Uloga opiorfina u usnoj šupljini

Pavić, Dalibor

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:055659

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Dalibor Pavić

ULOGA OPIORFINA U USNOJ ŠUPLJINI

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

Rad je ostvaren na Zavodu za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivan Salarić dr. med. dent., Zavod za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Mia Karanović, mag. educ. philol. croat. et phil.

Lektor engleskog jezika: Ivan Benković, mag. educ. philol. angl. et mag. educ. philol. germ.

Rad sadrži: 31 stranica

2 tablice

3 slike

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora diplomskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

Zahvala

Velika hvala mom mentoru doc. dr. sc. Ivanu Salariću za svu pomoć, sve poslane materijale, strpljenje, savjete te mu zahvaljujem što je uvijek brzo odgovarao na e-mailove.

Hvala mojoj dragoj djevojci i dragim prijateljima na svoj podršci i svim lijepim trenutcima koje smo proveli za vrijeme studija.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene i bez kojih ne bih ni mogao ostvariti željene ciljeve.

ULOGA OPIORFINA U USNOJ ŠUPLJINI

Sažetak

Slina je tjelesna tekućina koju izlučuju žlijezde slinovnice. Zbog svoje lake dostupnosti i neinvazivnosti pri uzimanju uzoraka, u proteklih nekoliko godina sve se češće proučava u znanstvenim istraživanjima. U slini se nalazi i opiorfin, pentapeptid za kojeg je ustanovljeno da ima analgetski učinak. Navedeni učinak se temelji na dvostrukom inhibitornom djelovanju na neutralnu endopeptidazu i aminopeptidazu N koji sudjeluju u katabolizmu enkefalina. Za razliku od opioidnih analgetika, ne izaziva ovisnost ni toleranciju. Nadalje, pokazalo se da ima antidepresivni učinak te djeluje na peristaltiku crijeva, krvni tlak i regulaciju tonusa glatkih mišića tijela penisa. Za određivanje se njegove koncentracije koriste dvije standardizirane metode, ELISA i LC-MS/MS. Osim fiziološkog učinka, uočeno je da se koncentracija opiorfina mijenja u određenim bolestima i stanjima usne šupljine. Zasad su ispitivane njegove koncentracije u temporomandibularnim poremećajima, sindromu pekućih usta, simptomatskom ireverzibilnom pulpitisu, simptomatskom apikalnom parodontitisu te ulkusima različite etiologije. U većini istraživanja ispostavilo se da ima tendenciju porasta koncentracije u ispitivanim bolestima i stanjima, osobito kod jače izraženog simptoma boli. Dosadašnje spoznaje govore da opiorfin ima veliki potencijal kao dijagnostičko i terapeutsko sredstvo. No, mali broj istraživanja proveden je od njegova otkrića. Stoga, potrebno je daljnjim istraživanjima potvrditi navedene spoznaje na većem uzorku te spoznati dodatne funkcije i terapijske mogućnosti opiorfina.

Ključne riječi: slina, dijagnostičko sredstvo, opiorfin, analgetik, bolna stanja

THE ROLE OF OPIORPHIN IN THE ORAL CAVITY

Summary

Saliva is a bodily fluid secreted by the salivary glands. Due to its easy accessibility and non-invasive sampling, it has increasingly been studied in the scientific investigations. Saliva contains opiorphin, a pentapeptide that has been found to have analgesic effects. This effect is based on its dual inhibitory action on neutral endopeptidase and aminopeptidase N, which are involved in the catabolism of enkephalins. Unlike opioid analgesics, it does not cause addiction or tolerance. Furthermore, it has been shown to have antidepressant effects and to affect intestinal peristalsis, blood pressure, and the regulation of penile smooth muscle tone. In determining its concentration, two standardized methods, ELISA and LC-MS/MS, are most commonly used. In addition to its physiological effects, changes in opiorphin concentration have been observed in certain chronic diseases and conditions of the oral cavity. Its concentrations have been investigated in temporomandibular disorders, burning mouth syndrome, symptomatic irreversible pulpitis, symptomatic apical periodontitis, and oral ulcers of various aetiology. Most studies have described increased opiorphin concentrations in the examined diseases and conditions, particularly in cases with more pronounced pain symptoms. Current findings suggests that opiorphin has great potential as a diagnostic and therapeutic tool. However, only a limited number of studies have been conducted since its discovery, therefore, further research is needed to confirm these findings on a larger sample size and to explore additional functions and therapeutic possibilities of opiorphin.

Keywords: saliva, diagnostic tool, opiorphin, analgesic, painful conditions

SADRŽAJ

1. UVOD…….1
2. SLINA KAO DIJAGNOSTIČKO SREDSTVO…….4
3. OPIORFIN…….11
   3.1. Uloga i mehanizam djelovanja opiorfina……....12
   3.2. Izolacija i kvantifikacija opiorfina……..14
4. OPIORFIN U BOLESTIMA I STANJIMA USNE ŠUPLJINE……...16
   4.1. Opiorfin i sindrom pekućih usta…….17
   4.2. Opiorfin i temporomandibularni poremećaji……..17
   4.3. Opiorfin i upalno-bolna stanja u usnoj šupljini……..17
5. RASPRAVA……..……19
6. ZAKLJUČAK……....22
7. LITERATURA……..24
8. ŽIVOTOPIS…….....30

Popis skraćenica

CE-HPLC – tekućinska kromatografija visokih perfomansi s izmjenom kationa (engl. *Cation-Exchange High-Performance Liquid Chromatography*)

ELISA – enzimski imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

PROL1 – lakrimalni, prolinom bogat 1 (engl. *Proline Rich, Lacrimal 1)*

RP-HPLC – tekućinska kromatografija visokih perfomansi s reverznom fazom (engl. *Reverse Phase – High-Performance Liquid Chromatography*)

SAP – simptomatski apikalni parodontitis

SIP – simptomatski ireverzibilni pulpitis

SPU - sindrom pekućih usta

TMP - temporomandibularni poremećaji

1. UVOD

Uspješnost terapije izrazito ovisi o vremenu potrebnom da se dijagnosticira bolest. Činjenica je da se bolesti često dijagnosticiraju u kasnijem stadiju kada se već pojave uznapredovali simptomi. Takva kasna dijagnoza vodi u lošiju kontrolu i prognozu same bolesti. Stoga, danas je imperativ medicine što ranija dijagnostika (1, 2).

