

UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA APIKALNI PARODONTITIS UZROKOVAN EKSPozICIJOM PULPE ZUBA U ŠTAKORA

Juzbašić, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:236:148431>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University in Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Martina Juzbašić

**UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA
APIKALNI PARODONTITIS UZROKOVAN
EKSPOZICIJOM PULPE ZUBA U ŠTAKORA**

Doktorski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Martina Juzbašić

**UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA
APIKALNI PARODONTITIS UZROKOVAN
EKSPozICIJOM PULPE ZUBA U ŠTAKORA**

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 NA APIKALNI PARODONTITIS UZROKOVAN EKSPOZICIJOM PULPE ZUBA U ŠTAKORA

Martina Juzbašić

Doktorski rad izrađen je u: Laboratoriju za farmakologiju, Medicinski fakultet u Zagrebu, Hrvatska i Laboratoriju za mikrobiologiju, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo u Osijeku, Hrvatska

Mentor 1: Prof. dr. sc. Predrag Sikirić

Mentor 2: Doc. dr. sc. Jasminka Talapko

Kratki sažetak doktorskog rada:

Apikalni parodontitis jedno je od najčešćih upalnih stanja zuba i široko je rasprostranjen. Unatoč nerijetkom neuspjehu mehaničkog čišćenja kao zlatnog standarda i dalje ne postoji alternativna terapija koja bi utjecala na smanjenje oštećenja uzrokovanoga otvaranjem pulpe te time sačuvala zub. Pentadekapeptid BPC 157 u raznim dosadašnjim životinjskim eksperimentalnim modelima pokazao je velik potencijal cijeljenja različitih tkiva. Cilj je ovog istraživanja pokazati učinak pentadekapeptida BPC 157 na modelu apikalnog parodontitisa uzrokovanog ekspozicijom pulpe zuba kod štakora.

Tretirane grupe štakora primale su BPC 157 *per os* u dozi od 10ng/kg, odnosno 10µg/kg otopljen u vodi za piće, kontrolna grupa je cijelo vrijeme pokusa pila vodu. Na unaprijed određenim intervalima štakorima su uzeti uzorci sline i brisevi usne šupljine za mikrobiološku analizu te je učinjena hemisekcija maksile s ciljem uzimanja oštećenog zuba i okolnog tkiva za histološku i molekularnu analizu. Cijeli pokus praćen je makroskopski i radiološki. Makroskopsko promatranje pokazalo je da je preostali koronarni dio zubnog tkiva oko trepanacijskog otvora skloniji pucanju u kontrolnoj grupi štakora. Mikrobiološka analiza pokazala je jednak broj kolonija i bakterijskih vrsta kod svih štakora. Područje radiografskog gubitka periapikalne kosti i defekta u furkaciji korijena bilo je znatno manje kod štakora koji su uzimali BPC 157. Histološka analiza pokazala je pojačanu razinu inflamatornog i staničnog uzorka i kod tretiranih i kontrolnih grupa, dok je statistički značajna razlika pronađena u broju krvožilnih prostora kojih je puno više kod tretiranih BPC-om 157. Rezultati RT-qPCR analize gena na razini mRNA, gdje su ispitani uzorci tretiranih grupa štakora BPC-om 157 i uspoređeni s kontrolnom grupom, pokazali su razinu ekspresije mRNA za gene *Egr1* i *Ptgs2* <1, a za gene *Nos2* i *Nos3* >1.

Ovaj pozitivan učinak BPC-a 157 otvara mogućnosti za daljnja istraživanja i novi pristup liječenju apikalnog parodontitisa.

Broj stranica: 106

Broj slika: 25

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 215

Jezik izvornika: hrvatski

Gljučne riječi: apikalni parodontitis; BPC 157; cijeljenje; citoprotekcija; NO sustav

Datum obrane: 11.10.2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Martina Smolić (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. Ivana Brekalo Pršo (član)
3. Prof.dr.sc. Vera Cesar (član)
4. Izv.prof.dr.sc. Antonio Kokot (zamjena člana)
5. Doc.dr.sc. Anita Matić (zamjena člana)

Doktorski rad pohranjen je u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Field: Basic Medical Sciences and Biology

EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 ON APICAL PERIODONTITIS CAUSED BY PULP EXPOSURE IN RATS

Martina Juzbašić

Thesis performed at: Laboratory of Pharmacology, School of Medicine in Zagreb, Croatia and Laboratory of Microbiology, School of Dental Medicine and Health in Osijek, Croatia

Menthor 1: Prof. Predrag Sikirić, PhD
Menthor 2: Assist. Prof. Jasminka Talapko, PhD

Short abstract:

Apical periodontitis is one of the most common inflammatory conditions of the teeth. Despite the frequent failure of mechanical cleaning as the gold standard, there is still no alternative therapy that would reduce the damage caused by the opening of the pulp and preserve the tooth. The pentadecapeptide BPC 157 has shown great healing potential in various animal studies in many experimental models to date. This study aimed to analyze the effect of pentadecapeptide BPC 157 on a model of apical periodontitis.

The treated groups in the therapy received BPC 157 (10ng/kg or 10µg/kg) *per os*, while the control group drank water during the experiment. Saliva samples and swabs of the oral cavity were collected for microbiological analysis. The damaged tooth and the surrounding tissue were analyzed histologically and molecularly, while the whole experiment was monitored macroscopically and radiologically. Macroscopic observation showed that the remaining coronal part of the tooth tissue around the trepanation opening is more prone to cracking in the non-treated group. Microbiological analysis showed the same count of colonies and bacterial species in all rats. The area of radiographic periapical bone loss and furcation defect was significantly smaller in rats that were taken BPC 157. Histological analysis showed increased levels of inflammatory and cellular patterns in both treated and untreated animals, while a statistically significant difference was found in the number of blood vessels, which was significantly greater in the rat groups treated with BPC 157. Results of RT-qPCR analysis of genes at the mRNA level, in which samples from rat groups treated with BPC 157 were examined and compared with the control group, showed that pentadecapeptide BPC 157 had a significant effect on the expression of the genes of interest. The mRNA expression level for the Egr1 and Ptgs2 genes was < 1 and for the Nos2 and Nos3 genes > 1. This positive effect of BPC 157 opens up opportunities for further research and a novel approach to apical periodontitis treatment.

Number of pages: 106

Number of figures: 25

Number of tables: 6

Number of references: 215

Original in: Croatian

Key words: apical periodontitis; BPC 157; healing; cytoprotection; NO system

Date of the thesis defense: 11.10.2023.

Reviewers:

1. Prof. Martina Smolić, PhD (president)
2. Prof. Ivana Brekalo Pršo, PhD (reviewer)
3. Prof. Vera Cesar, PhD (reviewer)
4. Assoc.Prof. Antonio Kokot, PhD (substitute)
5. Assist.Prof. Anita Matić, PhD (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorski rad izrađen je u okviru projekta *“Pentadekapeptid BPC 157 - nastavak istraživanja”* pod vodstvom prof. dr. dc. Predraga Sikirića i IP11-FDMZ-2021 *“Ispitivanje antimikrobne aktivnosti konvencionalnih i nekonvencionalnih oralnih antiseptika te pentadekapeptida BPC 157 na najčešćim oralnim patogenima”*, IP2-FDMZ-2022 *“Antibakterijski učinci pentadekapeptida BPC 157 te odabranih vrsta meda na oralnim patogenima in vitro”* pod vodstvom doc. dr. sc. Jasminke Talapko.

Zahvala

Posebnu zahvalu upućujem svojim mentorima - prof. dr. sc. Predragu Sikiriću i doc. dr. sc. Jasminki Talapko - na savjetima, motivaciji, nesebičnoj pomoći, razumijevanju i vremenu koje su posvetili u svim etapama izrade ovog doktorskog rada.

Hvala svim dijelatnicima i kolegama iz Laboratorija za farmakologiju, a posebno tehničaru Gržibovskom te doktoru Kreziću i doktorici Žižek, na pomoći, savjetima, smjehu i nezaboravnim trenucima u laboratoriju. Veliko hvala na pomoći i profesoricu Škrtić te doktorici Milavić.

Hvala mojoj studijskoj savjetnici, prof. dr. sc. Veri Cesar, koja me savjetovala i vodila tijekom cijelog studija.

Hvala mojim kolegicama i kolegama s Katedre za dentalnu medicinu te profesoru i docentici na podršci i prijateljstvu koji su mi svakako olakšali ovo razdoblje.

Hvala mojim prijateljima i mojoj obitelji na ljubavi, strpljenju, ohrabivanju i vjeri u mene.

Martina

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Pentadekapeptid BPC 157	2
1.1.1. Svojstva, struktura i sinteza	2
1.1.2. Dosadašnja istraživanja i poznati učinci.....	4
1.1.3. NO sustav i BPC 157	6
1.2. Apikalni parodontitis	8
1.2.1. Čimbenici nastanka.....	8
1.2.2. Epidemiologija.....	10
1.2.3. Lokalna terapija.....	11
1.2.4. Sistemska terapija.....	13
1.2.5. Regenerativna endodoncija	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Eksperimentalne životinje	21
3.2. Protokol istraživanja	21
3.3. Mikrobiološka analiza	25
3.4. Analiza ekspresije gena	27
3.5. Histološka analiza	29
3.6. Statistička analiza	30
4. REZULTATI	31
4.1. Makroskopske promjene	32
4.2. Radiološki nalaz	34
4.3. Bakterijske vrste i broj kolonija	36
4.4. Ekspresija gena Egr1, Nos2, Nos3 i Ptgs2	40
4.5. Broj krvožilnih prostora i razina inflamatornog i staničnog uzorka	46
5. RASPRAVA	51
6. ZAKLJUČAK	60
7. LITERATURA	62
8. SAŽETAK	93
9. SUMMARY	96

10. PRILOZI	99
10.1. Popis oznaka i kratica	100
11. ŽIVOTOPIS	102

1. UVOD

1.1. Pentadekapeptid BPC 157

1.1.1. Svojstva, struktura i sinteza

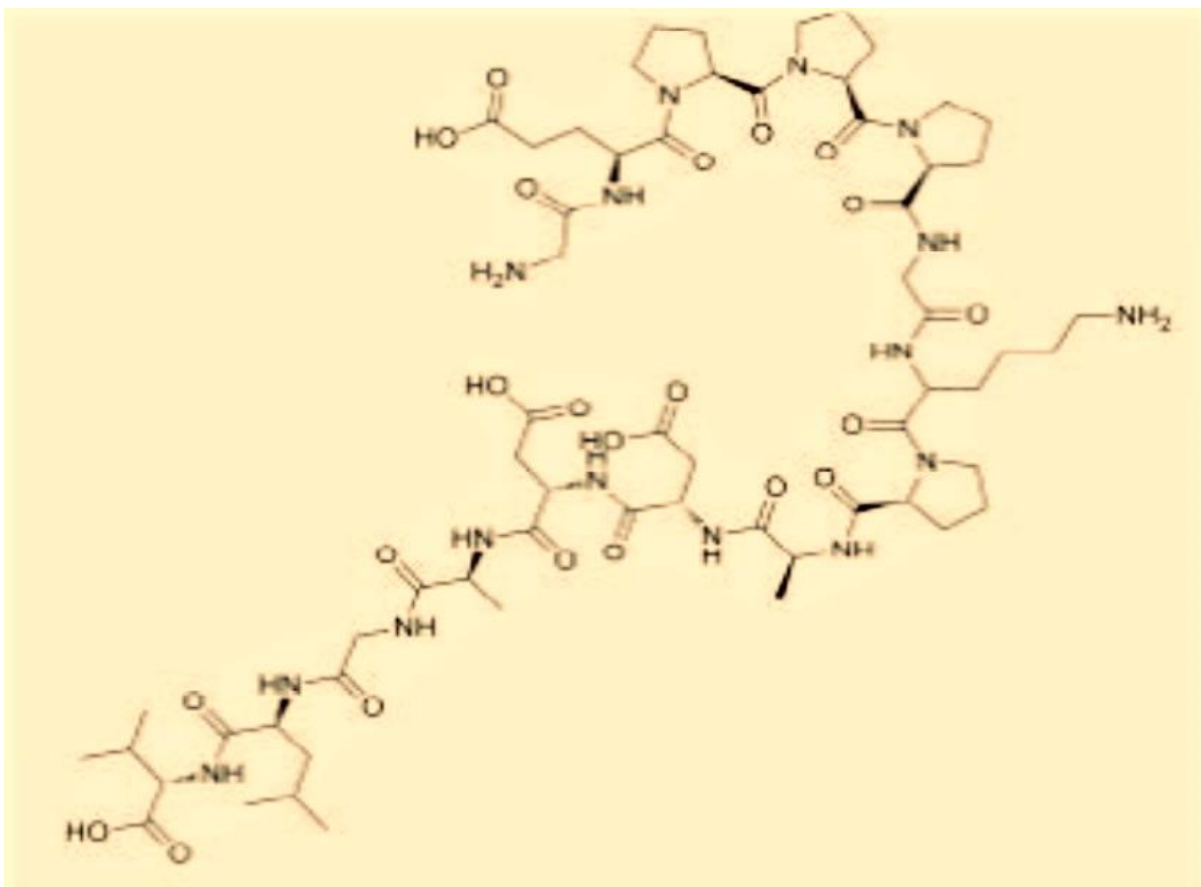
BPC 157 stabilan je pentadekapeptid koji je izoliran iz želučanih sokova i aktivni je fragment želučanog peptida BPC (*engl. Body Protection Compound*) [1]. Sastoji se od sekvence aminokiselina sljedećeg redoslijeda: Gly–Glu–Pro–Pro–Pro–Gly–Lys–Pro–Ala–Asp–Asp–Ala–Gly–Leu–Val. Kako nema homologije ove sekvence s poznatim gastrointestinalnim peptidima, smatra se da je BPC 157 bitan za aktivnost cijelog peptida [1–5]. Molekularna mu je formula C₆₂H₉₈N₁₆O₂₂, a molekularna masa (*engl. molecular weight, M.W.*) iznosi 1419.53552 Daltona. Poznat je još i pod sinonimima BPC 15, BPC-15, BPC-157 te nazivima PL-10, PLD-116, PL 14736. Danas se sintetizira prema patentu Sikirić i sur., EP0 572688 u slovenskoj tvrtci Diagen iz Ljubljane [6,7].

Dokazana je učinkovitost bilo da se primjenjuje lokalno na mjestu ozlijede npr. u kremama, kapima, kupkama, itd., ili sustavno u injekcijama intraperitonealno, intragastrično te peroralno otopljen u vodi za piće. Pri neutralnom pH od 7.0 dobro je topljiv u fiziološkoj otopini i vodi, a mogućnost aplikacije intragastrično i *per os* dostupna je zbog stabilnosti u želučanom soku. Naime, dokazano je kako se ne razgrađuje ni nakon 24 sata inkubacije u želučanom soku. To mu daje veliku prednost u odnosu na druge standardne peptide koji su stabilni u vodi, međutim u želučanom soku se vrlo brzo raspadaju [8,9].

Također, velika prednost BPC-a 157 je ta što se primjenjuje samostalno i što mu nije potreban nosač. Dakle, nema dvojbe što točno daje aktivnost tj. izbjegava se metodologija kojom je teško utvrditi pravi aktivni dio u kompleksu peptid + nosač i poseban doprinos pojedinoga dijela u terapiji (peptid, nosač, kompleks peptid + nosač ili nijedan od njih) [8,9].

Za njegovu aktivnost potrebna je niska doza i najčešće se koristi u koncentracijama od 10 µg/kg, 10 ng/kg, 10 pg/kg. Smrtonosna doza (*engl. Lethal dose, LD1*) odnosno smrt kod 1% tretiranih životinja ili stanica nije postignuta usprkos visokim primijenjenim dozama kao što je 100 mg/kg [1,10]. U istraživanjima se koristi kao peptid 99 postotne čistoće, što je potvrđeno visokotlačnom tekućom kromatografijom (*engl. High pressure liquid chromatography, HPLC*) uz 1-des-Gly peptid kao biološki neaktivnu nečistoću. Putem stupnjevite kondenzacije a uz pomoć zaštitne skupine fluoren-9-

ilmetoksikarbonil (*engl. Fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group, Fmoc*) odvija se sama sinteza pentadekapeptida. Postupak započinje valinom kao prvom aminokiselinom koja je vezana uz benzilidrilaminorezin polimerni nosač. Diisopropilkarodimid pri tom služi kao vezujući reagens. Piperidinom se zamijeni jedna Fmoc grupa sa svakim stupnjem kondenzacije, a jedna se aminokiselina nadoveže. Isti postupak primjenjuje se za sljedeće aminokiseline sve dok se sinteza ne završi. Pomoću trifluorooctene i trifluorometansulfonske kiseline i anizola u omjeru 2:17:52 obavlja se razdvajanje [1,5,11–13].



Slika 1. Struktura pentadekapeptida BPC 157, preuzeto i prilagođeno prema Park i sur. [11].

1.1.2. Dosadašnja istraživanja i poznati učinci

S obzirom na podrijetlo prvi fokus u istraživanju pentadekapeptida BPC 157 kao terapije bio je usmjeren na njegovo istaknuto djelovanje na razne gastrointestinalne ozljede izazvane različitim ulcerogenim čimbenicima, sugerirajući da se uočeni korisni učinci očito tiču cijeloga gastrointestinalnog trakta [1–4,12–14]. Pozitivni učinci pokazani su u više modela lezija jednjaka. Kod štakora s ezofagitisom u modelima koji oponašaju uvjete ljudskog pacijenta (tj. privremeno intubirani štakori, kombinacija poremećene funkcije donjeg ezofagealnog sfinktera i/ili sfinktera pilorusa uz dugotrajni ezofagitis s zatajenjem sfinktera; gdje sama disfunkcija piloričnog sfinktera pokazuje produljeni ezofagitis s konstantno sniženim tlakom ne samo u pilorusu, već i u donjem ezofagealnom sfinkteru i zatajenje oba sfinktera), sva oštećenja bila su otporna na standardne agense liječenja ali ublažena terapijom BPC-a 157 tj. došlo je do oporavka sfinktera uz održavanje cjelovitosti sluznice [8,15,16]. Također, poznato je da BPC 157 inhibira razvoj ezofagitisa u štakora s ezofagojejunalnom anastomozom [17].

Blagodatne učinke ima i kod različitih modela gastričnih ozljeda. Pri tome su najvažniji učinci cijeljenje i oporavak želučanih ulkusa koji teško zacjeljuju, kao i perzistentnih kožnih ulkusa, što se vidi na modelu učinka BPC-a 157 kod želučanih i kožnih nedostataka u štakora s gastrokutanim fistulama. Važno je napomenuti da je kod štakora s perzistentnim gastrokutanim fistulama BPC 157 također poništio štetni učinak sustavne primjene kortikosteroida [18]. Cijeljenje je potaknuto i prilikom terapije ezofagokutane [19] i kolokutane fistule [20]. Dokazan je i citoprotektivan učinak na sluznicu želuca oštećenu alkoholom u modelu akutnih i kroničnih lezija [2,8,13,21–23], lezija izazvanih upotrebom protuupalnih nesteroidnih lijekova (*engl. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID*) [8,11,24], haloperidola i reserpina [8,17,25,26], te kapsaicina [8,13,27]. Utječe i na aspirinima produženo krvarenje te trombocitopeniju [28]. U određenim pokusima primijenjena niža doza bila je jednako učinkovita kao i primijenjena viša doza [3].

Učinak je ispitivan i na modelima upalne bolesti crijeva [8,9,29] te u studiji za ulcerozni kolitis [8,30]. Pentadekapeptid BPC 157 (10 µg ili 10 ng/kg tjelesne težine, intraperitonealno, intragastrično ili intrarektalno), primijenjen u bilo kojem obliku, inhibirao je teške cisteaminske lezije debelog crijeva, procijenjeno nakon 30, 60 i 180 minuta, 24, 48 i 72 sata poslije doze cisteamina [9,31]. Na eksperimentalnom modelu ishemijskog kolitisa štakora dokazano je pozitivno djelovanje na

ishemijskoreperfuzijsku ozljedu debelog crijeva [32]. Cijeljenje se javilo i kod modela anastomoze tankog crijeva, debelog crijeva te abdominalne aorte [29,33,34].

Smanjenje oštećenja jetre pokazano je u pokusima gdje su lezije izazvane alkoholom, paracetamolom ili diklofenakom [21,24,35]. Istražena je mogućnost suzbijanja inzulinskih poremećaja i smrtnoga ishoda kod tretiranih životinja, gdje su štakori uglavnom bili bez hipoglikemičnih napadaja s očito višom razinom glukoze u krvnoj slici (glikogen je još bio prisutan u hepatocitima), manje patologije jetre (tj. normalna težina jetre, manje masna jetra), smanjene vrijednosti ALT, AST i amilaze u serumu, izrazito manje oštećenih neurona u mozgu i samo povremenih malih želučanih lezija [8,36]. Povoljno djeluje kod akutnog pankreatitisa, a pozitivan utjecaj BPC 157 na tijek cijeljenja lezije želuca i dvanaesnika primijećen je u štakora s podvezanim žučnim kanalima u oba režima primjene, tj. prije i poslije tretmana [3].

Protektivan učinak, osim na gastrointestinalni sustav, ima i na mozak te središnji živčani sustav što se temelji na činjenici da je pentadekapeptid BPC 157 važan dio moždano-probavne osovine [37,38]. U modelu multiple skleroze uspješno je zaustavio nastanak mišićne disfunkcije i razvitak encefalopatije kod tretirane skupine štakora [29]. Pozitivan učinak kod cijeljenja ozljeda središnjega živčanog sustava (SŽS), bilo djelujući na primarnu ozljedu ili na mogućnost nastanka sekundarne ozljede, pokazan je kod pokusa traumatske lezije mozga i leđne moždine. U oba slučaja došlo je do smanjenja edema, ali i smanjenja hemoragajskih traumatskih laceracija te intenziteta subarahnoidalnog krvarenja u mozgu i smanjenja difuznog aksonalnog oštećenja leđne moždine [39,40]. Učinkovitost je pokazao kod štakora i na modelu moždanog udara utječući na određene molekularne puteve [41]. BPC 157 dokazano sprječava nuspojave, tj. antagonizira djelovanje antipsihotika [25,42].

Na modelu opekline u miševa primjena pentadekapeptida BPC 157 u obliku kreme povoljno djeluje na sve promatrane pokazatelje cijeljenja [43], a pozitivno utječe i na zarastanje lezija rožnice [44].

Povoljno djelovanje pentadekapeptida BPC 157 pokazalo se i na modelu zatajenja srca izazvanog doksorubicinom gdje je došlo do smanjenja oštećenja endotela srca i antagoniziranja aritmije [45].

Dokazano djeluje i kao antidot za lokalne anestetike, posebno za lidokainom izazvane aritmije i konvulzije, infiltrativnu kožnu analgeziju te aksilarni i spinalni intratekalni blok [46].

BPC 157 ubrzava cijeljenje tetiva, ligamenata, mišića te pokazuje značajan osteogeni učinak i poboljšanje cijeljenja segmentnog koštanog defekta [47,48]. Kod fokusa istraživanja na cijeljenje Ahilove tetive zapaženo je sljedeće: tetiva do kosti nije mogla spontano zacijeliti, ali nakon primjene BPC-a 157 primijećeno je znatno poboljšanje [49,50]. Angiogeni potencijal pentadekapeptida BPC 157 pažljivo je ponovno procijenjen [48,51]. Iako nema izravnog angiogenog učinka na stanične kulture, pokazano je da je terapija ovim pentadekapeptidom u ranim razdobljima nakon ozlijede značajno povećala angiogenezu kod štakora s presječenom Ahilovom tetivom, presječenim mišićem kvadricepsom te nakon nagnječenja mišića [48,51]. Tijekom promatranja cijeljenja u modelu nagnječenja mišića potaknuto je pojačano cijeljenje unatoč sistemskoj primjeni kortikosteroida, a BPC 157 se u pokusu primjenjivao lokalno u obliku kreme [52]. Poboljšava cijeljenje medijalnog kolateralnog ligamenta štakora nakon kirurške transekcije, odnosno kod akutne ligamentarne ozlijede [53]. Pokazalo se da pospješuje zacjeljivanje kostiju, pseudoartroze [47] te osteonekroze glave bedrene kosti [54].

Također, u modelu ligaturom induciranog parodontitisa na donjem lijevom molaru tretman BPC-om 157 kroz 12 dana značajno je smanjio histološke promjene i resorpciju alveolarne kosti [55].

1.1.3. NO sustav i BPC 157

Dušikov monoksid, odnosno dušikov(II) oksid (*engl. Nitric oxide, NO*), vrlo je reaktivan, lako difuzibilan plinoviti slobodni radikal s jakim intrinzičnim oksidativnim svojstvima. Sintetiziraju ga tri različita podtipa enzima NO sintetaza (*engl. Nitric Oxide Synthases, NOS*). Svaka izoforma NOS-a ima jedinstveni obrazac ekspresije i funkcionalna svojstva, a razlikuju se sljedeće: neuronska NOS (*engl. Neuronal NOS, nNOS*) ili NOS1, inducibilna NOS (*engl. Inducible NOS, iNOS*) ili NOS2 i endotelna NOS (*engl. Endothelial NOS, eNOS*), tj. NOS3 [56–58]. NOS kataliziraju biosintezu dušikovog (II) oksida u reakciji koja uključuje pretvorba L-arginina u L-citrulin. Enzim funkcionira kao dimer koji se sastoji od dva identična monomera, oni se funkcionalno i strukturno mogu

podijeliti na dvije glavne domene. Prva domena je C-terminalna reduktaza, a druga je N-terminalna oksigenazna. Enzim sadrži vezna mjesta za nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin adenin nukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN) u bliskoj homologiji s citokrom-P-450 reduktazom, dok se potonji veže za željezo protoporfirin IX (hem) i tetrahidrobiopterin (BH₄), kao i supstrat L-arginin [59]. N(gamma)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) je antagonist L-arginina čija je uloga blokiranje Nos-a, tj. onemogućavanje sinteze dušikovog monoksida iz L-arginina.

Neuronska NOS temeljno se eksprimira u specifičnim neuronima mozga. Aktivnost enzima regulirana je s Ca²⁺ i kalmodulinom. nNOS se nalazi u obliku čestica te u topivim oblicima u stanicama, diferencijalna substancična lokalizacija nNOS-a može pridonijeti njenim različitim funkcijama [56,60].

Inducibilna NOS se obično ne izražava u stanicama, već njena ekspresija može biti izazvana bakterijskim lipopolisaharidom, citokinima i drugim agensima. Prvenstveno je identificirana u makrofazima, ali uz postojanje određenih inducirajućih čimbenika može se ekspimirati i drugdje. Jednom izražena iNOS je konstantno aktivna i nije regulirana unutarstaničnim koncentracijama Ca²⁺ [56]. Određene studije sugeriraju da je aktivacija iNOS-a usko povezana s patofiziološkim karakteristikama upalnih bolesti, poput reumatoidnog artritisa i parodontne bolesti [61–63].

Endotelna NOS pretežno se eksprimira u vaskularnim endotelnim stanicama iako je njena ekspresija otkrivena i u drugim specijaliziranim skupinama stanica s važnom cirkulacijskom ulogom. Slično nNOS-u, Ca²⁺-aktivirani kalmodulin važan je za regulacija aktivnosti eNOS-a. Aktivnost eNOS-a znatno raste kada intracelularni Ca²⁺ raste [56,58].

Uloga NO sustava općenito se prepoznaje u fiziologiji i patofiziologiji kardiovaskularnog sustava, tkivima središnjeg i perifernog živčanog sustava, imunologiji i upali, dok najnoviji dokazi ukazuju na ključnu važnost NO-sustava za mitohondrijsko signaliziranje i stanični odgovor na hipoksiju, a otprije je poznata njegova važnost u homeostazi [64–66]. Homeostaza ovisi o međudjelovanju inhibitora sinteza NO-a odnosno L-NAME i supstrata za sintezu NO-a odnosno L-arginina [7,64]. Dualna funkcija ovog sustava vrlo je značajna, tako bi do oštećenja dovela i inhibicija sinteze kao i nekontrolirano visoka razina NO-a [7,64,67]. Ta dvojnost doprinosi

moćnosti posredovanja pentadekapeptida BPC 157 (uz već poznate molekule kao što je faktor rasta vaskularnog endotela (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*), ciklooksigenaza 2/sintaza prostaglandin-endoperoksida 2 (*engl. Cyclooxygenase/Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2, COX2/PTGS2*) te endotelin-1) s NO sustavom u homeostazi [7,68]. U pokusu *in vitro* na želučanoj sluznici iz homogenata tkiva želuca štakora, BPC 157 davan u istoj dozi od 100 µM-a kao i L-arginin, inducirao je istovjetno otpuštanje NO-a [4,7]. BPC 157 štiti endotel te utječe na hipertenziju izazvanu s L-NAME i hipotenziju od L-arginina, a pritom nema utjecaj na normalan krvni tlak [4,7,30], a učinak ima i na razinu endotelina u serumu [69]. Pospješuje zacjeljivanje nakon teških ozljeda u različitim tkivima koja ne bi spontano zacijelila, utječe na ekspresiju gena faktora ranog odgovora na rast (*engl. Early growth response, EGR1*) koji je odgovoran za poticanje nakupljanja faktora rasta i citokina te formaciju kolagena, kao i ekspresiju proteina 2 koji veže NGFI-A/EGR1 (*engl. NGFI-A binding protein 2/EGR1 binding protein 2, NAB2*) [70]. Ta mogućnost regulacije transkripcije gena i utjecaj na mehanizam povratne sprege između njih daje mogućnost potpunog cijeljenja nakon aplikacije BPC-a157 [7,71–73].

