

# Uloga enkefalina u eksperimentalnoj upalnoj boli

---

Momčilović, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:000788>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Mirna Momčilović**

# **Uloga enkefalina u eksperimentalnoj upalnoj boli**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

*Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.*

*Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na podršci i strpljenju pri osmišljavanju i izradi ovog rada te Višnji Drinovac mag. pharm. na nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Također, hvala prijateljicama Ini, Ivani, Mateji i Tei koje su uvijek bile uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.*

*Hvala članicama odbojkaškog tima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i svim ostalim prijateljima i članovima obitelji koji će sa mnom dijeliti veselje nakon obrane ovog rada.*

*I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem majci Miri, tetama Neni i Snježani te djedu Mili, koji bi bio najviše ponosan na mene i kome stoga ovaj rad i posvećujem.*

*Velika HVALA svima!*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Bol.....	1
1.1.1. Receptori za bol i putovi prijenosa bolnih signala.....	2
1.1.2. Modulacija bolnog impulsa: silazni putovi iz mozga u kralježničnu moždinu i inhibitorni interneuroni u kralježničnoj moždini.....	6
1.2. Upalna bol.....	7
1.3. Endogeni opioidni sustav.....	9
1.3.1. Opioidni receptori.....	11
1.3.2. Opioidi i analgezija.....	13
1.3.3. Klinička primjena opioida.....	16
2.OBRAZLOŽENJE TEME.....	17
3.MATERIJALI I METODE.....	18
3.1.Tkivo.....	18
3.1.1. Metoda izazivanja eksperimentalne upalne boli.....	18
3.1.2. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu.....	18
3.2. Kemikalije.....	19
3.3. Imunohistokemija.....	19
3.4. Analiza imunofluorescencije Leu/Met enkefalina.....	19
3.5. Statistička analiza.....	20
4.REZULTATI I RASPRAVA.....	21
5.ZAKLJUČAK.....	27
6.LITERATURA.....	28
7.SAŽETAK/SUMMARY.....	32

# 1. UVOD

## 1.1. Bol

Prema Međunarodnoj udruzi za istraživanje boli (IASP<sup>1</sup>), bol je "... neugodno senzorno i emocionalno iskustvo vezano uz stvarnu ili moguću ozljedu tkiva ..." (www.iasp-pain.org). Bol je zaštitni mehanizam koji se pojavljuje pri bilo kakvom oštećenju tkiva te potiče reakcije kojima se uklanja bolni podražaj. Umijeće postavljanja dijagnoze pojedine bolesti uvelike ovisi o prepoznavanju vrste boli (Guyton i Hall, 2006.).

Bol možemo podijeliti prema porijeklu, trajanju, etiologiji ili patofiziologiji, intenzitetu ili simptomima.

Prema porijeklu bol dijelimo na kutanu, mišićnu, visceralnu i dr., dok je prema duljini trajanja dijelimo na akutnu i kroničnu.

*Akutna bol* svako je neželjeno senzorno i emocionalno iskustvo povezano s aktualnim ili prijetećim oštećenjem tkiva ili opisano u uvjetima takvog oštećenja. Akutna bol normalan je, predvidljiv fiziološki obrambeni odgovor na mehanički, kemijski ili toplinski podražaj izazvan kirurškim postupkom, povredom ili akutnom bolesti (Kogler i sur., 2013.).

*Kronična bol* definira se kao bol koja traje dulje od uobičajenog vremena potrebnog za cijeljenje ozljede (Jukić i sur., 2014.). Trajanje boli od tri mjeseca uzima se kao najprikladnije razdoblje za razlikovanje akutne od kronične boli (IASP, 1986.). Kronična bol ponekad nije uzrokovana ozljedom i može biti bez otkrivenog štetnog uzroka. Dovodi do narušavanja kvalitete života.

Prema etiologiji bol dijelimo na nociceptivnu, upalnu i neuropatsku (Bach-Rojecky, 2006.).

*Nociceptivna bol* nastaje pod utjecajem podražaja visokog intenziteta u fiziološkim uvjetima. Akutni bolni podražaj termalnog (>47°C), mehaničkog ili kemijskog karaktera aktivira specifične receptore ili ionske kanale na perifernim živčanim završecima. Nastali akcijski potencijal se prenosi u kralježničnu moždinu gdje se aktiviraju sljedeći neuroni u osjetnom

---

<sup>1</sup> IASP-International Association for the Study of Pain

putu. Nociceptivna bol nastaje kao rani sustav upozorenja organizma na moguću ozljedu tkiva.

*Upalna bol* rezultat je upale ili ozljede tkiva prilikom čega dolazi do lučenja upalnih medijatora koji mogu izravno aktivirati nociceptore ili dovesti do njihove povećane osjetljivosti utjecajem na signalnu kaskadu.

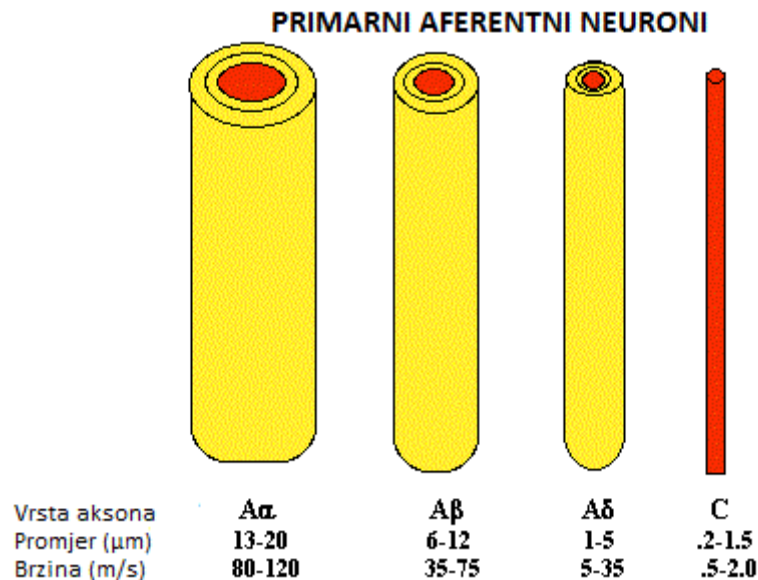
*Neuropatska bol* nastaje kao posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog i/ili središnjeg živčanog sustava. Patofiziologija ove vrste boli je vrlo složena, a uključuje brojne patološke promjene na periferiji, tj. na mjestu ozljede živca, kao i na spinalnoj i supraspinalnoj razini.

### **1.1.1. Receptori za bol i putovi prijenosa bolnih signala**

Receptori za bol, odnosno nociceptori, su slobodni živčani završeci koji provode različite bolne podražaje u mozak gdje se stvara osjećaj boli. Vrlo ih je mnogo u površinskim slojevima kože, a rasprostranjeni su i u potkožnom tkivu, uključujući mišiće i zglobove te u visceralnim organima. Većina drugih dubokih tkiva samo je oskudno opskrbljena receptorima za bol. Suprotno većini drugih osjetnih receptora u tijelu, receptori za bol se vrlo slabo prilagođavaju pa se osjećaj boli povećava kod ponavljano podraživanja (Guyton i Hall, 2006.). Bol mogu uzrokovati mnoge vrste podražaja, koji se svrstavaju u mehaničke, toplinske i kemijske, pa stoga i nociceptore dijelimo u tri skupine: mehanički, termalni i polimodalni (reagiraju na različite podražaje). Mehanički se nociceptori podražuju snažnim pritiskom kože, dok termalni nociceptori reagiraju na izrazito niske (manje od 5°C) ili izrazito visoke (veće od 47°C) temperature. I jedni i drugi su slobodni živčani završeci tankih mijeliniziranih A $\delta$  vlakana koja impuls prenose brzinom 6-30 m/s. Polimodalni receptori su slobodni živčani završeci nemijeliniziranih C-vlakana (manjeg promjera od A $\delta$  vlakana) koja impuls prenose brzinom 0,5-2 m/s, a reagiraju na mehaničke, toplinske i kemijske bolne podražaje (Slika 1.).

Zbog dvostrukog sustava inervacije receptora za bol, bolni podražaj često uzrokuje dvije faze boli: približno jednu sekundu poslije brze, oštre faze boli koja se u mozak prenosi A $\delta$  vlaknima, slijedi spora faza koja se prenosi C-vlaknima. Brza bol ima važnu ulogu u poticanju reakcije kojom se odmičemo od bolnog podražaja (Guyton i Hall, 2006.). Obje vrste vlakana stražnjim spinalnim korijenima ulaze u kralježničnu moždinu nakon čega bolni signali kreću

prema mozgu dvama putovima: neospinotalamičnim traktom i paleospinotalamičnim traktom (Slika 2.).

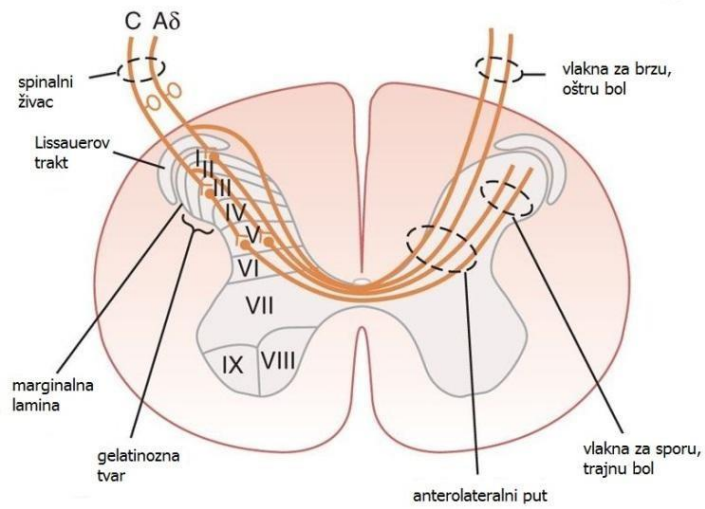


**Slika 1. Vlaka primarnih aferentnih neurona (preuzeto sa: <https://faculty.washington.edu/chudler/cv.html>, pristupljeno 20.5.2015.).**

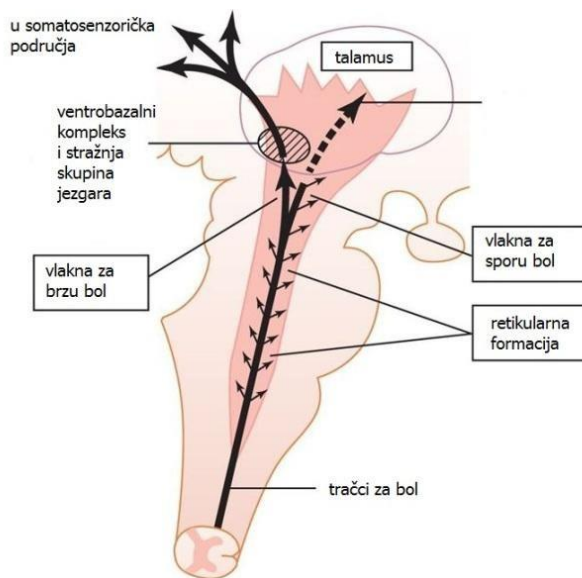
Impulsi koji se s periferije prenose A $\delta$  vlaknima, završavaju u marginalnoj lamini (lamina I) dorzalnih rogova i tu pobuđuju neurone drugog reda neospinotalamičnog trakta te se prenose do talamusa. Neka vlakna neospinotalamičnog trakta završavaju u retikularnim područjima moždanog debla; signali iz tih jezgara se prenose u druga bazalna područja mozga i somatosenzoričku koru (Guyton i Hall, 2006.). Živčani sustav ovakvu brzu i oštru bol može mnogo točnije lokalizirati od spore trajne boli. Međutim, ako uz receptore za bol istodobno nisu podraženi i receptori za opip, i brza bol se lokalizira s manjom preciznošću (samo na većoj površini tijela kao što je ruka ili noga).

