

Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Klara Naka, Ivan Orabović

**ULOGA OPIORFINA KOD EKSPERIMENTALNE OROFACIJALNE
BOLI**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mobilnu protetiku Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s Institutom Ruđer Bošković, pod mentorskim vodstvom prof. dr. sc. Ive Alajbeg u sklopu znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost “*Povezanost genskih polimorfizama s temporomandibularnim poremećajima*” (šifra projekta IP-2019-04-6211, voditeljica projekta prof. dr. sc. Iva Alajbeg) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

POPIS KRATICA I OZNAKA:

Gln	glutamin (<i>eng. Glutamine</i>)
Arg	arginin (<i>eng. Arginine</i>)
Phe	fenilalanin (<i>eng. Phenylalanine</i>)
Ser	serin (<i>eng. Serine</i>)
PROL1	<i>eng. Proline rich, lacrimal 1</i>
BPLP	<i>eng. Basic proline rich lacrimal protein</i>
TFA	trifluoroctena kiselina (<i>eng. Trifluoroacetic acid</i>)
TRPV1	vaniloidni receptori – kanali prolaznog potencijala (<i>eng. Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>)
CGRP	peptid povezan s kalcitoninskim genom (<i>eng. Calcitonin gene-related peptide</i>)
NPRS	numerička skala procjene boli (<i>eng. Numerical Pain Rating Scale</i>)
LC-MS	tekućinska kromatografija – masena spektrometrija (<i>eng. Liquid chromatography – mass spectrometry</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>eng. High-performance liquid chromatography</i>)
ESI	elektrosprej ionizacija (<i>eng. Electrospray ionization</i>)
FA	fluoroctena kiselina (<i>eng. Fluoroacetic acid</i>)
Me-OH	metanol (<i>eng. Methanol</i>)
MRM	praćenje višestrukih reakcija (<i>eng. Multiple reaction monitoring</i>)
ELISA	<i>eng. Enzyme - linked immunosorbent assay</i>

Sadržaj rada:

1.	UVOD	1
1.1.	Opiorfin	1
1.2.	Kapsaicin	2
1.3.	Percepcija boli	3
2.	CILJEVI I HIPOTEZE RADA	4
3.	MATERIJALI I METODE	4
3.1.	Ispitanici	4
3.2.	Stimulacija boli kapsaicinom.....	5
3.3.	Metoda procjene osjeta boli.....	5
3.4.	Prikupljanje sline	6
3.5.	Mjerenje koncentracije opiorfina.....	9
3.6.	Procjena potrebne veličine uzorka.....	9
3.7.	Statistička obrada podataka	10
4.	REZULTATI.....	11
5.	RASPRAVA.....	16
6.	ZAKLJUČAK	19
7.	ZAHVALE	19
8.	POPIS LITERATURE	20
9.	SAŽETAK.....	24
10.	SUMMARY	25

1. UVOD

1.1. Opiorfin

Opiorfin je endogeni peptid izoliran iz ljudske sline 2006. godine (1). Po sastavu je to pentapeptid (H – Gln – Arg – Phe – Ser – Arg – OH), a upravo je Phe³ skupina odgovorna za inhibitorni učinak na ektoenzime, ljudsku neutralnu ekto-endopeptidazu (hNEP) i ekto-aminopeptidazu (hAP-N) (2), čime se sprječava raspad enkefalina, držeći ih podalje od ektoenzima i omogućujući njihov produljeni analgetički učinak (3,4,5). Enkefalini su endogeni opioidni peptidi koje stvara kralježnična moždina i srž nadbubrežne žlijezde. Tijelo ih izlučuje kada osjeti bol te imaju vrlo važnu ulogu u njezinoj regulaciji (6).

Opiorfin antinociceptivni učinak postiže aktivacijom endogenih opioidnih puteva djelujući na μ i δ opioidne receptore (1,4,7,8).

Potječe od N-terminalne regije *Proline rich, lacrimal 1* (PROL1) proteina (3). Ljudski PROL1 gen (poznat kao PRL1 i BPLP gen) eksprimiran je u žlijezdama slinovnicama i pripada istoj multigennoj obitelji kao i sijalorfin, prirodni inhibitor bolne senzacije u štakora (4). Istraživanja bazirana na farmakološkim učincima opiorfina i sijalorfina pokazala su njihovu dvojnju aktivnost na povišenje koncentracije enkefalina: blokiranjem degradacije enzima, ali i direktnom interakcijom s veznim mjestima (9).

Istraživanja su pokazala da opiorfin ima šesterostruko jače djelovanje od morfina (4,5), ali suprotno tom egzogenom opioidu, opiorfin ne razvija značajnu antinociceptivnu toleranciju nakon dulje uporabe. Za razliku od morfina, opiorfin aktivacijom ograničenog opioidnog puta specifično uključenog u kontrolu boli, ne uzrokuje pretjerano iskorištavanje opioidnih receptora, dovodeći tako do boljeg balansa između analgezije i nuspojava (7,8).

Osim u slini, opiorfin je nađen i u plazmi, cerebrospinalnoj tekućini, urinu, suzama, sjemenoj tekućini i majčinom mlijeku (1).

Postoje naznake da se koncentracija opiorfina mijenja ovisno o intenzitetu boli u osoba s kroničnim bolnim poremećajima, na što je ukazalo pilot istraživanje provedeno na pacijentima s temporomandibularnim poremećajima (10). Također, pronađene su razlike između koncentracije opiorfina u pacijenata sa sindromom pekućih usta, u usporedbi sa zdravim osobama (1).

Istraživanja provedena na štakorima ukazala su na vrlo važnu značajku opiorfina. Naime, za njegov antidepresivni i analgetički potencijal potrebna je ista titracija, što ga čini vrlo obećavajućim za liječenje poremećaja koji istovremeno obuhvaćaju oba stanja (8). Zato danas postoji niz istraživanja usmjerenih na mehanizam djelovanja opiorfina s ciljem boljeg razumijevanja čovjekove endogene obrane protiv boli, ali i potencijalnog sintetiziranja analgetika što sličnijeg opiorfinu.

1.2. Kapsaicin

Kapsaicin je alkaloid koji se dobiva iz biljaka roda *Capsicum* (paprika). To je vaniloid (sadrži dušikovu skupinu lociranu na bočnom lancu) koji je prvi put izoliran iz kajenskog papra 1876. godine. Receptori za kapsaicin su vaniloidni receptori – kanali prolaznog potencijala (TRPV1) te su prvi put (1997.) izolirani iz ganglija dorzalnih korjenova spinalnih živaca štakora. Istraživanjem je dokazano da se ti receptori u ljudskom organizmu nalaze u dorzalnim ganglijima, mozgu, bubrezima, pankreasu, testisima, maternici, slezeni, plućima, jetri i tankom crijevu (11).

Kapsaicin uzrokuje žareću bol kada se aplicira na dorzalnu stranu jezika (12,13). Bolni podražaj kapsaicina zapravo je posljedica njegova vezanja za TRPV1. TRPV1 može biti aktiviran kapsaicinom, ali i visokom temperaturom, s pragom podražaja na 43°C, kada u neuronima dolazi do priljeva kalcijevih iona i aktivacije natrijskih kanala što na kraju rezultira postizanjem akcijskog potencijala. To će dovesti do otpuštanja neuropeptida, od kojih su najbrojniji: supstanca P, neurokinin A i CGRP, i posljedično bolnog podražaja (nocicepcije) (11).

Djelovanje kapsaicina nije ograničeno na uzrokovanje bolnog podražaja (12,13,14). Ponavljane doze kapsaicina uzrokuju inicijalnu bolnu senzaciju, ali potom imaju analgetički učinak desenzitizacijom, odnosno inhibicijom funkcije receptora (13,15). Primjena topikalnog kapsaicina registrirana je za liječenje bolnih stanja kao što su dijabetička i HIV neuropatija, korištenjem 8% flastera, ali svoju farmakološku ulogu ima i u: redukciji debljine, terapiji neurogenog mjehura, kontroli dijabetesa i snižavanju krvnog tlaka (15). Postoje naznake da bi se kapsaicin mogao koristiti u terapiji cluster glavobolje, trigeminalne neuralgije, psorijaze i ulkusa u usnoj šupljini nastalog zbog kemoterapije ili zračenja, iako bi se trebala provesti dobro koncipirana istraživanja koja bi to detaljno istražila (16). Njegovo je terapijsko djelovanje uočeno i kod sindroma pekućih usta. Inhibicijom biosinteze i aksonskog provođenja supstance

P (17), smanjuje njezine zalihe i posljedično bol za 2 do 3 jedinice na vizualno-analognu skali (18). Istraživanje Alexianu i sur. pokazalo je da se kapsaicin može koristiti u terapiji migrena dok doktor Chatterjee u svojoj studiji dokazuje da 72% ispitanika uopće ne osjeća bol nakon intranalazno primjenjenog kapsaicina, a od svih, 44,4% već unutar prve minute postiže olakšanje (19).