U najvećoj se mjeri, kao uzorci za dijagnostiku, koriste krv i urin. No, zbog nepraktičnosti te invazivnosti pri uzimanju krvnog uzorka, postojala je želja da se pronađe alternativa. Jedna se tjelesna tekućina pokazala iznimno korisnom i pouzdanom, a to je slina (2). Slina je tekućina koju izlučuju parotidna, submandibularna, sublingvalna žlijezda te male žlijezde slinovnice. U zdravih se pojedinaca dnevno proizvede između 0,5 L i 1,5 L sline. Ona se sastoji pretežito od vode (>99%) te organskih i anorganskih tvari. Izlučivanje sline može biti preko izvodnih kanala za veće žlijezde te direktno u usnu šupljinu za manje žlijezde slinovnice. Nakon što pristigne u usnu šupljinu, bilo izvodnim kanalima ili direktno, dolazi do miješanja sa sulkusnom tekućinom, mikroorganizmima, epitelnim stanicama, nazalnom i bronhalnom sekrecijom što na kraju sačinjava sveukupnu slinu(3-5). Njezine funkcije su probavljanje, olakšavanje žvakanja i formiranje zalogaja, puferiranje te zaštitna, okusna, ekskrecijska uloga koja pomaže pri formiranju govora (6). Zbog lake dostupnosti za uzimanje uzorka, zadnjih godina sve se više ispituju njezine mogućnosti u dijagnostici raznih oralnih i sistemskih bolesti. Mnogi autori, kako bi dokazali povezanost između bolesti i količine tvari iz sline, počeli su iz nje određivati i kvantificirati molekule, ali ju i proučavati uz „OMICS“ tehnologije. (7).

U sastavu sline nalazi se i molekula opiorfin. Za opiorfin smatra se da ima potentan analgetski učinak koji se temelji na djelovanju na endogeni nociceptivno-modulirajući sustav i pritom inhibiranju razgradnje opioida (8-10). Karakteristika mu je da ne izaziva ovisnost i toleranciju te je potrebna manja koncentracija za isti terapijski učinak uspoređujući ga s opioidnim analgeticima (11). Također se u istraživanjima uočilo njegovo djelovanje na peristaltiku crijeva i središnji živčani sustav (12, 13). Mnogi ga zbog tih svojstava nazivaju fiziološkim analgetikom. Stoga bi daljnja istraživanja mogla biti usmjerena u proučavanje opiorfina kao terapijskog sredstva. Osim fiziološkog učinka, istraživana je njegova povezanost i potencijalna uloga u raznim oralnim i sistemskim bolnim stanjima. Neka od stanja koja su se istraživala erektilna su disfunkcija, sindrom pekućih usta, temporomandibularni poremećaji te druga upalna i bolna stanja usne šupljine. U svim ovim istraživanjima opisan je kao potencijalni biomarker za bolesti (14-17).

Stoga, svrha je ovoga rada navesti prednosti i mane sline kao dijagnostičkog sredstva, detaljno opisati dosadašnje spoznaje o opiorfinu, načine njegove izolacije te ukazati na brojne mogućnosti opiorfina u dijagnostici oralnih i sistemskih bolesti, ali i naglasiti potencijalno svojstvo opiorfina kao efikasnog analgetika

2. SLINA KAO DIJAGNOSTIČKO SREDSTVO

Proteklih nekoliko godina dogodio se napredak u razvoju genomske i proteomske medicine. Taj se razvoj iskoristio i za istraživanje sline pomoću novih, osjetljivijih metoda analize (2). Novim metodama htjele su se otkriti molekule koje bi potencijalno mogle služiti u dijagnostici raznih bolesti i stanja. Poticaj znanstvenika na istraživanje sline bila je laka dostupnost sline pri uzimanju uzoraka. Usporedivši je s uzorkovanjem krvi, postupak uzorkovanja neinvazivan je, nije potrebna stručna osoba te je smanjen rizik za prijenos infektivnih bolesti kao što su hepatitis i HIV (5, 7, 18).

U Tablici 1 mogu se vidjeti prednosti i ograničenja uzimanja sline u dijagnostičke svrhe (19).

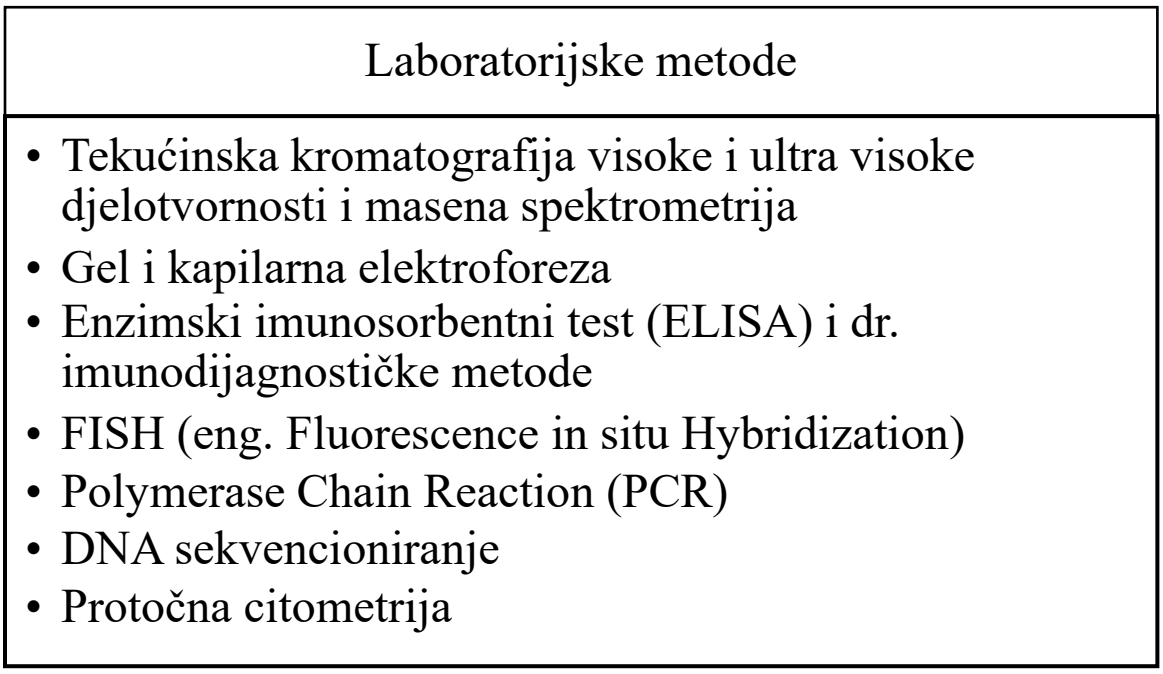
Tablica 1. Prednosti i ograničenja sline kao dijagnostičkog sredstva.

