol Paris* 1999;93:467-77.
7. Petrovic I, Dobric I, Drvis P, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, et al. An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat

and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157. J Pharmacol Sci 2006;102:269-77.

8. Dobric I, Drvis P, Petrovic I, Shejbal D, Brcic L, Blagaic AB, 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;104:7-18.
9. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, 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 H₂ receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. Life Sci 1994;54:PL63-8.
10. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. Salutory and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. Dig Dis Sci 1996;41:1518-26.
11. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, et al. Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity. Dig Dis Sci 1996;41:1604-14.
12. Sikirić P, Mazul B, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Pentadecapeptide BPC 157 interactions with adrenergic and dopaminergic systems in mucosal protection in stress. Dig Dis Sci 1997;42:661-71.
13. Sikirić P, Mikus D, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, 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.

14. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, 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;91:113-22.
15. 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.
16. 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.
17. Sikirić P, Seiwerth S, Grabarević Z, Rucman R, Petek M, Jagić V, 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;332:23-33.
18. Sikirić P, Seiwerth S, Desković S, Grabarević Z, Marović A, Rucman R, et al. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *Eur J Pharmacol* 1999;364:23-31.
19. Sikirić P, Marović A, Matoz W, Anić T, Buljat G, Mikus D, 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;93:505-12.
20. Jelovac N, Sikiric P, Rucman R, Petek M, Marovic A, Perovic D, et al. Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 1999;379:19-31.
21. Sikiric P, Separovic J, Buljat G, Anic T, Stancic-Rokotov D, Mikus D, 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;94:105-10.
22. Bilic I, Zoricic I, Anic T, Separovic J, Stancic-Rokotov D, Mikus D, 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;68:1905-12.
23. Stancic-Rokotov D, Sikiric P, Seiwerth S, Slobodnjak Z, Aralica J, Aralica G et al. Ethanol gastric lesion aggravated by lung injury in rat. Therapy effect of antiulcer agents. *J Physiol Paris* 2001;95:289-93.
24. Prkacin I, Aralica G, Perovic D, Separovic J, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats. *J Physiol Paris* 2001;95:295-301.
25. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001;27:817-27.

26. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, et al. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. *Burns* 2003;29:323-34.
27. Xue XC, Wu YJ, Gao MT, Li WG, Zhao N, Wang ZL, et al. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:1032-6.
28. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, Brcic L, Blagaic Boban A, Batelja L, et al. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig Dis Sci* 2009;54:46-56.
29. Ilic S, Brcic I, Mester M, Filipovic M, Sever M, Klicek R, 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;60 Suppl 7:107-14.
30. Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L, et al. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci* 2011;88(11-12):535-42.
31. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Balen I, Aralica G, Gjurasin M, et al. Cysteamine-colon and cysteamine-duodenum lesions in rats. Attenuation by gastric pentadecapeptide BPC 157, cimetidine, ranitidine, atropine, omeprazole, sulphasalazine and methylprednisolone. *J Physiol Paris* 2001;95:261-70.

32. Bedekovic V, Mise S, Anic T, Staresinic M, Gjurasin M, Kopljar M, et al. Different effect of antiulcer agents on rat cysteamine-induced duodenal ulcer after sialoadenectomy, but not gastrectomy. *Eur J Pharmacol* 2003;477:73-80.
33. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:417-22.
34. Sikiric P, Seiwert S, Aralica G, Perovic D, Staresinic M, Anic T, et al. Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat. *J Physiol Paris* 2001;95:283-8.
35. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today* 2007;37:768-77.
36. Klicek R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, et al. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci* 2008;108:7-17.
37. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, et al. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci* 2009;54:2070-83.
38. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Rotkvic I, 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 CCl₄ administration. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci* 1993;53:PL291-6.
39. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, et al. The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris* 1997;91:139-49.
40. Prkacin I, Separovic J, Aralicia G, Perovic D, Gjurasin M, Lovric-Bencic M, et al. Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *J Physiol Paris* 2001;95:315-24.
41. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Coric M, Brcic L, 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;61:241-50.
42. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Stancic Rokotov D, Brcic L, et al. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr Pharm Des* 2012;19:76-83.
43. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Brcic L, Radic B, et al. Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;667(1-3):322-9.
44. Stupnisek M, Franjic S, Drmic D, Hrelec M, Kolenc D, Radic B, Bojic D, Vcev A, Seiwerth S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin. *Thromb Res* 2011;129:652-9.