Kapsaicin je slabo topljiv u vodi, ali se dobro otapa u organskim otapalima poput etanola koji ujedno pruža i najbolju topljivost (20).

Iako je kapsaicin korišten u terapijske svrhe, valja biti oprezan s količinom koja se unosi u tijelo. Prevelika doza može dovesti do patoloških promjena. One se javljaju na staničnoj razini, ali i makroskopskoj kao što su ulceracije, nekroza, pa čak i pojave karcinoma (21,22).

1.3. Percepcija boli

Nemogućnost učinkovitog mjerenja osjeta boli najveća je barijera u napretku istraživanja boli i kliničkih intervencija u suzbijanju iste. Klinička se rutina za ocjenjivanje boli temelji na jednostavnom ispitivanju pacijenata da procjene subjektivni doživljaj boli i da tom osjetu pridodaju oznaku (najčešće broj) ovisno o intenzitetu (23). Sama percepcija i ekspresija boli uvjetovane su: okolinom (24), kulturom i etničkom pripadnošću (25,26). Kultura ne oblikuje samo životne vrijednosti, uvjerenja i običaje pojedinaca, nego oblikuje i način na koji osoba reagira i nosi se s boli.

Istraživanja su pokazala kako aspekt okoline ne čini samo osjet koji pojedinac prima na periferiji već i mozak čini bitnu sastavnicu u konačnom doživljaju boli. Emocionalno-motivacijska te kognitivno-bihevioralna sastavnica zato su neizostavne u percepciji, kao i u ekspresiji boli. Osim oblika bolnog podražaja, pažnja usmjerena na isti imaće značajnu ulogu u određivanju jačine boli. Odvratanje pažnje za vrijeme provođenja podražaja onemogućuje osobi da ga u potpunosti osvijesti, odnosno registrira, jer je kapacitet pojedinca za misaone procese uglavnom popunjen i nije u mogućnosti obraditi ga. Iz tog se razloga odvratanje pažnje prilikom bolne stimulacije smatra zaslužnom za smanjenu percepciju intenziteta boli, a u pojedinim slučajevima, ako je dovoljno veliko, i za stanje potpune analgezije. Zato je bitno znati da će poimanje boli, unaprijed određeno kulturnom, biti uvjetovano i situacijom u kojoj se pojedinac nalazi i sukladno tome potrebno je uvažiti varijacije u odgovoru na isti bolni podražaj (25).

2. CILJEVI I HIPOTEZE RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Izolirati endogeni peptid opiorfin iz sline ispitanika prije i nakon eksperimentalno izazvane orofacijalne boli.
2. Ustanoviti razlike u koncentracijama opiorfina prije i nakon eksperimentalno izazvane orofacijalne boli.
3. Ustanoviti razlike u intenzitetu boli tijekom, neposredno nakon te 20 minuta nakon djelovanja kapsaicina.

Početne hipoteze rada su:

1. Postojat će razlike između koncentracije opiorfina u slini zdravih ispitanika prije izazivanja boli kapsaicinom i nakon što se izazove eksperimentalni, kratkotrajni bolni podražaj (opiorfin će se pojačano lučiti na bolni podražaj).
2. Visina (jačina) bolnog osjeta bit će u korelaciji s koncentracijama izlučenog opiorfina u slini.

3. MATERIJALI I METODE

Eksperimentalno istraživanje provedeno je u skladu s temeljnim načelima i etičkim standardima Helsinške deklaracije i odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Broj: 05-PA-30-XVI-4/2020). Istraživanje je provedeno na Zavodu za mobilnu protetiku Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svim ispitanicima objašnjena je procedura i cilj ovog istraživanja te su svi dobrovoljno potpisali informirani pristanak.

3.1. Ispitanici

Sudionici istraživanja bili su studenti i zaposlenici Stomatološkog fakulteta u Zagrebu koji su dobrovoljno i bez novčane naknade pristali na istraživanje. Jedini je kriterij pri odabiru

ispitanika bio da trenutno nemaju orofacijalnu i/ili sistemsku bol kako bi se izbjegao bilo kakav neželjeni utjecaj na koncentraciju opiorfina u slini. Ispitanici su istih kulturoloških običaja sa sličnom prehranom, koja ne obuhvaća čestu uporabu čili papričica, kako bismo isključili hipotezu, ali i rezultate nekih istraživanja da učestala konzumacija hrane koja sadržava kapsaicin može uzrokovati smanjenje osjetljivosti na isti (14,27).

3.2. Stimulacija boli kapsaicinom

Budući da kapsaicin može imati i analgetički i bolni utjecaj na čovjeka, bitno je odrediti točnu koncentraciju otopine. Otopina kapsaicina pripravljena je miješanjem 916,23 μg praha kapsaicina s točno određenim volumenom 96% etanola kako bi se postigla koncentracija od 30 μM (12). Čuvan je u izoliranim epruvetama kako supstanca ne bi ishlapila.

Postupak je izveden po već utvrđenoj proceduri (12,14). Prije uporabe kapsaicina, 10 diskova laboratorijskog papira (promjera 12,7 mm i površine 1,267 cm^2) postavljeno je pincetom na podlogu. Pipetom (Finnpipette Digital 10 – 100 μL) je odmjereno 15 μL otopine kapsaicina za svaki pojedini disk nakon čega su diskovi natopljeni pripremljenom otopinom. Pripremu diskova bilo je potrebno napraviti 30 minuta prije same aplikacije i stimulacije orofacijalne boli kako bi imali dovoljno vremena za sušenje na zraku da etanol u potpunosti evaporira. Neposredno prije same aplikacije, na disk je pipetom (Finnpipette Digital 10 – 100 μL) s novim nastavkom, dodano po 15 μL destilirane vode kako bi se poboljšala adhezija diska na jezik. Nakon što su ispitaniku dane upute, započelo se s postavljanjem diskova. Disk se aplicirao na dorzalnu stranu jezika ispitanika koji ga je u zatvorenim ustima držao 30 sekundi nakon čega se disk uklonio i postavio novi. Pri promjeni diskova bilo je potrebno paziti da se upotrijebljeni disk gotovo istovremeno zamijeni novim kako bi se smanjilo vrijeme u kojem je ispitanik bez podražaja. Postupak apliciranja diskova trajao je 5 minuta, koliko je potrebno da se svih deset diskova postavi i ukloni s vrha jezika. Ispitanik je u tom vremenu zapisivao osjet boli svake minute, odnosno nakon uklanjanja svakog drugog diska.

3.3. Metoda procjene osjeta boli

Eksperimentalna orofacijalna bol u ispitanika izazvana je pomoću diskova natopljenih otopinom kapsaicina koji su postavljeni na vrh jezika. Prema istraživanjima provedenim na

uzorcima iz SAD-a i Europe, prednost za ocjenjivanje boli daje se numeričkoj skali procjene boli (*eng. Numerical Pain Rating Scale*) (NPRS) (26).

Kao metoda procjene boli u ovom istraživanju korištena je *NPRS*. Radi se o 11-bodovnom sustavu u kojem ispitanici upisuju subjektivan osjet boli na skali 0 – 10 pri čemu 0 označava izostanak boli, a 10 najgoru moguću bol (26). Svim je ispitanicima dan papir na kojemu su zapisivali osjet boli na sljedeći način: svake minute tijekom 5 minuta aplikacije diskova (nakon zamjene drugog diska trećim, četvrtog diska petim, šestog diska sedmim, itd.) te po prestanku aplikacije diskova svake 2 minute tijekom sljedećih 20 minuta, dakle do isteka 25. minute od početka aplikacije diskova. Pri tome su ispitanici dobili uputu da u traženim vremenskim razmacima zapisuju osjet u usnoj šupljini koji osjećaju od ranije izazvane boli, a vrijeme je kontrolirano uz pomoć sata (štoperice).

3.4. Prikupljanje sline

Slina se prikupljala u prijednevnom satima (između 9 i 11 sati). Ispitanici su dobili detaljne upute da dva sata prije prikupljanja sline ne peru zube niti konzumiraju bilo kakve namirnice (hrana, sok, žvakaće gume, kava), osim vode koja je dopuštena tijekom cijelog jutra. Kada je ispitanik udobno smješten u stomatološkom stolcu, nakupljenu slinu bilo je potrebno ispljunuti ili progutati te isprati usta običnom vodom kako bi se osigurali uvjeti za početak eksperimenta.