PREDNOSTI	OGRANIČENJA
Posjeduje dijagnostičke vrijednosti u stvarnom vremenu	Koncentracije nekih biomarkera nisu pouzdani pokazatelj koncentracije u serumu
Sigurnije za zdravstvene djelatnike u odnosu na prikupljanje krvnih uzoraka	Sastav sline ovisan je o metodi prikupljanja i stupnju stimulacije lučenja
Lakoća uzimanja više uzoraka	Razina lučenja te promjene pH vrijednosti sline utječu na koncentraciju i dostupnost biomarkera
Prikupljanje može biti napravljeno kod kuće	Razina lučenja sline razlikuje se od čovjeka do čovjeka
Neinvazivna, praktična i jeftina	Mnogi serumski biomarkeri mogu dospjeti u slinu iz nepredvidljivih izvora kao što je gingivna sulkusna tekućina, iz ozljede usne šupljine te tako utjecati na dijagnostičku vrijednost
Minimalni rizik od križne kontaminacije	Mnoge sistemske bolesti i zračenje u području glave i vrata utječe na lučenje žlijezda slinovnica pa tako i na sastav sline
Ekonomičnije uzorkovanje, transport i skladištenje	Slina se sastoji od mnogih proteolitičkih enzima koji mogu utjecati na stabilnost dijagnostičkih biomarkera
Manje manipulacija pri dijagnostici usporedivši ju s krvnim uzorcima	
Moguća komercijalna upotreba	
Ne zgrušava se kao krv	

Slina je prozirna tekućina sa pH vrijednosti između 6 i 7 (3). Najveći udio čini voda sa udjelom oko 99%. Uz vodu, sadrži anorganske i organske tvari. Anorganske tvari čine različiti ioni kao što su natrijevi, kloridni, kalcijevi, kalijevi, fosfatni, fluoridni, bikarbonatni, magnezijevi ioni. Također brojne su organske tvari u sastavu sline. Neke od njih su: glukoza, različiti lipidi, urea, aminokiseline, glikolipidi, hormoni i proteini. Proteini, kao što su amilaze, mucini, aglutinini, glikoproteini, lizozimi, peroksidaze, laktoferini te sekretorni IgA, imaju veliku ulogu u zaštiti