45. Tudor M, Jandric I, Marovic A, Gjurasin M, Perovic D, Radic B, et al. Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul Pept* 2010;160(1-3):26-32.
46. Boban Blagaic A, Turcic P, Blagaic V, Dubovecak M, Jelovac N, Zemba M, Radic B, Becejac T, Stancic Rokotov D, Sikiric P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 counteracts morphine-induced analgesia in mice. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:177-81.
47. Boban Blagaic A, Blagaic V, Mirt M, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, Petek M, Turkovic B, Anic T, Dubovecak M, Staresinic M, Seiwert S, Sikiric P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *Eur J Pharmacol* 2005;512(2-3):173-9.
48. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko I, Seiwert S, Sikiric P. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol* 2009;7:161-5.
49. Seiwert S, Brcic L, Vuletic LB, Kolenc D, Aralica G, Misic M, et al. BPC 157 and blood vessels. *Curr Pharm Des* 2014;20(7):1121-1125.
50. Cesarec V, Becejac T, Misic M, Djakovic Z, Olujic D, Drmic D, Brcic L, Rokotov DS, Seiwert S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. *Eur J Pharmacol* 2013;701:203-12.
51. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S, Kokic N, Batelja L, Brcic L, Boban-Blagaic A, Zoric Z, Ivanovic D, Ajduk M, Sebecic B, Patrlj L, Sosa T, Buljat G, Anic T, Seiwert S, Sikiric P. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006;24(5):1109-17.

52. Krivic A, Anic T, Seiwerth S, Huljev D, Sikiric P. Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J Orthop Res* 2006;24(5):982-9.
53. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L, Radic B, Vukoja I, Seiwerth S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res* 2010;28(9):1155-61.
54. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, Kolenc D, Radic B, Seiwerth S, Sikiric P. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept*;160(1-3):33-41.
55. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157-NO-system relation. *Curr Pharm Des* 2014;20(7):1126-1135.
56. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999;92:164-9.
57. Tkalcevic VI, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situm K, et al. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol* 2007;570:212-21.
58. Silverman ES, Khachigian LM, Santiago FS, Williams AJ, Lindner V, Collins T. Vascular smooth muscle cells express the transcriptional corepressor NAB2 in response to injury. *Am J Pathol* 1999;155:1311-7.
59. 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.

60. Turkovic B, Sikiric P, Seiwert S, Mise S, Anic T, Petek M, et al. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 studied for inflammatory bowel disease (PLD-116, PL14736, Pliva) induces nitric oxide synthesis. *Gastroenterology* 2004;126:287.
61. Blagaic AB, Blagaic V, Romic Z, Sikiric P. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur J Pharmacol* 2004;499:285-90.
62. Boban-Blagaic A, Blagaic V, Romic Z, Jelovac N, Dodig G, Rucman R, et al. The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med Sci Monit* 2006;12:36-45.
63. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, et al. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009;156:83-9.
64. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwert S, Rogic D, Kusec V, 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; 95:19-26.
65. Balenovic D, Barisic I, Prkacin I, Horvat I, Udovicic M, Uzun S, et al. Mortal furosemide-hypokalemia-disturbances in rats NO-system related. Shorten survival by L-NAME. Therapy benefit with BPC 157 more than with L-arginine. *J Clin Exp Cardiol* 2012;3:201.

66. Barisic I, Balenovic D, Klicek R, Radic B, Nikitovic B, Drmic D, et al. Mortal hyperkalemia disturbance in rats is NO-system related. The life saving effect of pentadecapeptide BPC 157. *Regul Pept* 2013;181C:50-66.
67. Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Ptak-Belowska A, Kwiecien S, Pawlik M, et al. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 2:89-102.
68. Yamada T. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by prostanoids. *Yakugaku Zasshi* 2009;129(10):1211-4.
69. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int* 2007;71(4):290-7.
70. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005;57(2):217-52.
71. Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Botting RM, Vane JR. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* 1995;114(7):1335-42.
72. Chen L, Salafranca MN, Mehta JL. Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. *Am J Physiol* 1997;273(4 Pt 2):H1854-9.
73. Zwolinska-Wcislo M, Krzysiek-Maczka G, Ptak-Belowska A, Karczewska E, Pajdo R, Sliwowski Z, et al. Antibiotic treatment with ampicillin accelerates the healing of colonic damage impaired by aspirin and coxib in the