Impulsi koji se s periferije prenose C-vlaknima, završavaju u laminama II i III dorzalnog roga koje se zajednički nazivaju želatinoznom tvari. Signal zatim prolazi jednim ili više neurona s kratkim vlaknima. Posljednji neuroni u nizu šalju dugačke aksone na suprotnu stranu kralježnične moždine i anterolateralni putem, zajedno s vlaknima brzog puta, se penju prema mozgu i završavaju u retikularnim jezgrama produljene moždine, ponsa i mezencefalona,

tektalnom području mezencefalona i sivom području oko akvedukta (Guyton i Hall, 2006.) (Slika 3).



**Slika 2. Prijenos brzih oštih i sporih trajnih bolnih signala u kralježničnu moždinu i kroz nju, na putu do moždanog debla (Guyton i Hall, 2006.).**



**Slika 3. Prijenos bolnih signala u moždano deblo, talamus i moždanu koru putovima za brzu, bockajuću bol i sporu, žareću bol (Guyton i Hall, 2006.).**



U prijenosu bolnih signala između završetaka prvog neurona i neurona dorzalnog roga posreduju neurotransmitori.

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor. Djeluje putem ionotropnih AMPA<sup>2</sup> i NMDA<sup>3</sup> receptora na perifernim završecima aferentnih živaca, neuronima dorzalnog roga kralježnične moždine i neuronima u talamusu. Zajedno s glutamatom izlučuju se i neuropeptidi, od kojih je najbolje poznat neurokinin, odnosno tvar P koja se otpušta kod oštećenja tkiva ili snažnog podraživanja perifernih živaca. Aktiviranjem neurokininskih receptora na neuronima uzrokuje se spori ekscitirajući potencijal koji produljuje učinak glutamata. Otpuštanje tvari P i srodnog peptida, neurokinina A povećano je kod perifernih upalnih procesa (Dickenson, 1995.).

Glutamat djeluje i na presinaptičke NMDA receptore čime dodatno pojačava lučenje neurotransmitora u sinapse.

Ostali važni neurotransmitori u prijenosu bolnih impulsa su somatostatin, galanin, peptid sličan genu za kalcitonin, kolekistokinin, faktor lučenja kortikotropina i dr. U dorzalnom rogu kralježnične moždine oslobađaju se i medijatori iz ne-živčanih izvora, primjerice adenozin-3-fosfat, dušikov oksid i prostaglandini, koji mogu djelovati ekscitacijski ili inhibicijski.

Prijenos informacija od perifernih nociceptora do struktura u središnjem živčanom sustavu naziva se nocicepcija, s njegova posljedica je svjesni doživljaj boli.

Nocicepciju dijelimo u četiri faze:

1. Transdukcija - prevođenje mehaničkog, kemijskog i termičkog podražaja u akcijski potencijal, odnosno živčanu aktivnost.
2. Transmisija - provođenje živčanoga impulsa tankim mijeliniziranim A $\delta$  i nemijeliniziranim C vlaknima do drugog neurona u kralježničnoj moždini te prijenos ascendentnim putovima prema subkortikalnim centrima srednjeg mozga i talamusu.
3. Modulacija - obrada i transformacija informacija o boli s periferije. Modulacijom bolni doživljaj može biti pojačan - periferna i središnja senzitivacija ili oslabljen - descendentna

---

<sup>2</sup> AMPA- alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

<sup>3</sup> NMDA-N-metil-D-aspartat

inhibicija. Modulacija bolnog doživljaja dovodi do niza patoloških pojava - dezinhibicije, nove neuroplastičnosti, strukturalne reorganizacije te pojave hiperalgezije i alodinije.

4. Percepcija – doživljaj boli uslijed projekcije živčanih putova u moždanu koru i subkortikalne centre (Kogler i sur., 2013.).

### **1.1.2. Modulacija bolnog impulsa: silazni putovi iz mozga u kralježničnu moždinu i inhibitorni interneuroni u kralježničnoj moždini**

Reakcija na bol različita je između pojedinaca. Razlog tomu je sposobnost mozga da aktiviranjem sustava za nadzor boli potiskuje ulaženje bolnih signala u živčani sustav.

Taj sustav naziva se analgezijski sustav. Sastoji se od tri glavna dijela - sive tvari oko akvedukta i periventrikularnog područja, velike jezgre rafe i kompleksa za inhibiciju boli koji se nalazi u stražnjim rogovima kralježnične moždine. Neuronima iz područja sive tvari oko akvedukta šalju signale u veliku jezgru rafe te retikularnu paragigantocelularnu jezgru u lateralnom dijelu kralježnične moždine, a iz tih jezgara signali se dorzolateralnim kolumnama prenose do kompleksa za inhibiciju boli (Guyton i Hall, 2006.).

Analgezijski sustav može zaustaviti bolne signale na mjestu njihova ulaska u kralježničnu moždinu prije nego se oni prekopčaju i krenu prema mozgu. On može prekinuti i lokalne spinalne reflekse uzrokovane bolnim signalima.

U analgezijskom sustavu sudjeluje nekoliko različitih neurotransmitora. Serotonin i noradrenalin sudjeluju u silaznom sustavu kontrole boli koji počinje u moždanoj kori i u supkortikalnim tvorbama te seže do ulaza bolnih podražaja u središnji živčani sustav. Serotoninski sustav počinje neuronima smještenima u periakveduktalnoj sivoj tvari i u ponu. Vjeruje se da serotonin potiče lokalne neurone u kralježničnoj moždini na lučenje enkefalina, koji uzrokuju presinaptičku i postinaptičku inhibiciju ulaznih C i A $\delta$  vlakana, ondje gdje ta vlakna u stražnjim rogovima tvore sinapse. Noradrenalinski sustav počinje u postranim dijelovima retikularne tvorbe srednjeg mozga (Guyton i Hall, 2006.).

Interneuroni čine najveći udio u populaciji neurona u dorzalnom rogu. Najveća gustoća im je u lamini I te lamini III (Todd i Koerber, 2006.). Za sustav kontrole boli u dorzalnom rogu važnu ulogu imaju inhibitorni interneuroni. Oni sudjeluju u: smanjenju odgovora nociceptivnih neurona na podražaj, isključivanju nociceptivnih neurona u odsutstvu štetnih

podražaja, odvajanju nociceptivnih od nenociceptivnih informacija i sprječavanju širenja ekscitacije kroz središnji živčani sustav (Sandkuhler, 2009.). Najvažniji neurotransmitori inhibitornog sustava su GABA<sup>4</sup> i glicin koji djeluju putem ionotropnih GABA-A receptora propusnih za kloridne ione, glicinskih receptora ili metabotropnih GABA-B receptora (Sandkuhler, 2009.).

## 1.2. Upalna bol

*Upalna bol* nastaje kao posljedica upale ili ozljede tkiva. Periferno se iz stanica oko nociceptora (na primjer, trombocita, mastocita, leukocita, fibroblasta), luče tvari poput različitih kinina, serotonina, eikosanoida, citokina i dr. (Slika 4.). Aktivacijom nociceptora neke se tvari, poput SP i CGRP<sup>5</sup>-a luče iz kolateralnih živčanih završetaka istog nociceptora (aksonski refleksi). Živčani impuls koji je nastao u jednom ogranku aksonom se prenosi u kralježničnu moždinu, ali se antidromno rasprostire i u ostale kolateralne aksonske ogranke. To uzrokuje lučenje neuropeptida u koži. Tvar P dovodi do vazodilatacije, a CGRP povećava kapilarnu permeabilnost (Bach-Rojecky, 2006.).

Dok neki medijatori upale, kao serotonin, ATP i protoni, djeluju izravno aktivirajući nociceptore, drugi neizravno interferiraju sa signalnim procesima unutar nociceptora. Kao posljedica smanjuje se prag aktivacije nociceptora, a podražljivost membrane aferentnog završetka se povećava. To je stanje periferne senzitivacije. Pri upali dolazi do aktivacije i tzv. tihih nociceptora (10-20% C-nociceptora u koži koji se ne aktiviraju bolnim podražajima u fiziološkim uvjetima). Oni se djelovanjem medijatora upale senzitiviraju i odgovaraju na podražaje niskog i visokog intenziteta, termalne, mehaničke i kemijske prirode (Bach-Rojecky, 2006.).