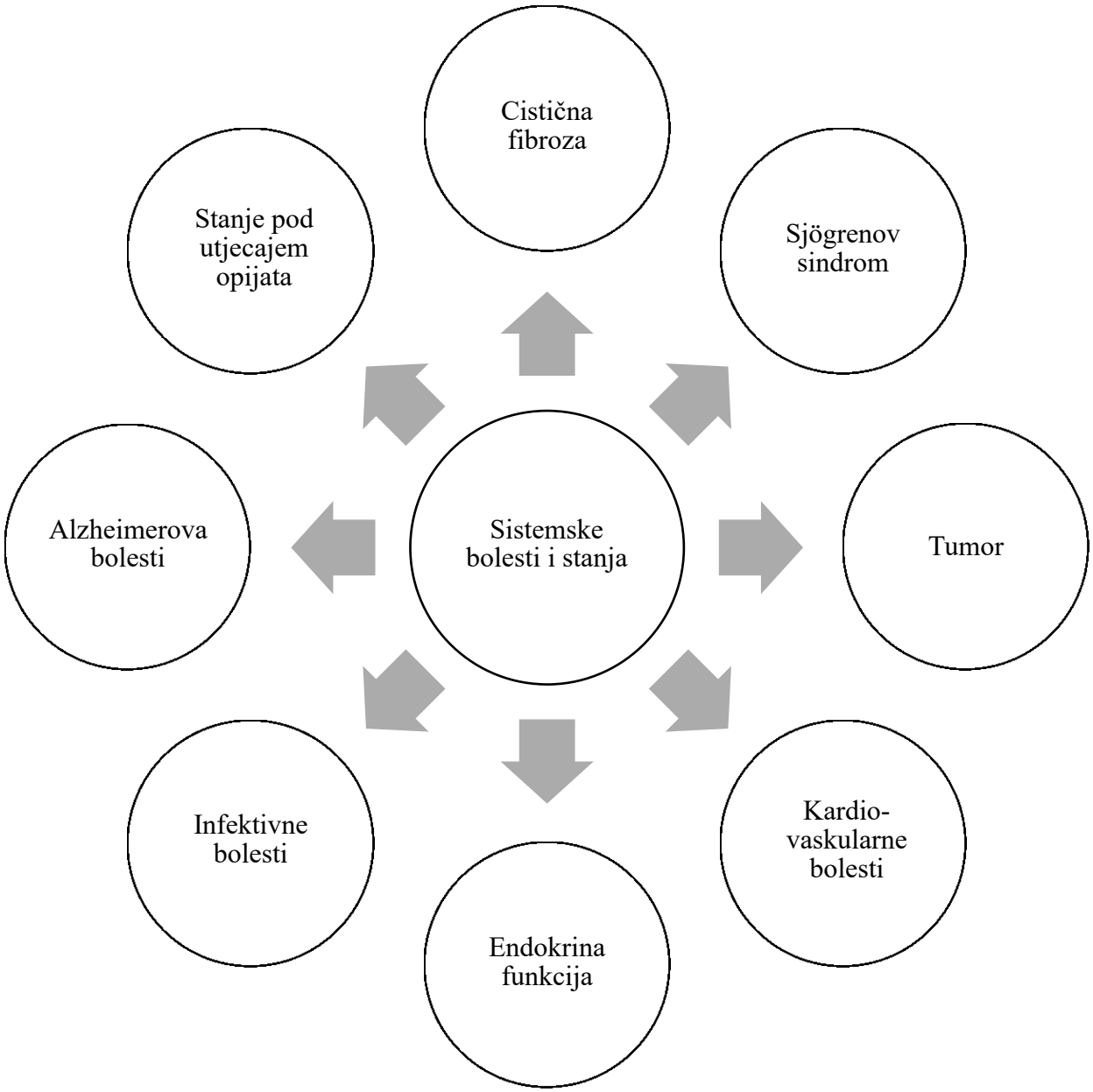
zubi i oralne sluznice (3). Većinu sline izlučuju parotidna, submandibularna i sublingvalna žlijezda. Osim njih, slinu izlučuju i male žlijezde slinovnice pri čemu one izluče oko 10% sveukupne sline (3, 4). Lučenje sline započinje sekrecijom acinusnih stanica kada nastaje primarna slina. Nakon toga primarna slina prolazi kroz izvodne kanale čije stanice modificiraju sastav sline. Sam nastanak sline upućuje na to da sastav sline i krvi nije upotpunosti isti (4, 5). Glavnu kontrolu nad procesom izlučivanja sline ima autonomni sustav, točnije simpatikus i parasimpatikus. Parasimpatikus potiče lučenje manje viskozne sline, dok simpatikus potiče lučenje viskoznije sline (3,4). Dvije vrste sline najčešće se koriste u dijagnostici, a to su nestimulirana i stimulirana. Stimulacija lučenja postiže se na razne načine, a najčešće okusnim i žvačnim podražajima. Četiri najkorištenije metode prikupljanja sline su: metoda odvodnje, metoda pljuvanja, sukcijska metoda i apsorpcijska metoda (korištenje vaterolice). Najpouzdaniji rezultati pokazali su se kod metode odvodnje i pljuvanja, stoga se u većini slučajeva i koriste (20, 21). Nakon prikupljanja uzoraka potrebno je kvantitativno i kvalitativno obraditi uzorke. Godine 2008. pojavljuje se pojam *„salivaomics"* koji označava znanstvenu disciplinu koja proučava razne skupine molekula u sastavu sline (22). Četiri pojma predstavljaju dijagnostičku abecedu, a to su: salivarni proteom (svi proteini sline), microRNA, metabolom (skupina malih molekularnih metabolita koji sudjeluju u različitim metaboličkim procesima) i mikrobiom (mikroorganizmi) (22).

Najčešće korištene laboratorijske metode za analizu uzoraka sline navedene su na slici 1 (2, 23, 24).



Slika 1. Primjeri laboratorijskih metoda analize sastava sline.

Nadalje, na slici 2 prikazane su sistemske bolesti i stanja koja se potencijalno mogu pratiti ili otkriti analizom sastava sline (24).



Slika 2. Slina kao dijagnostičko sredstvo u različitim bolestima i stanjima.

Istraživanje Boat i suradnika pokazalo je povišenu koncentraciju kalcija kod pacijenata s cističnom fibrozom (25). Drugi autori su kod istih pacijenata pronašli neobične oblike epidermalnog faktora rasta i povećane razine prostraglandina E2 u slini (26). Jedan od kriterija za dokazivanje Sjögrenova sindroma količina je izlučivanja sline. U istraživanjima s pacijentima sa Sjögrenovim sindromom uočene su povišene koncentracije natrijevih i kloridnih

iona, IgA i IgG protutijela, laktoferina, albumina te upalnih medijatora u slini (27, 28). Kod pacijenata s planocelularnim karcinomom usne šupljine mogu se u slini otkriti p53 protutijela, povišene razine salivarnih defenzina te peptida s antimikrobnim i citotoksičnim učinkom (29-31). Osim oralnog karcinoma, povišene razine CA 125 u slini se mogu pronaći u pacijentica s karcinomom jajnika (32). Salivarne amilaze su opisane kao potencijalni biomarker za praćenje pacijenata s kardiovaskularnim bolestima (33).

3. OPIORFIN

3.1 Uloga i mehanizam djelovanja opiorfina

U kontroli fizioloških funkcija u sisavaca važnu ulogu imaju cink metalne endopeptidaze i ektopeptidaze. One sudjeluju u receptorima ovisnoj modulaciji odgovora na stresne i prijeteće okolišne podražaje. Neki od predstavnika su supstanca P i enkefalini. Djelovanje im se temelji na utjecaju na prijenos nociceptivnih podražaja, na emocionalne reakcije, anksioznost, agresiju te mnoge druge neurološke i imunološke funkcije. Kako imaju važnu ulogu u organizmu, istraživači su počeli otkrivati što bi potencijalno moglo kontrolirati njihovu aktivnost (34-37). Skupina istraživača je 2006 godine izolirala dotada nepoznati endogeni peptid iz ljudske sline koji je nazvan opiorfin (8). Opiorfin jednostavna je molekula koja nastaje fragmentacijom produkta lakrimalnog, prolinom bogatog (PROL1) gena te se sastoji od pet aminokiselina, glutamin-arginin-fenilalanin-serin-arginin. Pokazalo se da ima dvostruki inhibitorni učinak na neutralnu endopeptidazu i aminopeptidazu N koji sudjeluju u katabolizmu enkefalina. Takvo djelovanje dovodi do suzbijanja kemijski i mehanički uzrokovane boli (8). No i prije njegova otkrića, izolirani su njegovi analozi iz goveda, heptapeptid spinorfin, te iz štakora pentapeptid sialorfin (38, 39).