Slina ispitanika prikupljala se u tri navrata: na početku eksperimenta (prije aplikacije diskova natopljenih kapsaicinom), odmah po završetku aplikacije diskova natopljenih kapsaicinom (5 minuta nakon aplikacije prvog diska) i 20 minuta nakon završetka aplikacije diskova natopljenih kapsaicinom (25 minuta nakon aplikacije prvog diska).

Potrebna aparatura za prikupljanje sline sastojala se od dvije sisaljke, epruvete i bočice s čepom. Ispitaniku se daje bočica sa specijaliziranim čepom u koju je postavljena graduirana epruveta. Kroz čep su bile provučene dvije sisaljke, od kojih je jedna postavljena u epruvetu i ispitanik ju je stavio u usta, a druga je priključena na nastavak stomatološkog stolca te ona svojim djelovanjem osigurava vakuum u bočici. Na taj način omogućeno je direktno prikupljanje sline u epruvetu. Tijekom postupka, ispitanik je morao imati zatvorena usta i nije smio raditi pokrete jezikom i obrazima kako bi se osiguralo prikupljanje nestimulirane sline. S dna usne šupljine prikupljalo se 2 mL sline. Budući da je brzina prikupljanja različita kod

svakog ispitanika, bilo ju je potrebno pratiti kako slina ne bi prešla oznaku od 2 mL. Epruvete su bile prethodno pripremljene i izvagane te je svaka sadržavala 300 μ L trifluoroctene kiseline (TFA) koja će najbolje osigurati postojanost i stabilizaciju opiorfina iz uzoraka sline do 2 sata na sobnoj temperaturi i do 30 dana na -20°C . Epruvete su zatim bile pohranjene u ledu, a uporabom TFA omogućena su i tri ciklusa odmrzavanja i smrzavanja na -20°C . Postupak je detaljno objašnjen u istraživanju koje je proveo dio članova tima (28).

Sva tri prikupljanja sline provedena su na isti način. Drugo prikupljanje započinje nakon prekida stimulacije kapsaicinom natopljenih diskova i usporedno s bilježenjem osjeta boli. Treća, i posljednja epruveta, priprema se i daje pacijentu kada je isteklo 20 minuta od završetka aplikacije diskova. Vremenski slijed aktivnosti prikazan je Tablicom 1.

Svaka se epruveta nakon završenog prikupljanja dobro začepila i protresla kako bi slina i TFA tvorile cjelinu te se važe na specijaliziranoj vagi (RADWAG WPS 210/C/1) i odmah pohranjuje u zamrzivaču na -20°C do daljnje pripreme. Dobivene vrijednosti zapisale su se u tablicu, a odnosile su se na masu: sline, trifluoroctene kiseline i epruvete zajedno.



Slika 1 Vaganje uzorka sline

Tablica 1 Vremenski slijed aktivnosti

<i>Vrijeme</i>	<i>Aplikacija diska</i>	<i>Zapisivanje boli (NPRS)</i>	<i>Uzorkovanje sline</i>
0 min	1.		I. mjerenje
0,5 min	2.		
1 min	3.	NPRS 1	
1,5 min	4.		
2 min	5.	NPRS 2	
2,5 min	6.		
3 min	7.	NPRS 3	
3,5 min	8.		
4 min	9.	NPRS 4	
4,5 min	10.		
5 min		NPRS 5	
			II. mjerenje
7 min		NPRS 6	
9 min		NPRS 7	
11 min		NPRS 8	
13 min		NPRS 9	
15 min		NPRS 10	
17 min		NPRS 11	
19 min		NPRS 12	
21 min		NPRS 13	
23 min		NPRS 14	
25 min		NPRS 15	III. mjerenje

NPRS - numerička skala procjene boli (eng. Numerical Pain Rating Scale)

Priprema je uključivala centrifugiranje (12 500 rpm, 30 min, 4°C) kako bi se istaložili proteini, a bistri supernatant (800 µl) potom je prebačen u drugu epicu i liofiliziran. Ostatak nakon liofilizacije otopljen je u 200 µl 0,1% FA u vodi (s i bez dodatka internog standarda), a alikvot od 30 µl injektiran je na LC-MS/MS. Tako su za svaki uzorak pripremljeni uzorak i pripadajući spike-uzorak (dodatak internog standarda) (28).

3.5. Mjerenje koncentracije opiorfina

Kromatografska analiza provedena je na LC-MS/MS-u (Agilent Technologies) koji se sastoji od HPLC uređaja 1200 s binarnom pompom, degazerom i autosamplerom. HPLC vezan je na 6420 spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom i ESI ionizacijom. Razdvajanje je provedeno na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni (4,6 mm x 75 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies). Korištena je gradijenta elucija uz 0,1% FA u vodi, kao otapala A i MeOH kao otapala B. Analize su provedene u MRM načinu rada s tri tranzicije, parametri MS-a podešeni su s ciljem dobivanja najvećeg odaziva pojedine tranzicije. Dva prijelaza (347-175 i 347-268) upotrijebljeni su kao kvalifikacijski, a prijelaz 347-120 upotrijebljen je kao kvantifikacijski. Signal opiorfina integriran je na svakom pojedinom kromatogramu kako bi se odredila ukupna površina signala MRM prijelaza koji je korišten kao kvantifikacijski. Preko porasta površine na spajkanom uzorku u odnosu na uzorak koji nije spajkan, izračunata je nepoznata koncentracija opiorfina u pojedinom uzorku (28).

Analize su provedene na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković.

3.6. Procjena potrebne veličine uzorka

Analiza snage za procjenu veličine uzorka (GPower 3.1) provedena je uz pretpostavku da očekivana razlika u koncentracijama opiorfina između mjerenja iznosi 0,45 (temeljeno na pilot istraživanju Alajbeg i sur.), uz standardnu devijaciju od 0,55. Uz statističku snagu od 80%, te $\alpha = 0,05$, za potrebe testiranja hipoteze t-testom za zavisne uzorke, potrebna veličina uzorka iznosila je 14 ispitanika.

3.7. Statistička obrada podataka

Svi prikupljeni podaci uneseni su u bazu podataka te su obrađeni pomoću programa za statističku obradu podataka (TIBCO Software Inc. (2018). Statistica, version 13). Za testiranje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test.

T-testom za nezavisne uzorke testirane su razlike u dobi i početnim koncentracijama opiorfina između muških i ženskih ispitanika.

Za usporedbu koncentracija opiorfina u slini prije i nakon eksperimentalnog izazivanja boli upotrijebljen je t-test za zavisne uzorke, pri čemu su testirane razlike između prvog i drugog uzorkovanja sline (usporedba početnih vrijednosti i koncentracija opiorfina neposredno nakon eksperimentalnog izazivanja boli) te između drugog i trećeg uzorkovanja sline (usporedba koncentracija opiorfina neposredno nakon eksperimentalnog izazivanja boli i koncentracija opiorfina 20 minuta nakon prestanka djelovanja kapsaicina). Razlike u koncentracijama opiorfina između muških i ženskih ispitanika neposredno nakon eksperimentalnog izazivanja boli i 20 minuta nakon prestanka djelovanja kapsaicina testirane su t-testom za nezavisne uzorke.

Promjene u prosječnim vrijednostima boli (NPRS) analizirane su uz pomoć analize ponovljenih mjerenja (ANOVA) s čimbenikom „vrijeme” (1 min – 25 min) kao izvorom varijabilnosti unutar ispitanika te čimbenikom „spol” (M i Ž) kao izvorom varijabilnosti između ispitanika, nakon čega su slijedili post hoc Bonferronijevi testovi. Eta kvadrat (η^2) služio je procjeni veličine efekta.

Za procjenu povezanosti koncentracija salivarnog opiorfina s visinom bolnog osjeta korištena je Pearsonova korelacija.