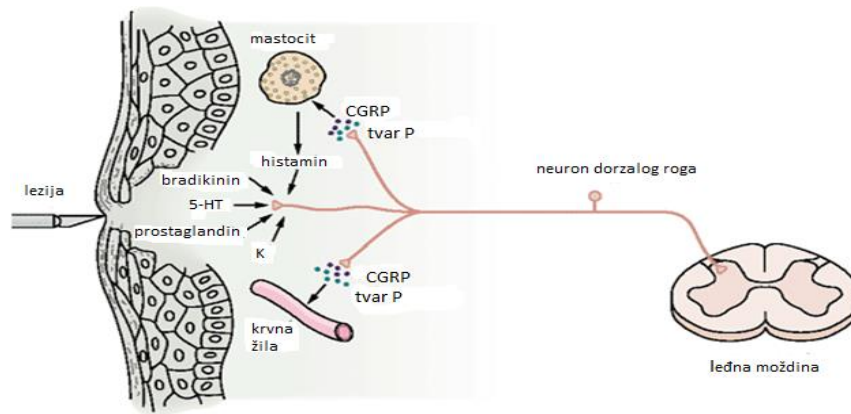
Tijekom učestalog izbijanja primarnih aferentnih neurona pri upali dolazi i do brojnih promjena u SŽS-u, poput središnje senzitivacije, kao i do promjena fenotipa, primjerice promjena u transkripciji gena za različite molekule uključene u proces nocicepcije.

Smatra se da kao posljedica ovakvih promjena nastaje stanje povećane osjetljivosti na bolne podražaje (hiperalgezija) i osjetljivost na podražaje koji inače nisu bolni (alodinija).

---

<sup>4</sup>  $\gamma$ -amino maslačna kiselina

<sup>5</sup> CGRP- calcitonin gene-related peptide



**Slika 4. Različite tvari u području upale koje sudjeluju u senzibilizaciji nociceptora (Turkalj, 2014.)**

Fenomeni senzitivacije, tj. pojačanja osjeta uslijed ponovljenog i učestalog podraživanja nociceptora, svojstveni samo kompleksnom osjetu boli, ostaju djelomično nerazjašnjeni. Dok kod drugih osjetnih stanica dugotrajniji podražaji uzrokuju njihovu prilagodbu i smanjenu podražljivost, kod senzornih neurona koji prenose bolne impulse to nije slučaj. Dugotrajnim podraživanjem nociceptora bol se pojačava i iz akutne prelazi u kroničnu (Bach-Rojecky, 2006.). Periferna i središnja senzitivacija karakteriziraju upalnu i neuropatsku vrstu boli.

Periferna senzitivacija je stanje povećane podražljivosti nociceptora. Periferno oslobođeni medijatori upale, poput bradikininina i prostaglandina, vežu se za metabotropne receptore spregnute s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka. Oni dovode do nizvodne aktivacije protein kinaza A i C koje fosforiliraju ionske kanale i receptore. Kao rezultat toga, smanjuju se pragovi aktivacije receptora i ionskih kanala, npr. TRPV1<sup>6</sup> receptora na termalni podražaj, ASIC<sup>7</sup> ionskih kanala na protone i dr. Podražljivost membrane nociceptora se povećava (Bach-Rojecky, 2006.).

Središnja senzitivacija, tj. povećana podražljivost neurona drugog reda u dorzalnom rogu kralježnične moždine, uključuje različite i vrlo kompleksne promjene u kralježničnoj moždini, a nastaje kao posljedica periferne senzitivacije i učestalog ulaza informacija s periferije. Središnja senzitivacija može biti brza i odgođena.

<sup>6</sup> TRPV1- transient receptor potential cation channel subfamily V member 1

<sup>7</sup> ASIC- acid sensing ion channel

Hiperalgezija i alodinija karakteriziraju neka klinička bolna stanja, poput neuropatske boli, a često se javljaju u eksperimentalnim modelima boli.

*Hiperalgezija* je stanje povećane osjetljivosti na bolne podražaje. Može biti primarna; na mjestu ozljede tkiva ili živca, ili sekundarna; izvan ozljede. Primarnu hiperalgeziju izazvat će termalni, mehanički i kemijski podražaji, a uzrok mogu biti ozljeda tkiva, upalni medijatori ili dugotrajni bolni podražaji. Mehanizam nastanka primarne hiperalgezije leži u promjeni fizioloških i farmakoloških osobina C i A $\delta$  vlakana. Sekundarnu hiperalgeziju izazivaju najčešće mehanički podražaji, a njezin uzrok mogu biti ozljeda tkiva ili živca. Nastaje zbog povećane podražljivosti središnjih neurona, a djelomično je neovisna o ulazu preko C i A $\delta$  vlakana s periferije (Bach-Rojecky, 2006.).

*Alodinija* je stanje pojačane osjetljivosti na podražaje koji nisu bolni, primjerice dodir. Osim mehaničkog podražaja kao što je dodir, alodiniju će izazvati i hladnoća. Uzrok alodinije leži u ozljedi živčanog sustava, a mehanizam kojim se manifestira uključuje aktivaciju A $\beta$ - vlakana, središnju senzitivizaciju, reorganizaciju neurona dorzalnog roga kralježnične moždine, aktivaciju senzitiviziranih neurona u dorzalnog roga kralježnične moždine s C-vlaknima osjetljivim na kapsaicin. (Bach-Rojecky, 2006.).

### **1.3. Endogeni opioidni sustav**

Prije više od 35 godina otkriveno je da se ubrizgavanjem vrlo malih količina morfina u periventrikularnu jezgru oko trećeg ventrikula ili u sivu tvar oko akvedukta u moždanome deblu postiže izuzetno visok stupanj analgezije. Daljnjim je istraživanjem pronađeno da tvari slične morfinu, uglavnom opijati, djeluju i na mnogim drugim mjestima analgezijskog sustava, uključujući stražnje robove kralježnične moždine (Guyton i Hall, 2006).

Budući da se učinak većine lijekova koji mijenjaju podražljivost neurona postiže djelovanjem na sinaptičke receptore, pretpostavilo se da bi 'receptori za morfin' mogli biti receptori za neki neurotransmitor koji se luči u središnjem živčanom sustavu. Intenzivnim traganjem za nekim fiziološkim opioidima, 70-tih godina 20. stoljeća pronađeni su Beta-endorfin, Met-enkefalin, Leu-enkefalin i dinorfin. Svi oni su razgradni produkti triju velikih proteinskih molekula (Guyton i Hall, 2006.). Beta-endorfin nastaje iz većeg prekursora propiomelanokortina, koji također tvori i adrenokortikotropni hormon te melanocit-stimulirajući hormon. Met-enkefalin

i Leu-enkefalin nastaju iz prekursora preproenkefalina od kojeg svaka molekula tvori višestruke kopije Met-enkefalina i jednu molekulu Leu-enkefalina. Dvije kopije dinorfina (A i B) te alfa-neoendorfin nastaju iz treće velike proteinske molekule preprodinorfina. Aminokiselinske sekvence endogenih opioidnih peptida uključenih u modulaciju boli prikazani su u Tablici 1. (Fields i sur., 2006.)

Enkefalin je identificiran 1974. godine kao mješavina dva peptida, metionin-enkefalina i leucin-enkefalina (Beluzzi i sur., 1976.). Brojni anatomske, farmakološki i elektrofiziološki podaci pokazuju da je spinalni enkefalinski sustav uključen u kontrolu ulaza nociceptivnih informacija s periferije u koru velikog mozga (Cesselin i sur., 1985.).

**Tablica 1. Sekvence endogenih opioidnih peptida uključenih u modulaciju boli (McMahon i suradnici, 2005.).**

Peptid	Sekvenca
<b>Leu-enkefalin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
<b>Met-enkefalin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH
<b>Beta-endorfin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Gln-OH
<b>Dinorfin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Tyr-Asp-Asn-Gln-OH

Ovi opioidi ponašaju se kao neurotransmitori i neuromodulatori te djeluju putem tri vrste opioidnih receptora.

### 1.3.1. Opioidni receptori

Iz najranijih dana istraživanja opioidnog sustava izgledalo je očigledno da opioidni alkaloidi djeluju na živčani sustav. Postojanje specifičnih receptora dokazano je prisutstvom visokoafinitetnih vežućih mjesta na izoliranim membranama mozga štakora. Otkriveno je da nalokson, sintetski derivat morfina, inhibira učinke morfina i smatran je prototipom opioidnog antagonista. Od tada, svaka biološka aktivnost koja je bila suprotna djelovanju naloksona,

smatrana je kao aktivnost opioidne prirode. Kemijskim sintezama dobiveno je još nekoliko alkaloida s opioidnom aktivnošću koji su doveli do otkrića nekoliko klasa opioidnih receptora (Dickenson i Kieffer, 2006.)

Tri najvažnija podtipa opioidnih receptora su mi, kapa i delta (Tablica 2.). Prvi od njih koji je bio karakteriziran je delta receptor iz stanica miša.

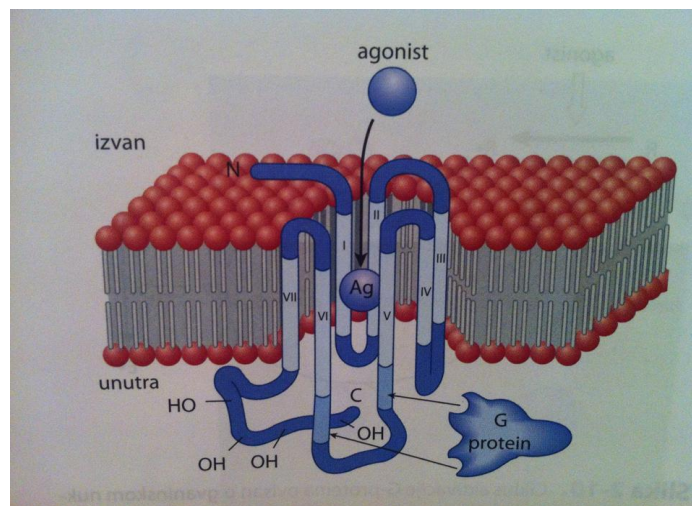
Opioidni receptori pripadaju superporodici receptora združenih s G-proteinima. Takvi receptori sadrže sedam hidrofobnih transmembranskih domena povezanih kratkim petljama i pokazuju ekstracelularnu N-terminalnu domenu te intracelularni C-terminalni rep (Slika 5.). Mi, delta i kapa receptori pokazuju homologiju u transmembranskim domenama i intracelularnim petljama, dok su im ekstracelularne petlje te N- i C-krajevi različiti. Ovisno o tipu liganda, vežuća strana receptora spregnutih s G-proteinima je locirana u ekstracelularnoj domeni ili unutar sedam transmembranskih uzvojnica. Alternativno, vežuća strana može biti istovremeno i vanjska i transmembranska regija. Ekstracelularne petlje opioidnih receptora uspostavljaju prvi kontakt s ligandom te su važne za selektivnost. Transmembranske domene su, nasuprot njima, visoko očuvane i tvore vežuću džep koji je sličan među mi, kapa i delta receptorima (Dickenson i Kieffer, 2006.).