Nadalje su slijedila istraživanja njegova fiziološkog učinka. Prvenstveno je ispitivan analgetski učinak i to na muškim *Wistar* štakorima s dva testa (8). Jedan od njih je bio formalinski test. On se koristi za ispitivanje utjecaja na kemijski izazvanu bol te se izvodi na način da se bilježi trajanje lizanja šapa štakora i tremora. Drugi korišteni bio je *pin-pain test* za mehanički uzrokovanu bol. Kod navedenog testa štakor se postavi u kavez s iglicama nakon čega slijedi bilježenje provedenog vremena u području s, odnosno bez iglica, prije i nakon primjene analgetika. Nakon provedenih testova, ustanovljeno je da je opiorfin učinkovit i pri 6 puta manjoj koncentraciji od morfija (8).

Osim analgetskog učinka, ustanovljeno je da za razliku od morfija kontinuiranom primjenom ne uzrokuje toleranciju i ovisnost. To se može pripisati tomu što morfij i opiorfin ne djeluju istim mehanizmom (11). S obzirom da navedeni učinci čine jedno od glavnih nuspojava opioidnih analgetika, ta i prije navedene spoznaje ukazuju na njegov izniman potencijal kao analgetik.

Uslijedila su istraživanja i na njegov učinak na motilitet crijeva (13). Primjenom opiorfina u miša došlo je do kontrakcije debelog crijeva i ta je kontrakcija bila jača što je koncentracija opiorfina bila veća. Učinak je potpuno poništen naloksonom, blokatorom opioidnih receptora (13).

Također se primijetio i učinak na modulaciju ponašanja (12). Intravenoznim ubrizgavanjem izazvao je antidepresivni učinak modulacijom koncentracije oslobođenih enkefalina preko μ i δ opioidnih receptora (12, 40). Njegovo djelovanje nije pratila amnezija niti je bio povećan ili smanjen odgovor lokomotornog sustava. Može se zaključiti da njegov potencijal nije jedino analgetski, već da postoji mogućnost i da se koristi kao lijek za stanja sniženog raspoloženja (12).

Nadalje, ispitivan je njegov utjecaj na arterijski tlak u štakora (41). Zaključak ispitivanja bio je da opiorfin može povisiti tlak u hipoksiji i stanju normalne koncentracije kisika preko sustava renin-angiotenzin. Ta spoznaja ukazuje također na još jedan potencijal, a to je mogućnost korištenja kao prva pomoć u stanjima hipoksije (41).

Nadalje, istraživana je veza analoga opiorfina kod štakora, sialorfina na erektilnu funkciju (14). Ustanovljeno je da bi se geni koji kodiraju opiorfin mogli koristiti kao biomarkeri za erektilnu disfunkciju. Do takvog se zaključka došlo na temelju činjenice da opiorfin ima ulogu u regulaciji tonusa glatkih mišića tijela penisa (14).

Na slici 3 nalazi se sažeti prikaz svih djelovanja i funkcija opiorfina prema dosadašnjim spoznajama.

Slika 3. Funkcije i djelovanje opiorfina na temelju dosadašnjih spoznaja.

Osim što je izoliran iz sline, nakon par godina od otkrića istraživana je njegova koncentracija u ostalim tjelesnim tekućinama. Pa se tako u jednom istraživanju pokazalo da je medijan fiziološke koncentracije opiorfina u krvi iznosio od 0,3 do 1,1 ng/ml te da su koncentracije bile više u muškog spola. Također je u urinu bila viša koncentracija u muškog spola. Velika razlika primijećena je u sjemenoj tekućini i majčinom mlijeku gdje je koncentracija bila 10 puta viša nego u krvnoj plazmi. Ipak, najveće fiziološke koncentracije opiorfina bile su u slini i suzama. Takva spoznaja potvrđuje činjenicu da je najveća ekspresija gena za opiorfin (gen PROL1) u salivarnim i suznim žlijezdama (42).

3.2. Izolacija i kvantifikacija opiorfina

Opiorfin je prvi puta izoliran iz ljudske sline 2006. godine i analiziran pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visokih perfomansi s izmjenom kationa (CE-HPLC) i s reverznom fazom (RP-HPLC) (8). Nakon što je otkriven, potrebno je bilo odrediti i prikladnu metodu za kvantifikaciju. Nakon nekoliko godina na Institutu Pasteur patentirana je metoda kvantifikacije opiorfina pomoću ELISA tehnike (43).

No, kako s ELISA metodom postoji ograničeni spektar osjetljivosti, potrebno je bilo pronaći novu metodu kako bi se rezultati usporedili. Ubrzo, nakon, sve se više popularizirala metoda tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) koja se naposljetku iskoristila i za istraživanja na opiorfinu. Metodu LC-MC/MS odlikuje veća preciznost u odnosu na metode ELISA, CE-HPLC i RP-HPLC (44). Također, pokazala se kao osjetljiva, specifična i pouzdana metoda za određivanje opiorfina u ljudskoj slini (45). S druge strane, izolacija i kvantifikacija iz seruma i urina kompliciranija je zbog hidrofilne naravi i brze degradacije u uzorcima. No, taj je problem skupina istraživača uspjela riješiti 2015. godine (46). Opisala je pouzdanu metodu u kojoj su degradaciju opiorfina spriječili upotrebom etilendiamintetraoctene kiseline, a analiza je učinjena hidrofilnom interakcijom tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (46).

U dosad provedenih pet istraživanja različitih autora, uočena je značajna razlika u koncentracijama opiorfina u slini u zdravih pojedinaca mjerena ELISA i LC-MS/MS metodama.

Usporedba koncentracija može se vidjeti u tablici 2 (15, 42, 43, 45, 47).