- experimental colitis. Importance of intestinal bacteria, colonic microcirculation and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol* 2011;62(3):357-68.
74. Houmani Z, Imbert A, Duchmann JC, Messerschmitt C, Barbare JC, Latrive JP, et al. Acute colitis closely following the beginning of celecoxib treatment. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:1294-5.
75. Coppelli G, Guaita E, Spaggiari S, Coruzzi G. Gastric effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, in the rat. *Dig Liver Dis* 2004;36:265-70.
76. Arellanes-Robledo J, Márquez-Rosado L, Pérez-Carreón JI, Fattel-Fazenda S, Aguirre-García J, Villa-Treviño S. Celecoxib induces regression of putative preneoplastic lesions in rat liver. *Anticancer Res* 2006;26(2A):1271-80.
77. Park K, Yang JH, Choi Y, Lee C, Kim SY, Byun Y. Chemoprevention of 4-NQO-induced oral carcinogenesis by co-administration of all-trans retinoic acid loaded microspheres and celecoxib. *J Control Release* 2005;104(1):167-79.
78. Galant LW, de Mattos AA, Menti E, Valiatti FB, de Mattos AZ, Porawski M, et al. The effect of celecoxib on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumors in rats. *Ann Hepatol* 2013;12:425-33.
79. Gupta A, Dhir A, Kumar A, Kulkarni SK. Protective effect of cyclooxygenase (COX)-inhibitors against drug-induced catatonia and MPTP-induced striatal lesions in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94:219-26.
80. Zandieh A, Maleki F, Hajimirzabeigi A, Zandieh B, Khalilzadeh O, Dehpour AR. Anticonvulsant effect of celecoxib on pentylenetetrazole-induced

convulsion: Modulation by NO pathway. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2010;70(4):390-7.

81. Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, Moon C. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res* 1999;843:118-29.
82. Sibilia V, Pagani F, Rindi G, Lattuada N, Rapetti D, De Luca V, et al. Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk. *Br J Pharmacol* 2008;154:688-97.
83. Abd El-Aal SA, El-Sawalhi MM, Seif-El-Nasr M, Kenawy SA. Effect of celecoxib and L-NAME on global ischemia- reperfusion injury in the rat hippocampus. *Drug Chem Toxicol* 2013;36(4):385-95.
84. Junqueira-Júnior J, Junqueira AF, Medeiros JV, Barbosa SH, Nogueira AC, Mota JM, et al. Role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons and non-protein sulphydryl groups on gastroprotective effect of amifostine against ethanol-induced gastric damage in rats. *Dig Dis Sci* 2011;56(2):314-22.
85. Whittle BJ, László F, Evans SM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. *Br J Pharmacol* 1995;116(4):2286-90.

9. Sažetak

Pomoću terapije BPC-om 157 (poznatom po inhibiciji gastrointestinalne, jetrene i moždane toksičnosti izazvane neselektivnim NSAIDs-ima) i L-argininom, pokušali smo razlučiti punu kompleksnost lezija (želučanih, jetrenih, moždanih) nakon administracije visoke doze celekoksiba; pogoršanje (koje oponaša pokušaj za oslobađanje od boli (npr. selektivni NSAID kao inhibitor enzima COX-2) i blokada enzima NOS-a (L-NAME)) zajedno sa mogućom terapijom iza svih ovih fenomena. U štakora soja Wistar, celekoksib (1g/kg tj.t. i.p.) je inducirao teške želučane lezije sa porastom oštećenja protokom vremena sa 24 na 48 sati, uz održanu razinu oštećenja jetre i mozga. Sva ta oštećenja su bila dodatno povećana uz primjenu L-NAME (5 mg/kg TT i.p. odmah nakon celekoksiba). Kao potrební dokaz specifičnog upliva (L-arginin, L-NAME+L-arginin), L-arginin (100 mg/kg tj.t. i.p. odmah nakon celekoksiba) je pokazao ograničeni korisni učinak (t.j. samo nakon 48 sati) dok je istovremeno zajedničko davanje L-arginina i L-NAME smanjuje pogoršanje izazvano L-NAME-om do lezija sličnih onima koje vidimo kod kontrolnih životinja tretiranih celekoksibom i nakon 24 i nakon 48 sati. Dakle, L-arginin je bio konzistentno više aktivan kad je dan zajedno sa L-NAME-om (stoga, više protiv L-NAME, manje protiv celekoksiba, manje protiv inhibicije enzima COX-2, inhibicija COX-2 enzima ostaje većinom sačuvana). Suprotno tome, BPC 157 dan samostalno (10 µg, 10 ng/kg tj.t. i.p. odmah nakon celekoksiba) umanjuje lezije izazvane celekoksibom i nakon 24 i nakon 48 sati. Poput toga, isti korisni učinak je bio konzistentno vidljiv kod svih inače povećanih negativnih okolnosti pri aplikaciji celekoksiba i L-NAME, kao i u svim grupama koje su primale BPC 157 (L-arginin+BPC 157; L-NAME+BPC 157; L-NAME+L-arginin+BPC 157). Stoga ovi nalazi pokazuju da se BPC 157 može jednako suprotstaviti inhibiciji enzima COX-2 (suprotstavljanje štetnom učinku celekoksiba u svim lezijama) kao i

dodatnoj blokadi enzima NOS (suprotstavljanje zajedničkom štetnom učinku celekoksiba i L-NAME).

Ključne riječi: BPC 157, prekomjerna doza celekoksiba, L-NAME, L-arginin, štakori

10. Abstract

Protective effect of pentadecapeptide BPC 157 on healing of gastric, duodenal, liver and brain lesions induced by high dose of celecoxib in rats

Ivan Domagoj Drmić (2015.)

With therapy with BPC 157 (known to inhibit nonselective NSAIDs- gastrointestinal, liver and brain-toxicity) and L-arginine, we attempted to discriminate the full complexity of lesions (stomach, liver, brain) after high dose celecoxib administration; the aggravation (that mimics attempt to relieve pain (i.e., selective NSAID as COX-2 inhibition) and NOS-blockade (L-NAME)) along with a possible therapy success and the mechanism(s) behind all of these phenomena. In Wistar rats celecoxib (1g/kg bw ip) induced severe gastric lesions with gradual increase from 24h to 48h after administration, and sustained level of liver and brain lesions. All these lesions were aggravated by L-NAME (5 mg/kg bw ip immediately after celecoxib). As the needed proof of NO-system specific involvement, (L-arginine; L-NAME+L-arginine), L-arginine (100 mg/kg bw ip immediately after celecoxib) exhibited a limited beneficial effect (i.e., only after 48h) while L-NAME+L-arginine protocol turned down L-NAME-aggravation to the control-celecoxib presentation at both 24h and 48h period. Thus, L-arginine was consistently more active given together with L-NAME (thus, more against L-NAME, less against celecoxib, less against COX-2 inhibition, COX-2-inhibition remains mostly preserved). Contrary, given alone BPC 157 (10 µg, 10 ng/kg bw ip immediately after celecoxib) completely turned down lesions induced by celecoxib, both at 24h and 48h. Likewise, the same beneficial effect was consistently evident in all increasingly negative circumstances of celecoxib and L-NAME

application and in all BPC 157-groups (L-arginine+BPC 157; L-NAME+BPC 157; L-NAME+L-arginine+BPC 157). Thereby, these findings evidenced that BPC 157 may equally counteract both COX-2 inhibition (celecoxib-noxious effect on all lesions counteracted) and additional NOS-blockade (celecoxib+L-NAME-noxious effect also equally counteracted).

Key words: BPC 157, celecoxib overdose, L-NAME, L-arginine, rats

11. BIOGRAFIJA

Rođenje: 11.7.1979., Zagreb, Hrvatska

Radno mjesto: 2009 do danas- Zavod za farmakologiju, Medicinski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Akademski curriculum: 2009 do danas- znanstveni novak-asistent na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje: 2007. doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

od 2007. do danas- doktorand na doktorskom studiju neuroznanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Istraživački projekti: od 2009 do danas- a znanstveni novak-asistent na projektu "Pentadekapeptid BPC 157 – daljnja istraživanja" (voditelj: profesor Predrag Sikiric, dr.med, šifra projekta MZOS 108-1083570-3635) financiranom od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske

Odgovornosti/organizacijske vještine: 2013.- član lokalnog organizacijskog odbora za Special IUPHAR GI Section Symposium održanom na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Publikacije: koautor 20 znanstvenih radova u recenziranim časopisima (Pub Med), svi u CC indeksiranim časopisima

Članstva: ASPET