Statistički značajnom smatrala se vrijednost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

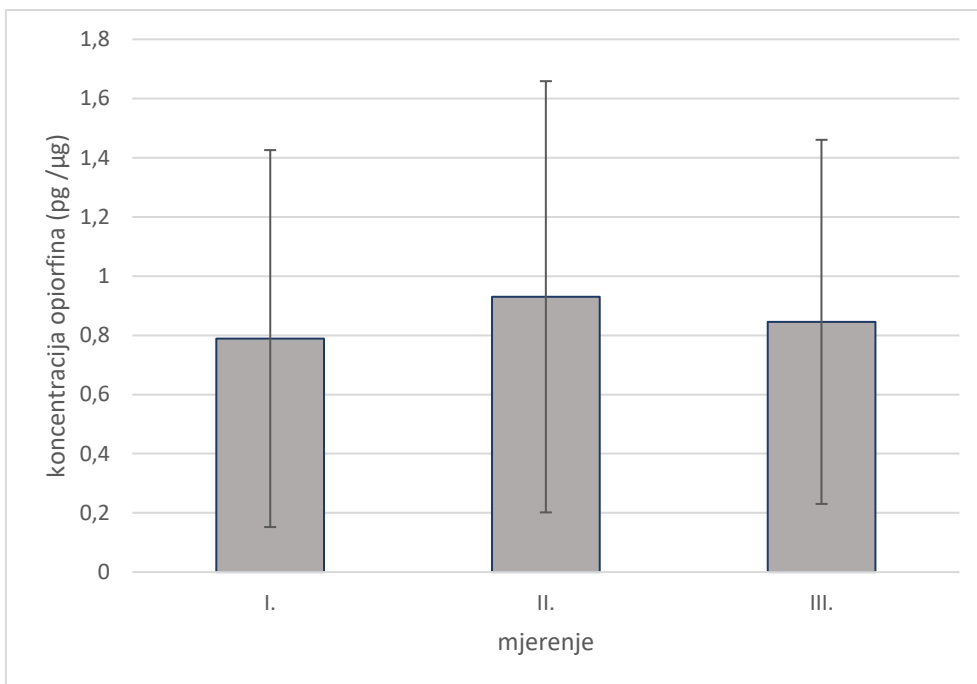
Ukupno je u istraživanju sudjelovalo 14 punoljetnih ispitanika (7 muških i 7 ženskih) prosječne dobi od $25,64 \pm 9,71$ godina, u rasponu 21 – 48 godina. Nisu zabilježene statistički značajne razlike između muških i ženskih ispitanika u dobi ($t = -0,24$, $p = 0,82$) kao niti u početnim koncentracijama salivarnog opiorfina ($t = 1,84$, $p = 0,09$).

Usporedba koncentracija opiorfina u slini prije (prvo uzorkovanje sline) i neposredno nakon eksperimentalnog izazivanja boli (drugo uzorkovanje sline) pokazala je više koncentracije u drugom uzorkovanju sline, no bez statistički značajne razlike ($t = -0,54$, $p = 0,59$). Isti obrazac prisutan je i kad se usporede pojedinačno muški ispitanici, ali je kod ženskih ispitanika vidljiv pad koncentracije u drugom uzorkovanju sline.

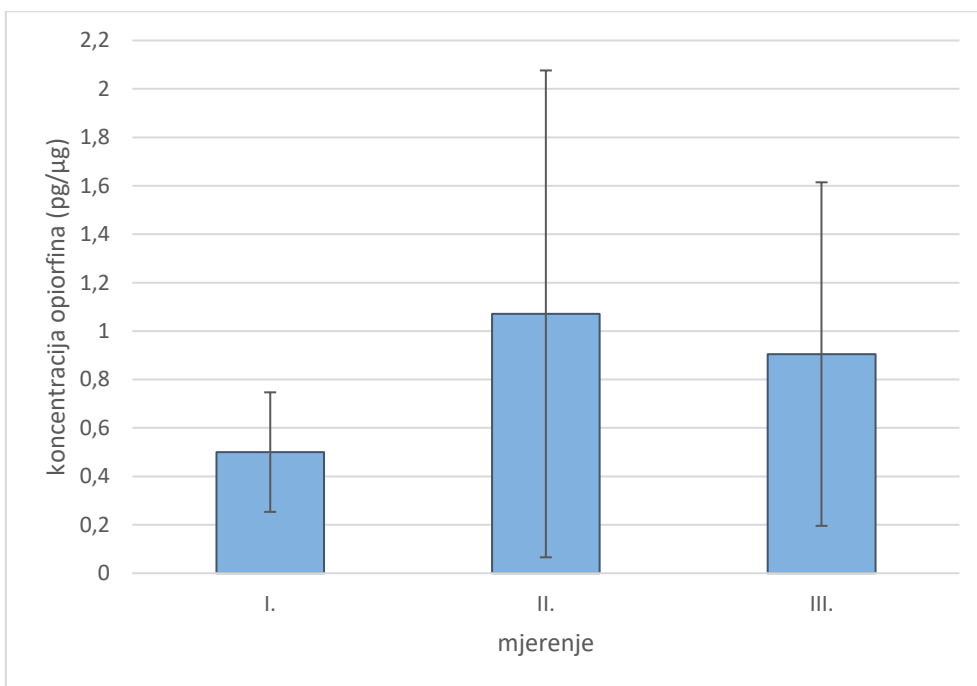
Usporedba koncentracija opiorfina u slini neposredno nakon eksperimentalnog izazivanja boli (drugo uzorkovanje sline) te 20 minuta nakon prestanka aplikacije kapsaicina (treće uzorkovanje sline) pokazala je da u trećem uzorkovanju sline dolazi do pada koncentracija opiorfina u odnosu na drugo uzorkovanje sline, no bez statistički značajnih razlika ($t = -0,41$, $p = 0,68$). Isti obrazac prisutan je i kad se usporede pojedinačno muški i ženski ispitanici.

Kad su se usporedili ispitanici prema spolu nisu zabilježene statistički značajne razlike među skupinama neposredno nakon eksperimentalnog izazivanja boli (drugo uzorkovanje sline) ($t = -0,71$, $p = 0,49$) kao niti 20 minuta nakon prestanka djelovanja kapsaicina (treće uzorkovanje sline) ($t = -0,35$, $p = 0,73$).

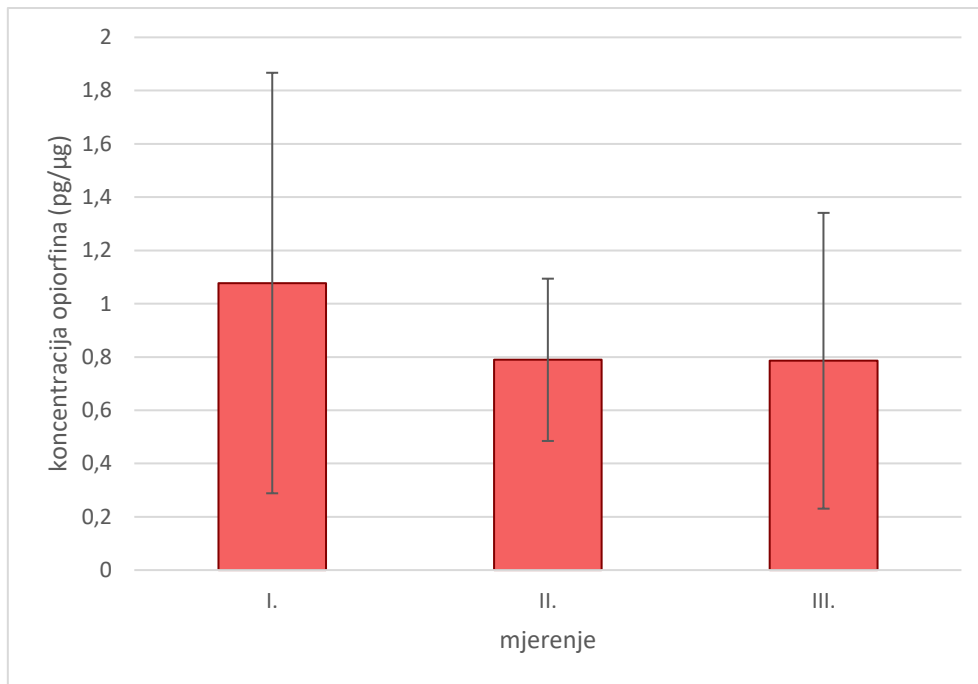
Koncentracije opiorfina za sva tri uzorkovanja sline prikazane su slikama: Slika 2 (za sve ispitanike), Slika 3 (za muškarce) i Slika 4 (za žene).



Slika 2 Usporedba koncentracije opiorfina po mjerenjima za sve ispitanike

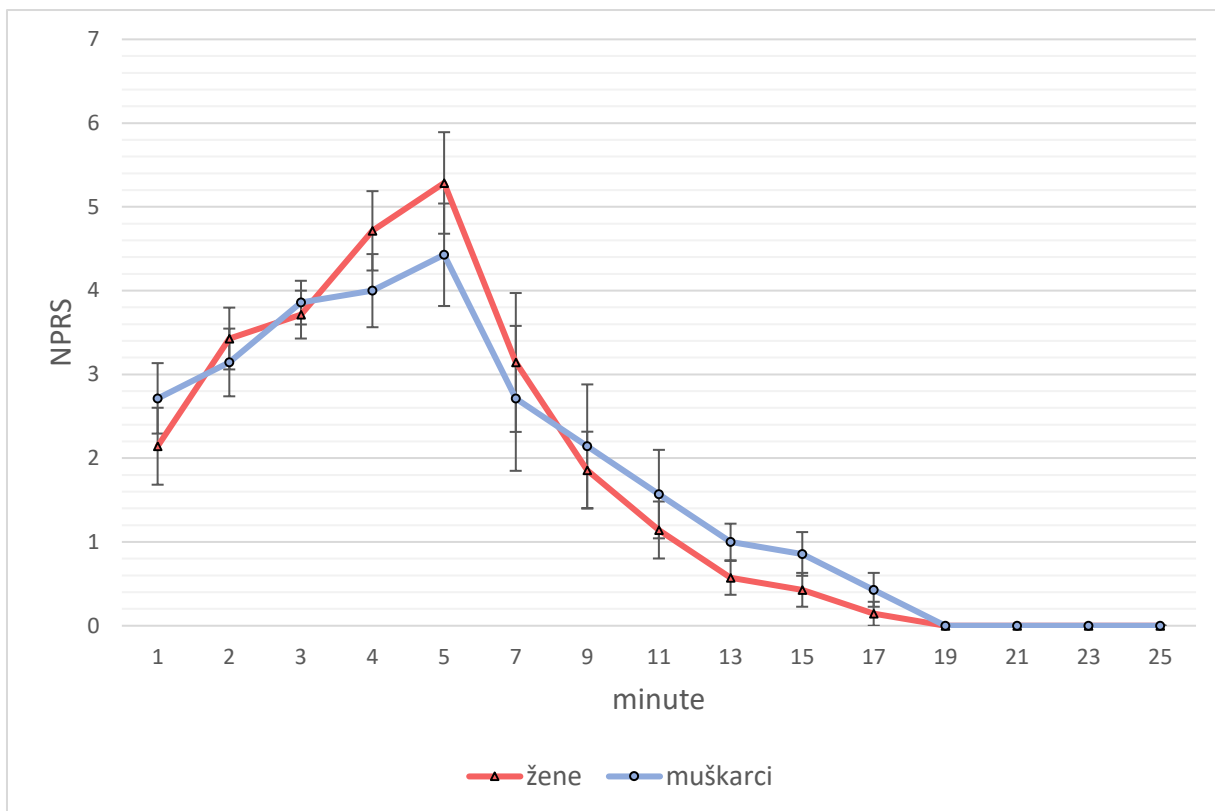


Slika 3 Usporedba koncentracije opiorfina po mjerenjima za muškarce



Slika 4 Usporedba koncentracije opiorfina po mjerenjima za žene

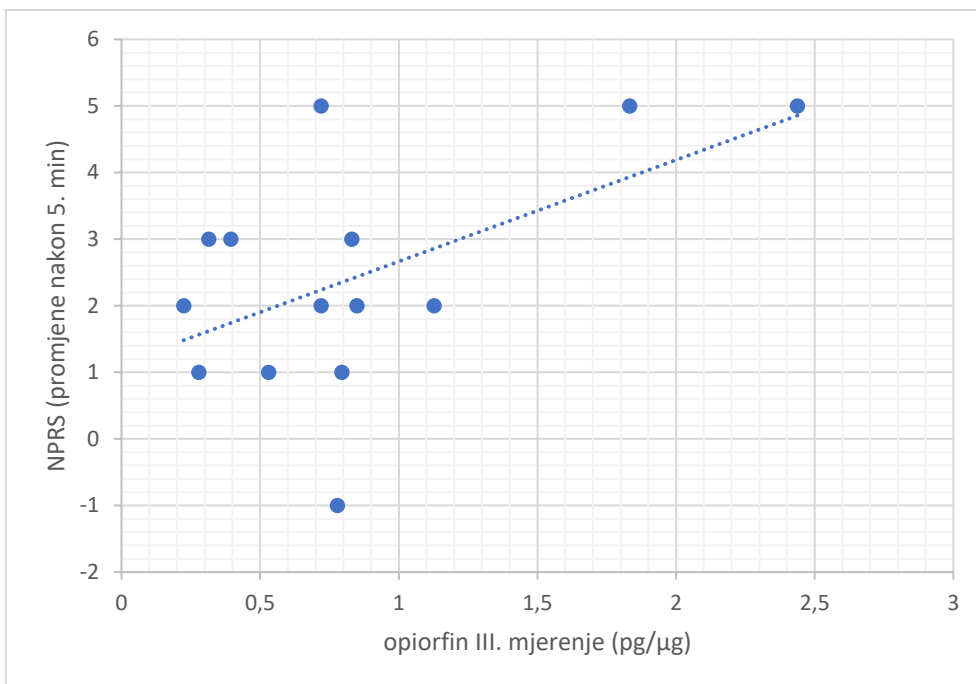
Vrijednosti boli procjenjivane prema NPRS ljestvici, prikazane Slikom 5, značajno su se mijenjale tijekom vremena (Wilks lambda=0,0075, F=39,71, p=0,005, veličina efekta=0,694). Promjene eksperimentalno izazvane boli nisu se razlikovale s obzirom na spol (F=0,005, p=0,94). Post hoc analiza pokazala je kako su vrijednosti boli prema NPRS u 5. minuti bile značajno više nego u 1. i 2. minuti (p=0,0001, p=0,0138, respektivno); vrijednosti boli prema NPRS u 5. minuti također su bile značajno više u usporedbi sa 7. minutom, pa sve do kraja mjerenja (p<0,0001).



Slika 5 Vrijednosti boli prema NPRS ljestvici

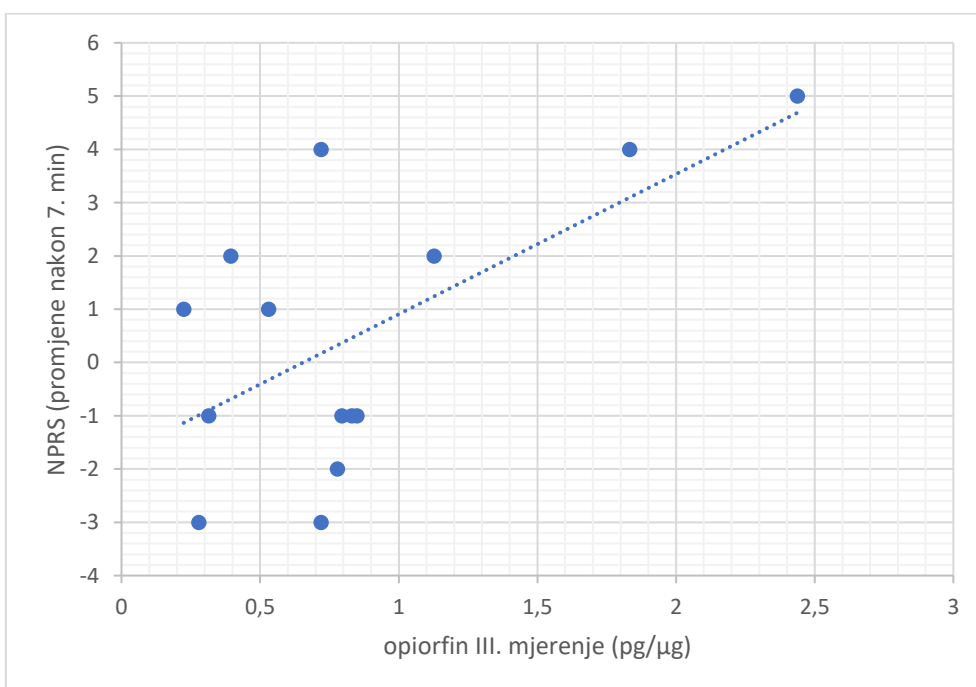
NPRS - numerička skala procjene boli (eng. Numerical Pain Rating Scale)

Usporedba povezanosti visine (jačine) bolnog osjeta s koncentracijom izlučenog opiorfina u slini pokazala je da postoji pozitivna korelacija između promjene boli nakon 5. minute ($r = 0,53$, $p = 0,047$) (Slika 6), nakon 7. minute ($r = 0,61$, $p = 0,019$) (Slika 7), te nakon 9. minute ($r = 0,66$, $p = 0,009$) s koncentracijom opiorfina u trećem uzorkovanju sline.



Slika 6 Korelacija promjene jačine boli nakon 5. minute s koncentracijom opiorfina u trećem mjerenju

NPRS - numerička skala procjene boli (eng. Numerical Pain Rating Scale)



Slika 7 Korelacija promjene jačine boli nakon 7. minute s koncentracijom opiorfina u trećem mjerenju

NPRS - numerička skala procjene boli (eng. Numerical Pain Rating Scale)

5. RASPRAVA

Ovo je istraživanje za cilj imalo utvrditi promjene koncentracije endogenog opiorfina opiorfina prilikom izazivanja eksperimentalne boli i njegovu korelaciju s jačinom boli. Polazeći od pretpostavke da će aplikacija kapsaicina uzrokovati srednje jaku bol (12) koja će biti regulirana opiorfinom i enkefalinima, očekivali smo i promjenu koncentracije opiorfina u slini sukladno tome.

Budući da neka istraživanja (29) pokazuju kako žareća (toplinska) bol pokazuje slabiji intenzitet u jutarnjim satima, dok druga (30) opovrgavaju tu tezu, moglo se očekivati, uvažavajući pritom oba istraživanja, da će ukupna bol izazvana kapsaicinom biti slaba do otprilike srednje jaka. Istraživanje je pokazalo da je maksimalna prosječna zabilježena bol iznosila $4,86 \pm 1,61$, što bismo na numeričkoj skali (od 0 do 10) mogli označiti srednjeg intenziteta čime smo unutar očekivanih granica (12). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da u procjeni osjeta boli ne postoji statistički značajna razlika između muškog i ženskog spola. Istraživanje (12) je pokazalo kako će uzastopna aplikacija kapsaicina uzrokovati povećanu intraepitelnu koncentraciju kapsaicina što može biti odgovorno za povećanu nociceptivnu aktivnost. U literaturi (31) se navodi da se magnituda boli može udvostručiti ili čak utrostručiti na kraju aplikacije diskova (5. minute) u odnosu na prvi podražaj. Taj je obrazac vidljiv i u našem eksperimentu gdje se na Slici 4 vidi kako je bol prema NPRS ljestvici rasla do zadnje minute aplikacije diskova (5. minute), gdje je doživjela svoj maksimum, s iznosom koji je 2 puta veći od početnog. Iz dobivenih se podataka može zaključiti da je senzitivizacija uzrokovana kapsaicinom, a vrednovana razlikom u osjetu boli između prve i zadnje stimulacije kapsaicinom (prvog i zadnjeg diska), statistički značajna ($p=0,0001$). Ako usporedimo osjet boli prema spolu u 5. minuti, za žene je iznosio $5,29 \pm 1,6$, što se u odnosu na muškarce, s iznosom od $4,43 \pm 1,6$, može smatrati blago izraženijim, ali statistički neznajno. Na kliničkim istraživanjima dokazano je kako testosteron može biti odgovoran za veću toleranciju na bol (32) i analgetički učinak, sprječavajući razvitak bolnih stanja kao što je primjerice poremećaj temporomandibularnog zgloba (33). Time se djelomično može objasniti podatak da su muški ispitanici slabije percipirali bol. Međutim, polazeći od pretpostavke da bi porast koncentracije opiorfina imao utjecaj na smanjenje osjećaja boli, mogli bismo tu razliku, odnosno nižu bol za muškarce, dijelom objasniti upravo porastom koncentracije opiorfina kod muškaraca u drugom uzorkovanju sline. Kod žena nije zabilježen porast koncentracije u drugom uzorkovanju sline, čak je došlo do pada koncentracije. Zanimljiv je podatak koncentracija opiorfina kod žena u

prvom uzorkovanju sline. Tada je iznosila $1,08 \pm 0,79$ pg/ μ g, što je 2,16 puta viša koncentracija u odnosu na muškarce. U istraživanju koje su proveli Dufour i sur. (34) dokazano je da je koncentracija opiorfina nestimulirane sline kod žena u 6. mjesecu trudnoće 1,47 puta veća u odnosu na muškarce. Budući da se, u određenom periodu menstrualnog ciklusa može vidjeti porast estrogena i progesterona slično kao u trudnoći, viša koncentracija opiorfina kod žena u odnosu na muškarce mogla bi se objasniti hormonalnim promjenama kod žena.

Nakon prestanka aplikacije diskova i vrhunca boli u 5. minuti, intenzitet žareće boli se smanjuje, podjednako i bez statističkih razlika između spolova, do 19. minute kada su svi ispitanici osjet boli zabilježili kao 0 na NPRS. Ako se pogleda raspon ocjena za osjet boli koji su ispitanici zapisivali po minutama i definira se kao razlika između najveće ocjene i one najmanje, vidjet će se da je najveći zabilježeni raspon u 7. minuti i iznosi 7. Ova se značajna razlika ne može tumačiti promjenom u koncentraciji opiorfina kod ispitanika jer je kod tih ispitanika zabilježen isti obrazac promjene koncentracije opiorfina te u obzir dolazi mogućnost da je kod ispitanika kod kojih je perzistirala tako visoka bol, bila podražena veća površina jezika i samim time je bio uključen veći broj nociceptora. Takva se pojava može objasniti mogućnošću salivarnog raznošenja kapsaicina po jeziku.

U istraživanju *Opiorphin in burning mouth syndrome: a case-control study* koje su proveli Salarić i sur. (1) napravljena je usporedba u koncentraciji opiorfina između pacijenata sa sindromom pekućih usta te kontrolne skupine. Prosjek godina u ispitanika kontrolne skupine iznosio je $67,31 \pm 12,66$, a od ukupno 29 kontrolnih ispitanika, osam ih je bilo zdravo, dok su ostali bolovali od barem jedne kronične bolesti (esencijalna hipertenzija, ateroskleroza, gastritis, duodenitis, itd.). Koncentracija opiorfina u nestimuliranoj slini kod ispitanika u istraživanju Salarić i sur. (1) iznosila je u prosjeku 5,017 ng/ml. U našem je istraživanju prosječna koncentracija opiorfina iznosila 0,647 ng/ml, odnosno 7,75 puta manje. Isti je obrazac u različiti koncentracije od otprilike 9 puta uočen i u usporedbi s istraživanjem Al-Safar i sur. (35) u kojem je kao metoda mjerenja koncentracije opiorfina korišten ELISA test.

U obzir za ovakve rezultate mogu doći: razlika u godinama ispitanika, zdravstveno stanje ispitanika, ali isto tako i različita metoda mjerenja koncentracije opiorfina (kromatografija, ELISA). No, ako se usporede rezultati našeg istraživanja s rezultatima istraživanja Dufour i sur. (34) u čijoj su skupini ispitanika bili zdravi muškarci i žene s prosjekom godina 26 ± 6 , vidjet će se još veća razlika u koncentraciji opiorfina nego u prethodno navedenim istraživanjima. Naime, u ovom su istraživanju dobivene srednje

vrijednosti opiorfina iz nestimulirane sline iznosile: za muškarce 53 ng/ml, a za žene 30 ng/ml. Ako se te vrijednosti usporede s vrijednostima našeg istraživanja dobivenima prvim uzorkovanjem sline, vidjet će se kako su koncentracije našeg istraživanja manje i do 120 puta za muškarce, odnosno 35 puta za žene. Iako se iz rezultata našeg istraživanja vidi značajna razlika u koncentraciji opiorfina u nestimuliranoj slini u odnosu na druga istraživanja, ne postoji dovoljno jasnih podataka iz kojih bi se moglo zaključiti da se koncentracija opiorfina mijenja starenjem budući da se koncentracija opiorfina razlikuje i od skupine ispitanika identičnih prosječnih godina kao ispitanika našeg istraživanja.

Kako je sam uvjet pristupa istraživanju bila odsutnost orofacijalne i/ili sistemske boli, moglo bi se i zdravlje obje grupe ispitanika navesti kao mogući razlog ovakvih rezultata. Iako su Paszynska i sur. (36) svojim istraživanjem, uspoređujući koncentraciju opiorfina u slini zdravih ispitanika i ispitanika s *Anorexiom nervosom*, kao jednom kroničnom mentalnom bolešću, došli do zaključka kako opiorfin nije marker kroničnog mentalnog stresa kojim će se organizam prilagoditi malnutriciji.

Kao posljednja mogućnost razlike u koncentraciji opiorfina u odnosu na druga istraživanja preostaje razlika u metodi korištenoj pri određivanju koncentracije opiorfina u slini. Mjerenja koncentracije opiorfina temeljena na ELISA testu (34,35) pokazuju tendenciju ka višim vrijednostima u odnosu na ostala istraživanja temeljena na LC-MS kromatografiji, korištenoj i u našem istraživanju. Kao razlog tome navodi se u istraživanju Brkljačić i sur. (28) prijelazni (nezreli) oblik opiorfina koji nastaje razgradnjom PROL1 i koji može biti detektiran antitijelima korištenima u ELISA testu, dok je on na MS detektoru nevidljiv. U istraživanju Dufour i sur. (34) kao mogući razlozi navode se i nedostatak inhibitora peptidaze za LC-MS/MS kromatografiju kao i metoda pripreme uzorka u kojoj razlika u jednom koraku (npr. ekstrakcijskoj proceduri) može uvjetovati promjenu u dobivenoj koncentraciji opiorfina. U istraživanju koje su proveli Paszynska i sur. (36) korišten je imunoenzimski ELISA test kojim je u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika dobiven raspon koncentracije opiorfina u slini 0,2 – 16,9 ng/ml. Budući da su koncentracije opiorfina našeg istraživanja unutar intervala dobivenog prethodno navedenim istraživanjem Paszynske i sur. (36), može se zaključiti da, iako se uglavnom rezultati dobiveni dvjema različitim metodama razlikuju, oni se mogu u određenim situacijama i usporediti.

Budući da porast koncentracije opiorfina, ukupno gledano, nakon eksperimentalno izazvane boli nije statistički značajan, može se zaključiti da podražaj izazvan kapsaicinom na jeziku nije dovoljno jak da bi kod zdravih ispitanika uzrokovao takvu bol da bi se opiorfin počeo

izlučivati u višim koncentracijama. Kako je osobama koje pate od temporomandibularnih poremećaja puno lakše dostići prag podražaja za bol jer se vjerojatno radi o hipervigilantnim osobama (37), odnosno osobama koje na isti podražaj reagiraju jačim odgovorom, postoji mogućnost da bi se kod njih pri jednakoj koncentraciji kapsaicina apliciranoj na jezik izazvao jači bolni podražaj i jači odgovor organizma u vidu lučenja opiorfina. To preostaje istražiti u nekim budućim istraživanjima.

6. ZAKLJUČAK

Koncentracija opiorfina, tijekom tri uzorkovanja sline, prati pretpostavljeni obrazac promjene, međutim te promjene nisu statistički značajne ($p > 0,05$). Prisutan je porast u koncentraciji nakon eksperimentalno izazvanog bolnog podražaja, ali nedovoljno da bi se smatrao statistički značajnim porastom i potvrdio postavljenu hipotezu.

Jačina bolnog osjeta uzrokovanog otopinom kapsaicina, gledajući NPRS ljestvicu, udvostručila se od početka aplikacije do posljednjeg postavljenog diska te ju možemo smatrati statistički značajnom ($p < 0,05$).

Uočena je pozitivna korelacija u promjeni jačine boli između 1. i 5. minute, 1. i 7. minute te 1. i 9. minute s koncentracijom opiorfina u trećem uzorkovanju sline.

Iako postoje razlike između muške i ženske skupine ispitanika u koncentraciji opiorfina, kao i u osjetu boli, one ne pokazuju statistički značaj ($p > 0,05$). Zabilježena odstupanja među skupinama mogu se objasniti hormonima i promjenama do kojih oni dovode. Različit obrazac izlučivanja opiorfina na bolni podražaj u muških i ženskih ispitanika trebalo bi uzeti u obzir u budućim istraživanjima.

Navedeni faktor predstavlja zanimljivu početnu točku za daljnja istraživanja kojima se može detaljnije opisati veza i utjecaj hormona, ali i zdravlja pojedinca na lučenje i djelovanje opiorfina.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo našoj mentorici, prof. dr. sc. Ivi Alajbeg, na ukazanom povjerenju, mnogobrojnim savjetima, uloženom vremenu, strpljenju te neiscrpnj želji i volji tijekom izrade ovog znanstvenog rada.

Također zahvaljujemo dr.sc. Emi Vrbanović na pomoći i podršci za ostvarenje ovoga rada.

Zahvaljujemo predstojniku Zavoda za mobilnu protetiku, izv. prof. dr. sc. Robertu Čeliću, na ustupljenim prostorijama Zavoda gdje je provedeno ovo istraživanje.

Zahvaljujemo dr. sc. Lidiji Brkljačić s Instituta Ruđer Bošković na pomoći pri određivanju koncentracije opiorfina iz sline.

Zahvaljujemo svim sudionicima na ugodnoj suradnji i povjerenju prilikom istraživanja.

8. POPIS LITERATURE

1. Salarić I, Sabalić M, Alajbeg I. Opiorphin in burning mouth syndrome patients: a case-control study. *Clin Oral Invest.* 2016;21:2363-70.
2. Rosa M, Arsequell G, Rougeot C, Calle LP, Marcelo F, Pinto M, Centeno NB, Jimenez-Barbero J, Valencia G. Structure - Activity Relationship Study of Opiorphin, a Human Dual Ectopeptidase Inhibitor with Antinociceptive Properties. *J Med Chem.* 2012;55:1181-8.
3. PubChem Database. [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004 - Opiorphin, CID=25195667; 2009 [cited 2020 Apr 29]; [about 17 p]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Opiorphin>
4. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdí A, Marcel A, Ungeheuer MN, Rougeot C. Human opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:17979-84.
5. Smith K. Natural painkiller found in human spit [Internet]. *Nature.* 2006 [cited 2020 Apr 29] Available from: <https://www.nature.com/news/2006/061113/full/061113-4.html>
6. Takahashi A. Neuropeptides: Enkephalin. In: Takei Y, Tsutsui K, Ando H. *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research.* 1st ed. Oxford : Elsevier/AP; 2016.55-7 <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/enkephalin>
7. Rougeot C, Robert F, Menz L, Bisson JF, Messaoudi M. Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61:483-90.
8. Javelot H, Messaoudi M, Garnier S, Rougeot C. Human Opiorphin is a naturally occurring antidepressant acting selectively on enkephalin-dependent δ -opioid pathways. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(3):355-62.

9. Sobocińska M, Giełdon A, Fichna J, Kamysz E. Alanine scan od sialoprhin and its hybrids with opiorphin: synthesis, molecular modelling and effect on enkephalins degradation. *Amino Acids*. 2018;50 (8):1083-8.
10. Alajbeg IZ, Vrbanović E, Brkljačić L, Alajbeg I. Salivary Opiorphin is Dependent of Pain Intensity in Chronic TMD Patients. *Book of Abstracts of the CED-IADR/NOF; 2019 September 19-21; Madrid, Spain*. str. 67.
11. Frias B, Merighi A. Capsaicin, Nociception and Pain. *Molecules*. 2016;21(6):797.
12. Ngom PI, Dubray C, Woda A, Dallel R. A human oral capsaicin pain model to assess topical anesthetic – analgesic drugs. *Neuroscience Letters*. 2001;316:149-52.
13. Bode AM, Dong Z. The Two Faces of Capsaicin. *Cancer Res*. 2011;71(8):2809-14.
14. Green BG, Rentmeister-Bryant H. Temporal Characteristics of Capsaicin Desensitization and Stimulus – induced Recovery in the Oral Cavity. *Physiology & Behavior*. 1998; 65(1):141-9.
15. Fattori V, Nohmann MSN, Rossaneis AC, Pinho-Ribiero FA, Verri WA. Capsaicin, Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules*. 2016;21(7):844.
16. Basith S, Cui M, Hong S, Choi S. Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases. *Molecules*. 2016;21(8):966.
17. Silvestre FJ, Silvestre-Rangil J, Tamarit-Santafé C, Bautista D. Application of capsaicin rinse in the treatment of burning mouth syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(1): e1-e4.
18. Crow HC, Gonzalez Y. Burning Mouth Syndrome. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am*. 2013;25:67-76.
19. Alexianu M, Chatterjee A. Intranasal Capsaicin (IC) Rapidly Relieves the Pain of Migraine and Other Severe Headaches. *Neurology*. 2014; 82 (10): P7.179.
20. Costanzo MT, Yost RA, Davenport PW. Standardized method for solubility and storage of capsaicin- based solutions for cough induction. *Cough*. 2014;10:6.
21. Georgescu SR, Sârbu MI, Matei C, Ilie MA, Caruntu C, Constantin C et al. Capsaicin: Friend or Foe in Skin Cancer and Other Related Malignancies?. *Nutrients*. 2017;9 (12):1365.
22. PubChem Database. [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Infomation (US); 2004 - Capsaicin, CID=154894; 2005 [cited 2020 Apr 29]; [about 55 p] Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Capsaicin> .
23. Chapman CR. Pain perception and assessment. *Minerva Anestesiol*. 2005; 71: 413-7.

24. Williamson A, Hoggart B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs*. 2004;14:798 – 804.
25. Davidhizar R, Giger JN. A review of the literature on care of clients in pain who are culturally diverse. *Int Nurs Rev*. 2004; 51(1):47-55.
26. Pathak A, Sharma S, Jensen MP. The utility and validity of pain intensity rating scales for use in developing countries. *Pain Rep*. 2018;3(5):672.
27. Rozin P, Mark M, Schiller D. The role of desensitization to capsaicin in chili pepper ingestion and preference. *Chemical Senses*. 1981;6:23-31.
28. Brkljačić L, Sabalić M, Salarić I, Jerić I, Alajbeg I, Nemet I. Development and validation of a liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the qualification of opiorphin in human saliva. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879:3920-6.
29. Aviram J, Shochat T. Pain Perception in Healthy young men Is modified by Time-of-day and is modality dependent. *Pain Med*. 2014;16(6):1137-44.
30. Bachmann CG, Nitsche MA, Pfungsten M, Gersdorff N, Harder C, Baier P et al. Diurnal time course of pain perception in healthy humans. *Neuroscience Letters*. 2011;489:122-5.
31. Lawless HT, Heymann H. *Sensory evaluation of food: Principles and practices*. II. title. New York: Springer Science, Business media New York; 1999. Chapter 2 Physiological and Psychological Foundations of Sensory Function Sensory responses to oral chemical heat, The Trigeminal Flavour Senses; 61-7.
32. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2012 Sep 21. Identifier NCT01689896, Effects of Testosterone Replacement on Pain Sensitivity and Pain Perception in Men With Chronic Pain Syndrome; 2015 Mar [cited 2020 Apr 29]; [about 7 p]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01689896>
33. Vincent K, Tracey I. Hormones and their Interaction with the Pain Experience. *Rev Pain*. 2008;2(2):20-4.
34. Dufour E, Villard-Saussine S, Mellon V, Leandri R, Jouannet P, et al. Opiorphin Secretion Pattern in Healthy Volunteers: Gender Difference and Organ Specificity. *Biochem Anal Biochem*. 2013;2:136.
35. Al-Safar M, Al-Sandook T, Taha M. A Possible New Concept in the Mechanism of Action of Local Anesthesia. *American Journal of Medical and Biological Research*. 2013;1:134-7.
36. Paszynska E, Roszak M, Slopian A, Boucher Y, Dutkiewicz A, Tyszkiewicz-Nwafor M, et al. Is there a link between stress and immune biomarkers and salivary opiorphin in patients with a restrictive-type of anorexia nervosa? *World J Biol Psychiatry*. 2019;21(3):220-9.

37. Garrigós-Pedron M, Elizagaray-García I, Domínguez-Gordillo AA, Del-Castillo-Pardo-de-Vera JL, Gil-Martínez A. Temporomandibular disorders: improving outcomes using a multidisciplinary approach. *J Multidiscip Healthc.* 2019;12:733-47.

9. SAŽETAK

Klara Naka, Ivan Orabović

ULOGA OPIORFINA KOD EKSPERIMENTALNE OROFACIJALNE BOLI

UVOD: Opiorfin je endogeni pentapeptid koji sudjeluje u regulaciji boli. Sintetizira se od *Proline rich, lacrimal 1* proteina te pripada istoj obitelji kao sijalorfin, inhibitor boli kod štakora. Aktivacijom ograničenog enkefalinskog puta preko μ i δ receptora, opiorfin djeluje analgetički, a da pritom ne uzrokuje druge nuspojave karakteristične za egzogene opioide. Kapsaicin je prirodni alkaloid izoliran iz ljute papričice. Djelujući kao agonist vaniloidnih receptora, uzrokuje otpuštanje brojnih neuropeptida odgovornih za osjećaj boli. Osim za indukciju boli, može se koristiti u terapijske svrhe zbog svoje desenzitizirajuće aktivnosti na receptore. Svrha ovog istraživanja bila je odrediti i analizirati koncentracije opiorfina u osoba prije i nakon eksperimentalno uzrokovane orofacijalne boli.

MATERIJALI I METODE: U istraživanju je sudjelovalo 14 zdravih ispitanika (7 muških, 7 ženskih, prosjek godina $25,64 \pm 9,71$). Eksperimentalna bol izazvana je serijom od 10 diskova natopljenih otopinom kapsaicina, apliciranih na jezik svakih 30 sekundi. Za svakog su ispitanika prethodno bile pripremljene tri graduirane epruvete s trifluorocetenom kiselinom. U njih se prikupljala slina u tri navrata: prvi put na početku istraživanja, drugi put neposredno nakon završetka aplikacije diskova natopljenih kapsaicinom (po isteku 5. minute od početka aplikacije diskova) i treći put 20 minuta nakon završene aplikacije (po isteku 25. minute od početka aplikacije diskova). Tijekom postave diskova ispitanici su procjenjivali osjet boli prema numeričkoj skali procjene boli (NPRS).

REZULTATI: U prvom uzorkovanju sline nisu zabilježene statistički značajne razlike u početnoj koncentraciji salivarnog opiorfina između muških i ženskih ispitanika ($p > 0,05$). Obrazac promjene koncentracije opiorfina razlikuje se u drugom uzorkovanju sline gdje je kod ispitanica koncentracija opiorfina pala, a kod ispitanika porasla, no bez statistički značajnih razlika između spolova ($p > 0,05$). Koncentracija opiorfina u trećem uzorkovanju sline pala je kod oba spola, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na drugo uzorkovanje sline ($p > 0,05$). Osjet boli, zabilježen NPRS ljestvicom, raste sukladno apliciranim diskovima te vrhunac

dostiže u 5. minuti za obje skupine ispitanika. Zapažena je statistički značajna razlika u iznosu boli u 5. minuti mjerenja u odnosu na 1. i 2. minutu, kao i u iznosu boli u 5. minuti u odnosu na ostala mjerenja boli do kraja eksperimenta ($p < 0,05$), ali bez statistički značajne razlike između muških i ženskih ispitanika ($p > 0,05$).

ZAKLJUČAK: Koncentracija opiorfina, tijekom tri uzorkovanja sline, prati pretpostavljeni obrazac promjene, međutim te promjene nisu statistički značajne ($p > 0,05$) i ne potvrđuju početnu hipotezu. Prisutna je pozitivna korelacija između koncentracije opiorfina i promjene jačine boli, a visina bolnog podražaja se udvostručila završetkom aplikacije što se smatra statistički značajnom promjenom. Zabilježena odstupanja između skupine muških i ženskih ispitanika u koncentraciji opiorfina, kao i u osjetu boli, mogu se objasniti hormonima i promjenama do kojih oni dovode.

KLJUČNE RIJEČI: slina, opiorfin, kapsaicin, bol

10. SUMMARY

Klara Naka, Ivan Orabović

THE ROLE OF OPIORPHIN IN EXPERIMENTAL OROFACIAL PAIN

INTRODUCTION: Opiorphin is an endogenous pentapeptide involved in pain regulation. It is synthesized from Proline rich, lacrimal 1 protein and belongs to the same family as sialorphin, a pain inhibitor found in rats. By activating a limited enkephalin pathway through μ and δ receptors, opiorphin acts analgesically without causing other side effects characteristic of exogenous opioids. Capsaicin is a natural alkaloid isolated from chilli pepper. Acting as a vanilloid receptor agonist, it causes the release of numerous neuropeptides responsible for pain sensation. Except for the induction of pain, it can be used for therapeutic purposes due to its desensitizing activity on the receptors. The purpose of this study was to determine and analyze opiorphin concentrations in healthy participants before and after experimentally caused orofacial pain.

MATERIALS AND METHODS: Fourteen healthy volunteers (7 male, 7 female, age average 25.64 ± 9.71) participated in the study. The experimental pain was provoked by a series of 10 disks soaked in capsaicin solution and applied to the tongue every 30 seconds. Three graded test tubes with trifluoroacetic acid were previously prepared for each participant. The saliva was collected three times: the first time at the beginning of the study, the second time immediately after the end of application of capsaicin-soaked disks (by the end of the 5th minute since the first disk was applied) and the third time 20 minutes after the application was completed (by the end of the 25th minute since the first disk was applied). During the disk set up, participants assessed the pain with the Numerical pain rating scale (NPRS).

RESULTS: At the baseline, no significant differences were present for the levels of salivary opiorphin (1st sampling) between males and females ($p > 0.05$). In the 2nd sampling changes in opiorphin levels followed a different pattern when compared between sexes - opiorphin levels decreased in females and increased in males. However, the difference in the pattern did not reach statistical significance ($p > 0.05$). The levels of opiorphin in the 3rd sampling decreased in both sexes, but without a statistically significant difference compared to the 2nd sampling ($p > 0.05$). The pain sensation, assessed with the NPRS, increased with each applied disc and reached its peak at the 5th minute for both groups of participants. A statistically significant difference in average pain between the 1st and 5th minute was observed as well as between 5th and all other time-points till the end of the experiment ($p < 0.05$) but without a statistically significant difference between sexes ($p > 0.05$).

CONCLUSION: The changes in levels of opiorphin, during three saliva samplings, follow the assumed pattern; however, these changes were not statistically significant ($p > 0.05$) and did not confirm the initial hypothesis. A positive correlation was found between opiorphin levels and the change in pain intensity; also, the intensity of the pain doubled at the end of the application, which is considered a statistically significant change. The differences in opiorphin levels, found between male and female participants, as well as differences in sensitivity to painful stimuli, could be attributed to differences in hormonal status.

KEY WORDS: saliva, opiorphin, capsaicin, pain