Tablica 2. Usporedba koncentracija opirofina pri dvije različite metode mjerenja

ELISA		LC-MS/MS	
Muški spol	Ženski spol	Muški spol	Ženski pol
59 ± 17 ng/ml	61 ± 23 ng/ml	9,4 ± 5,4 ng/ml	7,2 ± 4,6 ng/ml
69 ± 11 ng/ml	61 ± 23 ng/ml	5,01 ± 2,58 ng/ml	
67,6 ± 188,9 ng/ml			

Može se primijetiti da je koncentracija opiorfina u slini otprilike 7 do 8 puta veća kada je mjerena metodom ELISA. Takve bi se razlike mogle pripisati drugačijoj metodi prikupljanja, rukovanja i obradi uzoraka sline (16).

4. OPIORFIN U BOLESTIMA I STANJIMA USNE ŠUPLJINE

4.1. Opiorfin i sindrom pekućih usta

Sindrom pekućih usta (SPU) kronično je stanje koje karakterizira osjećaj pečenja u ustima bez prisutnih kliničkih znakova. Često je uz simptom pečenja prisutna suhoća usta i disgeuzija (48). SPU učestala je pojava u žena srednje i starije životne dobi. Ta učestalost seže do čak 14% u žena u postmenopauzi (48). Postoje dokazi da je u pozadini sindroma neurološki mehanizam, no do današnjeg dana nije poznat točan uzrok (48). S obzirom na to da je to kronično bolno stanje, vjerovalo se da postoji određena poveznica između opiorfina i SPU-a. Dosada su samo dva istraživanja parova provedena na tu temu i to 2017. godine. U jednom se istraživanju pokazalo da skupina sa SPU pacijentima ima veće koncentracije opirofina u nestimuliranoj slini nego kontrolna skupina (15). Dok se u drugom istraživanju nije uočila statistički značajna razlika u slini, ali zato je u krvi (47). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrila potencijalna uloga opiorfina u etiopatogenezi SPU-a.

4.2. Opiorfin i temporomandibularni poremećaji

Temporomandibularni su poremećaji (TMP) stanja koja uzrokuju bol i poremećaj funkcije žvačnih mišića, temporomandibularnog zgloba i pridruženih struktura. Nakon zubobolje, najčešće je bolno stanje u orofacijalnom području. Osim boli, prisutne su ograničene kretnje donje čeljusti te škljocanje ili krepitacije zgloba (49). Poveznica između opiorfina i TMP-a pronašla se u tome što je riječ o bolnom stanju. Dosada je provedeno jedno istraživanje na ovu temu. U njemu je uočeno da su pacijenti s TMP-om imali veće koncentracije opiorfina u odnosu na kontrolnu skupinu (50).

4.3. Opiorfin i upalno-bolna stanja u usnoj šupljini

Jedno od najčešćih su upalnih stanja u usnoj šupljini pulpne i periradikularne bolesti. Etiološki gledano, uzrokovane su bakterijama koje svojim djelovanjem dovode do karijesnog i parodontološkog procesa. Osim što su upalnog karaktera, nerijetko je uz njih prisutna bol različitog intenziteta. Zbog navedene boli, postavljalo se pitanje postoji li veza između njih i koncentracije opiorfina u slini. Dosada je provedeno samo jedno istraživanje na tu temu. U njemu se određivala koncentracija opiorfina kod simptomatskog ireverzibilnog pulpitisa (SIP) i simptomatskog apikalnog parodontitisa (SAP). Pokazalo se da koncentracija značajno raste u

stanjima SIP-a i SAP-a i to najviše kod pacijenta kod kojih je bio izraženiji osjet boli. Stoga se u direktnu vezu dovodi doživljaj boli i koncentracija opirofina (16).

Nadalje, u jednom istraživanju ispitivala se koncentracija opiorfina pri različitim traumatskim i upalnim stanjima kao što su promjene na oralnoj sluznici uzrokovane kandidijazom, traumatski ulkusi, rekurentne afte, lihen planus i submukozna fibroza. Autori nisu pronašli statistički značajnu razliku između ispitivane i kontrolne skupine u koncentraciji opiorfina (51).

5. RASPRAVA

Dijagnoza čini presudni korak u otkrivanju i liječenju bolesti. Da bi dijagnoza bila točna, potrebne su nam valjane i provjerene metode dokazivanja bolesti. Veliku skupinu čine biomarkeri za specifične bolesti čija se koncentracija u tjelesnim tekućinama mijenja ovisno o stadiju bolesti. Prvenstveno se biomarkeri određuju iz krvi i urina, no u zadnje se vrijeme slina istražuje kao potencijalna alternativa (18).

Slina je potencijalno dobro dijagnostičko sredstvo zbog svojih karakteristika lake dostupnosti te uzorkovanja bez potrebe stručnog medicinskog osoblja. Njezin najveći potencijal leži u tome što je ona djelomični filtrat krvi te bi je kao takva mogla zamijeniti (2-7). Pokazalo se da se već razne bolesti mogu dijagnosticirati na temelju analize sastava sline, što bi potencijalno u narednim godinama moglo povećati upotrebu sline kao dijagnostičkog sredstva u svakodnevnom radu medicinskih stručnjaka (24).

U sastavu sline je i opiorfin koji je svojim otkrićem izazvao zanimanja mnogih istraživača. Osim u slini, izoliran je iz krvi, urina, suza, majčinog mlijeka i sjemena (42). Pokazalo se da u navedenim tjelesnim tekućinama njegove koncentracije manje uspoređujući ih sa slinom, s izuzetkom u suzama gdje se koncentracija nije bitno razlikovala (42). Nadalje, njegova koncentracija nije samo ovisila o tjelesnoj tekućini nego i metodi analize. U istraživanjima koja su provedena do današnjeg dana, primijećena je razlika u koncentraciji u slini između metoda ELISA i LC-MS/MS (15, 42, 43, 45, 47). Navedena se razlika pripisuje drugačijoj metodi prikupljanja, rukovanja, obradi uzoraka sline te psihološkom stanju samih ispitanika (16). No i dalje nije potvrđeno zašto je tolika razlika u te dvije metode pa je potrebno u daljnjim istraživanjima dokazati preciznu koncentraciju opiorfina kod zdravih pojedinaca.