Distribucija opioidnih receptora razlikuje se među podtipovima. Delta opioidni receptori smješteni su primarno na aksonima, i sukladno tome djeluju presinaptički. Mi i kapa opioidni receptori nađeni su združeni s neuronalnom plazma membranom u dendritima i sukladno tome djeluju postsinaptički. Kod nekih populacija neurona, mi i kapa opioidni receptori smješteni su na aksonima (Elde i sur., 1995.).

Iako anatomske studije indiciraju da se enkefalini otpuštaju u blizini mi i delta opioidnih receptora, nije potpuno jasno koji endogeni opioid djeluje preko kojeg receptora (Tablica 2). Met- i Leu-enkefalin pokazuju veći afinitet za delta nego za mi opioidni receptor te vrlo nizak afinitet za kapa receptor. Dinorfini imaju relativno visok afinitet za kapa opioidni receptor i generalno je prihvaćeno da su oni endogeni ligandi toga receptora. Kao i enkefalini, beta-dinorfin pokazuje otprilike jednak afinitet za delta i mi receptore te manji afinitet za kapa opioidne receptore (Fields i sur., 2006.)

**Tablica 2. Podtipovi, fiziološke funkcije i afiniteti endogenih opioda za opioidne receptore (Katzung i suradnici, 2009).**

Podtip receptora	Funkcija	Afinitet endogenih opioda
$\mu$	supraspinalna i spinalna analgezija, sedacija, depresija disanja, usporenje peristaltike, modulacija izlučivanja hormona i neurotransmitora	endorfini > enkefalini > dinorfini
$\kappa$	supraspinalna i spinalna analgezija, psihotomimetski učinci, usporenje peristaltike	dinorfini > endorfini i enkefalini
$\Delta$	supraspinalna i spinalna analgezija, modulacija izlučivanja hormona i neurotransmitora	enkefalini > endorfini i dinorfini



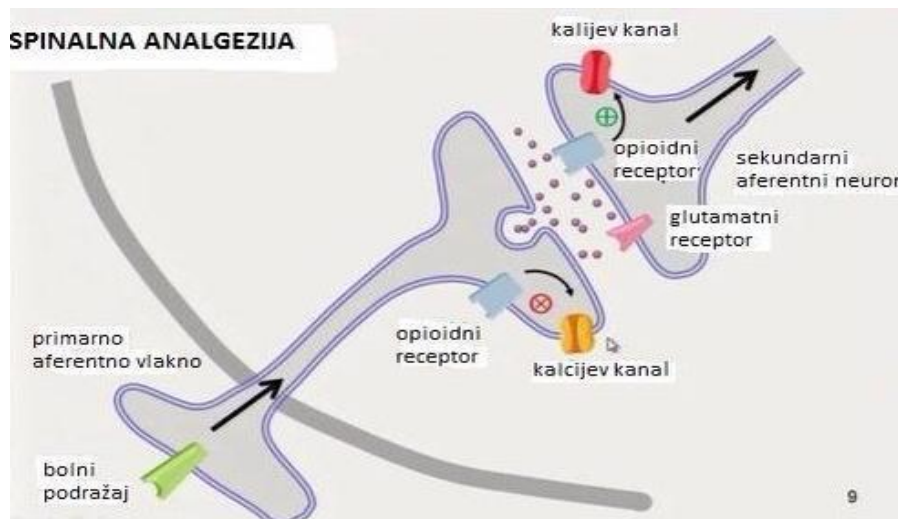
**Slika 5. Transmembranska topologija tipičnog receptora spregnutog s G-proteinom (Katzung i suradnici, 2009.).**



### 1.3.2. Opioidi i analgezija

Nakon vezanja endogenih peptida enkefalina i endorfina te egzogenih tvari za specifične proteinske molekule na membranama neurona pretpostavljeni mehanizam postreceptorskih unutarstaničnih učinaka je sparivanje opioidnih receptora s kalijevim i kalcijevim ionskim kanalima. Aktivacija sva tri tipa opioidnih receptora te modifikacija aktivnosti ionskih kanala, inhibirat će staničnu aktivnost. Otvaranje kalijevih kanala inhibirat će oslobađanje neurotransmitora ukoliko se receptori nalaze na presinaptičkim živčanim završecima te prijenos signala zbog hiperpolarizacije ako se receptori nalaze na postsinaptičkim neuronima. Zatvaranje kalcijevih kanala na presinaptičkim membranama smanjit će lučenje ekscitacijskih neurotransmitora, ponajprije tvari P iz presinaptičkog neurona (Dickenson i Kieffer, 2006.).

*Spinalna analgezija* (Slika 6.) - autoradiografskim i imunohistokemijskim metodama dokazano je da su unutar kralježnične moždine opioidni receptori većinom locirani u površinskim slojevima dorzalnog roga (lamina I i lamina II) te manjim dijelom u dubljim slojevima. Opioidni receptori sintetiziraju se u ganglijima dorzalnog roga i transportiraju se centralno i periferno što podrazumjeva da je glavni mehanizam spinalne opioidne analgezije, bila ona egzogeno ili endogeno posredovana, aktivacija presinaptičkih opioidnih receptora, što selektivno smanjuje lučenje neurotransmitora iz nociceptivnih aferenata te time i nociceptivnu transmisiju. U prilog tome govori i podatak da spinalno primijenjen morfin može smanjiti lučenje tvari P i CGRP-a nakon stimulacije te je ekscitatorna sinaptička transmisija u lamini II inhibirana presinaptičkim opioidnim mehanizmom.



**Slika 6. Modulacija aferentnih nocicepcijskih signala modulacijom opioidnih receptora (preuzeto sa: <https://quizlet.com/27507181/opioid-analgesics-flash-cards/>).**

*Supraspinalna analgezija* – izlazni signali iz kralježnične moždine stišavaju se djelovanjem opioida, a njihovo djelovanje na razini talamusa, amigdale i senzorne kore vjerojatno ima ulogu u ukupnom analgetskom učinku. Međutim, iz podataka dobivenih istraživanjima na životinjama i ljudima, jasno je da spinalna analgezija može u potpunosti spriječiti bolni odgovor te tako spriječiti i supraspinalnu aktivaciju. Signali koji iz kralježnične moždine dođu do parabrahijalne regije, sive tvari i amigdale vjerojatno će pridonijeti emocionalnom aspektu boli, dok će oni koji dođu do talamusa pridonijeti senzornom aspektu. Važne supraspinalne strukture vezane uz djelovanje opioida su srednji mozak i moždano deblo, odnosno periakveduktalna siva tvar i rostroventralna medula (RVM). Egzogeni injekcija morfina u bilo koju od navedenih struktura uzrokuje antinocicepciju preko povećane aktivnosti inhibitorne silazne kontrole koja završava u dorzalnom rogu kralježnične moždine. Ova pojava dovela je do identifikacije dviju najvećih populacija RVM neurona, ON stanica, čija se aktivnost podudara sa spinalnim nociceptivnim refleksima, i OFF stanica, čija je aktivnost povezana sa supresijom tih refleksa. Injekcija morfina u RVM dovodi do redukcije aktivnosti ON te povećanja aktivnosti OFF stanica (Dickenson i Kieffer, 2006.)

*Periferna analgezija* - Premda se dugo smatralo da opioidi djeluju analgetski isključivo unutar središnjeg živčanog sustava, sve je više dokaza da većina agonista različitih opioidnih receptora može uzrokovati analgetski učinak i na periferiji.

Opioidni receptori nalaze se također i na periferiji jer se nakon sinteze u ganglijima dorzalnog roga transportiraju i periferno te je njihova ekspresija povećana u primarnim nociceptivnim aferentima tijekom upale. Endogeni opioidi koje tvore stanice imunskog sustava, kao i njihovi sintetski analozi koji se primjenjuju periferno, imaju antinociceptivni učinak u upalnim stanjima (Dickenson i Kieffer, 2006.).

Brojna stanja, poput oštećenja tkiva i upale, mogu biti okidač za lučenje peptida koji će vezanjem na opioidne receptore perifernih neurona uzrokovati lokalnu analgeziju. Opioidi povećavaju struju kalija i smanjuju struju kalcija u tijelima senzornih neurona, što oboje može dovesti do smanjene neuronalne podražljivosti ili otpuštanja neurotransmitora. Slično njihovom učinku u središnjem živčanom sustavu, opioidi inhibiraju o kalciju ovisno otpuštanje proinflammatory tvari iz stanica na periferiji, kao što je tvar P, što govori u prilog i njihovom protuupalnom učinku (Stein, 1995.). Ovaj pristup mogao bi biti koristan u istraživanju analgetika koji bi djelovali periferno i time imali manje središnjih nuspojava.

Najpotentniji agonisti s analgetskim učinkom su ligandi mi receptora, potom delta i kapa. Kod sintetskih opioida (Tablica 3.) koji djeluju preko mi receptora, vrijedi pravilo da su opioidi s najvećom lipofilnošću najmanje potentni (Dickenson i Kieffer, 2006.).

Dinorfini-endogeni agonisti kapa opioidnih receptora imaju brojne učinke koji se razlikuju od tipičnih opioidnih učinaka. Uzrokuju povećanje aktivnosti nekih neurona, dok na druge djeluju inhibitorno. Spinalna primjena antagonista kapa receptora istovremeno može smanjiti i povećati neuronalnu aktivnost kod zdravih životinja. Novije studije pokazuju da povećana spinalna koncentracija dinorfina korelira s povećanom boli što je zanimljiv primjer pronociceptivnog djelovanja opioidnog peptida (Dickenson i Kieffer, 2006.).