1.2. Apikalni parodontitis

1.2.1. Čimbenici nastanka

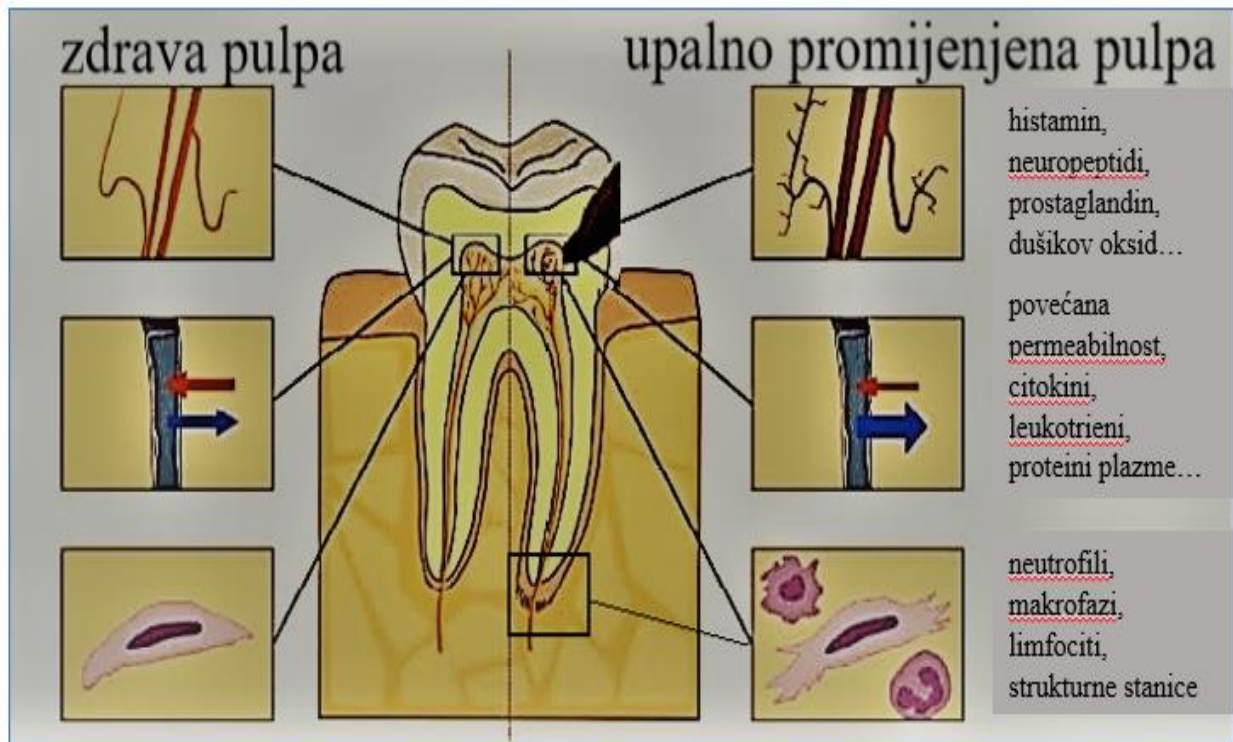
Zubi se sastoje od više jedinstvenih tkiva različite gustoće i tvrdoće što im omogućuje podnošenje značajne sile i trošenje žvakanjem [74]. Pulpa je visoko vaskularizirana i inervirana masa vezivnog tkiva koja se nalazi unutar prostora okruženog caklinom i dentinom u kruni te cementom i dentinom u korijenu zuba, a naziva se pulpna komora. Karakteriziraju ju različiti tipovi stanica, uključujući fibroblaste, odontoblaste, histiocite, makrofage, mastocite i plazma stanice. Također, sadrži izvanstanični matriks sastavljen većinom od kolagenih vlakana [75,76]. U pulpi se nalaze dvije glavne vrste živaca: autonomna i aferentna vlakna. Simpatička autonomna živčana vlakna koja se nalaze u pulpi potječu iz gornjeg cervikalnog ganglija. To su nemijelinizirani neuroni koji inerviraju glatke mišićne stanice arteriola unutar pulpe kako bi regulirale kontraktilne sile koje podržavaju protok krvi. Drugi skup živaca, aferentna osjetna vlakna, potječu iz maksilarnih i mandibularnih grana trigeminalnog živca. Za razliku od autonomnih živaca pulpe ovi aferentni osjetni neuroni većinom su mijelinizirani

(osim svojih slobodnih krajeva) i djeluju u toplinskoj i mehaničkoj nocicepciji. Mijelinizirani dio ovih vlakana ekstenzivno se grana, dok se slobodni živčani završeci protežu stršeći ponekad sve do dentinskih tubulusa [75,76]. Maksilarna arterija, koja je završna grana vanjske karotidne arterije, opskrbljuje krvlju i maksilarne i mandibularne zube jer se maksilarna arterija grana u inferiornu alveolarnu arteriju koja opskrbljuje krvlju mandibularni luk. Svaka pulpna komora sadrži jednu do dvije arteriole i jednu veliku venu koja se grana u razgranatu kapilarnu mrežu na periferiji u pulpi krune. Mreža općenito zauzima područje ispod sloja odontoblasta, ponekad čak i dopire u njega [76,77].

Nakon ozljede pulpe i njenog direktnog izlaganja uvjetima usne šupljine započinje upalna reakcija na preostalom zdravom pulpnom tkivu. Primarni je uzrok duboka karijesna lezija, zatim trauma zuba, mikropukotine na caklini te izloženi dentinski tubulusi, restaurativno propuštanje kao i oštećenja parodontnog porijekla. Upalne reakcije uz povećanu vaskularizaciju i protok krvi kod drugih tkiva ljudskog tijela ne dovode nužno do ozbiljnih posljedica, dok upala u pulpi dovodi do destrukcije i posljedično nekroze tkiva [78–80].

U ustima kao i na svim površinama ljudskog tijela prisutni su brojni mikroorganizmi i dio su normalne flore. Međutim, fiziološki prisutne bakterije u usnoj šupljini mogu prijeći u oportunističke patogene i izazvati bolest ukoliko dobiju pristup inače sterilnom području tijela kao što je zubna pulpa ili periapikalno tkivo [81]. Razvoj endodontske infekcije uključuje invaziju, umnožavanje i patogenu aktivnost mikroorganizama, a koja je povezana s odgovorom i mogućnostima obrane domaćina. S vremenom, pod utjecajem mikroorganizama, toksina i njihovih metaboličkih produkata, kao i ostataka nekrotične pulpe, u kanalima dolazi do promjena i resorpcije kosti oko apeksa zuba [82]. Upalni odgovor uključuje aktivaciju imunoloških stanica (neutrofila, makrofaga, limfocita), strukturnih stanica (fibroblasti, osteoblasti, osteoklasti, Malassezove epitelne stanice) i medijatora upale te u konačnici dovodi do brzog razaranja kosti (Slika 2). O interakciji između osteoblasta, osteoklasta, njihovih prekursora i imunoregulatornih mehanizama ovisi apozicija i resorpcija kosti [83,84]. Periapikalna resorpcija kosti može se smatrati nepoželjnom nuspojavom zaštitnog odgovora domaćina. Postojanost lezije ukazuje da je ravnoteža između resorpcije kosti, koja je posredovana djelovanjem koštanih stanica kao što su osteociti, osteoklasti i osteoblasti, i ozdravljenja još uvijek u korist bolesnog stanja [85,86].

Apikalni parodontitis može se podijeliti na akutni i kronični te primarni i sekundarni. Primarnim apikalnim parodontitisom nazivaju se promjene u periapikalnom dijelu zuba koji ranije nisu bili endodontski liječeni. Sekundarni je onaj koji nastaje nakon tretmana, tj. zbog prijenosa mikroorganizama čišćenjem kanala, perzistirajući ako ostaje unatoč terapiji, te rekurentni ako se ponovno javlja na zubu nakon izlječenja [87,88].



Slika 2. Ilustracija zuba sa strukturama i čimbenicima uključenim u upalni odgovor pulpe, preuzeto i prilagođeno prema Rechenberg i sur. [89].

1.2.2. Epidemiologija

Prema istraživanjima više od polovice odraslih ljudi diljem svijeta ima bar jedan zub s apikalnim parodontitisom. Češće je prisutan sekundarni apikalni parodontitis, tj. učestaliji je kod ranije liječenih zubi s prethodno punjenim korijenskim kanalima [90]. Prevalencija je viša u slabije razvijenim zemljama, a pokazano je da je općenito manji gubitak zuba i stopa bezubosti u visoko razvijenim državama u kojima su prihodi stanovnika veći [90,91]. Veća stopa apikalnog parodontitisa uočena je kod osoba sa sistemskim bolestima kao i štetnim navikama. Istraživanja su pokazala povećanu zastupljenost kod pacijenata s dijabetesom [92–94] i kardiovaskularnim bolestima [95–

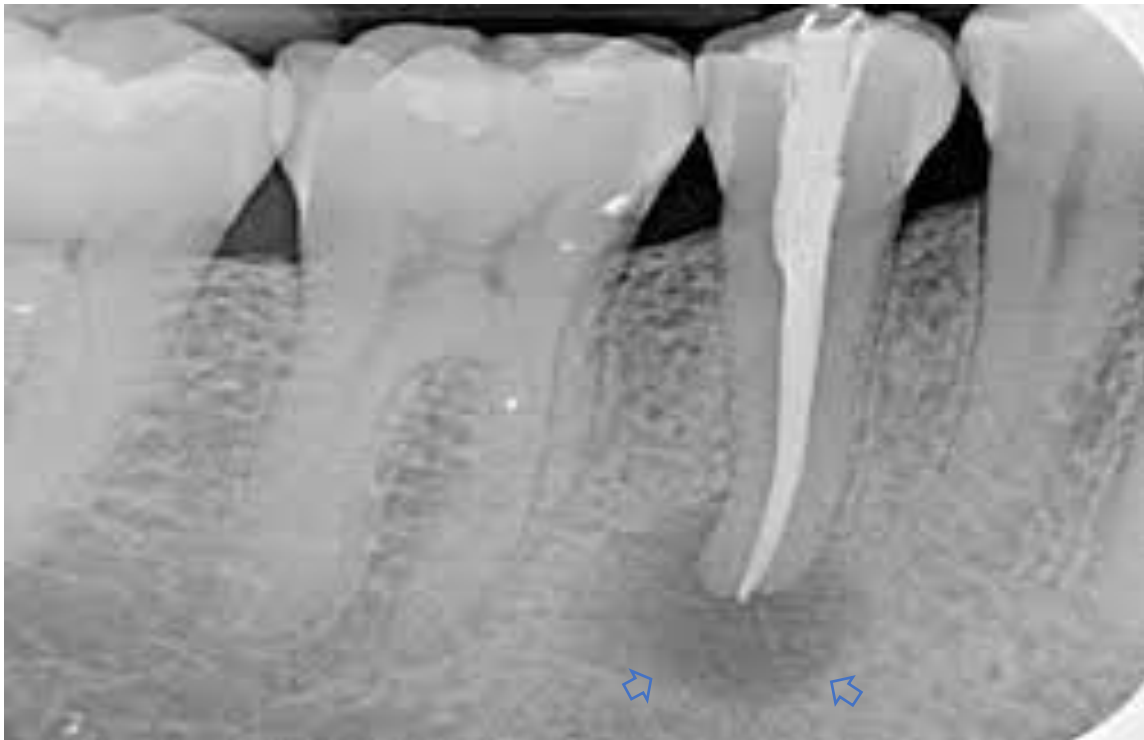
98], pacijenata nakon moždanog udara [99] kao i ostalih sistemskih bolesti poput upalne bolesti crijeva [100], sistemskog lupus eritematozusa [101] te osteoporoze, gdje je prevalencija periapikalnih lezija značajno veća u bolesnika s osteoporozom koji nisu na terapiji bisfosfonatima [102]. Povezanost je uočena s radiološki otkrivenim apikalnim paradontitisom kod majki i većim brojem prijevremeno rođene djece te niskom porođajnom težinom djeteta [103]. Bolesnici s cirozom jetre i periapikalnim lezijama također su imale više razine C reaktivnog proteina i veću prevalenciju komplikacija povezanih s cirozom kao što su ascites, jetrena encefalopatija i varikozno krvarenje [104]. Apikalni paradontitis može pridonijeti sustavnom imunološkom odgovoru koji nije ograničen na lokaliziranu leziju, što potencijalno dovodi kod neliječenog stanja do povećane razine sustavne upalne reakcije [105]. Pušenje se pokazalo kao predisponirajući čimbenik za razvoj periapikalnih lezija jer je kod pušača pronađeno dvaput više promjena koje ukazuju na apikalni paradontitis nego kod osoba koje nikada nisu pušile [106–108]. Konzumacija alkohola također je utjecajan čimbenik, prema dokazima u pretkliničkim istraživanjima, za razvoj i težinu bolesti periapikalne regije smanjujući gustoću kosti i pogoršavajući upalni odgovor [109,110]. Prevalencija apikalnog paradontitisa također raste s dobi [111,112].

1.2.3. Lokalna terapija

Kemomehanička obrada korijenskog kanala trenutno je prvi odabir u endodontskom liječenju zuba, a uključuje mehaničku obradu koja može biti ručna ili strojna te ispiranje sredstvima za dezinfekciju. Cilj je očistiti, oblikovati i napuniti korijenski kanal kako bi se prevenirala ili eliminirala upala oko apeksa zuba [113,114]. Kako bi liječenje bilo uspješno, mehaničkom instrumentacijom nastoji se eliminirati iritanse iz korijenskog kanala kao što su mikroorganizmi, preostalo pulpno tkivo te nekrotični i inficirani sadržaj. Međutim, kako postoje razne anatomske i morfološke modifikacije zuba i pulpnog prostora, kao što su jako zavijeni kanali, zatim akcesorni i lateralni kanali, različita suženja te apikalne varijacije, to često nije moguće samo mehaničkim čišćenjem, nego je potrebna dodatna kemijska obrada. Cilj ispiranja je ukloniti iritanse iz dijelova koji su nedostupni instrumentima za mehaničko čišćenje, osim toga irigansi služe i kao lubrikanti koji vlaže dentin i olakšavaju rad. Ispiranjem kanala uklanja se i debris koji nastaje instrumentacijom, što je vrlo važno za sprječavanje brtvljenja dentinskih tubulusa i smanjenje vjerojatnosti prebacivanja inficiranog sadržaja preko

apeksa zuba [115,116]. Dentinske strugotine, ostatci pulpnog i nekrotičnog tkiva te mikroorganizmi tijekom mehaničkog čišćenja mogu se ekstrudirati izvan korijena zuba u periapikalno tkivo, što pogoduje bržem razvoju i perzistiranju apikalnog parodontitisa. Studije pokazuju da i ručne i strojne tehnike instrumentacije uzrokuju u većoj ili manjoj mjeri prebacivanje sadržaja dobivenog čišćenjem preko apeksa zuba [117–119]. Za irigaciju se u osnovnom protokolu kao zlatni standard koristi natrij hipoklorit (*engl. Sodium Hypochlorite, NaOCl*) zbog svog širokog spektra antibakterijskog djelovanja te mogućnosti uklanjanja nekrotičnog i organskog tkiva. Koncentracije u kojima se primjenjuje jesu u rasponu od 0,5% do 5,25%. Za uklanjanje zaostatnog sloja i anorganske komponente koristi se etilendiamintetraoctena kiselina (*engl. Ethylenediamene tetraacetic acid, EDTA*) [120]. Osim toga što ne djeluje na anorgansku komponentu i zaostatni sloj, NaOCl ima i druge nedostatke, a to su: visoka površinska napetost zbog koje je ograničeno njegovo prodiranje dublje u dentinske tubuluse i kroz sužene dijelove, nema selektivno djelovanje i može biti toksičan za sluznicu i periapikalno tkivo, korozivno djeluje na instrumente za mehaničko čišćenje, može dovesti do diskoloracija i oštrog je mirisa [116,121]. Ostali irigansi koji se primjenjuju u endodonciji uključuju klorheksidin, sterilnu vodu, fiziološku otopinu, vodikov peroksid, urea peroksid i spojeve joda [116].

Međutim, unatoč napretku tehnologije i razvitku novih instrumenata i tehnika za čišćenje korijenskih kanala te dodatnim edukacijama doktora dentalne medicine, istraživanja pokazuju i dalje veliku stopu apikalnog parodontitisa poslije tretmana zuba i neuspjeh u liječenju [122,123]. Kao razlog tome najčešće se navodi loša instrumentacije i nepoštivanje protokola za ispiranje zuba, međutim apikalni parodontitis može se pronaći i na dobro liječenim zubima [87]. Radiolucencija oko apeksa zuba, koja nastaje zbog progresivne resorpcije kosti, glavni je klinički znak neuspjele endodontske terapije (Slika 3). Mogućnosti daljnjeg liječenja su revizija punjenja i ponovni endodontski tretman ili periradikalna kirurgija. Međutim, svakako ostaje potreba za razvojem manje invazivnih terapija s predvidljivijim rezultatom jer je ishod ponovnog liječenja manje povoljan od primarne lokalne terapije zbog više mogućih komplicirajućih čimbenika kao što su neliječeni i inficirani dodatni kanali, neprohodnost korijenskih kanala, slomljeni instrumenti, tvrdo punjenje ili nadogradnje ostale od prethodnog liječenja [84,124,125].



Slika 3. Translucencija kao glavni klinički znak neuspjelog liječenja

1.2.4. Sistemska terapija

Trenutno se kao sistemska terapija apikalnog parodontitisa uvode jedino antibiotici. Oni su često neopravdano uključeni zbog perzistiranja simptoma, radiolucencije oko apeksa zuba i boli. Istraživanja su pokazala kako je velik broj doktora dentalne medicine u nedoumici u kojim je situacijama potrebno propisati antibiotik te ih propisuju i u situacijama u kojima to nije indicirano [126]. Međutim, zbog nedostatka protoka krvi, antibiotici ne dolaze u željeno područje i neučinkoviti su protiv mikroorganizama te izostaje očekivani učinak [127]. Pokazano je i kako su vrlo često antibiotici prvi i jedini izbor liječenja [128]. To dokazuje nekritičnost u primjeni antibiotika koji su indicirani samo prilikom znakova i postojanja mogućnosti sistemskog širenja infekcije i kod medicinski kompromitiranih pacijenata [129]. Primjena antibiotika u ovom području je empirijska, propisuje se bez prethodno dokazanog uzročnika, a s pretpostavkom da će izabrani lijek djelovati na najvjerojatnijeg uzročnika. Najširu primjenu ima penicilinske skupina antibiotika. Najčešće je to amoksicilin u dozi od 500 mg svakih osam sati, odnosno tri puta na dan kroz tri do sedam dana. Česta je i upotreba amoksicilina u kombinaciji s klavulanskom kiselinom, što se pokazalo učinkovitim u liječenju endodontskih infekcija, posebice u imunokompromitiranih pacijenata. Kod

alergije na penicilin lijek izbora je klindamicin, propisuje se najčešće u dozi od 300 mg svakih šest sati, odnosno četiri puta na dan kroz tri do sedam dana. Ostali antibiotici koji se koriste kod alergija na penicilin su klaritromicin u dozi od 250 mg svakih dvanaest sati ili dva puta na dan, te azitromicin u dozi od 250 mg jednom dnevno. Ako nema promjena u simptomima infekcije i nakon dva dana od početka terapije penicilinskom skupinom antibiotika, u terapiju se može uključiti metronidazol. Ostali antibiotici koji se rjeđe koriste u liječenju endodontskih infekcija su eritromicin i cefalosporini [126,130,131]. Sistemska upotreba antibiotika važan je čimbenik u kontroli infektivnih bolesti te je kao takva milijunima ljudi produžila očekivano trajanje i kvalitetu života. Međutim, nekritičko propisivanje antibiotika od strane doktora medicine i dentalne medicine u situacijama kada to nije indicirano dovelo je do porasta rezistencije mikroorganizama na antibiotike [132]. Ono što dodatno pridonosi porastu rezistencije jest već spomenuto empirijsko propisivanje antibiotika širokog spektra u terapiji odontogene infekcije, a razlog je tomu njezina polimikrobna etiologija. Uz rizik od porasta razvoja rezistencije nekritičko propisivanje antibiotika povećava i rizik od potencijalnih alergijskih reakcija, od kojih je anafilaktički šok najopasnija te izlaže pacijente mogućim nepotrebnim nuspojavama [131,133].

U različitim područjima zdravstva, pa tako i u dentalnoj medicini, sve više se osvještava problem antimikrobne rezistencije. Važnost pronalaska lijeka koji bi zaustavio upalni proces, smanjio destrukciju kosti te potaknuo njen oporavak već je uočena. U prilog tomu govori i sve više pretkliničkih istraživanja kojima se pokušava pronaći rješenje za ovaj globalni problem [134–138]. Razumijevanje oralnog mikrobioma i njegove uloge u oralnom zdravlju i bolesti može pružiti uvid u razvoj ciljanih terapija koje mogu modulirati mikrobnu zajednicu bez promicanja otpornosti. Fokus je na novim agensima izvedenim iz prirodnih izvora, kao što su biljni ekstrakti i peptidi, probiotici te terapija temeljena na imunološkom sustavu [134-140].

U istraživanjima se, između ostalog, procjenjivalo učinke omega-3 polinezasićenih masnih kiselina kao dodataka prehrani za apikalni parodontitis izazvan izlaganjem pulpe kod eksperimentalnih štakora. Pokazale su se učinkovite ne samo u zaustavljanju osteoklastogeneze, nego i u poticanju osteoblastogeneze, kao i u smanjenju proinflammatoryh i pojačavanju antiinflammatoryh čimbenika [134,135,139]. Povoljne rezultate u ovom polju pokazali su i probiotici. Kod eksperimentalnih životinja, nakon otvaranja pulpe i izloženosti zuba uvjetima u usnoj šupljini te sistemske primjene

probiotika *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus acidophilus*, primijećena je statistički značajno manja lezija u periapeksu zuba [136,137,140]. Istraživanja su uključivala i primjenu hormona. Područja koštane resorpcije na eksperimentalnom modelu apikalnog parodontitisa kod štakora tretiranih melatoninom bila su smanjena. Kod kontrolne skupine s induciranim apikalnim parodontitisom prostor parodontnog ligamenta bio je jako proširen s edemom i alveolarna je kost imala veća područja resorpcije [138]. Primjena alendronata kao terapije u takvom modelu istraživanja uspjela je također inhibirati širenje gubitka alveolarne kosti [141]. Redukcija znakova apikalnog parodontitisa pokazana je i u eksperimentu tretiranja štakora nižim dozama doksiciklina u vodi za piće [142]. Nova istraživanja u području antimikrobne rezistencije usmjerena su i na antimikrobne peptide. To su prirodno prisutne tvari i proučavaju se različiti izvori antimikrobnih peptida, kao što su peptidi iz sline, proteini u sluznici usne šupljine i drugim sluznicama, ili pak peptidi iz prirodnih izvora kao što su biljke ili životinje. Cilj je identificirati nove antimikrobne peptide i razumjeti njihovu strukturu, funkciju i mehanizam djelovanja te procijeniti sigurnost i isključiti toksičnost prema ljudskim stanicama kako bi se osigurala njihova primjena bez štetnih nuspojava. Također, vrlo je važno utvrditi postoji li antagonistički ili sinergistički učinak s drugim terapijama, pogotovo antibioticima i antisepticima kao najčešće primjenjivanim za kontrolu infekcije u dentalnoj medicini [143,144].

Do danas se nijedna od mogućih alternativnih metoda sistemskog liječenja ne uključuje klinički u terapiju apikalnog parodontitisa. Nastavak istraživanja vrlo je važan i svakako u razmatranje treba uzeti proširenje istraživanja na peptide kao mogućnost sistemske terapije apikalnog koštanog defekta u pravoj dozi, posebno peptide kojima nije potreban nosač i koji su već pokazali dobre rezultate u cijeljenju koštanih defekata [48,55].

1.2.5. Regenerativna endodoncija

Regenerativna endodoncija definirana je kao biološki orijentirani postupak osmišljen za fiziološki nadomjestak oštećenih struktura zuba, uključujući dentin i strukture korijena, kao i pulpo-dentinski kompleks. Prema američkom udruženju endodonata (*engl. American Association of Endodontists, AAE*) i Europskom društvu za endodonciju (*engl. European Society of Endodontology, ESE*) primarni je cilj

regenerativnoga postupka eliminacija kliničkih znakova i simptoma te periapikalno cijeljenje i povlačenje apikalnog parodontitisa [145,146].

Od punjenja korijenskog kanala i materijala koji se koriste za punjenje očekuje se sprječavanje koronarnog propuštanja, usporavanje prodora bakterija iz prostora kanala u periapeksna tkiva te zadržavanje preostalih bakterija nakon kemomehaničke obrade u prostoru kanala. Nažalost, punjenje korijenskog kanala ne može ispuniti ova očekivanja kod svih endodontski liječenih zuba [147,148]. Iz tog razloga intenzivno se traga za novim mogućnosti liječenja, a Nygaard-Ostby je bio jedan od prvih začetnika ideje o regeneraciji i reparaciji u endodonciji. Pokušao je istraživati kod pasa i ljudi potencijal regeneracije tkiva u djelomično ispunjenom kanalnom prostoru endodontski liječenih zuba izazivanjem periapikalnoga krvarenja [149]. Međutim, utvrđeno je da nastalo tkivo koje se nalazilo u pulpnom prostoru kanala zuba nije pulpno tkivo, već fibrozno vezivno tkivo i celularni cement [150]. Posljednje desetljeće se sve više radi na revitalizaciji (poznatoj i kao regenerativni endodontski zahvati ili revaskularizacija) pokušavajući izliječiti upalno promijenjene ili nekrotične trajne zube sa nezavršenim i završenim razvojem korijena poštujući biologiju kompleksa pulpa–dentin [146,151,152]. Glavna je ideja revitalizacije da se najprije dezinficira korijenski kanal, a zatim privuče ili presadi mezenhimalne matične stanice iz preostale zubne pulpe i apikalne papile u korijenski kanal [152–154]. Ta terapija se ne temelji na mehaničkom i kemijskom tretmanu kao kod konvencionalnog liječenja kanala zuba, nego je poduprta načelima tkivnoga inženjerstva koji uključuje matične stanice, faktore rasta te biološke i sintetičke nosače [146,152,153]. Dentalne matične stanice koje mogu stvoriti pulpo-dentinski kompleks jesu sljedeće: matične stanice zubne pulpe (*engl. Dental Pulp Stem Cells, DPSCs*), matične stanice apikalne papile (*engl. Stem Cells from the Apical Papilla, SCAP*), matične stanice koštane srži (*engl. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells, BMSCs*) i matične stanice mliječnih zuba (*engl. Human Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cells, SHED*) [154–159]. U procesu regeneracije ključni su i faktori rasta kao trombocitni faktor rasta (*engl. Platelet-derived Growth Factor, PDGF*), transformirajući faktor rasta (*engl. Transforming Growth Factor, TGF*), endotelni faktor rasta (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*), faktor rasta fibroblasta (*engl. Fibroblast Growth Factor, FGF*), koštani morfogenetski protein (*engl. Bone Morphogenetic Protein, BMP*) te inzulinu sličan faktor rasta (*engl. Insulin like Growth Factor, IGF*) [160]. Nosači, kao što je već napomenuto, mogu biti prirodni i

umjetni, a najboljim se smatra izvanstanični matriks tkiva koje se nastoji regenerirati [161].

U sistemskom preglednom radu iz 2017. godine prikazana je visoka stopa uspjeha i zabilježeno je cijeljenje periapikalne kosti [162]. Ipak, izvješća od tada nisu bila u skladu s ovim ishodom. Prospektivno kliničko ispitivanje u vezi utjecaja apikalnog parodontitisa na revitalizaciju trajnih zuba s nezavršenim razvojem korijena pokazalo je negativan utjecaj prije operacijske nekroze pulpe i apikalnog parodontitisa na daljnji razvoj korijena i potpuno periapikalno cijeljenja kosti [163]. Postupak kod mladih trajnih zuba s nezavršenim rastom i razvojem i protokol liječenja za uklanjanje simptoma i znakova periapikalnih lezija jest poznat, međutim ostaje problem i izostaju jasne smjernice o položaju revitalizacije kao opcije liječenja za trajne zube s završenim rastom i razvojem korijena i nekrozom pulpe. Ostaje potreba za daljnjim kliničkim ispitivanjima koja bi pružila vjerodostojne dokaze kako je revitalizacija zaista uspješna u liječenju zrelih trajnih zuba s apikalnim parodontitisom [152].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Temeljeno na brojnim dosadašnjim rezultatima istraživanja u kojima je pentadekapeptid BPC 157 pokazao djelotvornost u cijeljenju postavljena je radna hipoteza:

- kod apikalnog parodontitisa uzrokovanog ekspozicijom pulpe zuba štakora aplikacija pentadekapeptida BPC 157 smanjit će oštećenje u periapikalnom dijelu.

Cilj rada je pokazati terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 na apikalni parodontitis uzrokovan ekspozicijom pulpe zuba kod štakora.

Specifični ciljevi su:

1. pokazati učinak pentadekapeptida BPC 157 na leziju pulpe i periapikalnog tkiva kod tretiranih štakora i usporediti ju s kontrolnom grupom
2. pokazati postoji li razlika u ekspresiji zadanih gena između grupe štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 i kontrolne grupe
3. pokazati postoji li razlika u broju i vrsti mikroorganizama usne šupljine kod štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 i kontrolne grupe

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Za istraživanje korišteni su mužjaci Wistar štakora, starosti četiri mjeseca te tjelesne mase 200 do 250 g. Životinje su iz vlastitog uzgoja u nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za farmakologiju Medicinskoga fakulteta u Zagrebu. Objekt je registriran i odobren od strane Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo (HR-POK-007).

Laboratorijske životinje boravile su u standardnim kavezima koji su označeni datumom, oznakom grupe, dozom medikacije te ukupnim brojem štakora u dotičnom kavezu. U prostoriji s životinjama održavaju se standardni laboratorijski uvjeti (20-24 °C temperatura zraka, 40-70% vlažnost zraka i buka do 60 dB). Voda i standardna prehrana dostupni su životinjama *ad libitum*. Ciklus dan-noć traje 12/12 sati (07/19 sati). U istraživanju se slijedila Direktiva 2010/63/EU, Zakon o zaštiti životinja RH (NN br. 103/17, 32/19) te FELASA smjernice, a sam pokus odobrilo je od Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Protokol istraživanja

Štakori su anestetizirani intraperitonealnom injekcijom tiopentala (Rotexmedica, Njemačka) u dozi 40 mg/kg i diazepamom (Apaurin; Krka, Slovenija) u dozi 10 mg/kg. Prema već opisanom modelu apikalnog paradontitisa [134,136] napravljena je trepanacija prvog desnog maksilarnog molara preparacijom I. razreda na mezijalnoj strani okluzalne plohe zuba (Slika 4.). Korišteno je okrugla svrdla (ISO 008, Diaswiss, Švicarska), a zub je trepaniran malom brzinom rotacije dok vrh glave svrdla nije dotaknuo pulpnu komoricu. Otvaranje pulpne komorice potvrđeno je endodontskom iglicom (ISO 15, VDW, Njemačka). Zub je ostao otvoren, a pulpa eksponirana do trenutka žrtvovanja [134,136,142].



Slika 4. Trepanirani prvi desni maksilarni molar štakora

Štakori su bili podijeljeni prema vremenskim intervalima u pet skupina (1. tjedan, 2. tjedan, 3. tjedan, 4. tjedan, 5. tjedan). Tretirana grupa 1 primala je cijelo vrijeme pokusa 10 ng/kg BPC-a 157 (Diagen, Slovenija) *per os*, dok je tretirana grupa 2 primala 10µg/kg BPC-a 157 *per os*. BPC 157 bio je otopljen u vodi za piće kod obje tretirane grupe. Kontrolna grupa pila je samo vodu tijekom čitavog vremena provedbe pokusa (Tablica 1).

Tablica 1. Raspored pokusnih životinja i primijenjenih supstanci

Trajanje pokusa (tjedni)	Kontrolna grupa	Tretirana grupa 1 (10 ng/kg BPC-a 157)	Tretirana grupa 2 (10 µg/kg BPC-a 157)
1	n=6	n=6	n=6
2	n=6	n=6	n=6
3	n=6	n=6	n=6
4	n=6	n=6	n=6
5	n=6	n=6	n=6

Pokus je praćen makroskopski (Veho Discovery VMS-004 Deluxe USB Camera, Veho, Dayton, OH, SAD) i radiološki (Scanora 3DX, CBCT radiološkim sustavom i Minray, uređajem za pojedinačne snimke – Soredex, Njemačka).

Makroskopskim promatranjem zuba klasificirano je pucanje preostalog zubnog tkiva oko trepanacijskog otvora gledano s palatinalne strane i uzimajući u obzir palatinalnu stijenku zuba koja je najbolje vidljiva snimanjem:

Bod 1 – razina palatinalne stijenke uz trepanacijski otvor u okluzijskoj je trećini gingivo-okluzijskog promjera

Bod 2 – razina palatinalne stijenke uz trepanacijski otvor u srednjoj je trećini gingivo-okluzijskog promjera

Bod 3 – razina palatinalne stijenke uz trepanacijski otvor u gingivnoj je trećini gingivo-okluzijskog promjera

Bod 4- stijenka je palatinalno uz trepanacijski otvor frakturirala ispod razine gingive

Radiološka klasifikacija apikalnog parodontitisa sukladna je stadiju akutnog i kroničnog apikalnog parodontitisa [164]:

Bod 0 – bez periapikalnih promjena

Bod 1 – blago proširenje parodontne pukotine (akutni)

Bod 2 – gubitak lamine dure i translucencija oko apeksa (kronični)

Odrednica radioloških nalaza kod kroničnoga oblika apikalnog parodontitisa jest perzistiranje translucencije periapikalno neovisno o poziciji tubusa i promijeni kuta snimanja zuba [164,165].

Težina pokusa može se klasificirati kao blaga prema klasifikaciji iz pravilnika za zaštitu životinja koji se koristi u znanstvene svrhe (NN broj 135/06 i 37/13). Analgezija je laboratorijskim životinjama u pokusu bila osigurana kroz najmanje tri dana poslije operativnih zahvata, pomoću Meloxoral (Genera) 1,5 mg/ml oralne suspenzije. Stanje eksperimentalnih životinja svakodnevno je bilo ispitivano te bodovano prema sljedećim kriterijima:

- oteklina, crvenilo ili gnojenje u eksperimentalnom području:

0 = nije prisutno; 1 = blago; 2 = srednje; 3 = teško; 4 = iznimno teško

- udobnost (obzervacija životinja unutar kaveza):

0 = budno stanje, zainteresiranost za okoliš i druge životinje, kretanje i ležanje, hranjenje; 1 = budno stanje, nezainteresiranost za okoliš i druge životinje, ležanje, slabo hranjenje; 2 = letargija, depresija, anoreksija; 3 = letargija, spuštenu glavu sa spuštenim uškama, anoreksija; 4 = vegetativno stanje odnosno ležanje, pogled fiksiran, poluzatvorene oči, bez odgovora na dodir, bruksizam

- kretanje (obzervacija životinja unutar kaveza):

0 = normalno kretanje; 1 = blago šepanje i usporenost; 2 = srednje šepanje i usporenost; 3 = naglašeno šepanje i usporenost; 4 = nemogućnost podizanja na noge

- ponašanje unutar kaveza:

0 = normalno; 1 = blaga promjena – blago zaostaje ali hvata tempo s ostalim životinjama; 2 = srednja promjena – značajnije zaostaje, ali hvata tempo s drugim životinjama; 3 = teška promjena – nezainteresiranost za druge životinje i kretanje u kavezu

- hranjenje (obzervacija životinja unutar kaveza):

0 = normalno – jede pelete iz hranilice; 1 = blaga promjena – jede nešto manje od ostalih životinja; 2 = srednja promjena; 3 = teška promjena – anoreksija

- frekvencija disanja:

0 = normalna; 1 = zamjetno povećanje frekvencije inspirirajućeg zraka; 2 = hiperventilacija; 3 = hiperventilacija s disanjem na usta

Obzirom na rezultat bodovanja, odnosno ako je rezultat bodovanja veći ili jednak 9, životinjama je dodatno bio administriran Meloxoral.

Na unaprijed određenim intervalima životinjama su uzimani uzorci slin i brisevi usne šupljine za mikrobiološku analizu te su eutanazirane dvostrukim vrijednostima anestezije. Učinjena je hemisekcija maksile s ciljem uzimanja oštećenog zuba i okolnog tkiva za histološku analizu i molekularnu analizu ekspresije gena.

3.3. Mikrobiološka analiza

Za kvalitativnu mikrobiološku analizu, tretiranim i kontrolnim eksperimentalnim životinjama, uzorkovani su obrisci usne šupljine te uzorci sline. Isti se nasađuju primjerenim mikrobiološkim tehnikama na sterilna hranilišta, Ceos kromogeni urea IV agar (Certifikat, Vukovar).

Za kvantitativno mikrobiološko određivanje uzorkovani su uzorci sline tretiranih i kontrolnih eksperimentalnih životinja. Budući da ne postoji univerzalno hranilište na kojem bi se mogle razlikovati sve bakterijske vrste prisutne u slini štakora, uzorci su nasađeni na kromogeno hranilište za koje je specifično da omogućava presumptivnu identifikaciju najčešćih bakterija prisutnih u slini štakora. To je neselektivna diferencijalna podloga koja omogućuje prilično točnu identifikaciju bakterijskih izolata iz različitih uzoraka, naime različite bakterijske vrste rastu u različitim bojama što omogućava i brojanje pojedine bakterijske vrste.

Uzorci sline su nasađeni u količini od 10 μ l, uz pomoć kalibrirane eze, na Ceos kromogeni urea IV agar (Certifikat, Vukovar). Inkubirani su u aerobnom termostatu (Binder, Njemačka) 18-24 h, na temperaturi od 37°C, nakon čega je izvršeno brojanje poraslih bakterijskih kolonija. Nakon brojanja svake bakterijske vrste rezultati su prikazani kao CFU/ml prema Tablici 2.

Tablica 2. Interpretacija broja poraslih bakterijskih kolonija na ploči, pri nasađivanju kalibriranom ezom zapremine 10 μ l

Broj kolonija poraslih na ploči uz zapreminu eze 10 μ l	Interpretacija broja bakterija u slini (CFU/ml)
1-9	10 ²
10-99	10 ³
100-999	10 ⁴
≥ 1000	≥ 10 ⁵

Nasađivanjem tekućega uzorka uz pomoć eze zapremine 10 µl (0,01 ml) prag detekcije je 10² CFU/ml, dok je maksimalno brojiv broj kolonija ≥10⁵ CFU/ml, što odgovara broju od ≥ 1000 kolonija na ploči [166,167].

Bakterijski izolati su identificirani uz pomoć masene spektrometrije MALDI TOF (Bruker Daltonics, Češka, Slika 5). MALDI TOF (*engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) tehnika je spektrometrije masa koja se često koristi u biokemiji i mikrobiologiji za identifikaciju mikroorganizama. Ta tehnika temelji se na principu da molekule mikroorganizama, kao što su proteini i peptidi, mogu biti ionizirane i analizirane na temelju svojih masa. Uzorak se priprema miješanjem mikroorganizama s matricom koja pomaže u stvaranju iona, a zatim se izloži laserskom snopu koji uzrokuje odvajanje iona iz uzorka. Ioni se ubrzavaju i putuju kroz električno polje prema detektoru, gdje se mjere njihova vremena *leta*. Na temelju toga vremena masa svakog iona se određuje i prikazuje kao spektar masa [168].



Slika 5. MALDI TOF uređaj

3.4. Analiza ekspresije gena

Nakon primjene odgovarajućih tvari i žrtvovanja životinja tkivo uz mezijalnu stranu zuba odstranjeno je i zamrznuto u tekućem dušiku. Tkivo je prvo homogenizirano pomoću homogenizatora tkiva Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific, Oxford, Connecticut, USA), u 1000 μ l TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA), a sama izolacija obavljena je pomoću reagensa na bazi TRIzola prema uputama proizvođača.

Nakon ekstrakcije ribonukleinske kiseline (*engl. Ribonucleic Acid, RNA*) kvantifikacija je napravljena s DeNovix DS-11 spektrofotometrom (DeNovix Inc., Delaware, SAD).

Reverzna transkripcija izvedena je korištenjem kompleta za reverznu transkripciju komplementarne deoksiribonukleinska kiseline (*engl. Complementary*

Deoxyribonucleic Acid, cDNA) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača i pomoću uređaja ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Sonde za hidrolizu TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) korištene su za analizu genske ekspresije odabranih gena od interesa (Tablica 3). Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) provedena je u triplicatu za svaki uzorak. Reakcije je izvedena pomoću instrumenta Cobas z 480 (Hoffmann-La Roche Ltd, Švicarska) prema sljedećem protokolu: 2 minute na 50°C, 10 minuta na 95°C, 45 ciklusa od 15 sekundi na 95°C i 1 min na 60°C.

Tri gena (*engl. Housekeeping Genes*) korištena su kao endogena kontrola kako bi se umanjila opasnost pogreške prilikom analize podataka i usporedbe uzoraka. Analizirani su aktin-beta (*engl. Actin Beta, Actb*), gliceraldehid-3-fosfatna dehidrogenaza (*engl. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Gapdh*) i gen koji kodira za 18S ribosomsku RNA kao referentni geni za normalizaciju rezultata nekoliko gena od interesa koji igraju važnu ulogu u regulaciji odgovora na faktore rasta, oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (*engl. Deoxyribonucleic Acid, DNA*), ishemiju, a reguliraju i stanično preživljenje, proliferaciju (EGR1, PTGS2), kao i ekspresiju dušičnog oksida (NOS2, NOS3) [41,169].

Razlika u ekspresiji gena između tretiranih i netretiranih uzoraka analizirana je pomoću formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdje je $\Delta\Delta Ct$ razlika između ΔCt tretiranog uzorka i ΔCt netretiranog uzorka. Rezultati su izraženi kao promjena puta ekspresije gena uzorka tretiranih grupa u odnosu na uzorke kontrolne grupe štakora.

Tablica 3. Pojediniosti o odabranim genima od interesa i TaqMan Assay specifikacije

Simbol gena	Sinonimi	Naziv gena	TaqMan Assay identifikacijska oznaka	NCBI referentna sekvencija	Duljina fragmenta (bp)
Actb		β -actin	Rn00667869_m1	NM_031144.3	91
Gapdh		Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	Rn01775763_g1	NM_017008.4	174
Rn18s		18S rRNA	Rn03928990_g1	NR_046237.1	61
Egr1	NGFI-A, Krox-24, Zif268	Early growth response 1	Rn00561138_m1	NM_012551.2	64
Nos2	iNos, Nos2a	Nitric oxide synthase 2	Rn00561646_m1	NM_012611.3	77
Nos3	cNOS, eNos	Nitric oxide synthase 3	Rn02132634_s1	NM_021838.2	117
Ptgs2	COX-2, Cox2, cyclooxygenase 2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Rn01483828_m1	NM_017232.3	112

- NCBI (*engl. National Center for Biotechnology Information*), baza podataka
- bp (*engl. base pair*), duljina sintetiziranog fragmenta

3.5. Histološka analiza

Za histološku analizu preparat zuba s okolnom alveolarnom kosti bio je uronjen u 4% formalin, dekalificiran s etilendiamintetraoctenom kiselinom i uklopljen u parafin. Tako pripremljeni preparati rezani su na debljenu od 5 μ m u laterolateralnom smjeru omogućujući na taj način presjek uzdužne osi zuba te su bojani hemalaun eozinom (HE). Kao pokazatelji angiogeneze promatrane su krvne žile s vidljivim volumenom i endotelom, broj krvožilnih prostora mjereno je na 2 mm².

Na temelju inflamatornog i staničnog uzorka u zubnom i parodontnom tkivu napravljena je skala razine upalnog infiltrata bodovana prema sljedećem kriteriju:

bod 1 (upala izostaje) = od 0 do nekoliko stanica

bod 2 (blaga upala) = <25 stanica

bod 3 (umjerena upala) = od 25 do 125 stanica

bod 4 (teška upala) = >125 stanica [134,136,138,141]

3.6. Statistička analiza

Statističke vrijednosti predstavljene su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) i kao minimum/median/maksimum. Broj životinja po skupini izračunat je na temelju prethodnih istraživanja [136,138,141,142] i uz pomoć GraphPad Instat statističkog programa (GraphPad Software Inc, San Diego, Kalifornija).

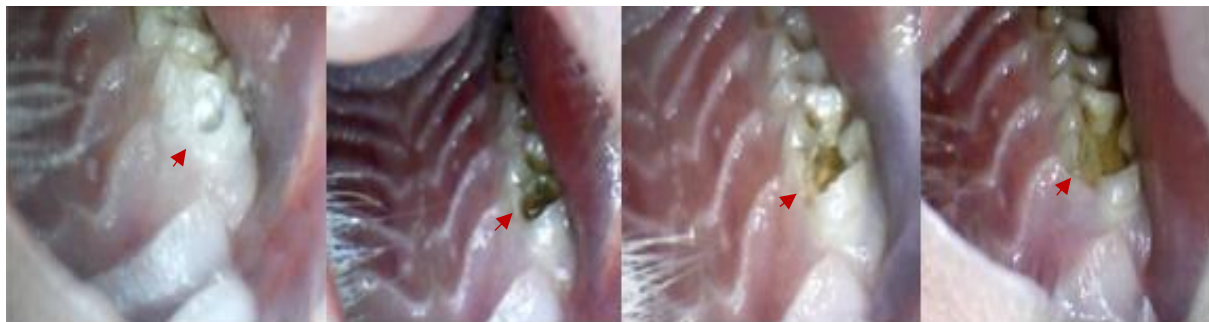
Uz snagu ANOVA testa za ponovljena mjerenja, tri skupine jednake veličine, pet vremenskih točki mjerenja, minimalni broj štakora po skupini jest šest. Uz ovu veličinu uzorka snaga testa je 80% (0,8), vjerojatnost pogreške tipa I (α) =0,05. Ukupno je pet skupina (podijeljenih po vremenskim intervalima), svaka skupina ima tri grupe, a broj životinja u grupi je minimalno šest, dakle ukupna količina životinja je minimalno 90.

Kontinuirane varijable testirane su za normalnost distribucije Shapiro-Wilk testom. Za provjeru statističke značajnosti parametara koji slijede normalnu raspodjelu podataka koršten je jednosmjerni ANOVA test. Značajnost razlika između mjerenih parametara testirana je Mann-Whitney-evim U-testom kod varijabli koje nisu slijedile normalnu raspodjelu. Distribucija kvalitativnih obilježja prikazana je tablicama kontingencije, a podaci analizirani Hi-kvadrat testom za nezavisne uzorke te McNemar χ^2 testom za zavisne uzorke. Vrijednost $p < 0,05$ smatra se statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Makroskopske promjene

Makroskopskim praćenjem eksperimentalnih životinja i snimanjem trepaniranog zuba pod povećanjem uočeno je da je preostali koronarni dio zubnog tkiva oko trepanacijskog otvora skloniji pucanju kod kontrolne skupine životinja (Slika 6, 8).



Slika 6. Makroskopski prikaz trepaniranog zuba od trenutka nastanka lezije do 5. tjedna kod kontrolne životinje

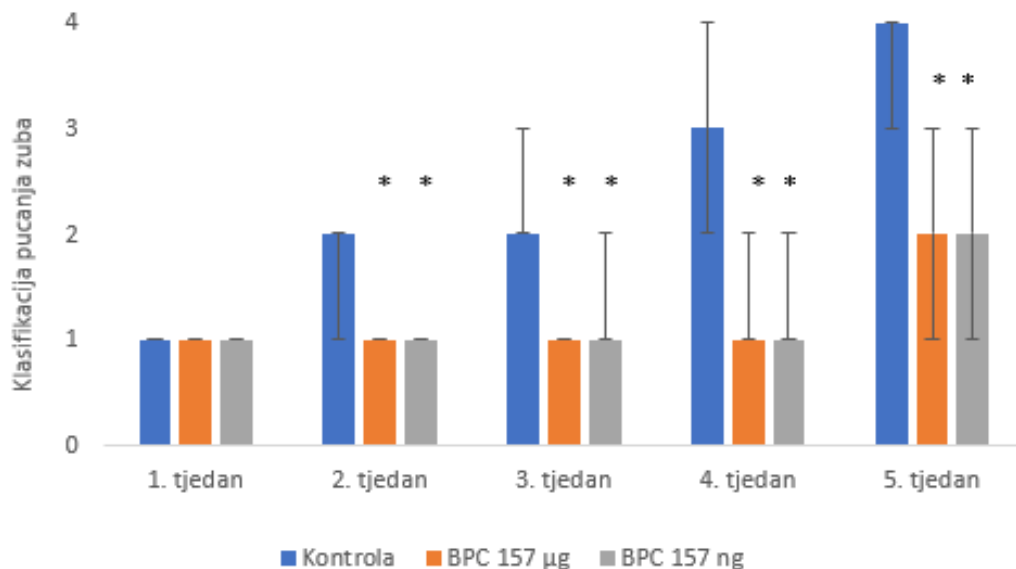
Kod štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 integritet preostalog koronarnog tkiva oko trepanacijskog otvora ostao je očuvan u većoj mjeri (Slika 7, 8).



Slika 7. Makroskopski prikaz trepaniranog zuba od trenutka nastanka lezije do 5. tjedna kod tretiranog BPC-om 157

U prvom tjednu eksperimenta pucanje zuba nije primijećeno ni u jednoj od grupa i sve životinje imale su bod 1 prema klasifikacijskoj skali. U drugom tjednu obje tretirane grupe zadržale su isto stanje, dok su kod kontrolne grupe uočene promjene i median

vrijednost je bod 2. Promjene su grafički prikazane kao minimum/median/maksimum. Sve životinje iz grupe štakora tretiranih BPC-om 157 u terapijskoj dozi od 10 µg/kg i u trećem tjednu su zadržale isto stanje, kod grupe tretirane BPC-om u dozi od 10 ng/kg u jedne životinjeuočeno je pucanje koje dogovara bodu 2 prema klasifikacijsko skali i za tu grupu vrijednosti su 1/1/2. Kod kontrolne je grupe u ovom tjednu puno veće pucanje i iznosi 2/2/3. Stanje se izjednačilo kod tretiranih grupa u četvrtom tjednu 1/1/2 kod obje grupe, kod kontrolne grupe je vrijednost 2/3/4 . U petom i zadnjem tjednu eksperimenata pucanje zuba za grupu tretiranu BPC-om 157 u ng znosi 1/2/3, za grupu tretiranu BPC-om 157 u µg iznosi isto, dok je za kontrolnu grupu vrijednost 3/4/4 (Slika 8).

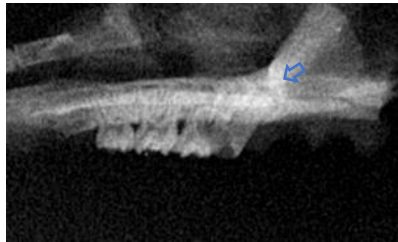
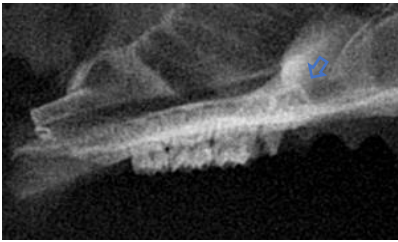
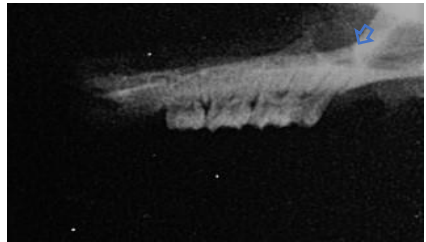



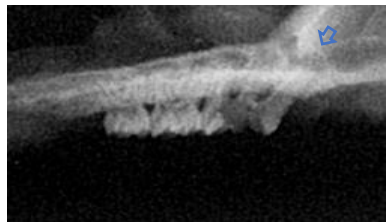
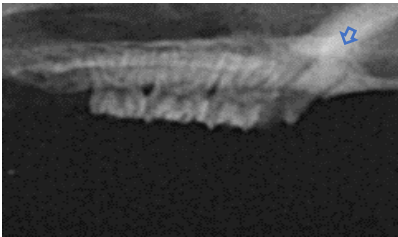



Slika 8. Klasifikacija loma zuba kod grupa štakora tretiranih BPC-om 157 u ng, µg i kontrolne grupe prikazana kao minimum/median/maksimum po tjednima praćenja pokusa. * je označena značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu uz $p < 0.05$.

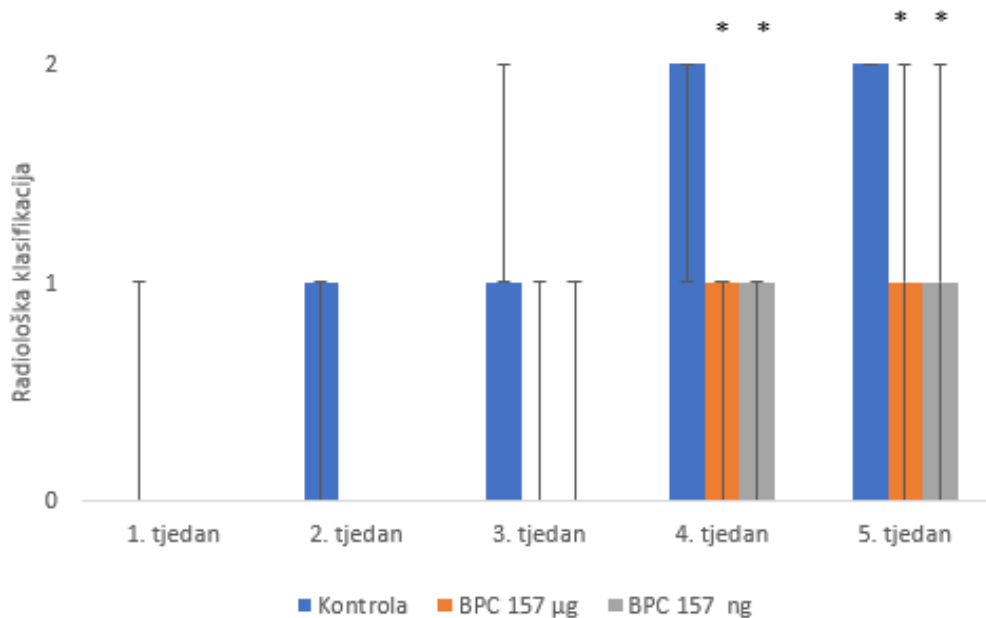
4.2. Radiološki nalaz

Očitavanjem radioloških snimki ustanovljeno je kako su promjene u kosti oko apeksa zuba u početku minimalne te podjednake i kod kontrolne i tretiranih grupa štakora. U kasnijim razdobljima upalni se proces javio kod kontrolne grupe i rapidno povećavao s odmakom vremena, na snimci iz 5. tjedna resorptivne promjene su se pokazale, osim oko vrha, i u furkaciji korijenova. Translucencija kao znak resorpcije kosti oko korijena štakora tretiranih BPC-om 157 u istim razdobljima znatno je manja i bez znakova širenja (Tablica 4, Slika 9).

Tablica 4. Usporedba RTG snimki kontrolne grupe i tretirane BPC-om 157

	Kontrolna grupa	Tretirana grupa ng	Tretirana grupa μ g
1 tjedan			
3 tjedna			
5 tjedana			

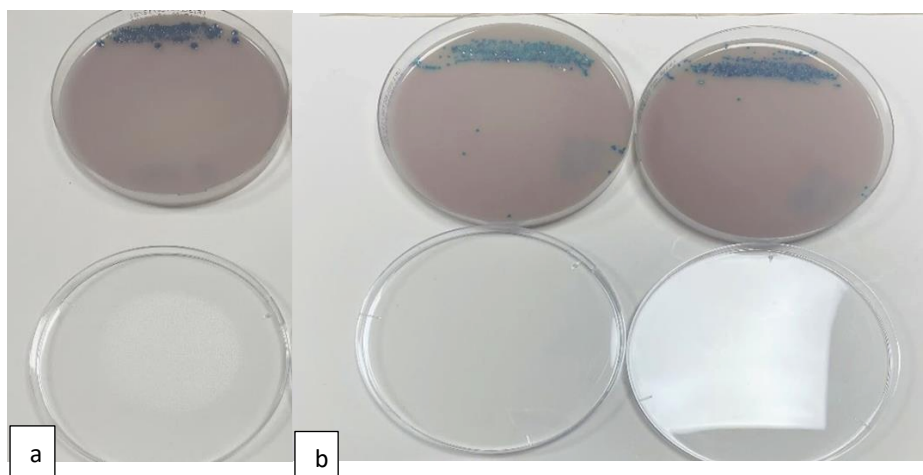
Radiološke snimke pregledane su i klasificirane bodovima 0, 1 i 2, vrijednosti su prikazane kao minimum/median/maksimum. U prva dva tjedna pokusa kod tretiranih grupa štakora nije bilo promjena u periapeksu zuba. Kod kontrolne grupe štakora promjene su bile minimalne i za prvi tjedan iznose 0/0/1, a za drugi tjedan iznose 0/1/1. U trećem tjednu vrijednosti za grupu tretiranu BPC-om 157 u μg su 0/0/1, za grupu tretiranu BPC-om 157 u ng su 0/0/1, dok su kod kontrolne grupe za isti termin 1/1/2. Vrijednosti u četvrtom i petom tjednu za tretirane u μg su 0/1/1 i 0/1/2, a za tretirane u ng su iste i također iznose 0/1/1 i 0/1/2. Kod kontrolne grupe vrijednosti su značajno veće i za četvrti tjedan iznose 1/2/2, a u petom tjednu su sve životinje iz ove grupe imale najveće vrijednosti tj. bod 2 prema klasifikaciji (Slika 9).



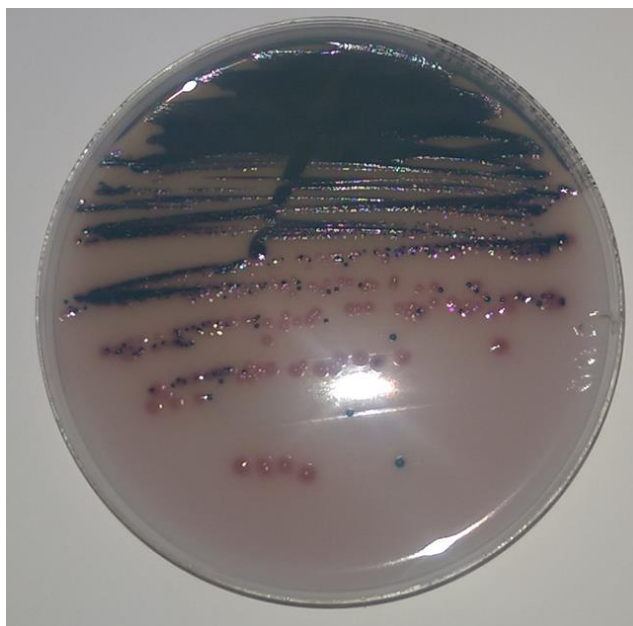
Slika 9. Klasifikacija radioloških snimki zuba kod grupa štakora tretiranih BPC-om 157 u ng, μg i kontrolne grupe prikazana kao minimum/median/maksimum po tjednima praćenja pokusa. * je označena značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu uz $p < 0.05$.

4.3. Bakterijske vrste i broj kolonija

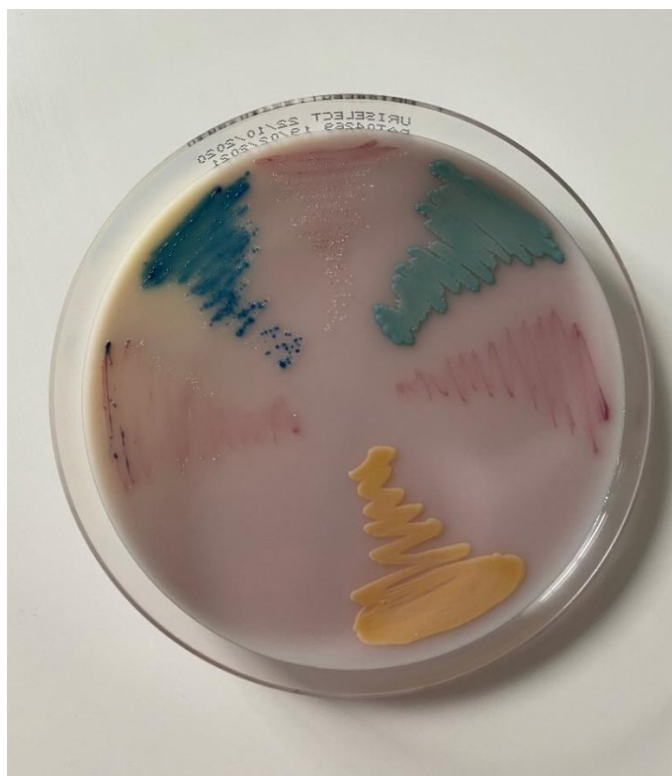
Obrisi usne šupljine i uzorci sline kod kontrolne grupe štakora te štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 nasađeni su na kromogeni urea IV agar (Slika 10). Na temelju boje izolirane su različite bakterijske vrste i kolonije su ponovno nasađene na Uri-select IV kromogenom hranilištu (Slika 11, 12). Kvalitativnom analizom prikupljenih uzoraka i identifikacijom pomoću MALDI TOF uređaja u ovom istraživanju pronađeno je šest bakterijskih vrsta (Tablica 5). Svi sojevi bakterija su fakultativni anaerobi i oportunistički patogeni. Četiri su vrste gram pozitivne i to su *Lactobacillus murinus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri* i *Rothia mucilagenosa* dok su druge dvije gram negativne: *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Ove bakterijske vrste izolirane su kod svih skupina štakora tj. u svim vremenskim etapama pokusa, a rezultati su bili isti neovisno o uzorcima dobivenim brisom sluznice usne šupljine ili uzorcima prikupljene sline.



Slika 10. Nasađeni uzorci sline kontrolne grupe (a) i štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 u dozi od 10 µg/kg i 10 ng/kg (b)



Slika 11. Makromorfologija miješane bakterijske kulture porasle na Uri-select IV kromogenom hranilištu, nakon nasađivanja uzorka sline i inkubacije u aerobnim uvjetima 24h na 37°C



Slika 12. Pikirane bakterijske vrste iz miješane bakterijske kulture porasle na Uri-select IV kromogenom hranilištu iz uzorka sline i nasađene na sektore Uri-select IV kromogeni agar

Tablica 5. Identificirane bakterijske vrste putem MALDI TOF uređaja

Mikroorganizam (najbolje podudaranje)	MALDI TOF Bodovna vrijednost	Mikroorganizam (drugo najbolje podudaranje)	MALDI TOF BODOVNA VRIJEDNOST
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.35	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.34
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2.00	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1.77
<i>Lactobacillus murinus</i>	2.12	<i>Lactobacillus murinus</i>	2.01
<i>Escherichia coli</i>	2.32	<i>Escherichia coli</i>	2.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.40
<i>Rothia mucilagenosa</i>	2.24	<i>Rothia mucilagenosa</i>	2.19

Nakon nasađivanja uzoraka sline bakterijske su vrste prebrojane kod štakora tretiranih BPC-om 157 u dozi od 10ng/kg i 10 µg/kg te kod kontrolne grupe štakora. Pokazalo se kako nema nikakve razlike u broju kolonija između grupa tretiranih BPC-om 157, a rezultati brojanja prikazani kao CFU/ml prikazani su u Tablici 6. Razlika između broja bakterijskih kolonija izoliranih iz sline štakora tretiranih BPC-om 157 i kontrolne grupe štakora testirana je Hi-kvadrat testom. Tim testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između broja bakterijskih kolonija izoliranih iz sline tretiranih štakora i kontrolne grupe štakora. Pokus je izveden tri puta.

Tablica 6. Broj bakterijskih kolonija kod kontrolne grupe štakora i tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 prikazan kao CFU/ml

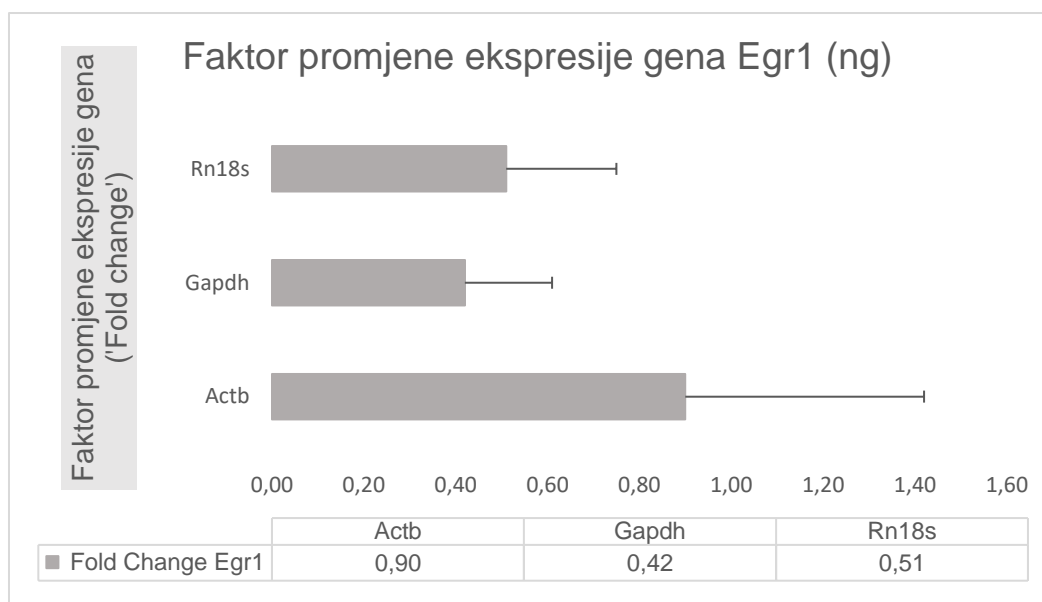
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rothia mucilagenosa</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
1. tjedan	Kontrola (med/min/max)	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ⁴	10 ² /10 ³ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ³ /10 ³ /10 ⁴	10 ¹ /10 ² /10 ³
	BPC 157 µg (min/med/max)	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ² /10 ³ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ³ /10 ⁴ /10 ⁵	10 ¹ /10 ² /10 ²
	BPC 157 ng (min/med/max)	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ² /10 ³ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ³ /10 ⁴ /10 ⁵	10 ¹ /10 ¹ /10 ²
2. tjedan	Kontrola (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ⁴	10 ³ /10 ³ /10 ⁴	10 ³ /10 ³ /10 ⁴	10 ² /10 ² /10 ³
	BPC 157 µg (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ³	10 ³ /10 ⁴ /10 ⁵	10 ² /10 ² /10 ³
	BPC 157 ng (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ³	10 ³ /10 ⁴ /10 ⁴	10 ² /10 ³ /10 ³
3. tjedan	Kontrola (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³	10 ² /10 ³ /10 ⁴	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³	10 ² /10 ³ /10 ³
	BPC 157 µg (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ¹	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³
	BPC 157 ng (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ²	10 ² /10 ³ /10 ³
4. tjedan	Kontrola (min/med/max)	10 ² /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ²	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ² /10 ³ /10 ³	10 ² /10 ² /10 ³
	BPC 157 µg (min/med/max)	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ² /10 ³ /10 ³	10 ² /10 ² /10 ³
	BPC 157 ng (min/med/max)	10 ² /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ² /10 ³ /10 ⁴	10 ¹ /10 ² /10 ³
5. tjedan	Kontrola (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ³ /10 ³ /10 ⁴	10 ¹ /10 ² /10 ⁴	10 ² /10 ² /10 ⁴	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³
	BPC 157 µg (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ³ /10 ³ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ² /10 ² /10 ²	10 ¹ /10 ² /10 ²	10 ² /10 ² /10 ³
	BPC 157 ng (min/med/max)	10 ¹ /10 ¹ /10 ²	10 ³ /10 ³ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ³	10 ¹ /10 ¹ /10 ³	10 ¹ /10 ² /10 ²	10 ¹ /10 ² /10 ³

Nakon brojanja svake bakterijske vrste i prikazivanja rezultata kao CFU/ml primijećeno je kako jedino *R. mucilagenosa* u pojedinim uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 ima maksimalno brojiv broj kolonija od 10⁵. *S. sciuri*, *S. aureus* i *K. pneumoniae* imale su maksimalan broj kolonija od 10⁴ kod kontrolne grupe životinja. Maksimalan broj kolonija kod *L. murinus* i *E. coli* bio je 10³ s podjednakom zastupljenošću i kod tretiranih grupa štakora i kod kontrolne grupe. Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u zastupljenosti kolonija pojedine bakterijske vrste, korišten je Hi-kvadrat test. Testom je utvrđeno da ne postoji značajna statistička razlika između različitih vrsta bakterija.

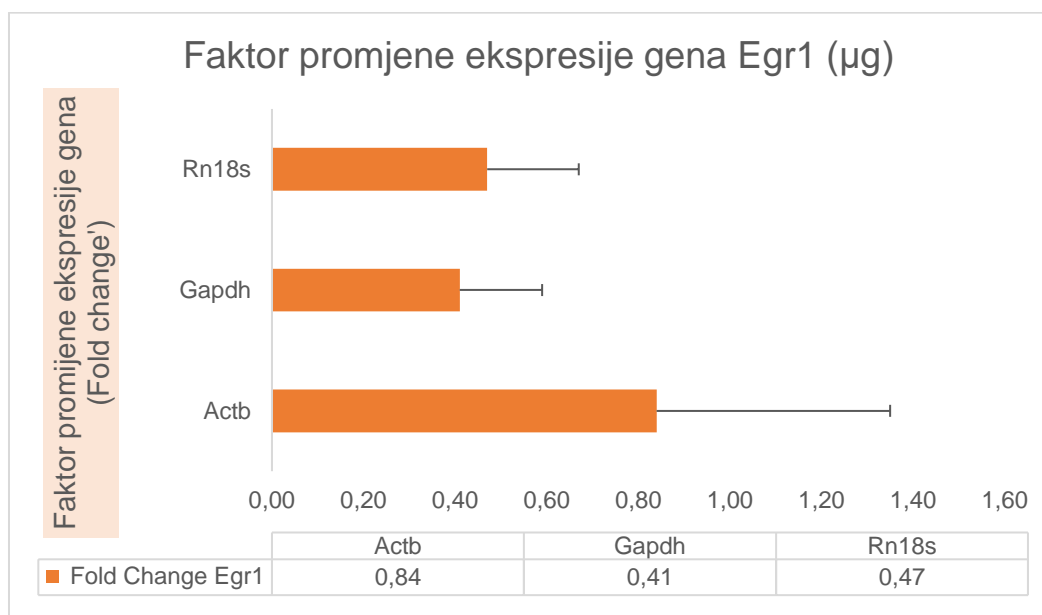
4.4. Ekspresija gena Egr1, Nos2, Nos3 i Ptgs2

Putem RT-qPCR analize gena na razini mRNA ispitani su uzorci tretiranih grupa štakora BPC-om 157 i uspoređeni s kontrolnom grupom, za normalizaciju rezultata korištena su tri gena kao endogena kontrola. Pokazalo se kako pentadekapeptid BPC 157 ima značajan učinak na ekspresiju gena od interesa. Vrijednost faktora promjene ekspresije gena ('Fold Change') >1 znači povećanu ekspresiju gena u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157, dok vrijednost <1 znači smanjenu ekspresiju gena u odnosu na netretiranu, odnosno kontrolnu grupu štakora. Rezultati su prikazani kao median \pm SD.

Razina ekspresije mRNA za Egr1 pokazala je Faktor promjene ekspresije gena <1 u odnosu na sve tri endogene kontrole. Tako kod normalizacije uzorka s Actb genom relativna ekspresija Egr1 gena iznosi $0,90 \pm 0,52$, s Gapdh genom iznosi $0,42 \pm 0,19$, a s Rn18s $0,51 \pm 0,24$ kod grupe štakora koja je tretirana s BPC-om 157 u ng (Slika 13). Vrijednosti razine ekspresije mRNA za gen Egr1 kod grupe štakora tretiranih BPC-om 157 u μg nisu pokazale značajne razlike u odnosu na tretirane BPC-om 157 u ng i iznose $0,84 \pm 0,51$ kod Actb gena, $0,41 \pm 0,18$ kod Gapdh gena i $0,47 \pm 0,20$ kod Rn18s gena (Slika 14).

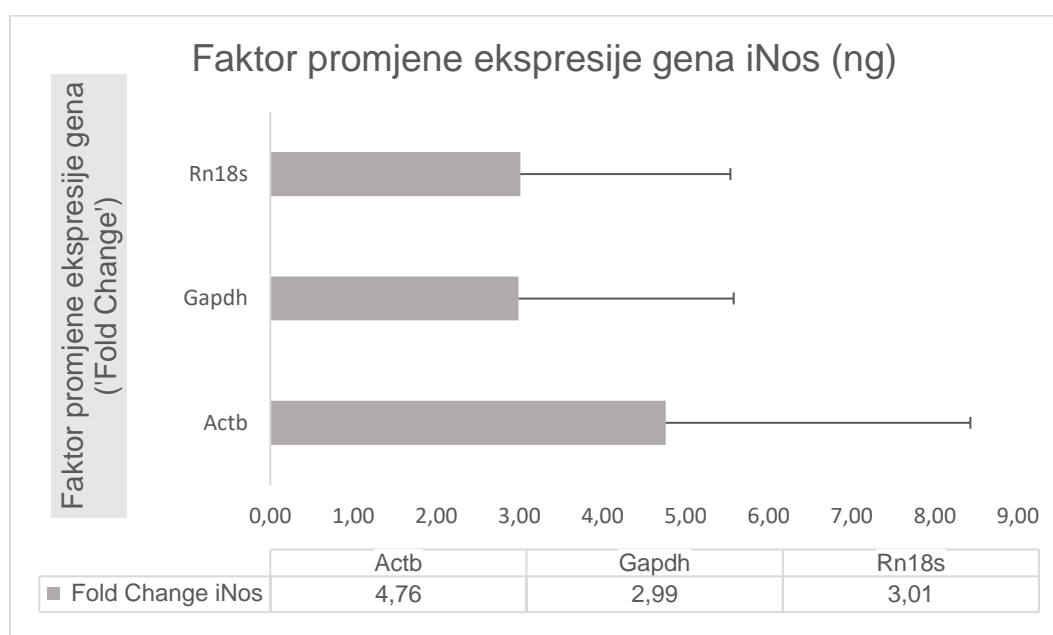


Slika 13. Razlika razine ekspresije gena Egr1 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (ng) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.

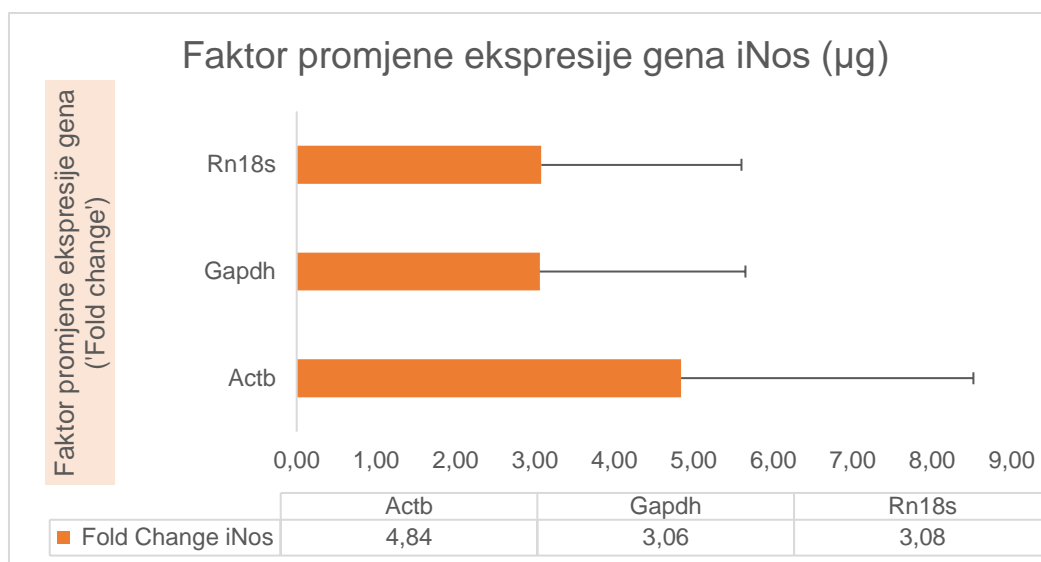


Slika 14. Razlike razine ekspresije gena Egr1 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (μg) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.

Razina ekspresije mRNA za Nos2 pokazala je Faktor promjene ekspresije gena >1 u odnosu na sve tri endogene kontrole. Tako kod normalizacije uzorka s Actb genom relativna ekspresija Nos2 gena iznosi $4,76 \pm 3,67$, s Gapdh genom iznosi $2,99 \pm 2,59$, a s Rn18s $3,01 \pm 2,53$ kod grupe štakora koja je tretirana BPC-om 157 u ng (Slika 15). Vrijednosti razine ekspresije mRNA za gen Nos2 kod grupe štakora tretiranih BPC-om 157 u μg nisu pokazale značajne razlike u odnosu na tretirane BPC-om 157 u ng i iznose $4,84 \pm 3,68$ kod Actb gena, $3,06 \pm 2,59$ kod Gapdh gena i $3,08 \pm 2,52$ kod Rn18s gena (Slika 16).

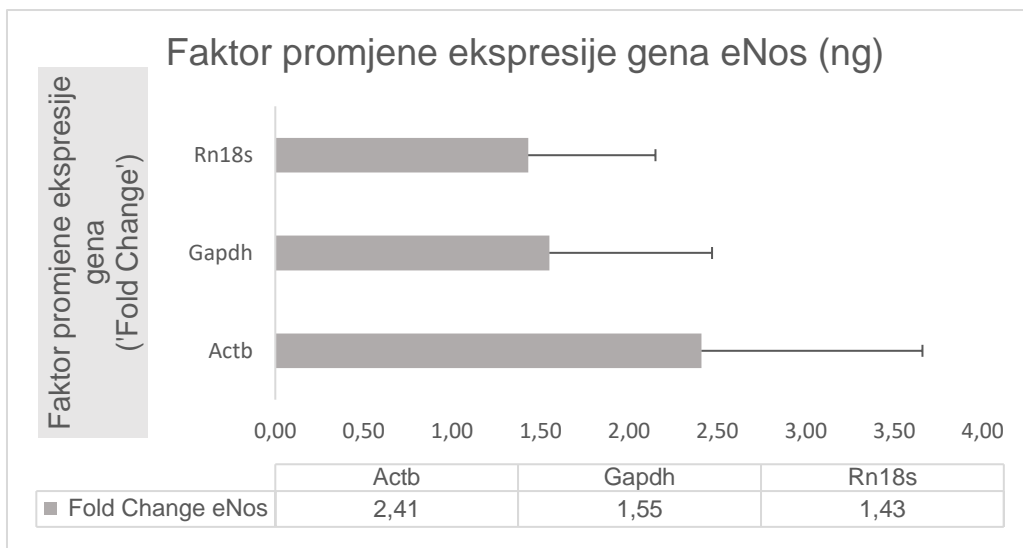


Slika 15. Razlika razine ekspresije gena Nos2 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (ng) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.

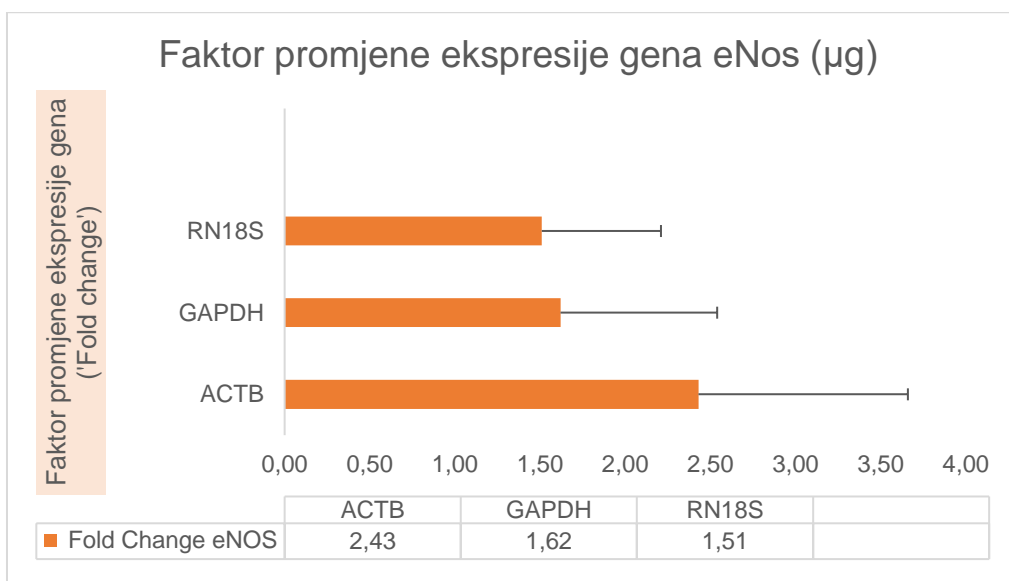


Slika 16. Razlika razine ekspresije gena *Nos2* u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (μg) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median \pm SD.

Razina ekspresije mRNA za *Nos3* pokazala je Faktor promjene ekspresije gena >1 u odnosu na sve tri endogene kontrole. Tako kod normalizacije uzorka s *Actb* genom relativna ekspresija *Nos3* gena iznosi $2,41 \pm 1,25$, s *Gapdh* genom iznosi $1,55 \pm 0,92$, a s *Rn18s* $1,43 \pm 0,72$ kod grupe štakora tretiranih BPC-om 157 u ng (Slika 17). Vrijednosti razine ekspresije mRNA za gen *Nos3* kod grupe štakora tretiranih BPC-om 157 u μg nisu pokazale značajne razlike u odnosu na tretirane BPC-om 157 u ng i iznose $2,43 \pm 1,23$ kod *Actb* gena, $1,62 \pm 0,92$ kod *Gapdh* gena i $1,51 \pm 0,70$ kod *Rn18s* gena (Slika 18).



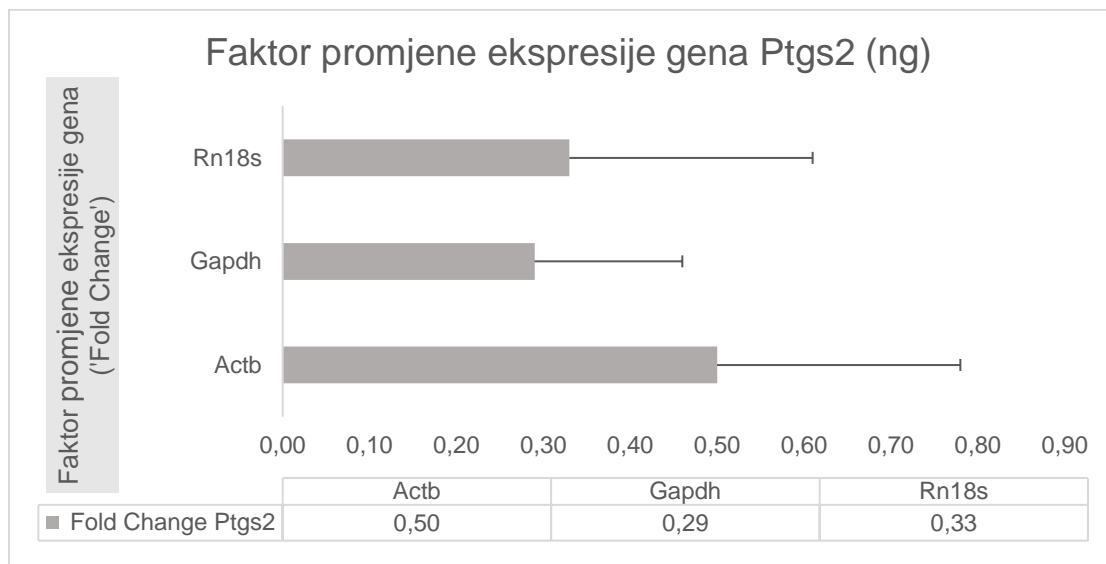
Slika 17. Razlika razine ekspresije gena Nos3 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (ng) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.



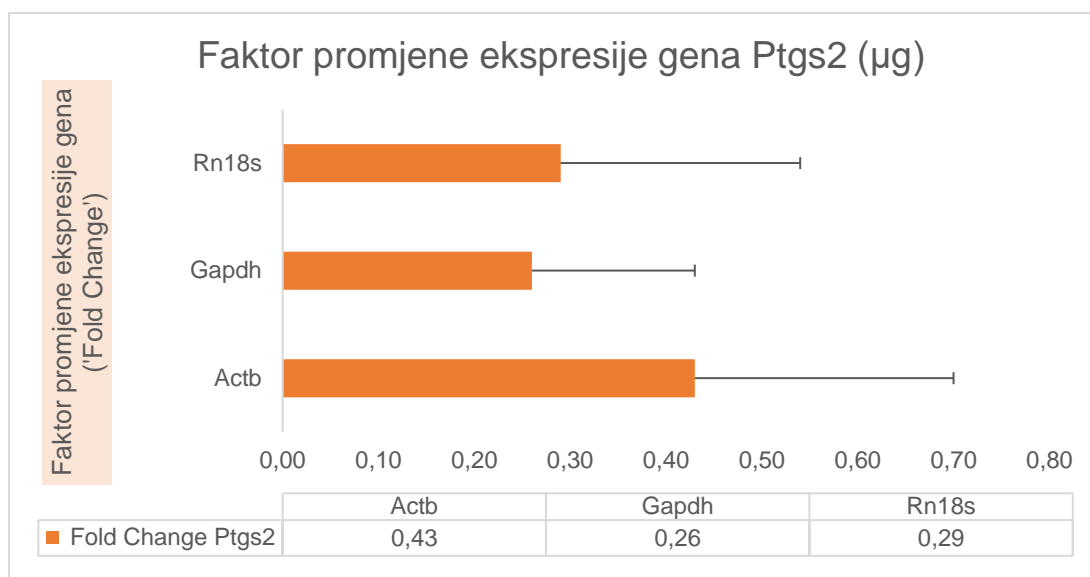
Slika 18. Razlika razine ekspresije gena Nos3 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (μg) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.

Razina ekspresije mRNA za Ptgs2 pokazala je Faktor promjene ekspresije gena <1 u odnosu na sve tri endogene kontrole. Tako kod normalizacije uzorka s Actb genom relativna ekspresija Ptgs2 gena iznosi $0,50 \pm 0,28$, s Gapdh genom iznosi $0,29 \pm 0,17$,

a s Rn18s $0,33 \pm 0,28$ (Slika 19). I u slučaju gena Ptgs2 vrijednosti razine ekspresije kod grupe štakora tretiranih BPC-om 157 u μg u odnosu na tretirane BPC-om 157 u ng nisu pokazale značajne razlike i iznose $0,43 \pm 0,27$ kod Actb gena, $0,26 \pm 0,17$ kod Gapdh gena i $0,29 \pm 0,25$ kod Rn18s gena (Slika 20).



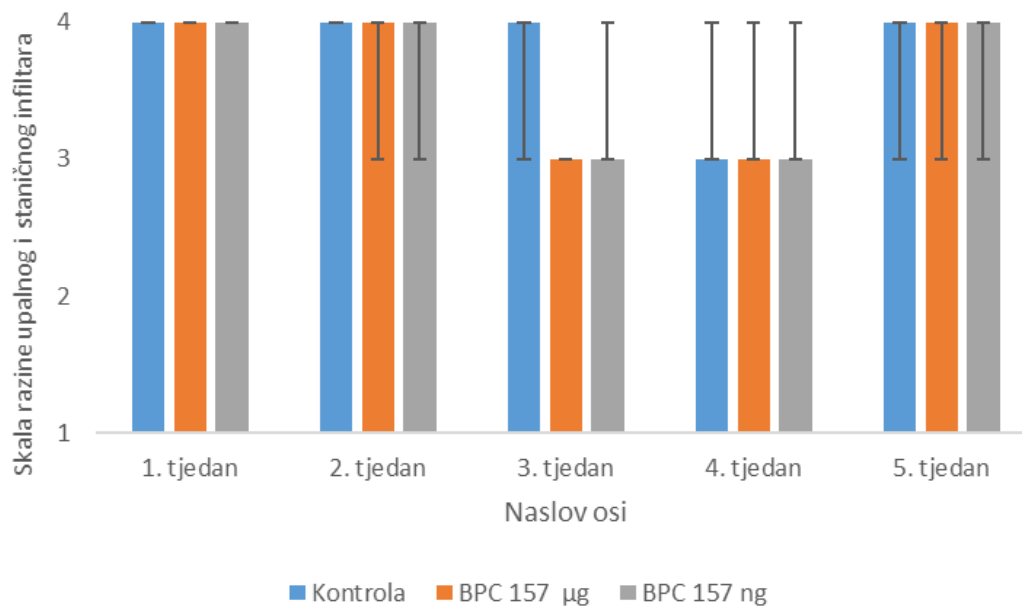
Slika 19. Razlika razine ekspresije gena Ptgs2 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (ng) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.



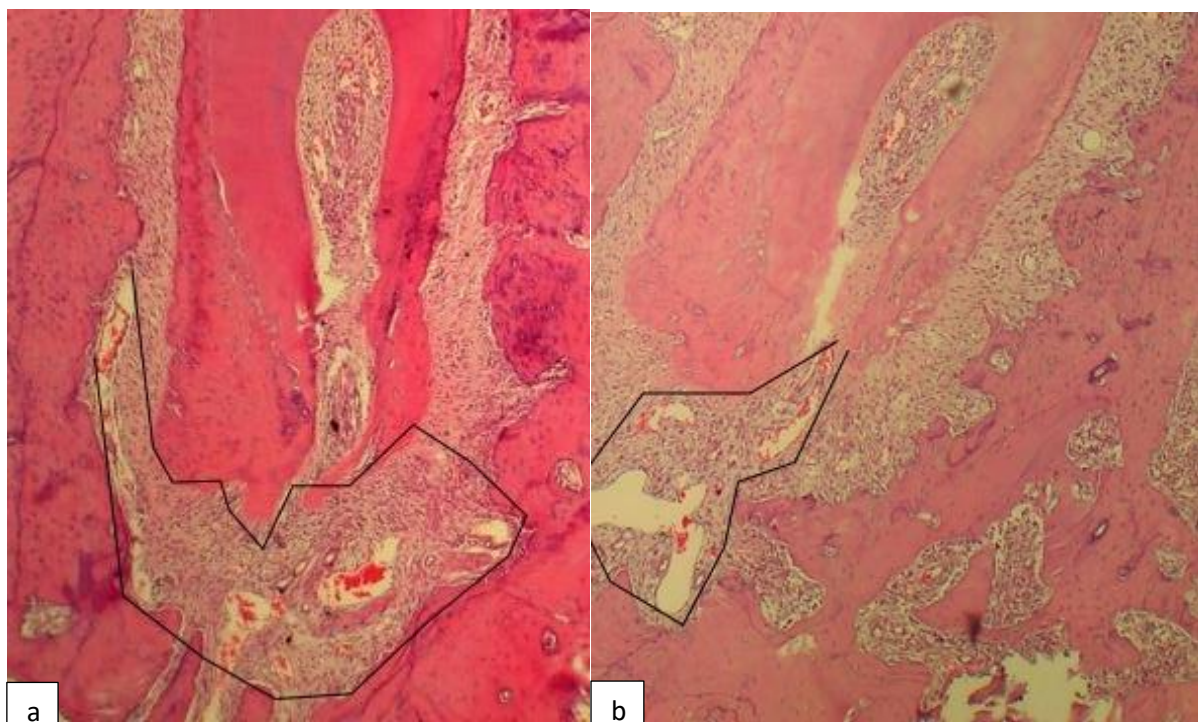
Slika 20. Razlika razine ekspresije gena Ptgs2 u uzorcima štakora tretiranih BPC-om 157 (μg) u odnosu na kontrolu analizirana qRT-PCR metodom. Rezultati su izraženi kao faktor promijene ekspresije gena i prikazani kao median +/- SD.

4.5. Broj krvožilnih prostora i razina inflamatornog i staničnog uzorka

Preparati su pregledani i histološka je analiza napravljena od strane nepristranih istraživača. Utvrđeno je kako u količini inflamatornog i staničnog uzorka u zubnom i parodontnom tkivu tijekom tjedana ne postoje velike razlike kod tretirane grupe štakora pentadekapeptidom BPC 157 u odnosu na kontrolnu grupu štakora. Prema bodovnoj skali najvećim djelom je zastupljena razina upalnog i staničnog uzorka koja odgovara bodu 4, gdje je zastupljeno više od 125 stanica na 1 vidno polje, tek u razdoblju trećega i četvrtoga tjedna količina upalnog infiltrata je nešto diskretnije snižena, no i dalje između 100 do 125 stanica (Slika 21, 22).

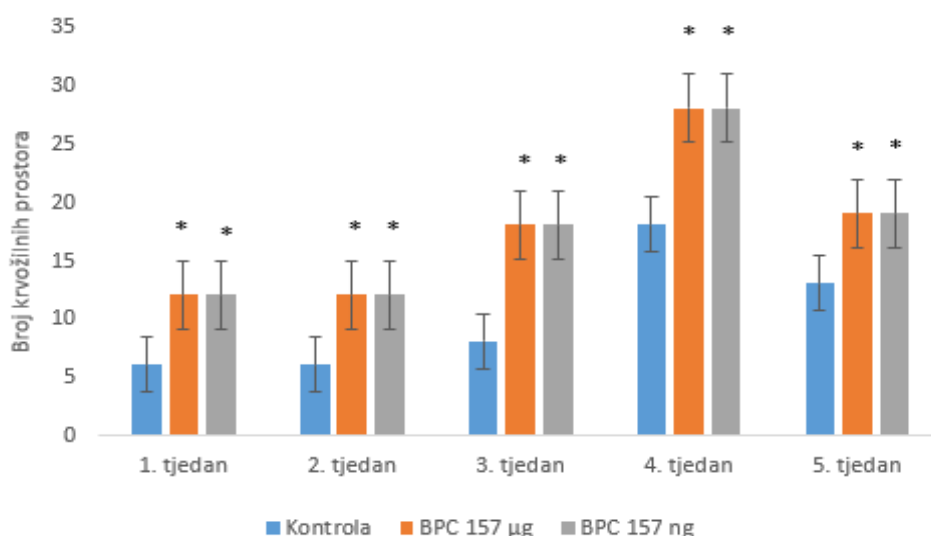


Slika 21. Razina inflamatornog i staničnog uzorka kod grupa štakora tretiranih BPC-om 157 u ng, μg i kontrolne grupe prikazana kao minimum/median/maksimum po tjednima praćenja pokusa

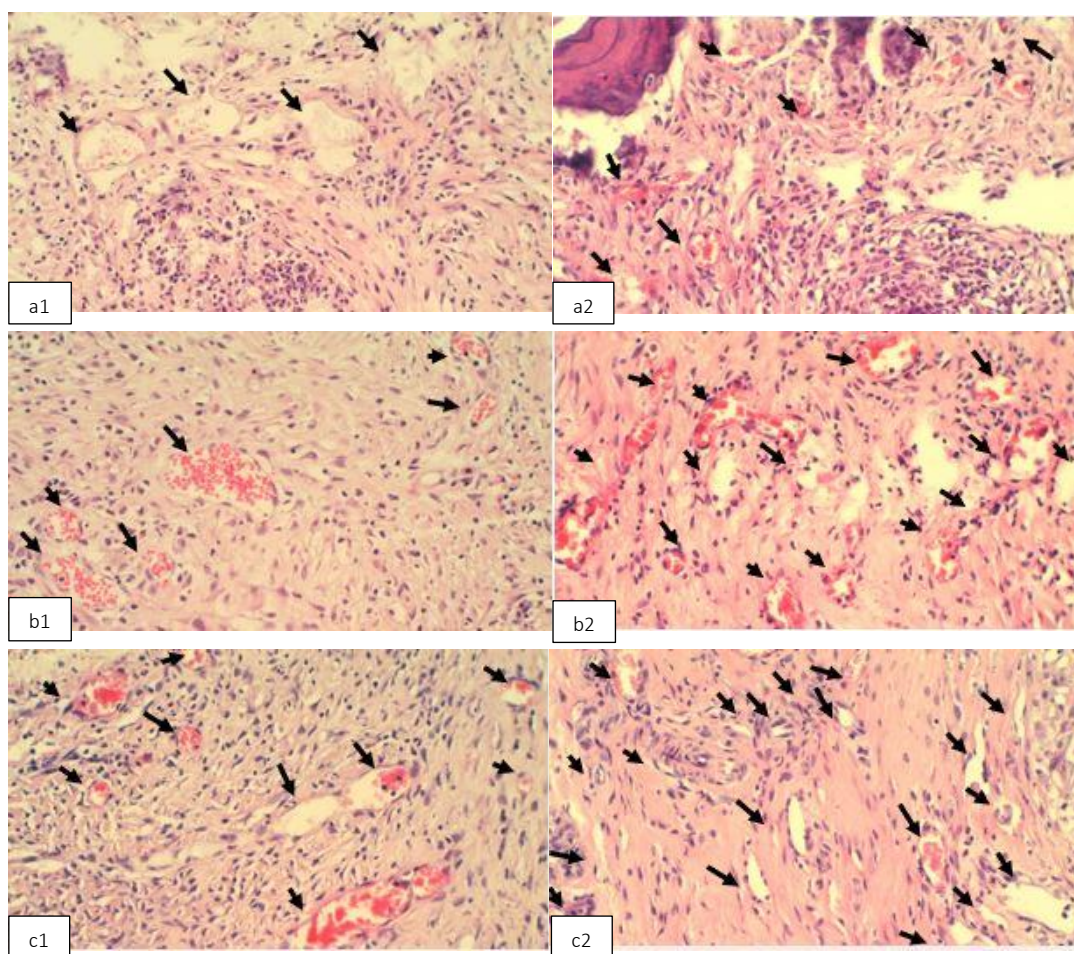


Slika 22. Razina upalnog i staničnog infiltrata kod kontrolne životinja (a) i tretirane (b). Bojanje preparata je hemalaun eozinom, povećanje 100x

Broj krvožilnih prostora mjeren na 2 mm² pokazuje porast novostvorenih krvožilnih prostora u svakoj grupi s najvećim brojem krvnih žila u četvrtom tjednu istraživanja. Tako median vrijednosti u prva dva tjedna za kontrolnu grupu iznosi 6, dok je kod tretiranih grupa ova vrijednost 12 u istom periodu. U trećem tjednu median vrijednosti kod kontrolne grupe je malo porastao i iznosi 8. Median vrijednosti u trećem tjednu kod grupa tretiranih BPC-om 157 u obje doze iznosi 18. U četvrtom tjednu median vrijednosti kod kontrolne grupe jest 18, a kod grupa tretiranih BPC-om 157 ima najveći porast i iznosi 28. U petom tjednu eksperimenta median vrijednosti kod kontrolne grupa je 13, dok je kod tretiranih 19. Vidljiva je statistički značajna razlika u broju krvnih žila između štakora tretiranih BPC-om 157 i kontrolne grupe štakora (Slika 23). Osim toga, vidljiva je razlika između promjera krvnih žila u kontrolnoj i tretiranim grupama. Kod kontrolne grupe krvne žile su većeg promjera, nepravilnog izgleda, dilatirane, ispunjene krvlju dok su u tretiranim grupama štakora krvne žile pravilnije, manjeg lumena, također ispunjeni krvlju. U petom tjednu u grupama životinja tretiranim BPC-om 157 u dozi od 10 µg/kg kao i dozi 10 ng/kg neke krvne žile su već dobro organiziranih mišićnih stjenki (Slika 24). Stoga, ovdje se može raspravljati o većoj brzini protoka kroz krvne žile, a time i utjecaju nutritivne te hemodinamske vrijednosti novostvorenog krvožilnog sustava u leziji.

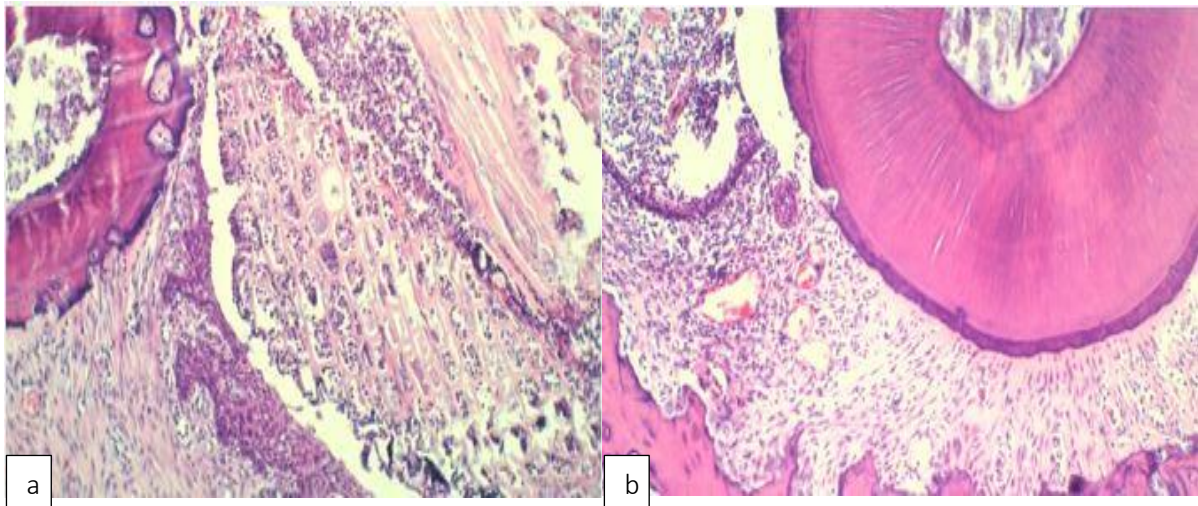


Slika 23. Broj krvožilnih prostora kod grupa štakora tretiranih BPC-om 157 u ng, µg i kontrolne grupe prikazana kao minimum/median/maksimum po tjednima praćenja pokusa. * je označena značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu uz $p < 0.05$.



Slika 24. Krvožilni prostori označeni crnim strijelicama u 3. tjednu (a1 kontrola, a2 tretirani), 4. tjednu (b1 kontrola, b2 tretirani) i 5. tjednu od trepanacije (c1 kontrola, c2 tretirani). Bojanje preparata je hemalaun eozinom, povećanje 400x

Količina stanica kroničnog upalnog infiltrata veća je u kontrolnoj grupi štakora, dok je umnažanje kolagenih vlakana vidljivo od trećeg tjedna u grupama tretiranim pentadekapeptidom BPC 157 organizirano i orijentirano, što nije slučaj u kontroli. U petom tjednu se počinje stvarati kolageno vezivo i kod kontrolne grupe životinja, ali nije orijentirano i organizirano (Slika 25).



Slika 25. Patohistološki prikaz tkiva lezije u 5. tjednu studije kod kontrolne životinje (a) i tretirane (b). Bojanje preparata je hemalaun-eozinom, povećanje 200x

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i pokazuju kako pentadekapeptid BPC 157 apliciran *per os* u vodi za piće smanjuje oštećenja izazvana modelom apikalnog parodontitisa uzrokovanog ekspozicijom pulpe zuba kod štakora. Ovo je prvo istraživanje koje procjenjuje učinak BPC-a 157 na cijeljenje nakon otvaranja pulpe zuba i indukcije lezije u periapeksu.

Štakori su korišteni kao eksperimentalni model jer su istraživanja pokazala kako su oralna bakterijska mikroflora i apikalni odgovor na izloženost pulpe slični onima kod ljudi [136,170]. Apikalni parodontitis izazvan je izlaganjem pulpe štakorskih molara u oralnu okolinu omogućujući tako infekciju pulpnog tkiva, razvoj nekroze pulpe i kasnije nastanak lezije u periapikalnom dijelu [134–142]. Kako bi se obuhvatio cijeli period od početne infekcije pulpe do nastanka i širenja apikalnog parodontitisa te njegovoga prelaska u kroničnu fazu, odabrani su vremenski intervali od prvoga do petoga tjedna nakon otvaranja zuba. Prijašnja su istraživanja pokazala kako je razdoblje od 30 dana potrebno za razvoj kroničnog apikalnog parodontitisa [110,136,171].

Anatomski položaj kutnjaka posteriorno od velike dijasteme, koja ih odvaja od sjekutića, otežava pristup području liječenja kod štakora. Meka tkiva, poput jezika i obraza, također mogu značajno smanjiti vizualni pristup operativnom području. Stoga, pravilan položaj glave i potpuna relaksacija životinje kroz duboku anesteziju omogućavaju izvođenje pokusa na kutnjacima. Mala veličina zuba zahtijeva upotrebu prikladnih malih instrumenata, tj. etički je dopušteno koristiti samo svrdla maksimalne veličine od ISO 008 [172].

Pucanje avitalnih zuba u nekom trenutku nakon liječenja korijenskih kanala uočeno je još davno. Jedno od prvih istraživanja uzroka ove kliničke manifestacije endodontski tretiranih zubi napravljeno je 1972. godine na Bostonskom Sveučilištu [173]. Dentin se sastoji od tekućinom ispunjenih dentinskih tubulusa i hidratiziranog matriksa. Istraživanja su pokazala da se od ukupne tekućine u dentinu 75,2% vode nalazi u dentinskim tubulusima, a 24,8% u mineraliziranom matriksu [174,175]. Postoje dvije vrste vode u dentinu, jedna vrsta je vezana voda (~70%), a druga vrsta je nevezana ili slobodna voda (~30%). Vezana voda je kemijski vezana za frakciju hidroksiapatita i kolagena dentina i može se znatnije ukloniti samo zagrijavanjem na 600 °C. S druge strane, nevezana voda može se ukloniti izlaganjem dentina uvjetima okoline usta i

gubitkom vitaliteta zuba [174–176]. Tako je istraživanje na psima iz 1972. godine pokazalo 9% manje vode kod zuba nakon gubitka vitaliteta u usporedbi s vitalnim zubima [173]. Brojna istraživanja nakon toga pokazala su kako je dehidrirani dentin smanjene žilavosti i veće sklonosti pucanju [176–179]. U ovoj eksperimentalnoj studiji, također, redovitim makroskopskim promatranjem zuba pod povećanjem primijećeno je pojačano pucanje preostalog zubnog tkiva oko trepanacijskog otvora kod kontrolne grupe štakora u usporedbi s tretiranim grupama.

Skupina autora sa Sveučilišta u Budimpešti 2009. godine istraživala je učinak pentadekapeptida BPC 157 na modelu parodontitisa izazvanog žičanim ligaturama oko cervikalnog dijela zuba na mandibularnim molarima štakora. U rezultatima su prikazali učinak BPC-a 157 na smanjenje gubitka alveolarne kosti mjereno od caklinsko-cementnog spojišta do ruba krestalne kosti. Usporedbom radioloških nalaza ligaturom izazvanog gubitka kosti kontrolne i tretirane skupine pokazano je značajno smanjenje koštanog defekta kod tretirane skupine i to na sve četiri mjerene lokacije (bukalna strana zuba, mezijalna, meziolingvalna i lingvalna) [55]. Model apikalnog parodontitisa izazvanog otvaranjem pulpe zuba i njenog izlaganja uvjetima usne šupljine u ovom pokusu pokazao je vrlo slične rezultate. Resorpcija kosti oko apeksa mezijalnog korijena maksilarnog molara osjetno je veća u svim etapama pokusa kod kontrolne grupe životinja.

U ovom istraživanju čiste bakterijske kulture podvrgnute su molekularnoj identifikaciji pomoću MALDI TOF analize. MALDI TOF radi na principu identifikacije proteinskog profila mikroorganizma koji je jedinstven za određenu mikrobnu vrstu. Brza i precizna karakterizacija mikroorganizma te jednostavna primjena dovele su do široke primjene ovog uređaja u raznim područjima i alternativa je konvencionalnim laboratorijskim biokemijskim i molekularnim identifikacijskim sustavima [180,181].

Identificirane vrste mogu se klasificirati kao oportunistički patogeni koji u za njih povoljnim uvjetima prelaze u patogene te mogu izazvati lokalne ili sistemske infekcije. Tako je *L. murinus* široko rasprostranjen u okolišu i pripada normalnoj flori crijeva, urogenitalnog trakta i usta. Unatoč reputaciji laktobacila kao korisnih mikroorganizama, oni mogu biti uključeni u ozbiljne infekcije, osobito kod osoba oslabljenog imuniteta. Posebno su povezani s uznapredovanim karijesom zuba, gdje se smatraju sekundarnim kolonizatorima zbog sklonosti okruženju s niskim pH, ali najčešće igraju važnu ulogu u pogoršanju postojećih lezija. Mogu uzrokovati bakterijemiju i

endokarditis, s povezanom relativno visokom stopom smrtnosti, s ustima kao primarnim putem ulaska u krvotok [182]. Sljedeće identificirane vrste su *S. aureus* i *S. sciuri*. *S. aureus* i njegov značaj u razvoju infekcija dobro je poznat. Važan je patogen i u usnoj šupljini, njegova sposobnost stvaranja biofilma može djelovati kao rezervoar za oralne infekcije i većinom je povezan s uznapredovanim slučajevima parodontitisa, gdje destrukcija kosti i mekog tkiva slabo reagira na terapiju [183]. *S. sciuri* fakultativni je patogen za kojeg se pokazalo da može uzrokovati invazivne bolesti kod životinja i ljudi. Dokazano je kako *S. sciuri* posjeduje širok spektar čimbenika virulencije kao što su lipolitičke, proteolitičke ili hemolitičke aktivnosti slične onima drugih stafilokoka uključenih u patogene procese kao što je *S. aureus*. Istraživanja pokazuju mogućnost sticanja različitih čimbenika virulencije od drugih stafilokoka horizontalnim prijenosom gena koji bi mogli dodatno ojačati patogeni potencijal ove bakterije [184]. *R. mucilagenosa* je bakterija normalno prisutna u usnoj šupljini. Poznato je da proizvodi ljepljivu, mukoidnu tvar koja joj pomaže u prijanjanju na oralne površine. Iako je *R. mucilagenosa* normalan dio mikrobioma usne šupljine, povezuje ju se s raznim vrstama infekcija, uključujući endokarditis, bakterijemiju i upalu pluća, osobito kod osoba oslabljenog imuniteta. Povezana je i s razvojem karijesa zuba te parodontnom bolesti [185]. Izolirane *E. coli* i *K. pneumoniae* su također bakterije koje se tipično mogu naći na sluznicama. Usna šupljina može sadržavati širok raspon tih vrsta mikroorganizama, ali ako dođe do bolesti i neravnoteže kod domaćina, bakterije mogu ući u sustav i izazvati ili pogoršati bolest [186].

Iste bakterijske vrste pronađene su kod grupa štakora tretiranih BPC-om u dozi od 10 ng/kg i dozi od 10 µg/kg, kao i kod kontrolne grupe. Statistički značajne razlike nije bilo ni u broju kolonija kod kontrolne grupe u odnosu na tretirane štakore.

Kvantitativna lančana reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu visoko je precizna metoda za analizu razine ekspresije gena. Za reakciju su potrebne male količine glasničke RNA (*engl. Messenger RNA, mRNA*) što je čini prikladnom kada je dostupna mala količina tkiva za analizu [187], kao što je bio slučaj u ovom istraživanju. Zbog smanjenja rizika od pogreške u analizi i usporedbi uzoraka korišteni su *housekeeping geni*. Mogu se definirati kao oni koji su stabilno izraženi u svim stanicama i uvjetima, esencijalni, pripadaju staničnim putevima održavanja i moraju biti očuvani. Također, mogu se definirati kao minimalni skup gena potrebnih za održavanje života. Na praktičnoj razini oni se mogu definirati kao stabilno eksprimirani geni u svim stanicama

organizma bez obzira na vrstu tkiva, razvojni stupanj, stanje staničnog ciklusa ili vanjski signal te kao markeri zdravog biološkog stanja organizma [188]. Međutim, istraživanja su pokazala kako njihova razina transkripcije ipak varira ovisno o vrsti jedinke, kod različitih vrsta stanica, u različitim razvojnim fazama i, što je ovdje najvažnije, pod različitim eksperimentalnim uvjetima [189]. Iz navedenih su razloga uz gen ACTB, kao endogene kontrole pridodani i geni GAPDH i RN18S. Ta tri gena najčešće su korištene endogene kontrole [189]. U ovom su se istraživanju geni eksprimirali podjednako u odnosu na sva tri gena endogene kontrole. Odnosno, razina ekspresije mRNA za gene Egr1 i Ptgs2 bila je <1 , a za gene Nos2 i Nos3 >1 kod svih endogenih kontrola.

Brojna istraživanja pratila su ekspresiju gena u određenim eksperimentalnim uvjetima i njihove promjene prilikom primjene BPC-a 157 [7,19,41,48,73,80,190,191]. Kod istraživanja ekspresije mRNA (Cox2, VEGF-a, Nos1, Nos2, Nos3, Nkap) nakon perforiracije želuca i nastanka lezije utvrđena je specifična genska podudarnost za taj model. Prvo je bio povišen Nos2 i smanjen VEGF-a, zatim povišeni Cox2, Nos1, Nos2, Nos3, na kraju je ekspresija Nos3 bila smanjena [192]. Uvidom u djelovanje kroz NO sustav uočava se visok učinak NO iz iNOS-a koji djeluje na antimikrobne, antivirusne, antiparazitske i tumoricidne procese i citotoksični učinak NO uključen u imunološko djelovanje koje oštećuje tkivo [192,193].

Dosadašnje su studije pokazale različite rezultate o utjecaju BPC-a 157 na ekspresiju gena. Tako se na primjeru ekspresije eNos gena mogu pronaći istraživanja koja pokazuju pojačanu ekspresiju toga gena djelovanjem BPC-a 157 [41,190], a neka druga pak umanjenu ekspresiju istoga gena [19]. To se događa zbog složene interakcije pentadekapeptida BPC 157 s agonistima i antagonistima NO sustava (L-arginin i L-NAME). Kompleksna kretanja u signalnim putevima i interakcije određenih gena, tj. njihovih proteinskih elemenata, komplicira jasno određivanje mehanizama funkcioniranja BPC-a 157. Iz do sada navedenog, a ovim radom potvrđenoga, zaključuje se kako BPC 157 ima mogućnost regulacije NO sustava i ekspresije drugih gena ovisno o sistemske situaciji, domaćinu i brojnim drugim parametrima, a s ishodom cijeljenja. Rezultati odražavaju mRNA razine za određene gene pa su moguća ograničenja jer možda nisu u korelaciji s razinama proteina [194], međutim istraživanje pokazuje način na koji BPC 157 može djelovati pozitivno na modelu apikalnog parodontitisa kroz NO i prostaglandin sustav te stoga ostavlja mogućnost daljnje analize proteina.

Istraživanja BPC-a 157 pokazala su poseban vaskularni učinak na zaštitu epitela i endotela, aktivaciju kolateralnih puteva [32,34,200–203,40,41,190,195–199], što može proizaći iz izvornih citoprotektivnih dokaza o BPC-u 157[5,11,38]. Začetnici koncepta o citoprotekciji, pretežno usmjereni na želučanu citoprotekciju, su Robert (izravna zaštita epitelnih stanica) i Szabo (izravna zaštita endotelne stanice) koji su u svojim istraživanjima ustanovili da nakon oštećenja želuca dolazi do maksimuma održavanja endotela → održavanja epitela brzo po ozljedi, brzi obrambeni odgovor, vaskularna ozljeda unutar manje od 1 minute, tromba i staza [204,205]. S obzirom na to da se konceptualni Robertov i Szabov odnos želučane citoprotekcije prenosi i na zaštitu drugih tkiva (Robertova i Szabova organozaštita), BPC 157, kao peptidgerički agens koji je nativan i nema razgradnju u ljudskom želučanom soku i stabilan je za više od 24 sata, konceptualno se pojavljuje kao novi medijator citoprotekcije s posebnim citoprotektivnim sposobnostima, koje se učinkovito prevode u pleiotropske korisne učinke [5,11,38]. Sa selektivnim učinkom na oštećenje epitelnoga i još većega oštećenja endotelne stanice (održavajući integritet i epitela i endotela) bio je vrlo siguran i nije bilo nuspojava u pretkliničkim ispitivanjima. Stoga, općenito uzevši, s obzirom na njegovu jednostavnu primjenjivost (uključujući putem terapijskog režima *per os*), terapija BPC-om 157 dovodi do toga da nadograđena manja krvna žila preuzima funkciju oštećene velike krvne žile kako bi nadoknadila i ponovno uspostavila reorganizirani protok krvi [32,34,203,40,41,190,196,198,200–202], što se događa kao oporavak funkcije endotela. Stoga postoji nada da bi ovaj poseban učinak vaskularnog oporavka s terapijom pentadekapeptidom BPC 157 konačno mogao uvesti u praksu veliku teoretsku važnost citoprotektivnih sredstava (tj. selektivnost za oštećeni epitel i/ili selektivnost za oštećeni endotel). U slučaju stabilnog želučanog pentadekapeptida BPC 157 selektivnost i za oštećeni epitel i za oštećeni endotel mogla bi brzo aktivirati maksimum citoprotekcije održavanje endotela → održavanje epitela, čineći BPC 157 *zaobilaznim ključem* sposobnim ostvariti sve aspekte koncepta citoprotektivne terapije [10,11,38,73,206–208].

Navedeno potvrđuje i primjer istraživanje na modelu ishemije stražnjih udova štakora koji je induciran kirurškim putem uklanjanjem femoralne arterije, što je rezultiralo potpunim gubitkom opskrbe krvlju [194]. Učinak BPC-a 157 na obnavljanje perfuzije krvi primijećen je unutar tjedan dana jasno ukazujući na izražen učinak BPC-a 157 na poticanje angiogeneze povećavanjem brojnosti i gustoće novonastalih krvnih žila.

Nadalje je istraživano može li internalizacija Vegfr2 izazvana BPC-om 157 aktivirati VEGFR2-AKT-eNOS signalni put, ekspresiju proteina Vegfr2, Akt, eNos, a njihovi fosforilirani oblicu analizirani su *western blotom*. Rezultati su pokazali fosforilaciju Vegfr2 ubrzo nakon dodavanja BPC-a 157 koja je dosegla vrhunac nakon 15 minuta, nakon čega je uslijedila fosforilacija Akt i eNos nakon 30 minuta. Ovo je istraživanje također pokazalo da terapija BPC-om 157 ima proangiogeni učinak i sprječava ishemiju organa i tkiva te potiče angiogenezu djelovanjem na ekspresiju određenih proteina i signalne puteve, ovdje aktivacijom Vegfr2-Akt-eNos signalnog puta [194]. NO sustav ima bitnu funkciju u kontroli upale jer se može ponašati dvojno, većinom se kod patoloških poremećaja ponaša kao prouupalni čimbenik, dok u normalnom stanju organizma ima protuupalne efekte [209].

Temelj adaptivnoga koncepta citoprotekcije prikazana je na modelu intra-(per)-oralne i direktne intragastrične administracije alkohola kod štakora. U ovom modelu prikazano je kako su lezije želuca manje nakon prethodne primjene alkohola intra-(per)-oralno [210]. O adaptivnoj citoprotekciji može se govoriti i u ovom istraživanju s obzirom na peroralnu primjenu BPC-a 157. Kako je lezija izazvana trepanacijom zuba, a primjena terapijskog agensa kroz usta početak djelovanja je, uzimajući u obzir mehanizme adaptivne citoprotekcije, na mjestu ozljede pulpe, a nastavak sistemno.

Angiogeneza, tj. stvaranje novih krvnih žila je temelj citoprotekcije. Ona igra ključnu ulogu i u patogenezi i procesu cijeljenja apikalnog parodontitisa. Neophodna je za cijeljenje jer pomaže u dopremi kisika, hranjivih tvari i imunoloških stanica do lezije. Također pomaže u stvaranju granulacijskog tkiva, što je ključna komponenta procesa zacjeljivanja [89,211].

Proces angiogeneze uključuje nekoliko koraka. Prvo se javlja vazodilatacija kao odgovor na upalne medijatore, krvne žile u periapeksnoj regiji se šire povećavajući protok krvi u tom području [212]. Aktivirane endotelne stanice koje oblažu krvne žile prolaze kroz promjene, postaju propusnije i dopuštaju ekstravazaciju proteina plazme i imunoloških stanica. Endotelne stanice počinju migrirati prema izvoru upale, vođene kemotaktičkim signalima. Nakon što dođu do ciljnog područja, proliferiraju stvarajući nove krvne žile, organiziraju se u cjevaste strukture stvarajući nove kapilarne mreže koje se protežu u upaljeno tkivo. Novoformirane krvne žile prolaze sazrijevaju i stabiliziraju se organizacijom mišićnih stijenki oko njih. Taj proces osigurava strukturni integritet krvnih žila [213].

Upalni odgovor u zubnom i parodontnom tkivu tijekom apikalnog parodontitisa uključuje složeno međudjelovanje različitih vrsta stanica i signalnih puteva.

Na staničnoj razini apikalni parodontitis određuje infiltracija različitih imunoloških stanica uključujući neutrofile, makrofage i limfocite. Te se stanice regrutiraju na mjesto infekcije kao odgovor na upalne signale koje oslobađa tkivo lezije. Neutrofili su među prvim stanicama koje stižu na mjesto infekcije, gdje imaju ključnu ulogu u fagocitozi bakterija te oslobađanju citokina i kemokina koji privlače druge imunološke stanice na područje lezije. Makrofagi su, s druge strane, odgovorni za uklanjanje mrtvih stanica i nekrotičnih ostataka te potiču obnovu tkiva oslobađajući faktore rasta i citokine. Limfociti, posebno T-stanice, također su uključeni u upalni odgovor kod apikalnog parodontitisa. Oni imaju ključnu ulogu u koordinaciji imunološkog odgovora i proizvodnji citokina koji dodatno potiču imunološke stanice na reakciju [89].

Osim imunoloških stanica druge vrste stanica, poput fibroblasta i osteoblasta, također imaju ulogu u apikalnom parodontitisu. Fibroblasti sudjeluju u oblikovanju granulacijskog tkiva koje je obilježje procesa zacjeljivanja kod apikalnog parodontitisa. Osteoblasti su, s druge strane, odgovorni za formiranje kosti i njezinu obnovu, što je ključno za cijeljenje i obnovu normalne funkcije zuba [214].

Dokazano je kako BPC 157 može poticati angiogenezu, odnosno formiranje novih krvnih žila. Potiče rast novih krvnih žila u oštećenim tkivima, poboljšavajući protok krvi i osiguravajući potrebne hranjive tvari i kisik za potporu zacjeljivanju tkiva [48,194,215]. Može povećati i sintezu kolagena, ključnog sastojka vezivnog tkiva. Povećana proizvodnja kolagena može pomoći u zacjeljivanju rana, obnovi tkiva i stvaranju novih krvnih žila [5,73]. Dokazano ima protuupalna svojstva. Može pomoći u smanjenju upale u ozlijeđenim tkivima, što doprinosi procesu zacjeljivanja [73]. BPC 157 je pokazao zaštitne učinke na endotelne stanice koje oblažu krvne žile te tako može pomoći u očuvanju cjelovitosti endotelnih stanica, sprečavanju endotelne disfunkcije i održavanju pravilne vaskularne funkcije tijekom upale [10]. Također, utječe na funkciju fibroblasta koji su važni za zacjeljivanje rana i obnovu tkiva. Može potaknuti migraciju fibroblasta na mjesto ozljede, poboljšati sintezu kolagena i olakšati obnovu tkiva [191]. Pokazan je i njegov utjecaj na proizvodnju dušikovog oksida, molekule koja sudjeluje u regulaciji vaskularnog tonusa i smanjenju upale. Promicanjem sinteze NO-a, može pomoći u moduliranju upalnog odgovora, što također pridonosi poboljšanju zacjeljivanja tkiva [38].

Rezultati ovog istraživanja pokazali su pojačan inflamatorni i stanični uzorak u svim periodima i kod svih grupa životinja. S obzirom da se promatrao uzorak i u pulpnom i parodontnom tkivu i bod 4 je bio >125 stanica, a iz svega navedenog, rezultati su u skladu s prethodno opisanim staničnim uzorkom koji se pojavljuje u ovom modelu. Ova studija ostavlja prostor za buduća istraživanja u kojima bi se stanični infiltrat mogao specificirati i promatrati odvojeno u odnosu na pulpno i parodontno tkivo. Statistički značajna razlika u broju krvožilnih prostora kod grupa životinja tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 u obje terapijske doze odgovara svim navedenim dosadašnjim istraživanjima koja su pokazala angiogeni potencijal BPC-a 157.

Statistički značajne razlike između tretirane grupe BPC-om 157 u dozi od 10 µg/kg i dozi od 10 ng/kg, kao i u dosadašnjim istraživanjima, nije bilo [191,210].

Inflamatorni i stanični uzorci u zubnim i parodontnim tkivima tijekom apikalnog parodontitisa uključuju složene međudnose između imunoloških stanica, upalnih medijatora, angiogeneze i procesa remodeliranja tkiva. Razumijevanje tih obrazaca ključno je za dijagnosticiranje, kao i za razvoj ciljane terapije za promicanje pravilnog cijeljenja.

Kronični apikalni parodontitis s nekrozom pulpe i infekcijom koja se proširila u apikalna tkiva predstavlja veliki izazov u liječenju zuba i njegovoga očuvanja u ustima. Histopatološka, molekularna i radiološka analiza u ovom istraživanju potvrdile su učinkovitost eksperimentalnog protokola korištenoga za indukciju periapikalne lezije. Pozitivan učinak nakon primjene pentadekapeptida BPC 157 otvara mogućnosti za daljnja istraživanja i novi pristup u liječenju apikalnoga parodontitisa.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i dokazuju da aplikacija pentadekapeptida BPC 157 kod apikalnog parodontitisa uzrokovanog ekspozicijom pulpe zuba štakora smanjuje oštećenje u periapikalnom dijelu.

1. Lezija pulpe i periapikalnog tkiva kod štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 manja je u odnosu na kontrolnu grupu.
2. Promjena puta ekspresije gena uzorka tretiranih grupa pentadekapeptidom BPC 157 u odnosu na uzorke kontrolne grupe štakora pokazala je ekspresiju mRNA za gene Egr1 i Ptgs2 je <1 , a za gene Nos2 i Nos3 >1 .
3. Kod štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157 i kontrolne grupe nema razlike u broju i vrsti mikroorganizama.

7. LITERATURA

- [1] P. Sikiric, M. Petek, R. Rucman, S. Seiwert, Z. Grabarevic, I. Rotkvic, B. Turkovic, V. Jagic, B. Mildner, M. Duvnjak, N. Lang, Z. Danilovic, A. Cviko, M. Kolega, A. Sallmani, S. Djacic, M. Bura, T. Brkic, M. Banic, M. Dodig, V. Coric, V. Simicevic, M. Veljaca, D. Erceg, D. Jezek, L.J. Simunic-Banek, N. Skroza, K. Bulic, G. Buljat, M. Hanzevacki, V. Orihovac, D. Lucinger, J. Culig, J. Separovic, A. Marovic, S. Mise, E. Suchanek, W. Matoz, D. Perovic, M. Gjurasin, S. Mikulandra, K. Dernikovic, V. Cuk, I. Karakas, A new gastric juice peptide, BPC. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC, *J. Physiol. Paris.* 87 (1993) 313–327. [https://doi.org/10.1016/0928-4257\(93\)90038-U](https://doi.org/10.1016/0928-4257(93)90038-U).
- [2] P. Sikiric, S. Seiwert, Z. Grabarevic, M. Petek, R. Rucman, B. Turkovic, I. Rotkvic, V. Jagic, M. Duvnjak, S. Mise, S. Djacic, J. Separovic, M. Veljaca, A. Sallmani, M. Banic, T. Brkic, 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.* 54 (1994). [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00796-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00796-9).
- [3] P. Sikiric, S. Seiwert, Z. Grabarevic, R. Rucman, M. Petek, V. Jagic, B. Turkovic, I. Rotkvic, S. Mise, I. Zoricic, L. Jurina, P. Konjevoda, M. Hanzevacki, D. Ljubanovic, J. Separovic, M. Gjurasin, M. Bratulic, B. Artukovic, N. Jelovac, G. Buljat, Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats, *Dig. Dis. Sci.* 41 (1996) 1518–1526. <https://doi.org/10.1007/BF02088582>.
- [4] P. Sikiric, S. Seiwert, Z. Grabarevic, R. Rucman, M. Petek, V. Jagic, B. Turkovic, I. Rotkvic, S. Mise, I. Zoricic, P. Konjevoda, D. Perovic, L. Jurina, J. Separovic, M. Hanzevacki, B. Artukovic, M. Bratulic, M. Tisljar, M. Gjurasin, P. Miklić, D. Stancic-Rokotov, Z. Slobodnjak, N. Jelovac, A. Marovic, 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.* 332 (1997) 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01033-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01033-9).
- [5] S. Seiwert, P. Sikiric, Z. Grabarevic, I. Zoricic, M. Hanzevacki, D. Ljubanovic,

- V. Coric, P. Konjevoda, M. Petek, R. Rucman, B. Turkovic, D. Perovic, D. Mikus, S. Jandrijevic, M. Medvidovic, T. Tadic, B. Romac, J. Kos, J. Peric, Z. Kolega, BPC 157's effect on healing, *J. Physiol. Paris.* 91 (1997) 173–178. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(97\)89480-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(97)89480-6).
- [6] P. Sikiric, S. Seiwert, R. Rucman, B. Turkovic, D. Stancic Rokotov, L. Brcic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, D. Drmic, S. Ilic, D. Kolenc, G. Aralica, H. Safic, J. Suran, D. Rak, S. Dzidic, H. Vrcic, B. Sebecic, Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 76–83. <https://doi.org/10.2174/13816128130111>.
- [7] P. Sikiric, S. Seiwert, R. Rucman, B. Turkovic, D. Stancic Rokotov, L. Brcic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, D. Drmic, S. Ilic, D. Kolenc, G. Aralica, M. Stupnisek, J. Suran, I. Barisic, S. Dzidic, H. Vrcic, B. Sebecic, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157-NO-system Relation, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 1126–1135. <https://doi.org/10.2174/13816128113190990411>.
- [8] P. Sikiric, S. Seiwert, R. Rucman, B. Turkovic, D. Stancic Rokotov, L. Brcic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, D. Drmic, S. Ilic, D. Kolenc, H. Vrcic, B. Sebecic, Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 1612–1632. <https://doi.org/10.2174/138161211796196954>.
- [9] P. Sikiric, S. Seiwert, R. Rucman, B. Turkovic, D. Stancic Rokotov, L. Brcic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, D. Drmic, S. Ilic, D. Kolenc, V. Stambolija, Z. Zoricic, H. Vrcic, B. Sebecic, Focus on Ulcerative Colitis: Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 126–132. <https://doi.org/10.2174/092986712803414015>.
- [10] P. Sikiric, K.B. Hahm, A. Boban Blagaic, A. Tvrdeic, K.H. Pavlov, A. Petrovic, A. Kokot, S. Gojkovic, I. Krezic, D. Drmic, R. Rucman, S. Seiwert, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157, Robert's Stomach Cytoprotection/Adaptive Cytoprotection/Organoprotection, and Selye's Stress Coping Response: Progress, Achievements, and the Future, *Gut Liver.* 14 (2020) 153–167. <https://doi.org/10.5009/GNL18490>.
- [11] J.M. Park, H.J. Lee, P. Sikiric, K.B. Hahm, BPC 157 Rescued NSAID-

cytotoxicity Via Stabilizing Intestinal Permeability and Enhancing
Cytoprotection, *Curr. Pharm. Des.* 26 (2020) 2971–2981.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200523180301>.

- [12] P. Sikiric, S. Seiwert, Z. Grabarevic, R. Rucman, M. Petek, I. Rotkvic, B. Turkovic, V. Jagic, B. Mildner, M. Duvnjak, Z. Danilovic, M. Kolega, A. Sallmani, S. Dacic, M. Dodig, N. Lang, J. Separovic, V. Coric, V. Simicevic, K. Bulic, M. Veljaca, N. Skroza, M. Banic, T. Brkic, G. Buljat, S. Mise, D. Lucinger, M. Bura, 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.* 53 (1993). [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90589-U](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90589-U).
- [13] P. Sikiric, S. Seiwert, Z. Grabarevic, R. Rucman, M. Petek, V. Jagic, B. Turkovic, I. Rotkvic, S. Mise, I. Zoricic, M. Gjurasin, P. Konjevoda, J. Separovic, D. Ljubanovic, B. Artukovic, M. Bratulic, M. Tisljar, L. Jurina, G. Buljat, P. Miklic, A. Marovic, Beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin, and capsaicin neurotoxicity, *Dig. Dis. Sci.* 41 (1996) 1604–1614.
<https://doi.org/10.1007/BF02087908>.
- [14] B. Bódis, O. Karádi, L. Nagy, C. Dohoczky, M. Kolega, G. Mózsik, Direct cellular effects of some mediators, hormones and growth factor-like agents on denervated (isolated) rat gastric mucosal cells, *J. Physiol. Paris.* 91 (1997) 183–187. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(97\)89482-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(97)89482-X).
- [15] I. Petrovic, I. Dobric, P. Drvis, D. Shejbal, L. Brcic, A. Boban Blagaic, L. Batelja, N. Kokic, A. Tonkic, S. Mise, T. Baotic, M. Staresinic, B. Radic, A. Jakir, T. Vuksic, T. Anic, S. Seiwert, P. Sikiric, An experimental model of prolonged esophagitis with sphincter failure in the rat and the therapeutic potential of gastric pentadecapeptide BPC 157, *J. Pharmacol. Sci.* 102 (2006) 269–277.
<https://doi.org/10.1254/jphs.FP0060070>.
- [16] I. Dobric, P. Drvis, I. Petrovic, D. Shejbal, L. Brcic, A. Boban Blagaic, L. Batelja, M. Sever, N. Kokic, A. Tonkic, I. Zoricic, S. Mise, M. Staresinic, B. Radic, A. Jakir, J. Babel, S. Ilic, T. Vuksic, I. Jelic, T. Anic, S. Seiwert, P. Sikiric,

- Prolonged esophagitis after primary dysfunction of the pyloric sphincter in the rat and therapeutic potential of the gastric pentadecapeptide BPC 157, *J. Pharmacol. Sci.* 104 (2007) 7–18. <https://doi.org/10.1254/JPHS.FP0061322>.
- [17] P. Sikiric, S. Jadrijevic, S. Seiwert, T. Sosa, S. Deskovic, D. Perovic, G. Aralica, Z. Grabarevic, R. Rucman, M. Petek, V. Jagic, B. Turkovic, T. Ziger, I. Rotkvic, S. Mise, I. Zoricic, B. Sebecic, L. Patrlj, B. Kocman, M. Sarlija, D. Mikus, J. Separovic, M. Hanzevacki, M. Gjurasin, P. Miklic, G. Buljat, Long-lasting cytoprotection after pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, sucralfate or cholestyramine application in reflux oesophagitis in rats, *J. Physiol. Paris.* 93 (1999) 467–477. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(99\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(99)00124-2).
- [18] S. Skorjanec, Z. Dolovski, I. Kocman, L. Brcic, A. Blagaic Boban, L. Batelja, M. Coric, M. Sever, R. Klicek, L. Berkopic, B. Radic, D. Drmic, D. Kolenc, S. Ilic, V. Cesarec, A. Tonkic, I. Zoricic, S. Mise, M. Staresinic, M. Ivica, M. Lovric Bencic, T. Anic, S. Seiwert, P. Sikiric, 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.* 54 (2009) 46–56. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0332-9>.
- [19] V. Cesarec, T. Becejac, M. Misic, Z. Djakovic, D. Olujić, D. Drmic, L. Brcic, D. Stancic Rokotov, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy, *Eur. J. Pharmacol.* 701 (2013) 203–212. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2012.11.055>.
- [20] R. Klicek, M. Sever, B. Radic, D. Drmic, I. Kocman, I. Zoricic, T. Vuksic, M. Ivica, I. Barisic, S. Ilic, L. Berkopic, H. Vrcic, L. Brcic, A. Boban Blagaic, M. Coric, I. Brcic, D. Stancic Rokotov, T. Anic, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colcutaneous fistulas in rats: Role of the nitric oxide-system, *J. Pharmacol. Sci.* 108 (2008) 7–17. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0072161>.
- [21] A. Boban Blagaic, V. Blagaic, Z. Romić, N. Jelovac, G. Dodig, R. Rucman, M. Petek, B. Turković, S. Seiwert, P. Sikiric, 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, *Eur. J. Pharmacol.* 12 (2006) 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.112>.
- [22] I. Prkacin, G. Aralica, D. Perovic, J. Separovic, M. Gjurasin, M. Lovric-Bencic, D. Stancic Rokotov, T. Ziger, T. Anic, P. Sikiric, S. Seiwert, M. Staresinic, S. Mise, I. Rotkvic, V. Jagic, R. Rucman, M. Petek, B. Turkovic, A. Marovic, I. Sjekavica, B. Sebecic, A. Boban Blagaic, Z. Ivasovic, Chronic cytoprotection: pentadecapeptide BPC 157, ranitidine and propranolol prevent, attenuate and reverse the gastric lesions appearance in chronic alcohol drinking rats, *J. Physiol. Paris.* 95 (2001) 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00041-9).
- [23] D. Stancic Rokotov, P. Sikiric, S. Seiwert, Z. Slobodnjak, J. Aralica, G. Aralica, D. Perovic, T. Anic, I. Zoricic, G. Buljat, I. Prkacin, M. Gjurasin, R. Rucman, M. Petek, B. Turkovic, Z. Ivasovic, V. Jagic, M. Staresinic, A. Boban Blagaic, Ethanol gastric lesion aggravated by lung injury in rat. Therapy effect of antiulcer agents, *J. Physiol. Paris.* 95 (2001) 289–293. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00040-7).
- [24] S. Ilic, D. Drmic, S. Franjic, D. Kolenc, M. Coric, L. Brcic, R. Klicek, B. Radic, M. Sever, V. Djuzel, M. Filipovic, Z. Djakovic, V. Stambolija, A. Boban Blagaic, I. Zoricic, M. Gjurasin, M. Stupnisek, Z. Romic, K. Zarkovic, S. Dzidic, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: Diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions, *Life Sci.* 88 (2011) 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.01.015>.
- [25] P. Sikiric, J. Separovic, G. Buljat, T. Anic, D. Stancic Rokotov, D. Mikus, B. Duplancic, A. Marovic, I. Zoricic, I. Prkacin, M. Lovric-Bencic, G. Aralica, T. Ziger, D. Perovic, N. Jelovac, G. Dodig, I. Rotkvic, S. Mise, S. Seiwert, B. Turkovic, Z. Grabarevic, M. Petek, R. Rucman, 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.* 94 (2000) 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(00\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(00)00147-9).
- [26] I. Bilic, I. Zoricic, T. Anic, J. Separovic, D. Stancic Rokotov, D. Mikus, G. Buljat, D. Ivankovic, G. Aralica, I. Prkacin, D. Perovic, S. Mise, I. Rotkvic, M. Petek, R.

- Rucman, S. Seiwert, P. Sikiric, Haloperidol-stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC 157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice, *Life Sci.* 68 (2001) 1905–1912. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)01025-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)01025-0).
- [27] P. Sikiric, Emerging drugs in gastrointestinal tract, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 1530–1531.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L362082170%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2174/138161211796196963>.
- [28] M. Stupnisek, S. Franjic, D. Drmic, M. Hrelec, D. Kolenc, B. Radic, D. Bojic, A. Vcev, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157 reduces bleeding time and thrombocytopenia after amputation in rats treated with heparin, warfarin or aspirin, *Thromb. Res.* 129 (2012) 652–659.
<https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2011.07.035>.
- [29] R. Klicek, D. Kolenc, J. Suran, D. Drmic, L. Brcic, G. Aralica, M. Sever, J. Holjevac, B. Radic, T. Turudic, A. Kokot, L. Patrlj, R. Rucman, S. Seiwert, P. Sikiric, Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability, *J. Physiol. Pharmacol.* 64 (2013) 597–612.
- [30] P. Sikiric, S. Seiwert, L. Brcic, A. Boban Blagaic, I. Zoricic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, N. Keller, K. Sipos, A. Jakir, M. Udovicic, A. Tonkic, N. Kokic, B. Turkovic, S. Mise, T. Anic, Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response, *Inflammopharmacology.* 14 (2006) 214–221. <https://doi.org/10.1007/s10787-006-1531-7>.
- [31] P. Sikiric, S. Seiwert, G. Aralica, D. Perovic, M. Staresinic, T. Anic, M. Gjurasin, I. Prkacin, J. Separovic, D. Stancic Rokotov, M. Lovric-Bencic, D. Mikus, B. Turkovic, I. Rotkvic, S. Mise, R. Rucman, M. Petek, T. Ziger, B. Sebecic, Z. Ivasovic, V. Jagic, LJ. Komericki, I. Balen, A. Boban Blagaic, I. Sjekavica, Therapy effect of antiulcer agents on new chronic cysteamine colon lesion in rat, *J. Physiol. Paris.* 95 (2001) 283–288.
[https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00039-0).

- [32] A. Duzel, J. Vlainic, M. Antunovic, D. Malekinusic, B. Vrdoljak, M. Samara, S. Gojkovic, I. Krezic, T. Vidovic, Z. Bilic, M. Knezevic, M. Sever, N. Lojo, A. Kokot, M. Kolovrat, D. Drmic, J. Vukojevic, T. Kralj, K. Kasnik, M. Siroglavic, S. Seiwert, P. Sikiric, Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in the treatment of colitis and ischemia and reperfusion in rats: New insights, *World J. Gastroenterol.* 23 (2017) 8465–8488.
<https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I48.8465>.
- [33] T. Vuksic, I. Zoricic, L. Brcic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, V. Cesarec, L. Berkopic, N. Keller, A. Boban Blagaic, N. Kokic, I. Jelic, J. Geber, T. Anic, S. Seiwert, P. Sikiric, 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.* 37 (2007) 768–777.
<https://doi.org/10.1007/S00595-006-3498-9>.
- [34] M. Hrelec, R. Klicek, L. Brcic, I. Brcic, I. Cvjetko, S. Seiwert, P. Sikiric, Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy., *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 7 (2009) 161–165.
- [35] S. Ilic, D. Drmic, K. Zarkovic, D. Kolenc, M. Coric, L. Brcic, R. Klicek, B. Radic, M. Sever, V. Djuzel, M. Ivica, A. Boban Blagaic, Z. Zoricic, T. Anic, I. Zoricic, S. Djidic, Z. Romic, S. Seiwert, P. Sikiric, 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.* 61 (2010) 241–250. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(09\)61912-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(09)61912-0).
- [36] S. Ilic, I. Brcic, M. Mester, M. Filipovic, M. Sever, R. Klicek, I. Barisic, B. Radic, Z. Zoricic, V. Bilic, L. Berkopic, L. Brcic, D. Kolenc, Z. Romic, L. Pazanin, S. Seiwert, P. Sikiric, 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.* 60 Suppl 7 (2009) 107–114.
- [37] P. Sikiric, S. Seiwert, R. Rucman, D. Kolenc, L. Batelja Vuletic, D. Drmic, T. Grgic, S. Strbe, G. Zukanovic, D. Crvenkovic, G. Madzarac, I. Rukavina, M.

- Sucic, M. Baric, N. Starcevic, Z. Krstonijevic, M. Lovric Bencic, I. Filipcic, D. Stancic Rokotov, J. Vlainic, Brain-gut Axis and Pentadecapeptide BPC 157: Theoretical and Practical Implications, *Curr. Neuropharmacol.* 14 (2016) 857–865. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666160502153022>.
- [38] J. Vukojevic, M. Milavic, D. Perovic, S. Ilic, A. Cilic, N. DJuran, S. Strbe, Z. Zoricic, I. Filipcic, P. Brecic, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157 and the central nervous system, *Neural Regen. Res.* 17 (2022) 482–487. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320969>.
- [39] M. Tudor, I. Jandric, A. Marovic, M. Gjurasin, D. Perovic, B. Radic, A. Boban Blagaic, D. Kolenc, L. Brcic, K. Zarkovic, S. Seiwert, P. Sikiric, Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect, *Regul. Pept.* 160 (2010) 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2009.11.012>.
- [40] D. Perovic, M. Milavic, S. Dokuzovic, I. Krezic, S. Gojkovic, H. Vranes, I. Bebek, V. Bilic, N. Somun, I. Brizic, I. Skorak, K. Hriberski, S. Sikiric, E. Lovric, S. Strbe, M. Kubat, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Novel Therapeutic Effects in Rat Spinal Cord Injuries: Recovery of the Definitive and Early Spinal Cord Injury by the Administration of Pentadecapeptide BPC 157 Therapy, *Issues Mol. Biol.* 2022 (2022) 1901–1927. <https://doi.org/10.3390/cimb44050130>.
- [41] J. Vukojevic, B. Vrdoljak, D. Malekinusic, M. Siroglavic, M. Milavic, D. Kolenc, A. Boban Blagaic, L. Batelja, D. Drmic, S. Seiwert, P. Sikiric, The effect of pentadecapeptide BPC 157 on hippocampal ischemia/reperfusion injuries in rats, *Brain Behav.* 10 (2020). <https://doi.org/10.1002/BRB3.1726>.
- [42] N. Jelovac, P. Sikiric, R. Rucman, M. Petek, A. Marovic, D. Perovic, S. Seiwert, S. Mise, B. Turkovic, G. Dodig, P. Miklic, G. Buljat, I. Prkacin, Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: The effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats, *Eur. J. Pharmacol.* 379 (1999) 19–31. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00486-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00486-0).
- [43] D. Mikus, P. Sikiric, S. Seiwert, A. Petricevic, G. Aralica, N. Druzijancic, R. Rucman, M. Petek, B. Pigac, D. Perovic, M. Kolombo, N. Kokic, S. Mikus, B. Duplancic, I. Fattorini, B. Turkovic, I. Rotkvic, S. Mise, I. Prkacin, P. Konjevoda,

- N. Stambuk, T. Anic, Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice, *Burns*. 27 (2001) 817–827. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(01\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(01)00055-9).
- [44] S. Masnec, A. Kokot, M. Zlatar, M. Kalauz, K. Kunjko, B. Radic, R. Kliceck, D. Drmic, R. Lazic, L. Brcic, R. Radic, R. Ivekovic, S. Seiwert, P. Sikiric, Perforating corneal injury in rat and pentadecapeptide BPC 157, *Exp. Eye Res.* 136 (2015) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.04.016>.
- [45] D. Balenovic, M. Lovric-Bencic, M. Udovicic, K. Simonji, J.S. Hanzevacki, I. Barisic, S. Kranjcevic, I. Prkacin, V. Coric, L. Brcic, M. Coric, I. Brcic, S. Borovic, B. Radic, D. Drmic, H. Vrcic, S. Seiwert, P. Sikiric, Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system, *Regul. Pept.* 156 (2009) 83–89. <https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2009.05.008>.
- [46] M. Lozic, V. Stambolija, I. Krezic, A. Dugandzic, G. Zivanovic-Posilovic, S. Gojkovic, J. Kovacevic, L. Vrdoljak, I. Mirkovic, A. Kokot, A. Petrovic, K.H. Pavlov, D. Drmic, J. Suran, A. Boban Blagaic, S. Seiwert, P. Sikiric, In relation to NO-System, Stable Pentadecapeptide BPC 157 Counteracts Lidocaine-Induced Adverse Effects in Rats and Depolarisation In Vitro, *Emerg. Med. Int.* 2020 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.1155/2020/6805354>.
- [47] B. Sebecic, V. Nikolic, P. Sikiric, S. Seiwert, T. Sosa, L. Patrlj, Z. Grabarevic, R. Rucman, M. Petek, P. Konjevoda, S. Jadrijevic, D. Perovic, M. Slaj, Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC-157, on the healing of segmental bone defect in rabbits: A comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation, *Bone*. 24 (1999) 195–202. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(98\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(98)00180-X).
- [48] S. Seiwert, R. Rucman, B. Turkovic, M. Sever, R. Kliceck, B. Radic, D. Drmic, M. Stupnisek, M. Misic, L.B. Vuletic, K.H. Pavlov, I. Barisic, A. Kokot, M. Japjec, A. Boban Blagaic, A. Tvrdeic, D. Stancic Rokotov, H. Vrcic, M. Staresinic, B. Sebecic, P. Sikiric, BPC 157 and Standard Angiogenic Growth Factors. Gastrointestinal Tract Healing, Lessons from Tendon, Ligament, Muscle and Bone Healing, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 1972–1989. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180712110447>.

- [49] A. Krivic, T. Anic, S. Seiwert, D. Huljev, P. Sikiric, Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation, *J. Orthop. Res.* 24 (2006) 982–989. <https://doi.org/10.1002/jor.20096>.
- [50] A. Krivic, M. Majerovic, I. Jelic, S. Seiwert, P. Sikiric, Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone, *Inflamm. Res.* 57 (2008) 205–210. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7056-8>.
- [51] L. Brcic, I. Brcic, M. Staresinic, T. Novinscak, P. Sikiric, S. Seiwert, Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing., *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 7 (2009) 191–196.
- [52] D. Pevec, T. Novinscak, L. Brcic, K. Sipos, I. Jukic, M. Staresinic, S. Mise, I. Brcic, D. Kolenc, R. Klicek, T. Banic, M. Sever, A. Kocijan, L. Berkopic, B. Radic, G. Buljat, T. Anic, I. Zoricic, I. Bojanic, S. Seiwert, P. Sikiric, Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application, *Med. Sci. Monit.* 16 (2010) 81–88.
- [53] T. Cerovecki, I. Bojanic, L. Brcic, B. Radic, I. Vukoja, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat, *J. Orthop. Res.* 28 (2010) 1155–1161. <https://doi.org/10.1002/JOR.21107>.
- [54] O. Gamulin, K. Serec, V. Bilic, M. Balarin, M. Kosovic, D. Drmic, L. Brcic, S. Seiwert, P. Sikiric, Monitoring the healing process of rat bones using Raman spectroscopy, *J. Mol. Struct.* 1044 (2013) 308–313. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2013.01.049>.
- [55] B. Keremi, Z. Lohinai, P. Komora, S. Duhaj, K. Borsi, G. Jobbagy-Ovari, K. Kallo, A.D. Szekely, A. Fazekas, C. Dobo-Nagy, P. Sikiric, G. Varga, Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats., *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 7 (2009) 115–122.
- [56] U. Förstermann, W.C. Sessa, Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 829–837. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHR304>.

- [57] P. Gresele, S. Momi, G. Guglielmini, Nitric oxide-enhancing or -releasing agents as antithrombotic drugs, *Biochem. Pharmacol.* 166 (2019) 300–312. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2019.05.030>.
- [58] A.R. Cyr, L. V. Huckaby, S.S. Shiva, B.S. Zuckerbraun, Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction, *Crit. Care Clin.* 36 (2020) 307–321. <https://doi.org/10.1016/J.CCC.2019.12.009>.
- [59] A.-M. Kampoli, D. Tousoulis, C. Tentolouris, C. Stefanadis, Novel agents targeting nitric oxide, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10 (2012) 61–76. <https://doi.org/10.2174/157016112798829805>.
- [60] L. Zhou, D.Y. Zhu, Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications, *Nitric oxide Biol. Chem.* 20 (2009) 223–230. <https://doi.org/10.1016/J.NIOX.2009.03.001>.
- [61] D.F. Lappin, M. Kjeldsen, L. Sander, D.F. Kinane, Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis, *J. Periodontal Res.* 35 (2000) 369–373. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0765.2000.035006369.X>.
- [62] M. Pozza, M. Guerra, E. Manzini, L. Calza, A histochemical study of the rheumatoid synovium: focus on nitric oxide, nerve growth factor high affinity receptor, and innervation, *J. Rheumatol.* 27 (2000) 1121–1127. <https://doi.org/10.1002/art.11389>.
- [63] T. Suzuki, H. Kumamoto, K. Ooya, K. Motegi, Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions, *J. Oral Pathol. Med.* 31 (2002) 488–493. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0714.2002.00016.X>.
- [64] S. Moncada, Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine, *J. R. Soc. Med.* 92 (1999) 164–169. <https://doi.org/10.1177/014107689909200402>.
- [65] J.D. Erusalimsky, S. Moncada, Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 2524–2531. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151167>.
- [66] C.T. Taylor, S. Moncada, Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 643–647.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181628>.

- [67] B.J.R. Whittle, N.K. Boughton-Smith, S. Moncada, Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664 (1992) 126–139. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1992.TB39755.X>.
- [68] P.A. Brennan, S. Moncada, From pollutant gas to biological messenger: The diverse actions of nitric oxide in cancer, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 84 (2002) 75–78.
- [69] M. Lovric-Bencic, P. Sikiric, J.S. Hanzevacki, S. Seiwert, D. Rogic, V. Kusec, G. Aralica, P. Konjevoda, L. Batelja, A. Boban Blagaic, 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.* 95 (2004) 19–26. <https://doi.org/10.1254/JPHS.95.19>.
- [70] V.I. Tkalcevic, S. Cuzic, K. Brajsa, B. Mildner, A. Bokulic, K. Situm, D. Perovic, I. Glojnaric, M.J. Parnham, Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression, *Eur. J. Pharmacol.* 570 (2007) 212–221. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2007.05.072>.
- [71] E.S. Silverman, L.M. Khachigian, F.S. Santiago, A.J. Williams, V. Lindner, T. Collins, Vascular smooth muscle cells express the transcriptional corepressor NAB2 in response to injury, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1311–1317. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65233-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65233-9).
- [72] S. Ilic, D. Drmic, K. Zarkovic, D. Kolenc, L. Brcic, B. Radic, V. Djuzel, A.B. Blagaic, Z. Romic, S. Dzidic, L. Kalogjera, S. Seiwert, P. Sikiric, Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 667 (2011) 322–329. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2011.05.038>.
- [73] S. Seiwert, M. Milavic, J. Vukojevic, S. Gojkovic, I. Krezic, L.B. Vuletic, K.H. Pavlov, A. Petrovic, S. Sikiric, H. Vranes, A. Prtoric, H. Zizek, T. Durasin, I. Dobric, M. Staresinic, S. Strbe, M. Knezevic, M. Sola, A. Kokot, M. Sever, E.

- Lovric, A. Skrtic, A. Boban Blagaic, P. Sikiric, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 and Wound Healing, *Front. Pharmacol.* 12 (2021).
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.627533>.
- [74] J.T. Wright, Normal formation and development defects of the human dentition, *Pediatr. Clin. North Am.* 47 (2000) 975–1000. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70254-6](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70254-6).
- [75] C. Yu, P. V. Abbott, An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury, *Aust. Dent. J.* 52 (2007) S4–S6. <https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2007.TB00525.X>.
- [76] M.G. Ghannam, H. Alameddine, B. Bordoni, Anatomy, Head and Neck, Pulp (Tooth), *StatPearls.* (2022).
- [77] E. Berggreen, A. Bletsa, K.J. Heyeraas, Circulation in normal and inflamed dental pulp, *Endod. Top.* 17 (2007) 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2010.00249.x>.
- [78] M. Goldberg, A. Njeh, E. Uzunoglu, Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration?, *Mediators Inflamm.* 2015 (2015).
<https://doi.org/10.1155/2015/347649>.
- [79] W.L.O. da Rosa, E. Piva, A.F. da Silva, Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy, *Int. Endod. J.* 51 (2018) 829–846.
<https://doi.org/10.1111/IEJ.12906>.
- [80] S. Sismanoglu, P. Ercal, Dentin-Pulp Tissue Regeneration Approaches in Dentistry: An Overview and Current Trends, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1298 (2020) 79–103. https://doi.org/10.1007/5584_2020_578.
- [81] P. Dudeja, K. Dudeja, D. Srivastava, S. Grover, Microorganisms in periradicular tissues: Do they exist? A perennial controversy, *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 19 (2015) 356–363. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.174612>.
- [82] L.L. Narayanan, C. Vaishnavi, Endodontic microbiology, *J. Conserv. Dent.* 13 (2010) 233. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73386>.
- [83] J. Lorenzo, M. Horowitz, Y. Choi, Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 403–440.

<https://doi.org/10.1210/ER.2007-0038>.

- [84] K. Karamifar, A. Tondari, M.A. Saghiri, Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities, *Eur. Endod. J.* 5 (2020) 54–67. <https://doi.org/10.14744/EEJ.2020.42714>.
- [85] Z. Metzger, Macrophages in periapical lesions, *Endod. Dent. Traumatol.* 16 (2000) 1–8. <https://doi.org/10.1034/J.1600-9657.2000.016001001.X>.
- [86] H. Xiong, L. Wei, B. Peng, Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions, *J. Endod.* 35 (2009) 216–220. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2008.10.022>.
- [87] J.F. Siqueira, I.N. Rôças, D. Ricucci, M. Hülsmann, Causes and management of post-treatment apical periodontitis, *Br. Dent. J.* 216 (2014) 305–312. <https://doi.org/10.1038/SJ.BDJ.2014.200>.
- [88] S. Bouillaguet, D. Manoil, M. Girard, J. Louis, N. Gaïa, S. Leo, J. Schrenzel, V. Lazarevic, Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis, *Front. Microbiol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02374>.
- [89] D. Rechenberg, J.C. Galicia, O.A. Peters, Biological Markers for Pulpal Inflammation : A Systematic Review, (2016) 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167289>.
- [90] C.S. Tibúrcio-Machado, C. Michelon, F.B. Zanatta, M.S. Gomes, J.A. Marin, C.A. Bier, The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis, *Int. Endod. J.* 54 (2021) 712–735. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13467>.
- [91] L.M. Seerig, G.G. Nascimento, M.A. Peres, B.L. Horta, F.F. Demarco, Tooth loss in adults and income: Systematic review and meta-analysis, *J. Dent.* 43 (2015) 1051–1059. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2015.07.004>.
- [92] S.N. Sisli, Evaluation of the Relationship between Type II Diabetes Mellitus and the Prevalence of Apical Periodontitis in Root-Filled Teeth Using Cone Beam Computed Tomography: An Observational Cross-Sectional Study, *Med. Princ. Pract.* 28 (2019) 533–538. <https://doi.org/10.1159/000500472>.
- [93] J.J. Segura-Egea, D. Cabanillas-Balsera, M.C. Jiménez-Sánchez, J. Martín-

- González, Endodontics and diabetes: association versus causation, *Int. Endod. J.* 52 (2019) 790–802. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13079>.
- [94] W. Saleh, W. Xue, J. Katz, Diabetes Mellitus and Periapical Abscess: A Cross-sectional Study, *J. Endod.* 46 (2020) 1605–1609. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2020.08.015>.
- [95] B. González-Navarro, J.J. Segura-Egea, A. Estrugo-Devesa, X. Pintó-Sala, E. Jane-Salas, M.C. Jiménez-Sánchez, D. Cabanillas-Balsera, J. López-López, Relationship between Apical Periodontitis and Metabolic Syndrome and Cardiovascular Events: A Cross-Sectional Study, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.3390/JCM9103205>.
- [96] J. Katz, I. Rotstein, Prevalence of Periapical Abscesses in Patients with Hypertension: A Cross-sectional Study of a Large Hospital Population, *J. Endod.* 47 (2021) 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2021.04.006>.
- [97] N. Khalighinejad, M.R. Aminoshariae, A. Aminoshariae, J.C. Kulild, A. Mickel, A.F. Fouad, Association between Systemic Diseases and Apical Periodontitis, *J. Endod.* 42 (2016) 1427–1434. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2016.07.007>.
- [98] E. Virtanen, T. Nurmi, P.Ö. Söder, S. Airila-Månsson, B. Söder, J.H. Meurman, Apical periodontitis associates with cardiovascular diseases: a cross-sectional study from Sweden, *BMC Oral Health.* 17 (2017). <https://doi.org/10.1186/S12903-017-0401-6>.
- [99] I. Rotstein, J. Katz, Periapical disease in post-stroke patients, *Am. J. Dent.* 35 (2022) 15–19.
- [100] M. Poyato-Borrego, J.J. Segura-Sampedro, J. Martín-González, Y. Torres-Domínguez, E. Velasco-Ortega, J.J. Segura-Egea, High Prevalence of Apical Periodontitis in Patients With Inflammatory Bowel Disease: An Age- and Gender- matched Case-control Study, *Inflamm. Bowel Dis.* 26 (2020) 273–279. <https://doi.org/10.1093/IBD/IZZ128>.
- [101] I. Rotstein, J. Katz, Prevalence of periapical abscesses in patients with systemic lupus erythematosus, *Spec. Care Dentist.* 42 (2022) 15–19. <https://doi.org/10.1111/SCD.12630>.

- [102] J. Katz, I. Rotstein, Prevalence of Periapical Lesions in Patients with Osteoporosis, *J. Endod.* 47 (2021) 234–238. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2020.10.019>.
- [103] A.S.M. Leal, A.E.F. De Oliveira, L.M.O. Brito, F.F. Lopes, V.P. Rodrigues, K.F. Lima, I.C. De Araújo Martins, Association between chronic apical periodontitis and low-birth-weight preterm births, *J. Endod.* 41 (2015) 353–357. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2014.11.018>.
- [104] L. Grønkjær, P. Holmstrup, S. Schou, K. Schwartz, J. Kongstad, P. Jepsen, H. Vilstrup, Presence and consequence of tooth periapical radiolucency in patients with cirrhosis, *Hepat. Med.* 8 (2016) 97–103. <https://doi.org/10.2147/HMER.S113485>.
- [105] M.S. Gomes, T.C. Blattner, M. Sant’Ana Filho, F.S. Grecca, F.N. Hugo, A.F. Fouad, M.A. Reynolds, Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis, *J. Endod.* 39 (2013) 1205–1217. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2013.06.014>.
- [106] R. Persic Bukmir, M. Jurcevic Grgic, G. Brumini, S. Spalj, S. Pezelj-Ribaric, I. Brekalo Prso, Influence of tobacco smoking on dental periapical condition in a sample of Croatian adults, *Wien. Klin. Wochenschr.* 128 (2016) 260–265. <https://doi.org/10.1007/S00508-015-0910-8>.
- [107] K.P. Pinto, C.M. Ferreira, L.C. Maia, L.M. Sassone, T.K.S. Fidalgo, E.J.N.L. Silva, Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis, *Int. Endod. J.* 53 (2020) 1068–1083. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13316>.
- [108] E.J.N.L. Silva, K.P. Pinto, C.M. Ferreira, L.C. Maia, L.M. Sassone, T.K.S. Fidalgo, Methodologic concerns regarding the evidence of a higher prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment need in tobacco smokers, *Int. Endod. J.* 53 (2020) 1744–1747. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13376>.
- [109] R. Dal-Fabbro, M. Marques de Almeida, L. Cosme-Silva, A.H.C. Neto, L.M.P. Salzedas, L.T.A. Cintra, J.E.G. Filho, Chronic alcohol consumption changes blood marker profile and bone density in rats with apical periodontitis, *J. Investig. Clin. Dent.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1111/JICD.12418>.

- [110] R. Dal-Fabbro, M. Marques-de-Almeida, L. Cosme-Silva, E. Ervolino, L.T.A. Cintra, J.E. Gomes-Filho, Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis, *Int. Endod. J.* 52 (2019) 329–336. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13014>.
- [111] R. Hamedy, B. Shakiba, J.G. Pak, J. V. Barbizam, R.S. Ogawa, S.N. White, Prevalence of root canal treatment and periapical radiolucency in elders: a systematic review, *Gerodontology*. 33 (2016) 116–127. <https://doi.org/10.1111/GER.12137>.
- [112] I.F. Persoon, A.R. Özok, Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections, *Curr. oral Heal. reports*. 4 (2017) 278–285. <https://doi.org/10.1007/S40496-017-0161-Z>.
- [113] C. Löst, Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology, *Int. Endod. J.* 39 (2006) 921–930. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2006.01180.X>.
- [114] N. Chugal, S.M. Mallya, B. Kahler, L.M. Lin, Endodontic Treatment Outcomes, *Dent. Clin. North Am.* 61 (2017) 59–80. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2016.08.009>.
- [115] M. Haapasalo, Y. Shen, W. Qian, Y. Gao, Irrigation in endodontics, *Dent. Clin. North Am.* 54 (2010) 291–312. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2009.12.001>.
- [116] D.W.R. Chubb, A review of the prognostic value of irrigation on root canal treatment success, *Aust. Endod. J.* 45 (2019) 5–11. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12348>.
- [117] A. Kfir, R. Moza-Levi, M. Herteanu, A. Weissman, R. Wigler, Apical extrusion of debris during the preparation of oval root canals: a comparative study between a full-sequence SAF system and a rotary file system supplemented by XP-endo finisher file, *Clin. Oral Investig.* 22 (2018) 707–713. <https://doi.org/10.1007/S00784-017-2144-9>.
- [118] B. Serefoglu, G. Kandemir Demirci, S. Miçooğulları Kurt, İ. Kaşıkçı Bilgi, M.K. Çalışkan, Impact of root canal curvature and instrument type on the amount of extruded debris during retreatment, *Restor. Dent. Endod.* 46 (2020). <https://doi.org/10.5395/RDE.2021.46.E5>.

- [119] D. Kaushal, S.G. Reddy, K.P. Biswas, A. Dixit, R. Chowdhry, A. Chug, Apical extrusion of debris with root canal instrumentation in primary teeth: A systematic review, *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 40 (2022) 9–18. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_298_21.
- [120] G.R. Young, P. Parashos, H.H. Messer, The principles of techniques for cleaning root canals, *Aust. Dent. J.* 52 (2007). <https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2007.TB00526.X>.
- [121] A. Ali, A. Bhosale, S. Pawar, A. Kakti, A. Bichpuriya, M.A. Agwan, Current Trends in Root Canal Irrigation, *Cureus.* 14 (2022). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.24833>.
- [122] M. Koch, E. Wolf, Tegelberg, K. Petersson, Effect of education intervention on the quality and long-term outcomes of root canal treatment in general practice, *Int. Endod. J.* 48 (2015) 680–689. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12367>.
- [123] G. Bergenholtz, Assessment of treatment failure in endodontic therapy, *J. Oral Rehabil.* 43 (2016) 753–758. <https://doi.org/10.1111/JOOR.12423>.
- [124] M. Del Fabbro, S. Corbella, P. Sequeira-Byron, I. Tsesis, E. Rosen, A. Lolato, S. Taschieri, Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions, *Cochrane database Syst. Rev.* 10 (2016). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005511.PUB3>.
- [125] Y.L. Ng, V. Mann, K. Gulabivala, Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature, *Int. Endod. J.* 41 (2008) 1026–1046. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2008.01484.X>.
- [126] J.J. Segura-Egea, K. Gould, B.H. Şen, P. Jonasson, E. Cotti, A. Mazzone, H. Sunay, L. Tjäderhane, P.M.H. Dummer, European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics, *Int. Endod. J.* 51 (2018) 20–25. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12781>.
- [127] A.L. Cope, I.G. Chestnutt, Inappropriate prescribing of antibiotics in primary dental care: reasons and resolutions, *Prim. Dent. J.* 3 (2014) 33–37. <https://doi.org/10.1308/205016814813877333>.
- [128] R. Bjelovucic, M. Par, D. Rubcic, D. Marovic, K. Prskalo, Z. Tarle, Antibiotic

- prescription in emergency dental service in Zagreb, Croatia - a retrospective cohort study, *Int. Dent. J.* 69 (2019) 273–280.
<https://doi.org/10.1111/IDJ.12460>.
- [129] J.F. Siqueira, I.N. Rôças, Microbiology and treatment of acute apical abscesses, *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (2013) 255–273.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00082-12>.
- [130] Z. Mohammadi, Systemic, prophylactic and local applications of antimicrobials in endodontics: an update review, *Int. Dent. J.* 59 (2009) 175–86.
- [131] J.J. Segura-Egea, K. Gould, B.H. Şen, P. Jonasson, E. Cotti, A. Mazzone, H. Sunay, L. Tjäderhane, P.M.H. Dummer, Antibiotics in Endodontics: a review, *Int. Endod. J.* 50 (2017) 1169–1184. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12741>.
- [132] B.K. English, A.H. Gaur, The use and abuse of antibiotics and the development of antibiotic resistance, *Adv. Exp. Med. Biol.* 659 (2010) 73–82.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0981-7_6.
- [133] A.L. Cope, N. Francis, F. Wood, I.G. Chestnutt, Systemic antibiotics for symptomatic apical periodontitis and acute apical abscess in adults, *Cochrane database Syst. Rev.* 9 (2018).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD010136.PUB3>.
- [134] M.M. Azuma, J.E. Gomes-Filho, E. Ervolino, C.B. Pipa, C. de B.M. Cardoso, A.C. Andrada, T. Kawai, L.T.A. Cintra, Omega 3 Fatty Acids Reduce Bone Resorption While Promoting Bone Generation in Rat Apical Periodontitis, *J. Endod.* 43 (2017) 970–976. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.01.006>.
- [135] M.M. Azuma, J.E. Gomes-Filho, E. Ervolino, C. de B.M. Cardoso, C.B. Pipa, T. Kawai, L.C. Conti, L.T.A. Cintra, Omega-3 Fatty Acids Reduce Inflammation in Rat Apical Periodontitis, *J. Endod.* 44 (2018) 604–608.
<https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.12.008>.
- [136] L. Cosme-Silva, R. Dal-Fabbro, L.T.A. Cintra, V.R. dos Santos, C. Duque, E. Ervolino, S. Mogami Bomfim, J.E. Gomes-Filho, Systemic administration of probiotics reduces the severity of apical periodontitis, *Int. Endod. J.* 52 (2019) 1738–1749. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13192>.

- [137] L. Cosme-Silva, R. Dal-Fabbro, L.T.A. Cintra, E. Ervolino, F. Piazza, S. Mogami Bomfim, P.C.T. Duarte, V.E.D.S. Junior, J.E. Gomes-Filho, Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats, *Int. Endod. J.* 53 (2020) 1084–1092. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13311>.
- [138] E. Saritekin, B. Üreyen Kaya, H. Aşçı, Özmen, Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions, *Int. Endod. J.* 52 (2019) 1466–1478. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13138>.
- [139] M.M. Azuma, C. de B.M. Cardoso, R.O. Samuel, C.B. Pipa, S.R.M. Bomfim, L.G. Narciso, J.E. Gomes-Filho, L.T.A. Cintra, Omega-3 Fatty Acids Alter Systemic Inflammatory Mediators Caused by Apical Periodontitis, *J. Endod.* 47 (2021) 272–277. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2020.11.015>.
- [140] G. Kumar, S. Tewari, J. Tagg, M.L. Chikindas, I. V. Popov, S.K. Tiwari, Can Probiotics Emerge as Effective Therapeutic Agents in Apical Periodontitis? A Review, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 13 (2021) 299–314. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09750-2>.
- [141] H. Xiong, L. Wei, Y. Hu, C. Zhang, B. Peng, Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions, *Int. Endod. J.* 43 (2010) 485–491. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2010.01703.X>.
- [142] Z. Metzger, D. Belkin, N. Kariv, M. Dotan, A. Kfir, Low-dose doxycycline inhibits bone resorption associated with apical periodontitis, *Int. Endod. J.* 41 (2008) 303–309. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2007.01363.X>.
- [143] M. Erdem Büyükkiraz, Z. Kesmen, Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds, *J. Appl. Microbiol.* 132 (2022) 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>.
- [144] M.S. Zharkova, A.S. Komlev, T.A. Filatenkova, M.S. Sukhareva, E. V. Vladimirova, A.S. Trulioff, D.S. Orlov, A. V. Dmitriev, A.G. Afinogenova, A.A. Spiridonova, O. V. Shamova, Combined Use of Antimicrobial Peptides with Antiseptics against Multidrug-Resistant Bacteria: Pros and Cons, *Pharmaceutics.* 15 (2023) 1–30.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010291>.

- [145] J.Y. Lee, D.D. Kersten, P. Mines, T.A. Beltran, Regenerative Endodontic Procedures among Endodontists: A Web-based Survey, *J. Endod.* 44 (2018) 250–255. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.09.010>.
- [146] K.M. Galler, G. Krastl, S. Simon, G. Van Gorp, N. Meschi, B. Vahedi, P. Lambrechts, European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures, *Int. Endod. J.* 49 (2016) 717–723. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12629>.
- [147] Y.L. Ng, V. Mann, S. Rahbaran, J. Lewsey, K. Gulabivala, Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success, *Int. Endod. J.* 40 (2007) 921–939. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2007.01322.X>.
- [148] T.M.A. Saoud, D. Ricucci, L.M. Lin, P. Gaengler, Regeneration and Repair in Endodontics-A Special Issue of the Regenerative Endodontics-A New Era in Clinical Endodontics, *Dent. J.* 4 (2016). <https://doi.org/10.3390/DJ4010003>.
- [149] B. Nygaard-Östby, The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study., *Acta Odontol Scand.* 19 (1961) 324–53. <https://doi.org/10.1002/jps.2600510816>.
- [150] B. Nygaard-Östby, O. Hjortland, Tissue formation in the root canal following pulp removal, *Scand. J. Dent. Res.* 79 (1971) 333–349. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1971.TB02019.X>.
- [151] R. Wigler, A.Y. Kaufman, S. Lin, N. Steinbock, H. Hazan-Molina, C.D. Torneck, Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development, *J. Endod.* 39 (2013) 319–326. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2012.11.014>.
- [152] N. Meschi, P.J. Palma, D. Cabanillas-Balsera, Effectiveness of revitalization in treating apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis, *Int. Endod. J.* (2022). <https://doi.org/10.1111/IEJ.13778>.
- [153] P. Hilkens, N. Meschi, P. Lambrechts, A. Bronckaers, I. Lambrichts, Dental Stem Cells in Pulp Regeneration: Near Future or Long Road Ahead?, *Stem*

- Cells Dev. 24 (2015) 1610–1622. <https://doi.org/10.1089/SCD.2014.0510>.
- [154] P.J. Palma, J. Martins, P. Diogo, D. Sequeira, J.C. Ramos, A. Diogenes, J.M. Santos, Does Apical Papilla Survive and Develop in Apical Periodontitis Presence after Regenerative Endodontic Procedures?, *Appl. Sci.* 2019, Vol. 9, Page 3942. 9 (2019) 3942. <https://doi.org/10.3390/APP9193942>.
- [155] Y.Y. Jo, H.J. Lee, S.Y. Kook, H.W. Choung, J.Y. Park, J.H. Chung, Y.H. Choung, E.S. Kim, H.C. Yang, P.H. Choung, Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues, *Tissue Eng.* 13 (2007) 767–773. <https://doi.org/10.1089/TEN.2006.0192>.
- [156] P.T. Sharpe, Dental mesenchymal stem cells, *Development.* 143 (2016) 2273–2280. <https://doi.org/10.1242/DEV.134189>.
- [157] O.A. Nada, R.M. El Backly, Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6 (2018). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2018.00103>.
- [158] X. Yang, Y. Ma, W. Guo, B. Yang, W. Tian, Stem cells from human exfoliated deciduous teeth as an alternative cell source in bio-root regeneration, *Theranostics.* 9 (2019) 2694–2711. <https://doi.org/10.7150/THNO.31801>.
- [159] B. Sui, D. Wu, L. Xiang, Y. Fu, X. Kou, S. Shi, Dental Pulp Stem Cells: From Discovery to Clinical Application, *J. Endod.* 46 (2020) S46–S55. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2020.06.027>.
- [160] G.F. Muschler, C. Nakamoto, L.G. Griffith, Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering, *J. Bone Joint Surg. Am.* 86 (2004) 1541–1558. <https://doi.org/10.2106/00004623-200407000-00029>.
- [161] G. Jadhav, N. Shah, A. Logani, Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series, *J. Conserv. Dent.* 16 (2013) 568–572. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.120932>.
- [162] M. Torabinejad, A. Nosrat, P. Verma, O. Udochukwu, Regenerative Endodontic Treatment or Mineral Trioxide Aggregate Apical Plug in Teeth with Necrotic Pulp and Open Apices: A Systematic Review and Meta-analysis, *J. Endod.* 43

- (2017) 1806–1820. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.06.029>.
- [163] H. Shetty, S. Shetty, A. Kakade, S. Mali, A. Shetty, P. Neelakantan, Three-dimensional qualitative and quantitative analyses of the effect of periradicular lesions on the outcome of regenerative endodontic procedures: A prospective clinical study, *Clin. Oral Investig.* 25 (2021) 691–700. <https://doi.org/10.1007/S00784-020-03583-Z>.
- [164] P. V. Abbott, Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis, *Endod. Top.* 8 (2004) 36–54. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00098.x>.
- [165] M.N. Chapman, R.N. Nadgir, A.S. Akman, N. Saito, K. Sekiya, T. Kaneda, O. Sakai, Periapical lucency around the tooth: Radiologic evaluation and differential diagnosis, *Radiographics.* 33 (2013) 15–33. <https://doi.org/10.1148/rg.331125172>.
- [166] M. Pezzlo, Detection of urinary tract infections by rapid methods, *Clin. Microbiol. Rev.* 1 (1988) 268–280. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.3.268>.
- [167] O. Aspevall, H. Hallander, V. Gant, T. Kouri, European guidelines for urinalysis: A collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID, *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (2001) 173–178. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743X.2001.00237.x>.
- [168] M. Oviaño, G. Bou, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond, *Clin. Microbiol. Rev.* 32 (2019). <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-18>.
- [169] G. Stelzer, N. Rosen, I. Plaschkes, S. Zimmerman, M. Twik, S. Fishilevich, T. Iny Stein, R. Nudel, I. Lieder, Y. Mazor, S. Kaplan, D. Dahary, D. Warshawsky, Y. Guan-Golan, A. Kohn, N. Rappaport, M. Safran, D. Lancet, The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses, *Curr. Protoc. Bioinforma.* 54 (2016) 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/CPBI.5>.
- [170] N. Tani-Ishii, C. -Y Wang, A. Tanner, P. Stashenko, Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions, *Oral Microbiol. Immunol.* 9 (1994) 129–135. <https://doi.org/10.1111/j.1399->

302X.1994.tb00048.x.

- [171] L.T.A. Cintra, R.O. Samuel, M.M. Azuma, A.O.S. De Queiróz, E. Ervolino, D.H. Sumida, V.M.F. De Lima, J.E. Gomes-Filho, Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide, *J. Endod.* 42 (2016) 747–751. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.022>.
- [172] T. Dammaschke, Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry, *Lab. Anim.* 44 (2010) 1–6. <https://doi.org/10.1258/la.2009.008120>.
- [173] A.R. Helfer, S. Melnick, H. Schilder, Determination of the moisture content of vital and pulpless teeth, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 34 (1972) 661–670. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(72\)90351-9](https://doi.org/10.1016/0030-4220(72)90351-9).
- [174] E.R. Van Der Graaf, J.J. Ten Bosch, The uptake of water by freeze-dried human dentine sections, *Arch. Oral Biol.* 35 (1990) 731–739. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90096-S](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90096-S).
- [175] M.W. Jameson, J.A.A. Hood, B.G. Tidmarsh, The effects of dehydration and rehydration on some mechanical properties of human dentine, *J. Biomech.* 26 (1993) 1055–1065. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(05\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(05)80005-3).
- [176] Z. Chen, B. Nadeau, K. Yu, X. Shao, X. He, M.C. Goh, A. Kishen, Whole-field macro- and micro-deformation characteristic of unbound water-loss in dentin hard tissue, *J. Biophotonics.* 11 (2018). <https://doi.org/10.1002/JBIO.201700368>.
- [177] B. Kahler, M. V. Swain, A. Moule, Fracture-toughening mechanisms responsible for differences in work to fracture of hydrated and dehydrated dentine, *J. Biomech.* 36 (2003) 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(02\)00327-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(02)00327-5).
- [178] A. Kishen, A. Asundi, Experimental investigation on the role of water in the mechanical behavior of structural dentine, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 73 (2005) 192–200. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.30288>.
- [179] A. Kishen, A. Rafique, Investigations on the dynamics of water in the macrostructural dentine, *J. Biomed. Opt.* 11 (2006) 054018.

<https://doi.org/10.1117/1.2360257>.

- [180] A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub, Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2012) 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.
- [181] R. Anwer, H. Darami, F.K. Almarri, M.A. Albogami, F. Alahaydib, MALDI-TOF MS for Rapid Analysis of Bacterial Pathogens Causing Urinary Tract Infections in the Riyadh Region, *Diseases.* 10 (2022) 78. <https://doi.org/10.3390/diseases10040078>.
- [182] P.W. Caufield, C.N. Schön, P. Saraithong, Y. Li, S. Argimón, Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans, *J. Dent. Res.* 94 (2015) 110S-118S. <https://doi.org/10.1177/0022034515576052>.
- [183] N.K. Archer, M.J. Mazaitis, J. William Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E. Shirtliff, *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease, *Virulence.* 2 (2011) 445–459. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>.
- [184] S. Nemeghaire, M.A. Argudín, A.T. Feßler, T. Hauschild, S. Schwarz, P. Butaye, The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes, *Vet. Microbiol.* 171 (2014) 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.005>.
- [185] P. Ramanan, J.N. Barreto, D.R. Osmon, P.K. Tosh, *Rothia* bacteremia: A 10-year experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, *J. Clin. Microbiol.* 52 (2014) 3184–3189. <https://doi.org/10.1128/JCM.01270-14>.
- [186] S. Alghamdi, Isolation and identification of the oral bacteria and their characterization for bacteriocin production in the oral cavity, *Saudi J. Biol. Sci.* 29 (2022) 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.096>.
- [187] J. Jozefczuk, J. Adjaye, Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression, 1. izd., Elsevier Inc., 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2>.
- [188] C.J. Joshi, W. Ke, A. Drangowska-Way, E.J. O'Rourke, N.E. Lewis, What are housekeeping genes?, *PLoS Comput. Biol.* 18 (2022) 1–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010295>.

- [189] N. Silver, S. Best, J. Jiang, S.L. Thein, Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR, *BMC Mol. Biol.* 7 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>.
- [190] J. Vukojevic, M. Siroglavic, K. Kasnik, T. Kralj, D. Stancic, A. Kokot, D. Kolaric, D. Drmic, A.Z. Sever, I. Barisic, J. Suran, D. Bojic, M.H. Patrlj, I. Sjekavica, K.H. Pavlov, T. Vidovic, J. Vlainic, M. Stupnisek, S. Seiwert, P. Sikiric, Rat inferior caval vein (ICV) ligation and particular new insights with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157, *Vascul. Pharmacol.* 106 (2018) 54–66. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2018.02.010>.
- [191] M. Japjec, K.H. Pavlov, A. Petrovic, M. Staresinic, B. Sebecic, M. Buljan, H. Vranes, A. Giljanovic, D. Drmic, M. Japjec, A. Prtoric, E. Lovric, L.B. Vuletic, I. Dobric, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 as a Therapy for the Disable Myotendinous Junctions in Rats, *Biomedicines.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9111547>.
- [192] Z. Bilic, S. Gojkovic, L. Kalogjera, I. Krezic, D. Malekinusic, M. Knezevic, M. Sever, N. Lojo, A. Kokot, K. Kasnik, T. Kralj, J. Vukojevic, M. Siroglavic, M. Peklic, D. Drmic, M. Milavic, S. Sikiric, I. Skorak, I. Brizic, K. Hriberski, M. Kubat, J. Vladic, A. Boban Blagaic, A. Tvrdeic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Novel Insight Into Robert'S Cytoprotection: Complex Therapeutic Effect of Cytoprotective Pentadecapeptide Bpc 157 in Rats With Perforated Stomach Throughout Modulation of Nitric Oxide-System. Comparison With L-Arginine, Ranitidine and Pantoprazole Therapy, *J. Physiol. Pharmacol.* 72 (2021) 939–955. <https://doi.org/10.26402/jpp.2021.6.11>.
- [193] J. Kopincová, A. Púzszerová, I. Bernátová, Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide, *Interdiscip. Toxicol.* 4 (2011) 63–68. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0012-z>.
- [194] M.J. Hsieh, H.T. Liu, C.N. Wang, H.Y. Huang, Y. Lin, Y.S. Ko, J.S. Wang, V.H.S. Chang, J.H.S. Pang, Therapeutic potential of pro-angiogenic BPC157 is associated with VEGFR2 activation and up-regulation, *J. Mol. Med.* 95 (2017)

323–333. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1488-y>.

- [195] M. Knezevic, S. Gojkovic, I. Krezic, H. Zizek, D. Malekinusic, B. Vrdoljak, H. Vranes, T. Knezevic, I. Barisic, K.H. Pavlov, D. Drmic, M. Staroveski, A. Djuzel, Z. Rajkovic, T. Kolak, I. Kocman, E. Lovric, M. Milavic, S. Sikiric, A. Tvrdeic, L. Patrlj, S. Strbe, A. Kokot, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Occlusion of the superior mesenteric artery in rats reversed by collateral pathways activation: Gastric pentadecapeptide bpc 157 therapy counteracts multiple organ dysfunction syndrome; intracranial, portal, and caval hypertension; and aortal hypotension, *Biomedicines*. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060609>.
- [196] M. Zlatar, A. Kokot, L.B. Vuletic, S. Masnec, T. Kralj, M.M. Perisa, I. Barisic, B. Radic, K. Milanovic, D. Drmic, S. Seiwert, P. Sikiric, BPC 157 as a Therapy for Retinal Ischemia Induced by Retrobulbar Application of L-NAME in Rats, *Front. Pharmacol.* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.632295>.
- [197] S. Gojkovic, I. Krezic, B. Vrdoljak, D. Malekinusic, I. Barisic, A. Petrovic, K.H. Pavlov, M. Kolovrat, A. Duzel, M. Knezevic, K. Kasnik Kovac, D. Drmic, L.B. Vuletic, A. Kokot, A. Boban Blagaic, S. Seiwert, P. Sikiric, Pentadecapeptide BPC 157 resolves suprahepatic occlusion of the inferior caval vein, Budd-Chiari syndrome model in rats, *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 11 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.4291/WJGP.V11.I1.1>.
- [198] M. Knezevic, S. Gojkovic, I. Krezic, H. Zizek, H. Vranes, D. Malekinusic, B. Vrdoljak, T. Knezevic, K.H. Pavlov, D. Drmic, M. Staroveski, A. Djuzel, Z. Rajkovic, T. Kolak, E. Lovric, M. Milavic, S. Sikiric, I. Barisic, M. Tepes, A. Tvrdeic, L. Patrlj, S. Strbe, M. Sola, A. Situm, A. Kokot, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Complex Syndrome of the Complete Occlusion of the End of the Superior Mesenteric Vein, Opposed with the Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 in Rats, *Biomedicines*. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9081029>.
- [199] F. Amic, D. Drmic, Z. Bilic, I. Krezic, H. Zizek, M. Peklic, R. Klicek, A. Pajtak, E. Amic, T. Vidovic, M. Rakic, M. Milkovic Perisa, K. Horvat Pavlov, A. Kokot, A. Tvrdeic, A. Boban Blagaic, M. Zovak, S. Seiwert, P. Sikiric, Bypassing major venous occlusion and duodenal lesions in rats, and therapy with the stable

- gastric pentadecapeptide BPC 157, L-NAME and L-arginine, *World J. Gastroenterol.* 24 (2018) 5366–5378.
<https://doi.org/10.3748/WJG.V24.I47.5366>.
- [200] T. Kralj, A. Kokot, M. Zlatar, S. Masnec, K. Kasnik Kovac, M.M. Perisa, L.B. Vuletic, A. Giljanovic, S. Strbe, S. Sikiric, S. Balog, B. Sontacchi, D. Sontacchi, M. Buljan, E. Lovric, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 Therapy of Rat Glaucoma, *Biomedicines*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10010089>.
- [201] M. Tepes, S. Gojkovic, I. Krezic, H. Zizek, H. Vranes, Z. Madzar, G. Santak, L. Batelja, M. Milavic, S. Sikiric, I. Kocman, K. Simonji, M. Samara, M. Knezevic, I. Barisic, E. Lovric, S. Strbe, A. Kokot, I. Sjekavica, T. Kolak, A. Skrtic, S. Seiwert, A. Boban Blagaic, P. Sikiric, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 Therapy for Primary Abdominal Compartment Syndrome in Rats., *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 718147. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.718147>.
- [202] I.M. Smoday, I. Petrovic, L. Kalogjera, H. Vranes, H. Zizek, I. Krezic, S. Gojkovic, I. Skorak, K. Hriberski, I. Brizic, M. Kubat, S. Strbe, I. Barisic, M. Sola, E. Lovric, M. Lozic, A.B. Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Therapy Effect of the Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 on Acute Pancreatitis as Vascular Failure-Induced Severe Peripheral and Central Syndrome in Rats, *Biomedicines*. 10 (2022).
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10061299>.
- [203] I. Barisic, D. Balenovic, M. Udovicic, D. Bardak, D. Strinic, J. Vlainic, H. Vranes, I.M. Smoday, I. Krezic, M. Milavic, S. Sikiric, S. Uzun, G.Z. Posilovic, S. Strbe, I. Vukoja, E. Lovric, M. Lozic, M. Sever, M.L. Bencic, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, S. Seiwert, P. Sikiric, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 May Counteract Myocardial Infarction Induced by Isoprenaline in Rats, *Biomedicines*. 10 (2022).
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10020265>.
- [204] S. Szabo, J.S. Trier, A. Brown, J. Schnoor, Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat, *Gastroenterology*. 88 (1985) 228–236. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(85\)80176-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(85)80176-1).

- [205] P. Sikiric, M. Udovicic, I. Barisic, D. Balenovic, G. Zivanovic Posilovic, D. Strinic, S. Uzun, S. Sikiric, I. Krezic, H. Zizek, H. Yago, S. Gojkovic, I.M. Smoday, L. Kalogjera, H. Vranes, M. Sola, S. Strbe, A. Koprivanac, I. Premuzic Mestrovic, T. Mestrovic, P. Pavic, A. Skrtic, A. Boban Blagaic, M. Lovric Bencic, S. Seiwert, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157 as Useful Cytoprotective Peptide Therapy in the Heart Disturbances, Myocardial Infarction, Heart Failure, Pulmonary Hypertension, Arrhythmias, and Thrombosis Presentation, *Biomedicines*. 10 (2022).
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10112696>.
- [206] P. Sikiric, R. Rucman, B. Turkovic, M. Sever, R. Klicek, B. Radic, D. Drmic, M. Stupnisek, M. Misic, L.B. Vuletic, K.H. Pavlov, I. Barisic, A. Kokot, M. Peklic, S. Strbe, A. Boban Blagaic, A. Tvrdeic, D. Stancic Rokotov, H. Vrcic, M. Staresinic, S. Seiwert, Novel Cytoprotective Mediator, Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Vascular Recruitment and Gastrointestinal Tract Healing, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 1990–2001.
<https://doi.org/10.2174/1381612824666180608101119>.
- [207] P. Sikiric, S. Gojkovic, I. Krezic, H. Zizek, M. Knezevic, S. Strbe, A. Boban Blagaic, A. Skrtic, E. Lovric, S. Sikiric, M. Milavic, S. Seiwert, A. Kokot, Cytoprotective gastric pentadecapeptide BPC 157 resolves major vessel occlusion disturbances, ischemia-reperfusion injury following Pringle maneuver, and Budd-Chiari syndrome, *World J. Gastroenterol.* 28 (2022) 23–46. <https://doi.org/10.3748/WJG.V28.I1.23>.
- [208] E.A. Kang, Y.-M. Han, J.M. An, Y.J. Park, P. Sikiric, D.H. Kim, K.A. Kwon, Y.J. Kim, D. Yang, H. Tchah, K.B. Hahm, BPC157 as Potential Agent Rescuing from Cancer Cachexia, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 1947–1956.
<https://doi.org/10.2174/1381612824666180614082950>.
- [209] J.N. Sharma, A. Al-Omran, S.S. Parvathy, Role of nitric oxide in inflammatory diseases, *Inflammopharmacology*. 15 (2007) 252–259.
<https://doi.org/10.1007/S10787-007-0013-X>.
- [210] T. Becejac, V. Cesarec, D. Drmic, D. Hirsl, G. Madzarac, Z. Djakovic, I. Bunjevac, A.Z. Sever, A. Sepac, L.B. Vuletic, D. Stancic Rokotov, S. Seiwert, P. Sikiric, An Endogenous Defensive Concept , Renewied Cytoprotection /

Adaptive Cytoprotection : Intra (Per) -Oral / Intragastric Administration of Strong Alcohol in Rat . Involvement of Pentadecapeptide BPC 157 and Nitric Oxide System, (2018) 429–440. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.3.11>.

[211] R.B. Diller, A.J. Tabor, The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review, *Biomimetics*. 7 (2022) 14–16. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087>.

[212] J.S. Pober, W.C. Sessa, Inflammation and the blood microvascular system, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016345>.

[213] K. Omori, T. Kida, M. Hori, H. Ozaki, T. Murata, Multiple roles of the PGE₂-EP receptor signal in, (2014) 4879–4889. <https://doi.org/10.1111/bph.12815>.

[214] L.M. Lin, P.A. Rosenberg, Repair and regeneration in endodontics, (2011) 889–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01915.x>.

[215] S. Seiwerth, L. Brcic, L. Vuletic, D. Kolenc, G. Aralica, M. Misic, A. Zenko, D. Drmic, R. Rucman, P. Sikiric, BPC 157 and blood vessels, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 1121–1125. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990421>.

8. SAŽETAK

Apikalni parodontitis jedno je od najčešćih upalnih stanja zuba i široko je rasprostranjen. Unatoč nerijetkom neuspjehu mehaničkog čišćenja kao zlatnog standarda i dalje ne postoji alternativna terapija koja bi utjecala na smanjenje oštećenja uzrokovanoga otvaranjem pulpe te sačuvala zub. Pentadekapeptid BPC 157 stabilni je gastrični antiulkusni peptid koji je u brojnim istraživanjima pokazao protektivne učinke i pospješivanje cijeljenja, ne samo u gastrointestinalnom traktu, iz kojeg je izoliran, nego i u brojnim drugim organima i organskim sustavima. Pri neutralnim vrijednostima pH od 7.0 dobro je topljiv u vodi i fiziološkoj otopini te se tako otopljen primjenjuje samostalno i nije mu potreban nosač. Djelotvoran je već pri malim koncentracijama i najčešće se koristi u nanogramskim i mikrogramskim dozama. U životinjskim modelima nije postignuta letalna doza. BPC 157 sveobuhvatno poboljšava cijeljenje kod serije ozljeda različitih vrsta, od akutnih do kroničnih. Povezanost sustava dušičnog oksida (NO) i BPC - a 157 jedan je od ključnih čimbenika u njegovom učinku na proces cijeljenja tkiva.

Cilj rada je pokazati terapijski učinak pentadekapeptida BPC 157 na apikalni parodontitis uzrokovan ekspozicijom pulpe zuba kod štakora.

Prvi desni maksilarni molar štakora trepaniran je na mezijalnoj strani okluzalne plohe zuba. Tretirane grupe u terapiji su primale BPC 157 (10ng/kg ili 10µg/kg) *per os*, dok je kontrolna grupa tijekom eksperimenta pila vodu. Uzorci sline i brisevi usne šupljine uzeti su za mikrobiološku analizu. Oštećeni zub i okolno tkivo analizirani su histološki i molekularno, dok je cijeli eksperiment praćen makroskopski i radiološki.

Makroskopsko promatranje pokazalo je da je preostali koronarni dio tvrdog zubnog tkiva, oko trepanacijskog otvora, skloniji pucanju u netretiranoj grupi. Mikrobiološka analiza pokazala je jednak broj kolonija i bakterijskih vrsta kod svih štakora. Područje radiografskog gubitka periapikalne kosti i defekta furkacije bilo je znatno manje u štakora koji su uzimali pentadekapeptid BPC 157. Rezultati RT-qPCR analize gena na razini mRNA, gdje su ispitani uzorci tretiranih grupa štakora BPC-om 157 i uspoređeni s kontrolnom grupom, pokazali se kako pentadekapeptid BPC 157 ima značajan učinak na ekspresiju gena od interesa. Za normalizaciju rezultata korištena su tri gena kao endogena kontrola. Razina ekspresije mRNA za gene *Egr1* i *Ptgs2* bila je <1 , a za gene *Nos2* i *Nos3* >1 . Histološka analiza pokazala je pojačanu razinu inflamatornog i staničnog uzorka i kod tretiranih i netretiranih životinja, dok je statistički značajna

razlika pronađena u broju krvožilnih prostora kojih je znatno više kod grupa štakora tretiranih pentadekapeptidom BPC 157.

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i dokazuju da aplikacija pentadekapeptida BPC 157 kod apikalnog parodontitisa uzrokovanog ekspozicijom pulpe zuba štakora smanjuje oštećenje u periapikalnom dijelu.

9. SUMMARY

Apical periodontitis is one of the most common inflammatory dental diseases and is widespread. Despite the frequent failure of mechanical cleaning as the gold standard, there is still no alternative therapy that could reduce the damage caused by pulp opening and save the tooth. The pentadecapeptide BPC 157 is a stable gastric anti-ulcer peptide that has been shown in numerous studies to have protective and healing effects not only in the gastrointestinal tract from which it was isolated, but also in numerous other organs and organ systems. With a neutral pH of 7.0, it is highly soluble in water and physiological solution, so it can be used independently and does not require a carrier. It is effective at low concentrations and is most commonly used in nanogram and microgram doses. No lethal dose has been achieved in animal models. BPC 157 comprehensively improves healing in a range of injuries of different types, from acute to chronic. The link between the nitric oxide system (NO) system and BPC 157 is one of the key factors in its effect on the tissue healing process.

The aim of this work is to demonstrate the therapeutic effect of the pentadecapeptide BPC 157 on apical periodontitis caused by exposure of dental pulp in rats

Trepanation of the rat's first right maxillary molar was performed on the mesial side of the tooth occlusal surface. The treated groups in the therapy received BPC 157 (10ng/kg or 10µg/kg) *per os*, while the control group drank water during the experiment. Saliva samples and swabs of the oral cavity were collected for microbiological analysis. The damaged tooth and the surrounding tissue were analyzed histologically and molecularly, while the whole experiment was monitored macroscopically and radiologically.

Macroscopic observation showed that the remaining coronal part of the tooth tissue around the trepanation opening is more prone to cracking in the non-treated group. Microbiological analysis showed the same count of colonies and bacterial species in all rats. The area of radiographic periapical bone loss and furcation defect was significantly smaller in rats that were taken BPC 157. The results of RT-qPCR analysis of genes at the mRNA level, in which the samples from the rat groups treated with BPC 157 were examined and compared with the control group, showed that the pentadecapeptide BPC 157 had a significant effect on the expression of the genes of interest. Three genes were used as endogenous controls to normalize the results. The mRNA expression level for the *Egr1* and *Ptgs2* genes was < 1 and for the *Nos2* and *Nos3* genes was > 1. Histological analysis showed an increased level of inflammatory

and cellular patterns in both treated and untreated animals, while a statistically significant difference was found in the number of blood vessels, which was significantly greater in the rat groups treated with pentadecapeptide BPC 157.

The results of the conducted research confirm the hypothesis and prove that the application of pentadecapeptide BPC 157 in apical periodontitis caused by the exposure of the dental pulp of rats reduces the damage in the periapical part.

10. PRILOZI

10.1. Popis oznaka i kratica

AAE	američko udruženje endodonata; <i>engl. American Association of Endodontists</i>
ACTB	aktin-beta; <i>engl. Actin Beta</i>
BMP	koštani morfogogenetski protein; <i>engl. Bone Morphogenetic Protein</i>
BMSCs	matične stanice koštane srži; <i>engl. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells</i>
BPC	pentadekapeptid; <i>engl. Body Protection Compound</i>
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina; <i>engl. Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CFU	jedinice koje tvore kolonije; <i>engl. Colony-forming unit</i>
COX2/PTGS2	ciklooksigenaza 2/sintaza prostaglandin-endoperoksida 2; <i>engl. Cyclooxygenase/Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina; <i>engl. Deoxyribonucleic Acid</i>
DPSCs	matične stanice zubne pulpe; <i>engl. Dental Pulp Stem Cells</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina; <i>engl. Ethylenediamene tetraacetic acid</i>
EGR1	faktora ranog odgovora na rast; <i>engl. Early growth response</i>
ESE	europsko društvo za endodonciju; <i>engl. European Society of Endodontology</i>
FGF	faktor rasta fibroblasta; <i>engl. Fibroblast Growth Factor</i>
FMOC	fluoren-9-ilmetoksikarbonil; <i>engl. Fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfatna dehidrogenaza; <i>engl. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HE	hematoksilin-eozin
HPLC	visokotlačna tekuća kromatografija; <i>engl. High pressure liquid chromatography</i>
IGF	inzulinu sličan faktor rasta; <i>engl. Insulin like Growth Factor</i>
ISO	<i>engl. International Organization for Standardization</i>
kg	kilogram
L-arginin	prekursor dušikovog monoksida
LD1	smrtonosna doza; <i>engl. Lethal dose</i>
L-NAME	N(gamma)-nitro-L-arginine methyl ester
MALDI-TOF	<i>engl. Matrix Assisted LASER Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
mg	miligram
ml	mililitar
M.W.	molekularna masa; <i>engl. molecular weight</i>
mRNA	glasnička RNA; <i>engl. Messenger RNA</i>
µg	mikrogram
µl	mikrolitar
NAB2	protein 2 koji veže NGFI-A/EGR1; <i>engl. NGFI-A binding protein 2/EGR1 binding protein 2</i>
NaOCl	natrij hipoklorit; <i>engl. Sodium Hypochlorite</i>
ng	nanogram
NO	dušikov monoksid, dušikov(II) oksid; <i>engl. Nitric oxide</i>

NOS	sintetaza dušikovog monoksida; <i>engl. Nitric Oxide Synthases</i>
NOS1/nNOS	neuronska sintetaza dušikovog monoksida; <i>engl. Neuronal Nitric Oxide Synthases</i>
NOS2/iNOS	inducibilna sintetaza dušikovog monoksida; <i>engl. Inducible Nitric Oxide Synthases</i>
NOS3/eNOS	endotelna sintetaza dušikovog monoksida; <i>engl. Endothelial Nitric Oxide Synthases</i>
NSAID	protuupalni nesteroidni lijek; <i>engl. Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom; <i>engl. Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	trombocitni faktor rasta; <i>engl. Platelet-derived Growth Factor</i>
RNA	ribonukleinska kiselina; <i>engl. Ribonucleic Acid</i>
RN18S	gen koji kodira za 18S ribosomsku RNA
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom kojoj prethodi reverzna transkripcija; <i>engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SCAP	matične stanice apikalne papile; <i>engl. Stem Cells from the Apical Papilla</i>
SD	standardna devijacija
SHED	matične stanice mliječnih zuba; <i>engl. Human Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cells</i>
SŽS	središnji živčani sustav
TGF	transformirajući faktor rasta; <i>engl. Transforming Growth Factor</i>
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela; <i>engl. Vascular Endothelial Growth</i>

11. ŽIVOTOPIS

Martina Juzbašić rođena je 17. listopada 1987. godine u Slavonskom Brodu. Nakon završene Prirodoslovno-matematičke gimnazije u Županji 2006. godine upisuje stomatologiju na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Isti završava 2012. godine i počinje sa stažiranjem u DZ Zagreb Zapad. Poslije položenog državnog ispita zapošljava se u DZ Županja te nakon četiri godine rada prelazi u DZ Osijek u kojem ostaje do zapošljavanja na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo 2019. godine. U studenom 2021. godine započinje i sa specijalističkim usavršavanjem iz Protetike dentalne medicine. Autorica je i koautorica više radova u znanstvenim časopisima. Članica je Hrvatske komore dentalne medicine. Sudjelovala je i usavršavala se na inozemnim i domaćim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima trajnog usavršavanja.

PUBLIKACIJE

Znanstveni radovi:

1. Talapko, Jasminka; Matijević, Tatjana; Juzbašić, Martina; Antolović-Požgain, Arlen; Škrlec, Ivana. Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry, Cardiology and Dermatology. *Microorganisms* 2020, 8, 1400. doi: 10.3390/microorganisms8091400
2. Talapko, Jasminka; Juzbašić, Martina; Matijević, Tatjana; Pustijanac, Emina; Bekić, Sanja; Kotris, Ivan; Škrlec, Ivana. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J. Fungi* 2021, 7, 79. doi: 10.3390/jof7020079
3. Juzbašić, Martina; Seifert, Davor; Tomas, Matej; Čandrlić, Marija; Matijević, Marko. Importance of Oral Hygiene and Maintaining Oral Health in Persons With Disabilities // *Southeastern European medical journal*, 2021, 5, 1; 170-175 doi:10.26332/seemedj.v5i1.176
4. Škrlec, Ivana; Talapko, Jasminka; Juzbašić, Martina; Steiner, Robert . Sex Differences in Circadian Clock Genes and Myocardial Infarction Susceptibility. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2021, 8, 53. doi: 10.3390/jcdd8050053
5. Tomas, Matej; Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; Ivanišević, Zrinka; Matijević, Nikola; Včev, Aleksandar; Cvijanović Pelosa, Olga; Matijević, Marko; Perić Kačarević, Željka. Synthetic Injectable Biomaterials for Alveolar Bone

- Regeneration in Animal and Human Studies. *Materials* 2021, 14, 2858. doi: 10.3390/ma14112858
6. Čandrić, Marija; Dvorski, Manuela; Matijević, Marko; Petrović, Đorđe; Matijević, Nikola; Juzbašić, Martina; Ivanišević, Zrinka; Tomas, Matej. Knowledge and Attitudes of Patients about Dental Implants as a Treatment Option after Tooth Extraction // *Collegium antropologicum*, 2021, 45, 2; 121-133 doi:10.5671/ca.45.2.8
 7. Talapko, Jasminka; Frauenheim, Erwin; Juzbašić, Martina; Tomas, Matej; Matić, Suzana; Jukić, Melita; Samardžić, Marija; Škrlec, Ivana. Legionella pneumophila—Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. *Microorganisms* 2022, 10, 255. doi: 10.3390/microorganisms10020255
 8. Talapko, Jasminka; Juzbašić, Martina; Srb Milostić, Andrea; Holik, Dubravka; Pačarić, Stana; Škrlec, Ivana. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti različitih vrsta meda na bakterijskim vrstama *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* // *Zbornik radova iz laboratorijske dijagnostike*, 1 (2022), 1-13
 9. Talapko, Jasminka; Meštrović, Tomislav; Juzbašić, Martina; Tomas, Matej; Erić, Suzana; Horvat Aleksijević, Lorena; Bekić, Sanja; Schwarz, Dragan; Matić, Suzana; Neuberg, Marijana; Škrlec, Ivana. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. *Antibiotics* 2022, 11, 1417. doi: 10.3390/antibiotics11101417
 10. Gamulin, Ozren; Oroz, Katarina; Ćoric, Luka; Krajačić, Maria; Škrabić, Marko; Dretar, Vilim; Štrbe, Sanja; Talapko, Jasminka; Juzbašić, Martina; Krezić, Ivan i sur. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Reveals Molecular Changes in Blood Vessels of Rats Treated with Pentadecapeptide BPC 157. *Biomedicines* 2022, 10, 3130. doi: 10.3390/biomedicines10123130
 11. Tomas, Matej; Karl, Matej; Čandrić, Marija; Matijević, Marko; Juzbašić, Martina; Cvijanović Pelozo, Olga; Jerbić Radetić, Ana Terezija; Kuiš, Davor; Vidaković, Bruno; Ivanišević, Zrinka; Perić Kačarević, Željka. A Histologic, Histomorphometric, and Immunohistochemical Evaluation of Anorganic Bovine Bone and Injectable Biphasic Calcium Phosphate in Humans: A Randomized Clinical Trial. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5539. doi: 10.3390/ijms24065539

12. Talapko, Jasminka; Meštrović, Tomislav; Dmitrović, Branko; Juzbašić, Martina; Matijević, Tatjana; Bekić, Sanja; Erić, Suzana; Flam, Josipa; Belić, Dino; Petek Erić, Anamarija; Milostić Srb, Andrea; Škrlec, Ivana. A Putative Role of Candida albicans in Promoting Cancer Development: A Current State of Evidence and Proposed Mechanisms. Microorganisms 2023, 11, 1476. doi: 10.3390/microorganisms11061476

Kongresni sažetak u zborniku radova:

1. Martina Juzbašić. Važnost oralne higijene i održavanja oralnog zdravlja kod osoba s invaliditetom // 1. Međunarodna umjetnička i znanstvena konferencija Osobe s invaliditetom u umjetnosti, znanosti, odgoju i obrazovanju (The 1st International Artistic and Scientific Conference Persons with Disabilities in Arts, Science and Education) / Sabljar, Mirna ; Šulentić Begić, Jasna ; Ileš, Tatjana (ur.). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Akademija za umjetnost i kulturu u Osijeku, 2019. str. 100-101
2. Tomas, Matej; Čandrlić, Marija; Karl, Matej; Juzbašić, Martina; Matijević, Nikola; Perić Kačarević, Željka; Matijević, Marko. Histological analysis of two biomaterials after socket preservation – Preliminary histological findings // Special Issue of Clinical Oral Implant Research: 29th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration, 5–11 October 2020 / Heitz-Mayfield, Lisa J.A. (ur.). Berlin, Germany: John Wiley & Sons Ltd, 2020. str. 100-100 doi:https://doi.org/10.1111/clr.41_13644
3. Kirsch, Sanja; Grdiša, Antonija; Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; Tomas, Matej; Matijević, Marko. Career choice motivations of Dental Medicine and Dental Hygiene students' at Faculty of Dental Medicine and Health osijek // International Congress: "Current Practice in Croatian Pediatric Dentistry – 2020" Zagreb, Hrvatska, 2020. str. 111-111
4. Tomas, Matej; Suzana Varga; Čandrlić, Marija; Juzbašić, Martina; Dozet Matea; Nikola Matijević; Marko Matijević. Interdisciplinary collaboration during the treatment of orthodontic patients // 2nd International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians - Abstract Book / Pušeljić, Nora - Osijek : University of Osijek, Faculty of Medicine, 2020

5. Juzbašić Martina, Talapko Jasminka, Krezić Ivan, Žižek Helena, Tomas Matej. Effect of pentadecapeptide BPC 157 on apical periodontitis caused by pulp exposure in rats // 10. hrvatski kongres farmakologije i 1. hrvatski kongres kliničke farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem. Opatija, Hrvatska, 2022. str. 200-200

Projekti:

IP2-FDMZ-2022

Ime i prezime voditelja: doc. dr. sc. Jasminka Talapko

„Antibakterijski učinci pentadecapeptida BPC 157 te odabranih vrsta meda na oralnim patogenima in vitro” (suradnik)

IP11-FDMZ-2021

Ime i prezime voditelja: doc. dr. sc. Jasminka Talapko

„Ispitivanje antimikrobne aktivnosti konvencionalnih i nekonvencionalnih oralnih antiseptika te pentadecapeptida BPC 157 na najčešćim oralnim patogenima“ (suradnik)