Glavna i prva otkrivena funkcija opiorfina analgetski je učinak koji se temelji na inhibiciji razgradnje enkefalina (8). Takva je spoznaja istraživače odmah dovela do pitanja može li on zamijeniti opioidne analgetike koji zbog svojih nuspojava nisu optimalan izbor u terapiji bolnih stanja. Dodatno mu prilog ide to što se dokazalo da ne izaziva ni toleranciju ni ovisnost te ima dodatni antidepresivni učinak (9, 11, 12). Sve mu to daje veliku prednost u odnosu na morfij. Činjenica jest da je opiorfin tek u ranim fazama istraživanja pa su svi učinci istraživani na životinjskim modelima. Da bi se mogao iskoristiti njegov terapeutski potencijal, potrebno je ispitati te potvrditi navedene spoznaje i na ljudima.

Također, proučavana je njegova uloga u bolestima i stanjima usne šupljine. Istraživanja su provedena na ispitanicima s pojedinim bolestima i stanjima, kao što su sindrom pekućih usta, temporomandibularni poremećaji te različita upalno-bolna stanja usne šupljine: ulkusi

uzrokovani traumom, rekurentne afte i oralna kandidijaza (47-51). Trenutno, malo je istraživanja provedeno na ispitanicima s bolestima i stanjima usne šupljine kako bi se donio relevantni zaključak o ulozi opiorfina u usnoj šupljini. Može se primijetiti da je tendencija porasta koncentracije opiorfina u većini istraživanja koja su uključivala bolna stanja. Takvi bi se podaci mogli iskoristiti u dijagnostici, ali i u objektiviziranju simptoma boli.

6. ZAKLJUČAK

Opiorfin ima veliki potencijal u dijagnostici raznih bolesti i stanja te kao terapeutsko sredstvo u liječenju kronične boli. Njegov potencijal u dijagnostici temelji se ponajviše na lakoj dostupnosti i velikoj koncentraciji u slini, dok mogućnost da se koristi kao terapeutsko sredstvo leži u činjenici da se primjenom postiže jaki analgetski učinak. Također rast njegove koncentracije u slini u bolnim stanjima usne šupljine mogao bi se koristiti kao objektivni pokazatelj simptoma boli. No kako je opiorfin nedavno otkriven, o njemu još ne znamo dovoljno. Stoga, daljnja su istraživanja neophodna kako bi se potvrdile navedene spoznaje te dokazale dodatne funkcije i mogućnosti.

7. LITERATURA

1. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. Semin Surg Oncol. 2000;19(1):3-10.

2. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. Am J Dent. 2009;22(4):241-8.

3. Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, Vaquero AF, Ureña R. Saliva composition and exercise. Sports Med. 1998;26(1):17-27.

4. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. J Med Life. 2009;2(3):303-7.

5. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):197-212.

6. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. J Clin Periodontol. 2002;29(3):189-94.

7. Esser D, Alvarez-Llamas G, de Vries MP, Weening D, Vonk RJ, Roelofsen H. Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid. Biomark Insights. 2008;3:25-27.

8. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdi A, Marcel A, Ungeheuer MN, et al. Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(47):17979-84.

9. 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(4):483-90.

10. Power I. An update on analgesics. Br J Anaesth. 2011;107(1):19-24.

11. Popik P, Kamysz E, Kreczko J, Wróbel M. Human opiorphin: the lack of physiological dependence, tolerance to antinociceptive effects and abuse liability in laboratory mice. Behav Brain Res. 2010;213(1):88-93.

12. Javelot H, Messaoudi M, Garnier S, Rougeot C. Human opiorphin is a naturally occurring antidepressant acting selectively on enkephalin-dependent delta-opioid pathways. J Physiol Pharmacol. 2010;61(3):355-62.

13. Tian XZ, Chen J, Xiong W, He T, Chen Q. Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. Peptides. 2009;30(7):1348-54.

14. Davies KP. The role of opiorphins (endogenous neutral endopeptidase inhibitors) in urogenital smooth muscle biology. J Sex Med. 2009;6(3):286-91.

15. Salarić I, Sabalić M, Alajbeg I. Opiorphin in burning mouth syndrome patients: a case-control study. Clin Oral Investig. 2017;21(7):2363-70.

16. Ozdogan MS, Gungormus M, Ince Yusufoglu S, Ertem SY, Sonmez C, Orhan M. Salivary opiorphin in dental pain: A potential biomarker for dental disease. Arch Oral Biol. 2019;99:15-21.

17. Paszynska E, Hernik A, Slopien A, Boucher Y, Tyszkiewicz-Nwafor M, Roszak M, et al. Expression of salivary immunoglobulins and their association with analgesic neuropeptide opiorphin in anorexia nervosa during adolescence. J Eat Disord. 2022;10(1):118.

18. Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. J Am Dent Assoc. 2006;137(3):313-21.

19. Sindhu S, Jagannathan N. Saliva: A cutting edge in diagnostic procedures. J Oral Dis. 2014;2014:8.

20. Navazesh M. Methods for collecting saliva. Ann N Y Acad Sci. 1993 Sep 20;694:72-7.

21. Mandel ID. Salivary diagnosis: more than a lick and a promise. J Am Dent Assoc. 1993 Jan;124(1):85-7.

22. Wong DT. Salivaomics. J Am Dent Assoc. 2012 Oct;143(10):19-24.

23. Poornima G, Mahesh Kumar TS. Genomic alphabets of saliva as a biomarker in oral cancer. J Indian Acad Oral Med Radiol. 2017;29:300–5.

24. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, et al. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. J Med Life. 2009;2(2):124-32.

25. Boat TF, Wiesman UN, Pallavicini JC. Purification and properties of the calcium-precipitable protein in submaxillary saliva of normal and cystic fibrosis subjects. Pediatr Res. 1974;8(5):531-9.