**Tablica 3. Polusintetski i sintetski opioidi**

Agonisti	Antagonisti	Parcijalni agonisti	Agonisti-antagonisti
Fentanil	nalokson	buprenorfin	Nalorfin
Sufentanil	naltrekson	butorfanol	Nalbutin
Levorfanol	nalmefen		Pentazocin
Oksikodon	diprenorfin		Bremazocin
Hidromorfon			
Tramadol			
Metadon			
Metazocin			
Fenazocin			

### 1.3.3. Klinička primjena opioida

Prema ATK (Anatomsko-Terapijsko-Kemijska klasifikacija lijekova) skupinama u terapiji boli primjenjuju se lijekovi iz skupine N<sup>8</sup> i M<sup>9</sup>: nesteroidni protuupalni lijekovi, analgetici i lokalni anestetici, ali se u liječenju primjenjuju i psihotropni lijekovi iz skupine antiepileptika i psihoanaleptika (triciklički antidepresivi), kao koanalgetici. Odabir analgetika ovisi o vrsti i intenzitetu boli. Svjetska zdravstvena organizacija na temelju intenziteta boli postavila je algoritam liječenja u obliku trostupanjske ljestvice (Slika 7.) iz koje je vidljivo da se opioidni analgetici koriste kod boli srednjeg i jakog intenziteta (akutne, kronične, karcinomske, nekarcinomske) ([www.plivamed.net](http://www.plivamed.net)). Randomizirane studije pokazale su da je uporaba opioida za liječenje akutne i karcinomske boli opravdana i učinkovita, dok je uporaba kod kronične nekarcinomske boli (reumatoidni artritis, osteoartritis, glavobolje, periferna neuropatija...) kontroverzna i nema dovoljno dobrih studija o opravdanosti i učinkovitosti opioida (Jukić i sur., 2014.).

Kod *akutne boli* najčešće korišteni opiodi su morfij, kodein, tramadol, buprenorfin, metadon i oksikodon te fentanil i sufentanil kod izuzetno jake boli izazvane pankreatitisom, plućnom embolijom, infarktom miokarda ili politraumom (Kogler i sur., 2013.).

Kod *kronične karcinomske boli* upotrebljavaju se slabi opiodi na drugoj razini trostupanjske analgoljestvice: kodein, tramadol i fiksna kombinacija tramadola i paracetamola te jaki opiodi na trećoj razini trostupanjske ljestvice (Kogler i sur., 2011.).

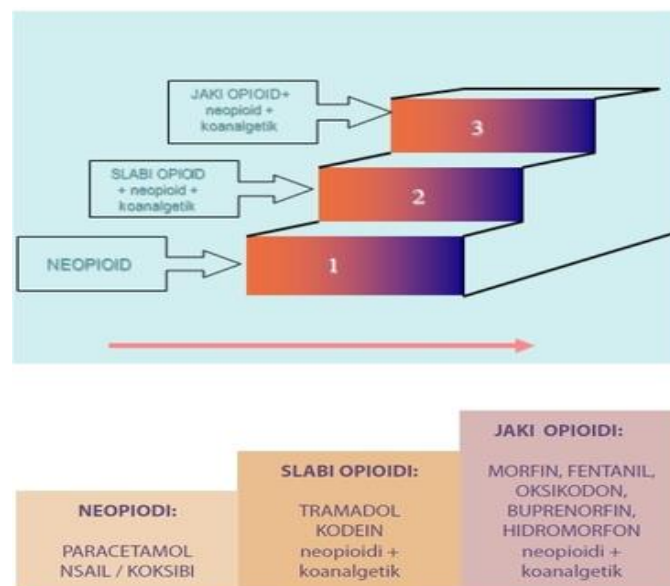
*Kronična nekarcinomska bol* rutinski se ne liječi opioidima, međutim bol koja nije ublažena neopiodima, u određenim slučajevima može se liječiti opioidom uz uvjet da prednost terapije nadmašuje moguće rizike. Primjerice, tramadol je odobren za terapiju umjerene boli kod osteoartritisa i dolazi u obzir kod pacijenata s kontraindikacijama za primjenu specifičnih inhibitora ciklooksigenaze 2 i neselektivnih nesteroidnih protuupalnih lijekova (Altman i sur., 2000.). Međutim, brojne studije govore u prilog rizicima koji nadmašuju prednosti terapije: stariji pacijenti koji boluju od artritisa skloniji su frakturama nakon uvođenja opioida u terapiju (Miller i sur., 2011); postoje dokazi da bi opiodi mogli biti učinkoviti analgetici za

---

<sup>8</sup> N-lijekovi s djelovanjem na živčani sustav

<sup>9</sup> M-lijekovi s djelovanjem na koštano mišićni sustav

pacijente s reumatoidnim artritisom, ali nuspojave su česte i mogu nadmašiti prednost ovih lijekova te ne postoji dokaz o benefitima korištenja dužeg od 6 tjedana (Whittle i sur.,2011.). Prilikom uvođenja opioida u terapiju, počinje se s niskim dozama kratkodjelujućeg opioida, a tek nakon što se odredi dnevna doza opioida, u terapiju se uvodi dugodjelujući opioid. Liječnici moraju voditi računa o nuspojavama (opstipacija, nastanak tolerancije, ovisnost, apneja pri spavanju) i evidentirati ih. Prije uporabe opioida potrebno je uvesti laksative u terapiju, a ukoliko dođe do razvoja ovisnosti, vršiti rotaciju opioida (Jukić i sur., 2014.).



Slika 7. Trostepanski algoritam liječenja boli (preuzeto sa:

<http://www.plivamed.net/aktualno/clanak/6240/Uloga-ljekarnika-u-lijecenju-boli-terapija-boli.html>).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Brojna istraživanja pokazala su važnu ulogu endogenog opioidnog sustava u različitim bolnim stanjima, pa tako i kod boli uzrokovane upalnim procesima. Potvrđena je aktivna uloga opioidnog sustava na perifernoj, supraspinalnoj, te spinalnoj razini. Pri tome opioidni interneuroni u dorzalnog rogu kraljeznične moždine koji luče enkefaline, naše prirodne analgetike, imaju najvažniju ulogu u modulaciji senzornih aferentnih ulaznih impulsa tijekom perifernih upalnih stanja.

Cilj ovog istraživanja je pokazati uključenost enkefalinskog sustava u modulaciju upalne boli na spinalnoj razini. Stoga ćemo imunohistokemijskom metodom ispitati razinu enkefalina u laminama dorzalnog roga štakora kojima je upalna bol uzrokovana primjenom otopine formalina.

### **3. MATERIJALI I METODE**

U ovom diplomskom radu analizirani su uzorci poprečnih prereza lumbalnog dijela leđne moždine mužjaka štakora soja Wistar, prethodno pripremljeni nakon bihevioralnih mjerenja bolnih odgovora koje su provele osobe osposobljene za rad s pokusnim životinjama. U pokusima na laboratorijskim životinjama slijedio se Zakon o zaštiti životinja (NN 125/13) te smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. 0-26/2005-439).

#### **3.1.1. Metoda uzrokovanja eksperimentalne upalne boli**

U mužjaka štakora soja Wistar u dobi od 3 do 4 mjeseca, težine 300 do 400 g, uzgajanih na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu proveden je formalinski test na način da je štakorima subkutano injicirana 5%-tna otopina formalina (50  $\mu$ L) u plantarnu stranu desne stražnje šape nakon čega su odmah vraćeni u prozirni kavez na promatranje tijekom 1 sata. Bol je je mjerena kao broj lizanja i protresanja injicirane šape. Vrijeme promatranja podijeljeno je u dvije faze: akutna faza I (0-15 minuta) u kojoj je odgovor izazvan direktnom stimulacijom perifernih senzornih živčanih završetaka formalinom i inflamatorna faza II (15-60 minuta) koja je posljedica periferne senzitivacije. Svaka eksperimentalna skupina sadržavala je 5 životinja. Kontrolne životinje umjesto otopine formalina primile su određeni isti volumen fiziološke otopine. Po 3 životinje iz svake skupine su žrtvovane, podvrgnute su transkardijalnoj perfuziji paraformaldehidom radi uzimanja uzoraka lumbalnog dijela leđne moždine za imunohistokemijske analize.

#### **3.1.2. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu**

Lumbalni dio leđne moždine nakon žrtvovanja životinja kardijalnom punkcijom je najprije čuvan na 4°C tijekom noći u 15%-tnoj otopini sukroze u paraformaldehidu te potom

idući dan u 30%-tnoj otopini sukroze u PBS-u, i konačno smrznut na  $-80^{\circ}\text{C}$  do uporabe. Smrznuti uzorci izrezani su na kriostatu (Leica, Germany) na prereze debljine 30  $\mu\text{m}$ . Za imunohistokemijsku analizu korišten je lumbalni segment L5-L3.

### **3.2. Kemikalije**

Za imunohistokemijsku analizu korištene su sljedeće kemikalije: Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD), kozji serum (Vector, Inc., Burlingame, CA, SAD), primarno mišje monoklonsko protutijelo na Met/Leu enkefalin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, SAD), sekundarno mišje protutijelo Alexa Fluor-448 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD).

### **3.3. Imunohistokemija**

Odabrani prerezi lumbalnog L5-L3 dijela leđne moždine stavljeni su u jažice s fosfatnim puferom (engl, phosphate-buffered saline, PBS), kako je prikazano na Slici 7. (8 prereza po jažici). Ispirani su 3 puta po 5 minuta u 0,25% otopini PBS – TritonX100 (PBST), blokirani 10%-tnim kozjim serumom tijekom 1 h i inkubirani tijekom noći na sobnoj temperaturi sa primarnim mišjim protutijelom na Leu/Met enkefalin (1:100) razrijeđenim u 1%-tnom kozjem serumu. Uzorci su sljedeći dan isprani 3 puta po 5 minuta PBST-om i inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi sa fluorescentnim sekundarnim mišjim protutijelom Alexa Fluor-448 (1:400), razrijeđenim u 1%-tnom kozjem serumu u tami. Uzorci su opet isprani 3 puta po 5 minuta i potom nanaseni na predmetna stakalca. Prije stavljanja pokrovnice, na prereze je nanasena supstanca koja sprječava gubitak fluorescencije. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani koristeći 10x i 40x povećanje.

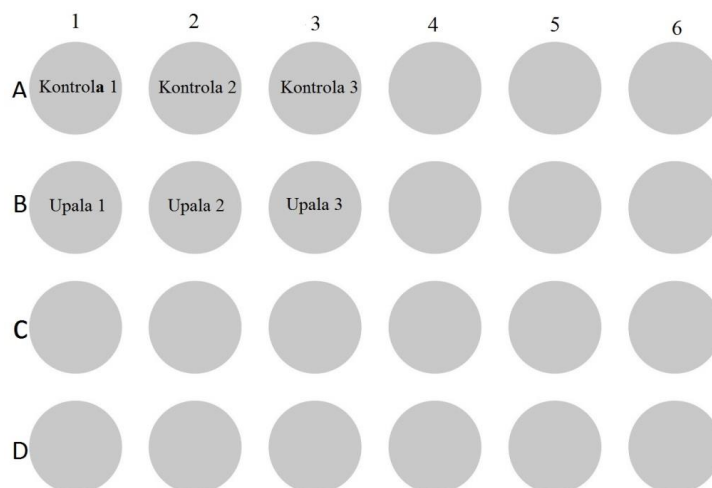
### **3.4. Analiza imunofluorescencije Leu/Met enkefalina**

Za vizualizaciju imunofluorescencije Leu/Met enkefalina, od svih je fotografiranih prereza izabrana jedna reprezentativna slika koja opisuje pojedinu eksperimentalnu skupinu.



Slike su spojene u programu Microsoft Paint, a potom su svjetlina i kontrast slike ugođeni u programu Adobe Photoshop.

Kvantitativna analiza imunofluorescencije Leu/Met enkefalina izvedena je koristeći program Image J ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)). Taj program može izračunati površinu i odrediti vrijednost piksela unutar zadanog odabira. Prema literaturnim podacima, u laminama dorzalog roga leđne moždine, Leu/Met enkefalin se detektira u površinskim laminama I i II. Na prerezima u ovom pokusu najprije je provjerena takva distribucija enkefalina analizom odnosa ukupne površine prereza i površine na kojoj se uočilo pojačano obojenje. Potom su opcije programa mjerenja podešene tako da se na označenim regijama od interesa mjeri površina označene regije (koja je smještena unutar lamina I i II) kao i intenzitet fluorescencije na označenoj regiji. U ovu su analizu uključena po 3 prereza od svake životinje; za svaku je životinju zatim izračunata srednja vrijednost, te je na kraju od srednjih vrijednosti za sve 3 životinje izračunata srednja vrijednost skupine.



**Slika 7. Shema nanošenja uzoraka u jažice.**

### 3.5. Statistička analiza

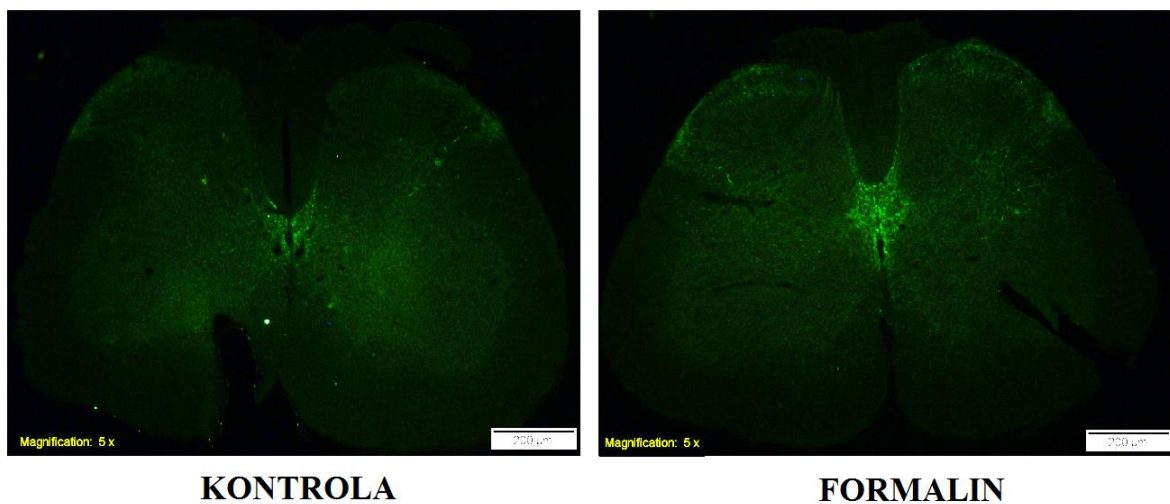
Svi rezultati dobiveni u ovom eksperimentu prikazani su kao srednja vrijednost skupine +/- standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM). Razlika varijanci analizirana je jednosmjernom analizom (One-way ANOVA). Kao statistički značajna, uzeta je vrijednost  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu metodom imunohistokemije je analizirana distribucija enkefalina u leđnoj moždini te imunoreaktivnost enkefalina u površinskim laminama dorzalnog roga u dvije eksperimentalne skupine životinja: kontrole kod koje je injektirana fiziološka otopina i upalne boli koja je izazvana injektiranjem 5%-tne otopine formaldehida. Analiza je provedena na lumbalnim segmentima L3-L5 kralježnične moždine.

### 4.1. Kvalitativna analiza imunoreaktivnosti

Distribucija enkefalina u ovom pokusu odgovarala je prethodno opisanom u literaturi, odnosno detektirana je najviše u površinskim laminama dorzalnog roga (I i II), te oko centralnog kanala (lamina X), što je prikazano na slici 8. na kojoj se također može uočiti da postoji razlika u površini s imunofluorescencijom, koja se čini većom u životinja s upalnom boli u odnosu na kontrolne životinje, kao i razini imunoreaktivnosti, koja se također čini veća u životinja s upalnom boli.



**Slika 8. Prikaz imunoreaktivnosti Leu/Met enkefalina u poprečnom prerezu L4 segmenta leđne moždine u ispitivanih eksperimentalnih skupina. Povećanje 20X**

## 4.2. Kvantitativna analiza imunoreaktivnosti

Kako bismo opažanja s kvalitativne analize vezana uz površinu s imunofluorescencijom te razinu imunoreaktivnosti u površinskim laminama mogli provjeriti te napraviti statističku analizu među grupama, proveli smo kvantitativnu analizu sa slika prereza pomoću programa Image J. S obzirom da Image J analizira vrijednost piksela, te kako bismo izbjegli moguće pogreške u analizi, lamine I i II ipsilateralnog i kontralateralnog dorzalog roga su analizirane s iste slike, odnosno s manjeg povećanja (20X). U tablici 3. prikazani su rezultati analize po 3 prereza od svake životinje u analizi iz kojih je izračunata srednja vrijednost, pa je iz srednjih vrijednosti pojedine životinje izračunata srednja vrijednost za svaku skupinu. Rezultati su dodatno prikazani i grafički na slici 9-A i 9-B.

A)

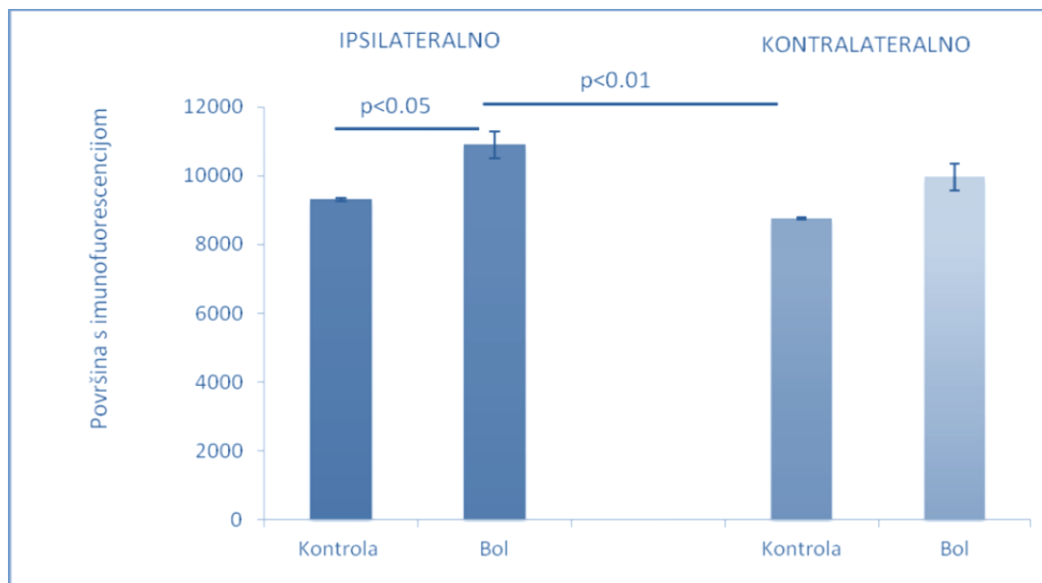
Površina s imunofluorescencijom	Ipsilateralno		Kontralateralno	
	Kontrola	Bol	Kontrola	Bol
Srednja vrijednost	9311,222	10905,78	8762,889	9964,444
Standardna devijacija(±)	105,725	775,7559	44,50884	805,4272
Standardna pogreška(+/-)	52,87625	387,8779	22,25442	402,7136

B)

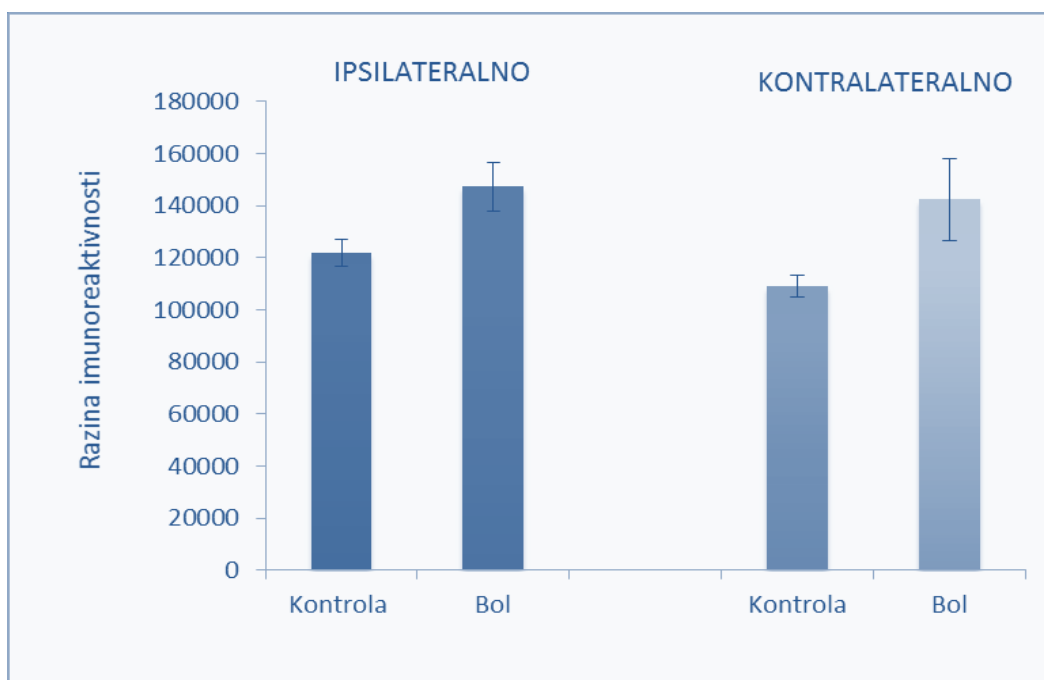
Imunoreaktivnost	Ipsilateralno		Kontralateralno	
	Kontrola	Bol	Kontrola	Bol
Srednja vrijednost	121806,1	147179,9	109086,7	142353,1
Standardna devijacija(±)	10164,01	18237,23	8253,166	31646,14
Standardna pogreška(+/-)	5082,004	9118,617	4126,583	15823,07

**Tablica 3. Porast Leu/Met enkefalina u eksperimentalnoj upalnoj boli ipsilateralno i kontralateralno, promatrano kao: A) porast površine s imunofluorescencijom B) porast razine imunoreaktivnosti. Prikazana je srednja vrijednost sa standardnom devijacijom i pogreškom.**

A)



B)



**Slika 9. Porast Leu/Met enkefalina u eksperimentalnoj upalnoj boli ipsilateralno i kontralateralno, promatrano kao: A) porast površine s imunofluorescijom B) porast razine imunoreaktivnosti. Rezultati su prikazani kao:srednja vrijednost +/- SEM.**

Kvantitativna analiza potvrdila je nalaze te je primijećen obostrani porast površine s imunofluorescencijom Leu/Met enkefalina u laminama I i II, statistički značajan na ipsilateralnoj strani ( $p < 0.05$ ), dok s kontralateralne strane nije statistički značajan. Utvrđen je i obostrani porast razine imunoreaktivnosti, međutim nije statistički značajan.

Na eksperimentalnim modelima boli u životinja uočeno je da se kod nekih bolnih podražaja, kao što je pritisak na njušku, intraperitonealna injekcija octene kiseline ili toplina primjenjena na njušku ili rep, potiče lučenja Met-enkefalina u kralježničnoj moždini (Cesselin i sur., 1985.). Analgetski učinak enkefalina uočen je u brojnim studijama: kod njegove spinalne primjene kod mačaka (Duggan i sur., 1977.), primijenjen zajedno s morfinom Leu-enkefalin potencira analgetskih učinak morfina (Lee and Leybin, 1980; Larsson i sur., 1980; Beluzzi i sur., 1976.), primijenjen prije metadona i levorfanola, pojačava njihov analgetski učinak (Vaught and Takemori, 1979.), kod upalne boli povećano je otpuštanje Met- i Leu-enkefalina iz rostroventromedularne medule (Hurley and Hammond, 2001.), modulira odgovor na bolni podražaj kod transgeničnih miševa (Stein, 1999.).

Brojni radovi pokazali su povećano lučenje enkefalina kod subkutane primjene formalina u štakora. Formalinski model upalne boli karakteriziraju dvije odvojene faze; prva u trajanju od 0. do 15. minute i druga od 15. do 60. minute. Bol u prvoj fazi uzrokovana je izravnom stimulacijom nociceptora, dok se u drugoj fazi oslobađaju medijatori boli i dolazi do senzitivacije. Studija je pokazala da kod intraplantarne primjene 1% formalina dolazi do delta-opioidnim agonistima posredovanog povećanog bihevioralnog odgovora u ranoj fazi upalne boli, ali isto tako i do smanjene ekstravazacije i u ranoj i u kasnoj fazi upalne boli. Ovime je potvrđena različita patofiziologija dviju faza upalnog odgovora kod primjene formalina (Hong i Abbott, 1995.). Uloga opioidnog sustava u nocicepciji proučavana je i u studiji u kojoj je primjenjivano po 20 mikrolitara 10%-og formalina te je dokazano da prethodnom primjenom 5 mg/kg delta-opioidnog agonista dovodi do smanjenja vremena češanja i grizenja (Towelt i suradnici, 2009.). Većina rezultata vezanih uz povećanje lučenja enkefalina odnosila se na ipsilateralnu stranu: 2 sata nakon subkutane primjene 0.2 ml 0.5%-og formalina u desnu šapu, značajno je povećana koncentracija Met-enkefalina u živčanim završecima dorzalnog roga na ipsilateralnoj strani u odnosu na stranu primjene formalina (Zhang i suradnici, 1994.); periferna upala povećava razinu proenkefalin mRNA u neuronima kralježnične moždine i to do 200% više na ipsilateralnoj strani u odnosu na kontralateralnu

(Noguchi i sur., 1989; Noguchi i sur.,1992.). Na temelju ovih rezultata pretpostavka je bila da ćemo na ipsilateralnoj strani imati statistički značajan porast koncentracije enkefalina, što je i potvrđeno u našem eksperimentu. Također, postoji tendencija povećanja razine imunoreaktivnosti, međutim, zbog prevelike devijacije, nije statistički značajna.

Ovaj nalaz povećane ekspresije enkefalina u stanjima hiperosjetljivosti na bolne podražaje na prvi pogled izgleda kontradiktorno, budući da su enkefalini važne komponente endogenog opioidnog sustava koji ima analgetsku funkciju. Moguće objašnjenje je da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima kronične hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja mi-, a vjerojatno i delta-opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje učinke. Degradacija i smanjenje broja receptora potvrđena je u brojnim studijama (Bridges i sur., 2001.).

## 5.ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu mjerena je imunoreaktivnost enkefalina imunohistokemijskom metodom u uzorcima tkiva dorzalnog roga kralježnične moždine životinja kojima je prethodno uzrokovana upalna bol primjenom 5%-tne otopine formalina. Budući da se enkefalini smatraju endogenim tvarima s analgetskim učinkom koji ostvaruju učinak vezanjem za mi-opioidne receptore u dorzalnog rogu kralježnične moždine, očekivali smo da u stanjima upalne boli dolazi do njihove smanjene aktivacije. Suprotno očekivanom, ovim istraživanjem pokazali smo da nakon uzrokovanja upalne boli, dolazi do statistički značajnog porasta enkefalina u dorzalnog rogu kralježnične moždine. Premda je bolnost uzrokovana samo s jedne strane, povećanje imunoreaktivnosti mjereno je bilateralno. Ovi rezultati nas dovode do zaključka da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja ili osjetljivosti mi-, a vjerojatno i delta-opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje fiziološke učinke.

## 6. LITERATURA

1. Altman RD, Hochberg MC, Moskowitz RW, Schnitzer TJ. Recommendations for the medical management of the osteoarthritis of the hip and knee. *Arthritis&Rheumatism*, 2000, 43, 1905-1915.
2. Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 10-16.
3. Beluzzi JD, Grant N, Garsky V, Sarantakis D, Wise CD, Stein L. Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. *Nature*, 1976, 260, 625 – 626.
4. Bridges D, Thompson SWN, Rice ASC. Mechanisms of neurophatic pain. *British Journal of Anaesthesia*, 2011, 87, 12-26.
5. Cesselin F, Bourgoin S, Artaud F, Gozlan H, Hamon M. The spinal enkephalinergic and serotonergic systems in the control of transmission of nociceptive message. *British Journal of Pharmacology*, 1985, 16, 119-37.
6. Dickenson AH, Kieffer B. Opiates: basic mechanisms. U: Textbook of Pain, McMahon SB, Koltzenburg M, urednici, Philadelphia, Elsevier, 2006, str. 427-438.
7. Dickenson AH. Spinal cord pharmacology of pain. *Brithish Journal of Anaesthesia*, 1995, 75, 194.
8. Duggan AW, Hall JG, Headley PM. Enkephalins and dorsal horn neurones of the cat: effects on responses to noxious and innocuous skin stimuli. *British Journal of Pharmacology*, 1977, 61, 399–408.
9. Elde R, Arvidsson U, Riedl M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Chakrabarti S, Zhang X, Loh HH, et al. Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995, 757, 390-404.



10. Fields HL, Basbaum AI, Heinreicher MM. Central nervous system mechanisms of pain modulation. U: Textbook of Pain, McMahon SB, Koltzenburg M, urednici, Philadelphia, Elsevier, 2006, str. 128-129.
11. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 598-603.
12. Hong Y, Abbott FV. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. *European Journal of Pharmacology*, 1995, 277, 21-28.
13. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. *Nature*, 1975, 258, 577-579.
14. Hurley RW, Hammond DL. Contribution of Endogenous Enkephalins to the Enhanced Analgesic Effects of Supraspinal  $\mu$  Opioid Receptors after Inflammatory Injury. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21, 2536-2545.
15. International Association for the Study of Pain, (Internet), <http://www.iasp-pain.org/>, pristupljeno 15.5.2015.
16. Jukić M, Puljak L, Katić M. Smjernice o uporabi opioida za liječenje kronične nekarcinomske boli. Hrvatsko društvo za liječenje boli. Zagreb, 2014., <http://www.hdlb.org/wp-content/uploads/2014/09/Smjernice-o-uporabi-opioida-za-liječenje-kronicne-nekarcinomske-boli.-pdf.pdf>, pristupljeno 23.10.2015.
17. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 26.
18. Kogler Majerić V i suradnici. Smjernice za liječenje akutne boli. Hrvatsko društvo za liječenje boli, 2013., <http://www.hdlb.org/wp-content/uploads/2013/01/Bol-glasilo-br-6-2013.pdf>, pristupljeno 23.10.2015.
19. Kogler Majerić V i suradnici. Smjernice za liječenje kronične karcinomske boli u odraslih, 2011., [http://www.hdlb.org/wp-content/uploads/2012/01/Bol\\_glasilo\\_br\\_2\\_2011\\_web.pdf](http://www.hdlb.org/wp-content/uploads/2012/01/Bol_glasilo_br_2_2011_web.pdf), pristupljeno 23.10.2015.
20. Larsson AA, Vaught JL, Takemori AE. The potentiation of spinal analgesia by leucine enkephalin. *European Journal of Pharmacology*, 1980, 61, 381-383.
21. Lee NM, Leybin L. Opiate and peptide interaction: Effect of enkephalins on morphine analgesia. *European Journal of Pharmacology*. 1980, 68, 181-185.

22. Miller M, Sturmer T, Azrael D, Levin R, Solomon DH. Opioid Analgesics and the Risk of Fractures in Older Adults with Arthritis. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2011, 59, 430-428.
23. Noble F, Roques BP. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2007, 11, 145-159.
24. Noguchi K, Dubner R, Ruda MA. Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal neurons is induced by peripheral inflammation and co-localised with Fos and Fos-related proteins. *Neuroscience*, 1992, 46, 561-570.
25. Noguchi K, Yashiro M, Hiroshi K, Makoto S, Keiro O, Masaya T. Preproenkephalin gene expression in the rat spinal cord after noxious stimuli. *Molecular Brain Research*, 1989, 5, 227-234.
26. Sandkuhler J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiological Reviews*, 2009, 89, 730-735.
27. Stein C. Opioids in pain control. *Cambridge University Press*, 1999, 1, 22.
28. Stein C. The Control of Pain in Peripheral Tissue by opioids. *New England Journal of Medicine*, 1995, 332, 1685-1690.
29. Todd AJ, Koerber HR. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. U: Textbook of Pain, McMahon SB, Koltzenburg M, urednici, Philadelphia, Elsevier, 2006, str. 82.
30. Towett PK, Kanui TI, Maloij GMO, Juma F, Miaron JOO. Activation of mu, delta or kappa opioid receptors by DAMGO, DPDPE, U-50488 or U-69593 respectively causes antinociception in the formalin test in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 2009, 91, 566-572.
31. Turkalj L. Bol. *Gyrus Journal*, 2014, 2, 79.
32. Uloga ljekarnika u liječenju boli-terapija boli, <http://www.plivamed.net/aktualno/clanak/6240/Uloga-ljekarnika-u-lijecenju-boli-terapija-boli.html>, pristupljeno 24.10.2015.
33. Vaught JL, Takemori AE. Differential effects of leucine and methionine enkephalin on morphine-induced analgesia, acute tolerance and dependence. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1979, 208, 86-90.
34. Whittle SL, Richards BL, Husni E, Buchbinder R. Opioid therapy for treating rheumatoid arthritis pain, 2011.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003113.pub3/epdf/abstract>,  
pristupljeno 24.10.2015.

35. Zhang RX, Mi ZP, Jian-Tian Q. Changes of spinal substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. *Regulatory Peptides*, 1994, 51, 25-32.

## 7. SAŽETAK

Upalna bol nastaje kao posljedica upale ili ozljede tkiva prilikom čega dolazi do lučenja različitih upalnih medijatora koji djeluju izravno aktivirajući nociceptore ili interferiraju sa signalnim procesima unutar njih. Tijekom učestalog izbijanja primarnih neurona pri upali dolazi do brojnih promjena u SŽS-u, praćenih pojavama poput senzitivacije, hiperalgezije i alodinije.

Brojna istraživanja su pokazala značajnu ulogu endogenog opioidnog sustava u procesima transmisije i modulacije bolne informacije. Od tri glavne skupine opioidnih peptida, najviše dokaza o uključenosti u nociceptivne procese na spinalnoj razini dostupno je za enkefaline.

Opioidni analgetici već dugo nalaze mjesto u kliničkoj primjeni, a novija istraživanja proučavaju njihov potencijal upotrebe u kroničnim bolestima, među kojima su i brojne upalne bolesti kao što su reumatoidni artritis ili osteoartritis.

U ovom diplomskom radu mjerena je imunoreaktivnost enkefalina imunohistokemijskom metodom u uzorcima tkiva dorzalnog roga kraljeznične moždine životinja kojima je prethodno uzrokovana upalna bol primjenom 5%-tne otopine formalina. Budući da se enkefalini smatraju endogenim tvarima s analgetskim učinkom koji učinak ostvaruju vezanjem za mi-opioidne receptore u dorzalnom rogu kraljeznične moždine, očekivali smo da u stanjima upalne boli dolazi do njihove smanjene aktivacije. Suprotno očekivanom, ovim istraživanjem pokazali smo da nakon uzrokovanja upalne boli, dolazi do statistički značajnog porasta enkefalina u dorzalnom rogu kraljeznične moždine. Premda je bolnost uzrokovana samo s jedne strane, povećanje imunoreaktivnosti mjereno je bilateralno. Ovi rezultati nas dovode do zaključka da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja ili osjetljivosti mi-, a vjerojatno i delta-opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje fiziološke učinke.

Kako bi se skupili dodatni dokazi o navedenoj hipotezi, potrebna su daljna istraživanja koja će doprinijeti boljem razumjevanju uloge endogenog opioidnog sustava kod upalne boli te u konačnici rezultirati uporabom u kliničkoj praksi.

## SUMMARY

Inflammatory pain occurs as a result of inflammation or tissue injury which causes the secretion of various inflammatory mediators that act directly by activating nociceptors or interfere with the signaling processes inside them. Frequent outbreak of primary neurons leads to numerous changes in CNS accompanied by phenomena such as sensitization, hyperalgesia and allodynia.

Numerous studies have shown the important role of endogenous opioid system in the process of transmission and modulation of painful information. Out of three main groups of opioid peptides, most evidence of involvement in nociceptive processes in the spinal level is available for enkephalins.

Opioid analgesics have long found a place in clinical practice. Recent research studies potential of their use in chronic diseases, among which are inflammatory diseases like rheumatoid arthritis or osteoarthritis.

This thesis is based on measurement of enkephalin immunoreactivity in tissue samples of dorsal horn of the spinal cord of animals which had previously caused pain by using 5% formalin solution. Immunohistochemical methods were used. Since the endogenous enkephalins are considered as substances with analgesic effects that effect by binding to mu-opioid receptors in the dorsal horn of spinal cord, we expected their decreased activation in conditions of inflammatory pain. Contrary to expectations, this research has shown that, after causing inflammatory pain, there is a statistically significant increase in enkephalin concentration in the dorsaln horn of spinal cord. Although the pain was caused only on the one side of body, an increase in immunoreactivity was billateraly. These results lead us to the conclusion that, despite of the increased concentration of enkephalis, the states of hypersensitivity leads to reduced number or sensitivity of mu, and probably also delta-opioid receptors through which enkephalins effect their physiological effects.

Further research is needed to gather more evidence on the above hypothesis in order to contribute to a better understanding of the role of the endogenous opioid system in inflammatory pain and ultimately result in its use in clinical practice.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmakologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ULOGA ENKEFALINA U EKSPERIMENTALNOJ UPALNOJ BOLI

Mirna Momčilović

#### SAŽETAK

Upalna bol nastaje kao posljedica upale ili ozljede tkiva prilikom čega dolazi do lučenja različitih upalnih medijatora koji djeluju izravno aktivirajući nociceptore ili interferiraju sa signalnim procesima unutar njih. Tijekom učestalog izbivanja primarnih neurona pri upali dolazi do brojnih promjena u SŽS-u, praćenih pojavama poput senzitivacije, hiperalgezije i alodinije.

Brojna istraživanja su pokazala značajnu ulogu endogenog opioidnog sustava u procesima transmisije i modulacije bolne informacije. Od tri glavne skupine opioidnih peptida, najviše dokaza o uključenosti u nociceptivne procese na spinalnoj razini dostupno je za enkefaline.

Opioidni analgetici već dugo nalaze mjesto u kliničkoj primjeni, a novija istraživanja proučavaju njihov potencijal upotrebe u kroničnim bolestima, među kojima su i brojne upalne bolesti kao što su reumatoidni artritis ili osteoartritis.

U ovom diplomskom radu mjerena je imunoreaktivnost enkefalina imunohistokemijskom metodom u uzorcima tkiva dorzalnog roga kraljeznične moždine životinja kojima je prethodno uzrokovana upalna bol primjenom 5%-tne otopine formalina. Budući da se enkefalini smatraju endogenim tvarima s analgetskim učinkom koji učinak ostvaruju vezanjem za mi-opioidne receptore u dorzalnom rogu kraljeznične moždine, očekivali smo da u stanjima upalne boli dolazi do njihove smanjene aktivacije. Suprotno očekivanom, ovim istraživanjem pokazali smo da nakon uzrokovanja upalne boli, dolazi do statistički značajnog porasta enkefalina u dorzalnom rogu kraljeznične moždine. Premda je bolnost uzrokovana samo s jedne strane, povećanje imunoreaktivnosti mjereno je bilateralno. Ovi rezultati nas dovode do zaključka da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja ili osjetljivosti mi-, a vjerojatno i delta-opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje fiziološke učinke.

Kako bi se skupili dodatni dokazi o navedenoj hipotezi, potrebna su daljna istraživanja koja će doprinijeti boljem razumjevanju uloge endogenog opioidnog sustava kod upalne boli te u konačnici rezultirati uporabom u kliničkoj praksi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 33 stranice, 2 grafička prikaza, 5 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bol, upalna bol, nociceptori, opioidi, imunohistokemija, enkefalini

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: prosinac 2015.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmacology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ROLE OF ENKEPHALINS IN EXPERIMENTAL INFLAMMATORY PAIN

Mirna Momčilović

#### SUMMARY

Inflammatory pain occurs as a result of inflammation or tissue injury which causes the secretion of various inflammatory mediators that act directly by activating nociceptors or interfere with the signaling processes inside them. Frequent outbreak of primary neurons leads to numerous changes in CNS accompanied by phenomena such as sensitization, hyperalgesia and allodynia.

Numerous studies have shown the important role of endogenous opioid system in the process of transmission and modulation of painful information. Out of three main groups of opioid peptides, most evidence of involvement in nociceptive processes in the spinal level is available for enkephalins.

Opioid analgesics have long found a place in clinical practice. Recent research studies potential of their use in chronic diseases, among which are inflammatory diseases like rheumatoid arthritis or osteoarthritis.

This thesis is based on measurement of enkephalin immunoreactivity in tissue samples of dorsal horn of the spinal cord of animals which had previously caused pain by using 5% formalin solution. Immunohistochemical methods were used. Since the endogenous enkephalins are considered as substances with analgesic effects that effect by binding to mu-opioid receptors in the dorsal horn of spinal cord, we expected their decreased activation in conditions of inflammatory pain. Contrary to expectations, this research has shown that, after causing inflammatory pain, there is a statistically significant increase in enkephalin concentration in the dorsaln horn of spinal cord. Although the pain was caused only on the one side of body, an increase in immunoreactivity was billateraly. These results lead us to the conclusion that, despite of the increased concentration of enkephalis, the states of hypersensitivity leads to reduced number or sensitivity of mu, and probably also delta-opioid receptors through which enkephalins effect their physiological effects.

Further research is needed to gather more evidence on the above hypothesis in order to contribute to a better understanding of the role of the endogenous opiod system in inflammatory pain and ultimately result in its use in clinical practice.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 33 pages, 2 figures, 5 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pain, inflammatory pain, nociceptors, opioids, immunocytochemistry, enkephalins

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2015.