26. Aubert B, Cochet C, Souvignet C, Chambaz EM. Saliva from cystic fibrosis patients contains an unusual form of epidermal growth factor. Biochem Biophys Res Commun. 1990;170(3):1144-50.

27. Schiødt M, Thorn J. Criteria for the salivary component of Sjögren's syndrome. A review. Clin Exp Rheumatol. 1989;7(2):119-22.

28. Thorn JJ, Prause JU, Oxholm P. Sialochemistry in Sjögren's syndrome: a review. J Oral Pathol Med. 1989;18(8):457-68.

29. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. Cancer. 2007;109(1):54-9.

30. Bourhis J, Lubin R, Roche B, Koscielny S, Bosq J, Dubois I. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1996;88:1228–33.

31. Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S. Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. Anticancer Res. 1998;18:4645–9.

32. Chien DX, Schwartz PE. Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. Obstet Gynecol. 1990;75:701–704.

33. Forde MD, Koka S, Eckert SE, Carr AB, Wong DT. Systemic Assessments Utilizing Saliva:Part 1 General Considerations and Current Assessments . Int J Prosthodont . 2006;19:43–52.

34. Dickenson AH. Spinal cord pharmacology of pain. Br J Anaesth. 1995;75(2):193-200.

35. Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, et al. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(4):1544-9.

36. König M, Zimmer AM, Steiner H, Holmes PV, Crawley JN, Brownstein MJ, et al. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. Nature. 1996;383(6600):535-8.

37. Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, et al. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. Nat Genet. 2000;25(2):195-200.

38. Rougeot C, Messaoudi M, Hermitte V, Rigault AG, Blisnick T, Dugave C, et al Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8549-54.

39. Yamamoto Y, Ono H, Ueda A, Shimamura M, Nishimura K, Hazato T. Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation. Curr Protein Pept Sci. 2002;3(6):587-99.

40. Yang QZ, Lu SS, Tian XZ, Yang AM, Ge WW, Chen Q. The antidepressant-like effect of human opiorphin via opioid-dependent pathways in mice. Neurosci Lett. 2011;489(2):131-5.

41. Fang Y, Li S, Zhou H, Tian X, Lv S, Chen Q. Opiorphin increases blood pressure of conscious rats through renin-angiotensin system (RAS). Peptides. 2014;55:47-51.

42. Dufour E, Villard-Saussine S, Mellon V, Leandri R, Jouannet P, Ungeheuer MN, et al. Opiorphin secretion pattern in healthy volunteers: gender difference and organ specificity. Biochem Anal Biochem. 2013;2:136.

43. Rougeot C, Dufour E, Villard-Saussine S, Ungeheuer MN, Jouannet P, inventor; Institut Pasteur de Lille., assignee. Use of basic prolin-rich lacrimal gene products, such as opiorphin, as a biomarker. Canada patent CA 2645452A1. 2010 May 5.

44. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? Clin Biochem Rev. 2011;32(1):5-31.

45. 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 quantification of opiorphin in human saliva. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011;879(32):3920-6.

46. Wang CC, Hartmann-Fischbach P, Krueger TR, Wells TL, Simonson A, Compton JC. Opiorphin analysis in equine plasma and urine using hydrophilic interaction LC-MS. Bioanalysis. 2015;7(5):593-603.

47. Boucher Y, Braud A, Dufour E, Agbo-Godeau S, Baaroun V, Descroix V, et al. Opiorphin levels in fluids of burning mouth syndrome patients: a case-control study. Clin Oral Investig. 2017;21(7):2157-64.

48. McMillan R, Forssell H, Buchanan JA, Glenny AM, Weldon JC, Zakrzewska JM. Interventions for treating burning mouth syndrome. Cochrane Database Syst Rev. 2016;11(11):CD002779.

49. List T, Jensen RH. Temporomandibular disorders: Old ideas and new concepts. Cephalalgia. 2017;37(7):692-704.

50. Alajbeg I, Vrbanović E, Brkljačić L, Alajbeg I. Salivary Opiorphin is Dependent of Pain Intensity in Chronic TMD Patients. Proceedings of the CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress; 2019 Sep 19-21; Madrid, Spain. Available from: https://iadr.abstractarchives.com/abstract/ced-iadr2019-3223173/salivary-opiorphin-is-dependent-of-pain-intensity-in-chronic-tmd-patients

51. Nejad NK RP, Kar A, Sujatha S. Quantitative analysis and expression of salivary opiorphin in painful oral soft-tissue conditions: A descriptive study. J Global Oral Health. 2020;3(2):123–7.

8. ŽIVOTOPIS

Dalibor Pavić rođen je 4. srpnja 1998. godine u Zagrebu. Završio je osnovnu školu i X gimnaziju u Zagrebu, nakon čega upisuje Stomatološki fakultet u Zagrebu. Za vrijeme studija obnašao je dužnost predstavnika godine. Bio je član Studentskog zbora Stomatološkog fakulteta i Studentski pravobranitelj od akademske godine 2019./2020. do 2020./2021. Nakon čega postaje član Studenskog zbora Sveučilišta u Zagrebu i član Senata Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 2021./2022. do 2022./2023. akademske godine. Sudjelovao je u organizaciji mnogih studentskim projekata kao što su „Virtual World Congress of Dental Students", „Simpozij studenata dentalne medicine" i „Studentski zdravi dani". U 2021. godini bio je član povjerenstva za akreditaciju studija dentalne medicine u Kijevu u organizaciji AZVO agencije. Na Zavodu za parodontologiju i Katedri za fiziologiju bio je demonstrator. Objavio je jedan stručni članak u studentskom časopisu „Sonda" pod nazivom „Suvremeni debeloslojni (bulk-fill) kompoziti s ultra-kratkim vremenom polimerizacije". Također, aktivno je sudjelovao na brojnim međunarodnim kongresima s oralnim i poster prezentacijama. Dobitnik je dvije Rektorove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici.