

Lösın Enkefalin'in Kurbağa Sinir Sistemindeki Lokalizasyonu

Localization of Leucine Enkephalin on Frog Nerve System

Yusuf ÇAMLICA¹, Ali AŞKIN¹, Nejat YILMAZ²

¹Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mersin

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Bu çalışmada, opioid peptitlerden lösın enkefalin'in kurbağa sinir dokularında immünohistokimyasal lokalizasyonunun tespit edilmesi amaçlandı.

Yöntem: Kurbağaların (n=6) diseksiyonuyla beyin, omurilik ve siyatik sinir dokuları izole edildi. İndirekt immünohistokimya yöntemi ve ışık mikroskopi tekniği kullanılarak kurbağa sinir dokularında lösın enkefalin yayılışı belirlendi.

Bulgular: Kurbağa beyin ve omurilik dokularında immünopozitif hücreler gözlemlendi. Buna göre perikaryonlar, ependima ve glial hücreler immünopozitif olarak işaretlendi. Ayrıca, siyatik sinir aksoplazmalarının çoğunda immünoreaktivite saptandı fakat, fibroblast ve Schwann hücrelerinin az bir kısmında immünoreaktivite izlendi. İncelenen deneklerin dokuları arasında immünoreaktivite kuvveti bakımından herhangi bir fark gözlemlenmedi.

Sonuç: Bulgular, kurbağa sinir sisteminde opioid peptitlerden lösın enkefalin'in lokalize olduğuna işaret etmektedir. Bu peptitin merkezi sinir sisteminde yayılışı göstermesi, nörotransmitter veya nöromodülatör rolünün olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: lösın enkefalin, kurbağa, immünohistokimya, sinir doku

Abstract

Objective: In this study, it is aimed to determine the immunohistochemical localization of opioid peptide, leucine enkephalin in frog nerve tissues.

Method: After dissection of frog (n=6) brain, spinal cord and sciatic nerves were isolated. Indirect immunohistochemical and light microscopy techniques were then applied for the distribution of leucine enkephalin in frog nerve tissues.

Result: In frog nerve tissues such as brain, spinal cord immunopositive structures were observed. Accordingly, the perikaryon, ependymal and glial cells were immunoreactive. In addition, immunopositive staining was observed in all axoplasm of the sciatic nerves, but little of fibroblast and Schwann cells were immunoreactive. It was no observed immunoreactivity difference of intensity between tissues of patterns.

Conclusion: These findings show that opioid peptide, leucine enkephalin in the frog nervous system was localized. The distribution of leucine enkephalin in the central nervous system is an evidence of their neurotransmitter or neuromodulator role.

Key Words: leucine enkephalin, frog, immunohistochemistry, nerve tissue

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2009; 2(1):30-40

Geliş Tarihi : 08.01.2009

Kabul Tarihi : 10.04.2009

Yazışma Adresi:

Dr. Yusuf ÇAMLICA

Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü,

Çiftlikköy Kampüsü, 33342, Mersin

Tel : 0-324-3610001-4601

Faks : 0-324-3610047

E-posta : ycamlica@yahoo.com

*Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ME.Ü. BAP - FBE. BB (YÇ) 2004 - 3 DR kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Giriş ve Amaç

Sinir sistemine sahip hayvanlarda içsel (endojen) ağrı indirici bir sistem bulunur. Bu sistem peptit yapısında olan nöromodülatörler tarafından düzenlenir (1-5). Opioidler olarak isimlendirilen bu peptitler, sinir sistemi başta olmak üzere vücudun birçok farklı bölgesinde lokalize olmuştur. Opioid peptitler, merkezi sinir sistemi olan beyin ve omurilikte sentezlendikten sonra motor sinirler ile vücudun periferine ulaştırılır. Nöromodülatör ya da nörohormon olarak görev yapan opioid peptitler, hedef doku üzerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Opioid peptitler, sinir hücrelerinin perikaryonlarında buldukları gibi, motor nöronların aksoplazmasında ve endodermal hücrelerin plazmasında da bulunabilmektedir (3-5).

Opioid peptitler, tıp alanında uyuşturucu, sedatif ve analjezik olarak kullanılmaktadır. Metionin enkefalin (ME) ve lösin enkefalin (LE) adı verilen iki pentapeptit, 1975 yılında ilk defa kobay beyininden izole edilen opioid peptitlerdir (1-5). Bu peptitler daha sonra sıçan (6- 8) ve fare (9) sinir sisteminde identifiye edilmişlerdir. Ayrıca, enkefalin benzeri maddeler sıçan nörohipofizinde kolokelize edilmiştir (10). Bunların yanı sıra bu peptitler amfibilerde de bulunmuşlardır. Enkefalinler, *Rana catesbeiana* beyininde (11), *Rana temporaria* mide bağırsak sisteminde (12) ve *Rana esculenta*, *Cyanolyca pulchra* ile *Bufo marinus* böbreküstü bezinde immünohistolojik olarak tespit edilmiştir (13). Başka bir tür olan *Rana ridibunda*'da ise enkefalin varlığı sadece böbreküstü bezinde immünolojik olarak bulunmuştur. Ayrıca enkefalinlerin bu türün siyatik siniri aksiyon potansiyelini inhibe ettiği de gözlemlenmiştir (14, 15). *Rana ridibunda* sinir sisteminde enkefalinin yayılışı henüz immünohistolojik olarak çalışılmamıştır. Bu nedenle tıp alanında kullanılan opioid peptitlerden LE'nin *Rana ridibunda* sinir sisteminde lokalize olup olmadığını tespit etmek amacı ile bu çalışma yapıldı. LE, bu türün beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularında immünohistokimyasal yöntemlerle lokalize edildi.

Yöntem

Deney Hayvanları

Deneylerde, Mersin Müftü Deresi'nden yakalanan 6 adet kurbağa (*Rana ridibunda*; 40±5gr) kullanıldı. Havalandırmalı bidonlar içerisinde taşınan kurbağalar, laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları için 5 gün boyunca akvaryumda bekletildi. Kurbağaların, ketamin (0.1mg/gr) ile anestezi altına alınmasından sonra, karınları açılarak truncus arteriosus içine, 10 ml %0.64'lük NaCl çözeltisi enjekte edilerek damarları yıkandı. Bu işlemi takiben, yine truncus arteriosus içine PBS (Phosphate Buffer Saline) içinde hazırlanmış 25 ml %4'lük paraformaldehit enjekte edilerek dokuların tespiti sağlandı. Diseksiyon

sonucu kurbağalardan izole edilen beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularına %4'lük paraformaldehit içinde 4 saat boyunca postfiksasyon uygulandı. Dokular, sırasıyla dehidrasyon ve şeffaflandırma işlemlerinden sonra parafin bloklar içerisine gömüldü. Leica marka mikrotom kullanılarak polilizin kaplı lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kurbağalara uygulanan tüm işlemler, National Institutes of Health (NIH) tarafından hazırlanan laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım rehberinde belirtilen kriterlere göre yapıldı.

İmmünohistokimyasal Uygulama

Çalışmada indirekt immünohistokimya yöntemi kullanıldı (16). Bunun için, rabbit anti LE (USBIO, E3220-10) primer antikor, biyotin ile konjuge edilmiş anti rabbit-IgG (Sigma-B 8895) sekonder antikor olarak kullanıldı. Antikorlar %0.5 BSA (Bovine Serum Albumin) içeren fosfat tamponu (PBS: NaCl: 8.79; KH₂PO₄: 0.274; Na₂HPO₄: 1.135 gr; 1000 ml saf su; 0.01 M; pH=7.4) ile hazırlandı. Antikorlar (rabbit anti LE: 1/500; anti rabbit IgG: 1/1600) doku kesitlerine 40'ar µl olarak uygulandı. Kromojen olarak diaminobenzidin (0.9mg DAB/1 ml süstrat) kesitlere uygulandı ve immünopozitif hücreler kahverengi olarak izlendi. Yapılan işlemlerin spesifik olup olmadığını belirlemek amacı ile dokulara negatif kontrol uygulandı. Negatif kontrol uygulanan dokulara, primer antikor yerine BSA'lı PBS (%0.5) damlatılarak inkübasyona bırakıldı. Diğer bütün işlemler, indirekt immünohistokimya prosedürüne uygun olarak yapıldı. Negatif kontrol sonucunda herhangi bir spesifik işaretlenmeye rastlanmadı. Beyin dokudan sagittal, omurilik dokusundan enine, siyatik sinirden ise, enine ve boyuna kesit alınarak immünohistokimyasal işaretleme yapıldı. Beyin dokusunun, sagittal kesitinde ön, orta ve arka beyin, omurilik dokusunun enine kesitinde ise, torakal bölge anti LE ile işaretlendi. Sinir dokuları daha sonra ışık mikroskopunda incelendi.

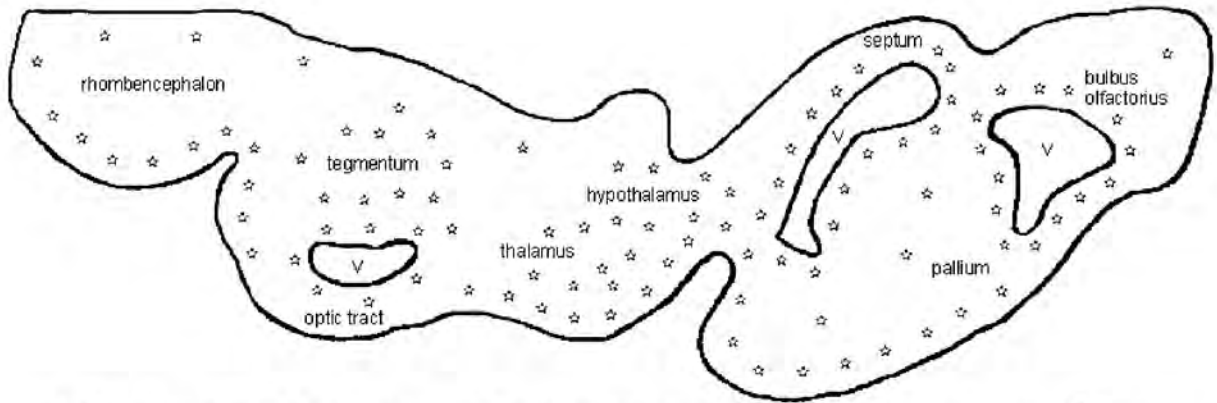
Bulgular

Işık mikroskopik inceleme sonucunda, indirekt işaretlenme ile LE'nin *Rana ridibunda* beyin dokusunda büyük oranda lokalize olduğu gözlemlendi. Beyin dokusunun sagittal kesitinde ön beyin, orta beyin ve arka beyin olmak üzere beyin dokularının tamamında immünoreaktivite saptandı. Bu doku perikaryonlarının yanı sıra, ventriküllerin etrafını döşeyen endodermal hücrelerin ve glial hücrelerinin de immünoreaktif oldukları görüldü. LE özellikle bulbus olfactorius, septum, pallium, tegmentum, optik traktus, rhombencephalon, talamus ve hipotalamus gibi nöronal aktivitenin yüksek olduğu alanlarda lokalize olduğu tesbit edildi. LE'nin immünopozitifliği, beyin dokusunun özellikle büyük motor nöron hücre gövdelerinde izlenirken, motor nöron nükleuslarında ise görülmedi. Arka beyin alanlarında da LE bakımından

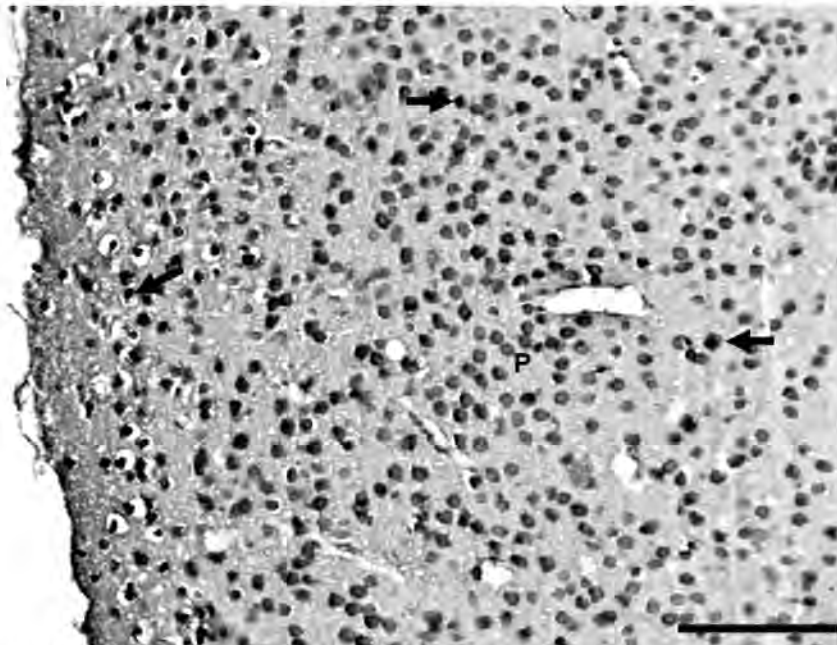
immünopozitif hücreler izlendi (Şekil 1-4). Buna karşılık, bu dokunun negatif kontrolünde herhangi bir immünoreaktif hücreye rastlanmadı (Şekil 5).

Dokulardaki immünoreaktivite kuvveti beyin doku sagittal kesitinde ve omurilik torakal bölge enine kesitinde yıldız (*) ile şematik olarak gösterildi (Şekil 1 ve 6).

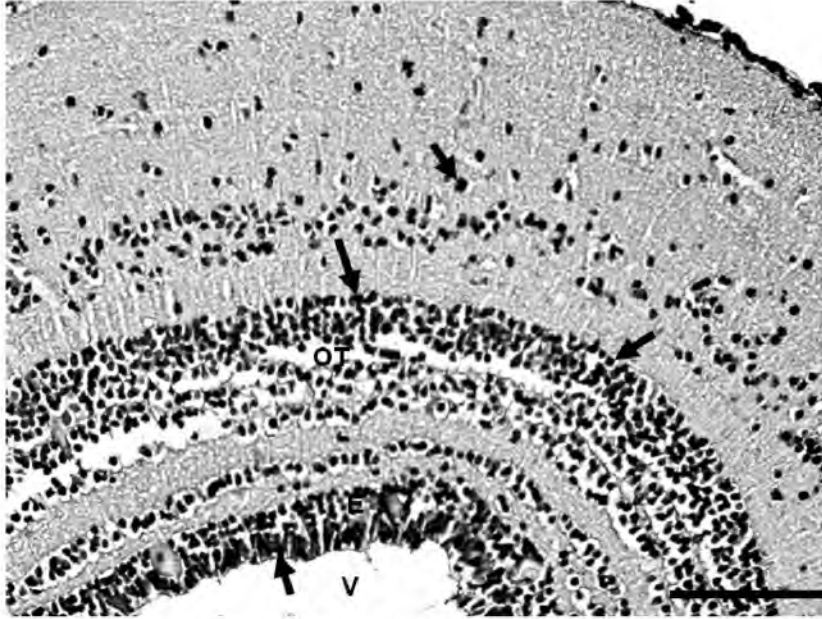
Dokular arasındaki farkı belirtmek için immünoreaktivitenin kuvvetli olduğu bölgeler yıldız ile işaretlenmiş, olmadığı bölgeler ise boş bırakıldı. Ayrıca her bir dokunun immünoreaktivite oranı Tablo 1'de belirtildi.



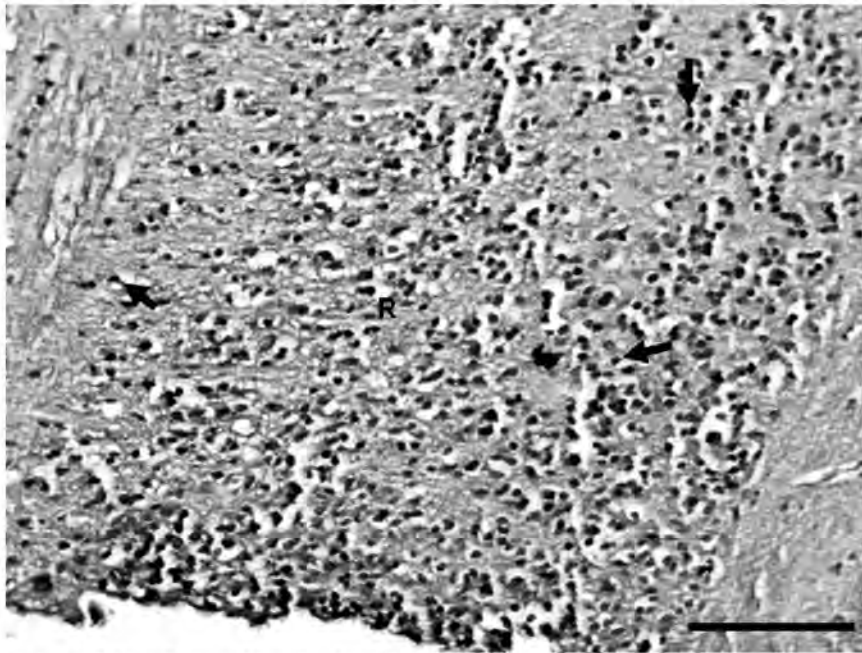
Şekil 1. *Rana ridibunda* beyin dokusu sagittal kesiti şematik çizimindeki lösin enkefalin lokalizasyonu (☆:Lösin enkefalini lokalize olduğu alanlar, v: ventrikül)



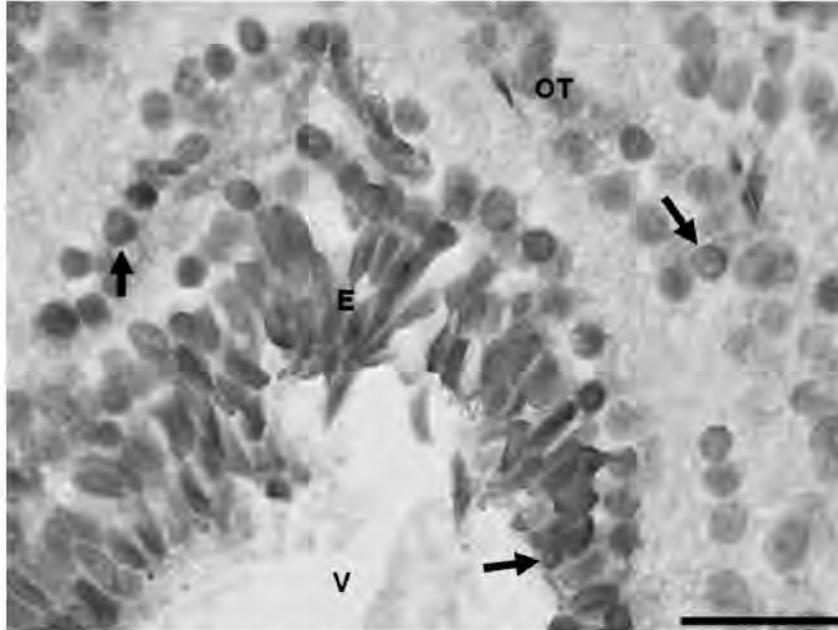
Şekil 2. Lösin enkefalini *Rana ridibunda* ön beyin dokusundaki lokalizasyonu (P: Pallium; ön beyinde bazı immünoreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir, skala: 100 µm).



Şekil 3. Lösin enkefalinin *Rana ridibunda* orta beyin dokusundaki lokalizasyonu (OT: Optik traktus, E: Ependima, V: Ventrikül; orta beyindeki optik traktus ve ependimal hücrelerin immüno pozitifliği oklarla gösterilmiştir, skala: 100 µm).



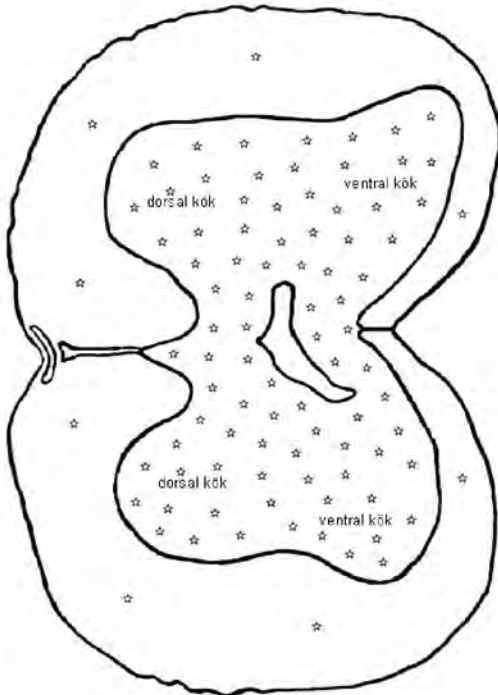
Şekil 4. Lösin enkefalinin *Rana ridibunda* arka beyin dokusundaki lokalizasyonu (R: Rhombencephalon; arka beyinde bazı immüno reaktif hücreler oklarla gösterilmiştir, skala: 100 µm).



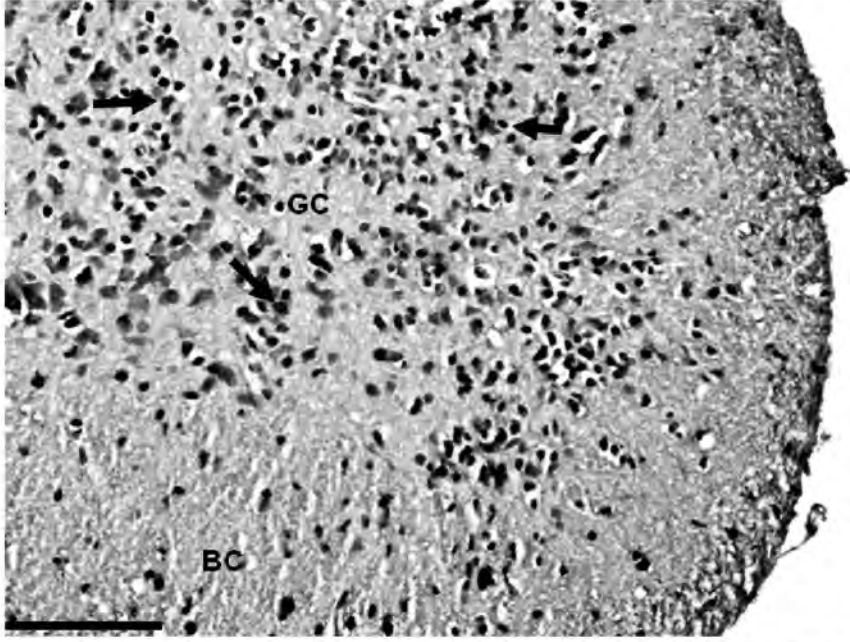
Şekil 5. *Rana ridibunda* orta beyin dokusunda negatif kontrol (OT: Optik traktus, E: Ependima, V: Ventrikül; negatif kontrolde immünoaktif olmayan optik traktus ve ependimal hücreler oklarla gösterilmiştir, skala: 50 µm).

Benzer şekilde kurbağa omuriliği ventral kökünde bulunan motor nöron perikaryonlarının yanı sıra, akson lifleri, dorsal kökteki afferent nöron aksonları, santral kanalı döşeyen ependimal hücreler, gri cevher ve beyaz cevherdeki glial hücrelerin de immünopozitif olarak işaretlendikleri gözlemlendi. Omurilik dokusu enine kesitinde,

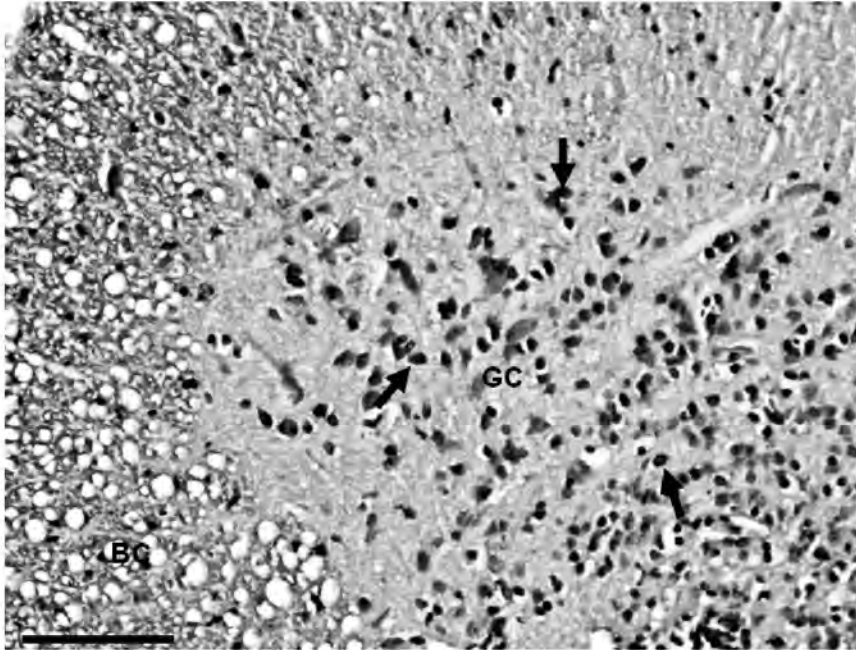
immünopozitiflik gösteren perikaryonlar ve glial hücrelerin gri cevherde beyaz cevhere göre daha fazla olduğu izlendi. (Şekil 6-8). Bu dokunun negatif kontrolünde ise, herhangi bir immünopozitif işaretlenme göze çarpmadı (Şekil 9).



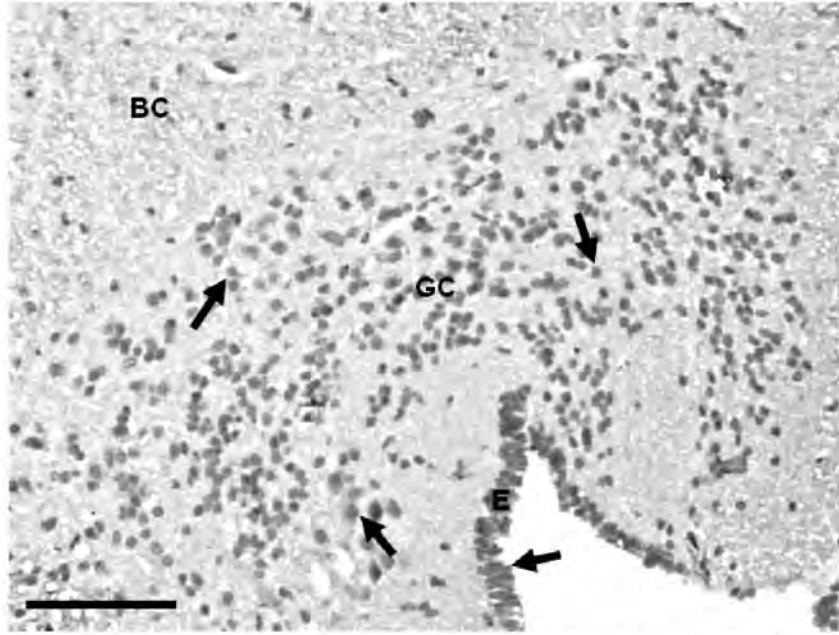
Şekil 6. *Rana ridibunda* omurilik dokusu enine kesiti şematik çizimindeki lösin enkefalin lokalizasyonu (☆: Lösin enkefalinin lokalize olduğu alanlar).



Şekil 7. Lösın enkefalinin *Rana ridibunda* omuriliği ventral kök lokalizasyonu (BC: Beyaz cevher, GC: Gri cevher, omurilik ventral kökündeki bazı immünoreaktif perikaryonlar oklarla gösterilmiştir, skala 60 µm).



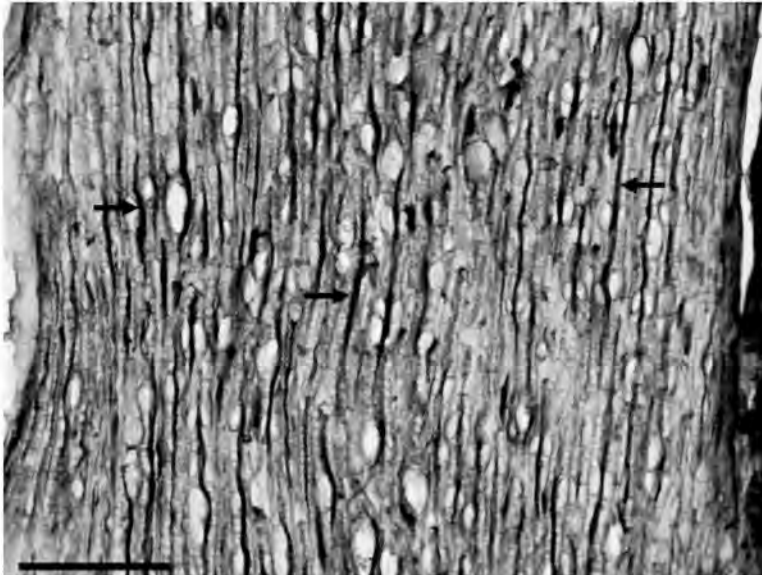
Şekil 8. Lösın enkefalinin *Rana ridibunda* omuriliği dorsal kök lokalizasyonu (BC: Beyaz cevher, GC: Gri cevher, omurilik dorsal kökünde bazı immünoreaktif hücreler oklarla gösterilmiştir, skala 60 µm).



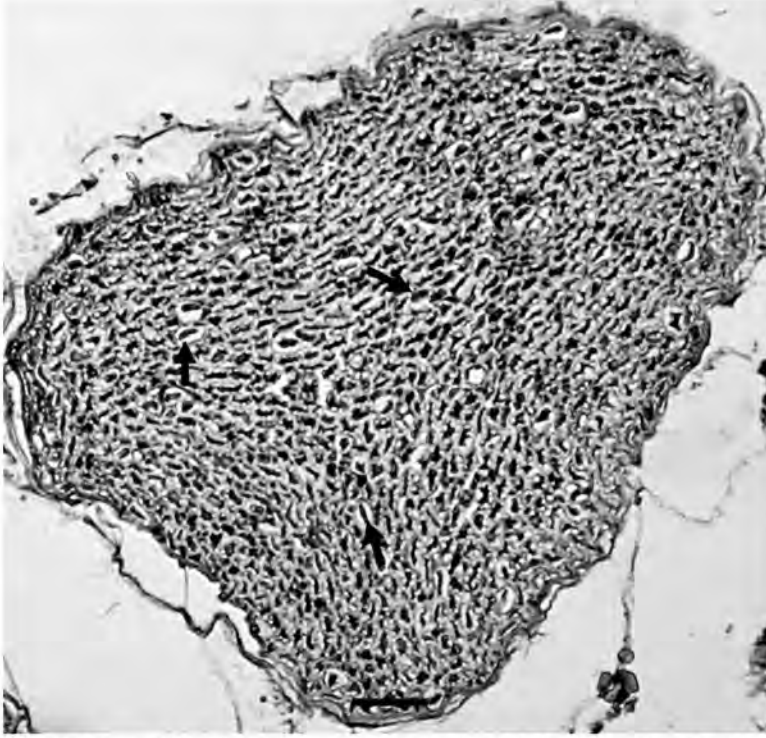
Şekil 9. *Rana ridibunda* omurilik dokusunda negatif kontrol (BC: Beyaz cevher, GC: Gri cevher, E: Ependima, omurilik dokusunda immunoreaktif olmayan bazı hücreler oklarla gösterilmiştir, skala 60 µm).

Diğer bir doku olan siyatik sinirin enine ve boyuna kesitleriyle yapılan işaretlemelerde LE'nin, burada da yayılış gösterdiği bulundu. İmmünopozitif işaretlenme aksoplazmada gözlenirken miyelin kılıfta ise izlenmedi. Sinir aksoplazmalarının tamamına yakınında immunoreaktivite saptanırken, fibroblast ve Schwann

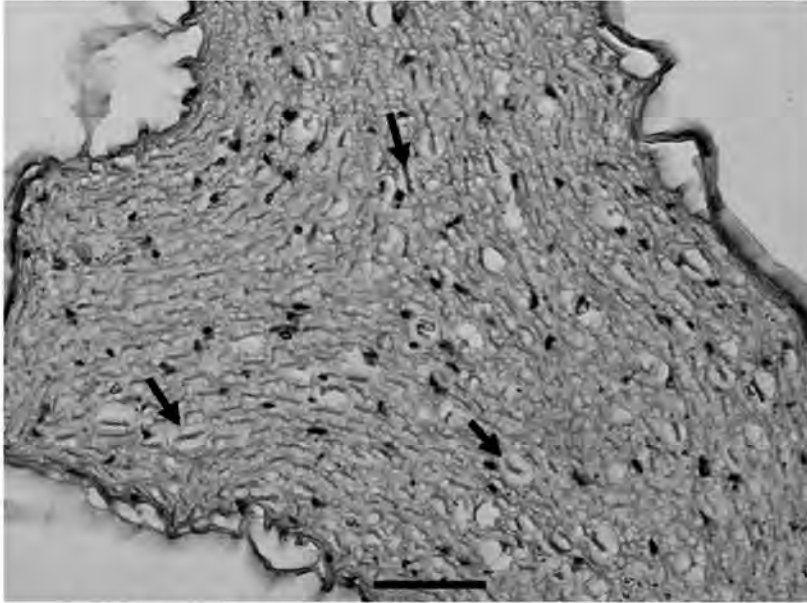
hücrelerinin az bir kısmında immunoreaktivite gözlendi (Şekil 10,11). Diğer dokuların negatif kontrollerinde olduğu gibi, siyatik sinirin negatif kontrolünde de herhangi bir immünopozitif işaretlenme görülmedi (Şekil 12).



Şekil 10. Lösın enkefalinin *Rana ridibunda* siyatik siniri boyuna kesitindeki lokalizasyonu (Siyatik sinir boyuna kesitinde bazıları oklarla işaretlenen immunoreaktif aksoplazmalar gösterilmiştir, skala 70 µm).



Şekil 11. Lösın enkefalinin *Rana ridibunda* siyatik siniri enine kesitindeki lokalizasyonu (Siyatik sinir enine kesitinde bazıları oklarla işaretlenen immünoreaktif aksoplazmalar gösterilmiştir, skala 30 µm).



Şekil 12. *Rana ridibunda* siyatik siniri enine kesitinde negatif kontrol (Siyatik sinir enine kesitinde bazıları oklarla işaretlenen immünoreaktif olmayan aksoplazmalar gösterilmiştir, skala 30 µm).

Tablo 1. Lössin enkefalinin *Rana ridibunda* sinir dokularındaki immünoreaktivite düzeyi

Doku	Anatomik bölge	İşaretlenme düzeyi
Beyin	bulbus olfactorius	+
	septum	++
	pallium	+
	tegmentum	++
	optik traktus	+++
	hipotalamus	+++
	talamus	+++
	rhombencephalon	++
	Omurilik (torakal bölge)	gri cevher (ventral kök)
gri cevher (dorsal kök)		++
beyaz cevher		+
Siyatik sinir	aksoplazma	+++
	fibroblast	-
	schwann hücreleri	-

–: işaretlenme yok, +: zayıf, ++: orta, +++: kuvvetli.

Denek sayısı kadar doku preparatı incelenerek dokulardaki immün reaksiyon tespit edilmeye çalışıldı. Yapılan inceleme sonucuna göre, işaretlenme oranının dokular arasında farklılık gösterdiği, fakat denekler arasında immünoreaktivite kuvveti bakımından herhangi bir fark olmadığı gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç

Tıbbi öneme sahip bir opioid peptit olan LE *Rana ridibunda* beyin, omurilik ve siyatik sinir dokularında immünoreaktivite göstermiştir. Beyin dokusunun tamamına yakını immünoreaktivite gösterirken, işaretlenmenin özellikle sinirsel aktivitenin yoğun olduğu pallium, septum, hipotalamus, talamus, tegmentum, optik traktus ve ventrikülleri içeriden döşeyen ependimal hücrelerde diğer bölgelere göre daha kuvvetli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Başka kurbağa türlerinde de opioid peptitlerin lokalizasyonları tespit edilmiştir. Kuljis ve Karten (17) LE'yi *Rana pipiens* beyini optik tektum bölgesinde immünopozitif olarak gözlemlemişlerdir. Diğer kurbağa türleri olan *Rana esculenta* ve *Litoria moorei* beyini enine kesitlerinde aynı şekilde LE yayılımı gözlenmiştir (18). Başka bir opioid peptit olan ME varlığı Hirai ve Katayama (19) tarafından *Rana catesbeiana* sempatik gangliyon hücrelerinde bulunmuştur. Diğer bir çalışmada *Rana esculenta* beyininin optik ventrikül ve onun ependimal hücrelerinde ME'nin immünohistolojik lokalizasyonu tespit edilmiştir (20).

Omurilik ile yapılan çalışmada, ventral kökte bulunan büyük motor nöronların perikaryonları, akson lifleri, dorsal kökteki afferent nöron akson lifleri ve santral kanalı döşeyen ependimal hücrelerin immünoreaktif oldukları gözlenmiştir. Özellikle, fizyolojik aktivitenin fazla olduğu gri cevherde, beyaz cevhere göre daha yoğun

immünoreaktivite bulunmuştur. Hajek ve ark. (21) tarafından, *Rana temporaria* omuriliğinde enkefalinlerjik sistemin varlığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada Stevens ve Rothe (22) tarafından, *Rana pipiens* omuriliğinde enkefalinlerin yayılımı izlenmiştir. Aynı kurbağa türünde, başka bir opioid peptit olan nociceptin'in omurilik nöronal aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (23). Kurbağaların yanı sıra sıçanlarla yapılan çalışmada, Sprague/Dawley erkek sıçan omuriliği servikal bölgesinde ME ve delta opioid reseptörü lokalize edilmiştir (24).

Siyatik sinirde ise LE'nin daha çok aksoplazmada lokalize olduğu gözlemlendi. Buna karşılık fibroblast ve Schwann hücrelerinin çok az bir kısmında immünoreaktivite vardı. Endojen olarak bulunan opioid peptitlerin iyon kanalları üzerine etkileri de araştırılmıştır. Carratu ve ark. (25) tarafından, enkefalinlerin *Rana esculenta* siyatik siniri liflerindeki sodyum kanallarına bağlanarak iyon geçişine engel oldukları ve aksiyon potansiyeli iletimini engellediği bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada, *Rana pipiens* ve erkek İngiliz kısa saçlı kobay siyatik siniri ile kobay ve Yeni Zelanda beyaz tavşanı vagus sinirinde enkefalinlerin varlığı gösterilmiştir (26). Diğer çalışmalarda, *Rana ridibunda* siyatik sinirinde elektrofizyolojik olarak enkefalinlerjik sistemin varlığı gösterilmiştir (14,15). Mizuta ve ark. (27) opioidlerin, *Rana nigromaculata* siyatik siniri birleşik aksiyon potansiyeli genliğini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, LE'nin *Rana ridibunda* beyin dokusunda lokalize olması, burada sentezlendiğine, nörotransmitter veya nöromodülatör rolünün olduğuna işaret etmektedir. LE'nin farklı kurbağa türlerinin merkezi veya periferik sinir sisteminde yayılımı göstermesi, filogenetik olarak bu peptit geninin günümüze kadar

muhafaza edildiğini göstermektedir. Bu peptidin, nörotransmitter veya nöromodulator rolünün olup olmadığını tespit etmek için reseptör araştırmaları yapılmalıdır.

Kaynaklar

- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergil LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975;258:577-9.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Moore PK. Pharmacology, 5th Ed., London; Churchill Livingstone, 2003:562-84.
- Sneddon LU. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Rev* 2004;46:123-30.
- Nozaki C, Kamei J. Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve injured mice. *Eur J Pharmacol* 2006;552:99-104.
- Bodnar RJ, Klein GE. Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides* 2006;27:3391-478.
- Watson SJ, Akil H, Sullivan S, Barchas JD. Immunocytochemical localisation of Methionine enkephalin: Preliminary observations. *Life Sci* 1977;21:733-8.
- Van Leeuwen FW, Pool CW, Sluiter AA. Enkephalin immunoreactivity in synaptoid elements on glial cells in the rat neural lobe. *Neuroscience* 1983;8:229-41.
- Shioda S, Nakai Y, Ochiai H, Nakada H, Sano Y. Simultaneous identification of two different neuropeptides using a combined PAP and protein A gold technique in the rat neurohypophysis. *J Electron Microsc* 1984;33:72-5.
- D'Este L, Casini A, Puglisi-Allegra S, Cabib S, Tooyama I, Kimura H, Renda TG. Immunoreactive neurons in the brain of two mouse strains after incubation with an antiserum recognizing Asp-Val-Val-Gly.NH₂ (DVVG), the C-terminal fragment of (D-Ala²)-deltorphin I. *J Chem Neuroanat* 2002;24:189-98.
- Martin R, Geis R, Holl R, Schafer M, Voigt KH. Coexistence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophysis: Immunoreactive methionin-Enkephalin, Leucine-enkephalin and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience* 1983;8:213-27.
- Kanetoh T, Sugikawa T, Sasaki I, Muneoka Y, Minakata H, Takabatake I, Fujimoto M. Identification of a novel frog RFamide and its effect on the latency of the tail-flick response of the newt. *Comp Biochem Physiol Part C* 2003;134:259-66.
- Valverde E, Diaz De Rada O, Burrell MA, Rovira J, Sesma P. Immunocytochemical and ultrastructural characterisation of endocrine cells and nerves in the intestine of *Rana temporaria*. *Tissue and Cell* 1993;25:505-16.
- Reinecke M, Heym C, Forssmann WG. Distribution patterns and coexistence of neurohormonal peptides (ANP, BNP, NPY, SP, CGRP, Enkephalins) in chromaffin cells and nerve fibers of the anural adrenal organ. *Cell Tissue Res* 1992;268:247-56.
- Çamlica Y, Aşkin A, Çömelekođlu Ü. Evidence for the involvement of an opioid system in sciatic nerve of *Rana ridibunda*. *Neuropeptides* 2004;38:83-91.
- Aşkin A, Çamlica Y, Çömelekođlu Ü. Opioid peptides as possible neuromodulators in the frog peripheral nerve system. *Neuropeptides* 2007;41:73-81.
- Guglielmotti V, Cristino L, Sada E, Bentivoglio M. The epithalamus of the developing and adult frog: Calretinin expression and habenular asymmetry in *Rana esculenta*. *Brain Res* 2004;999:9-19.
- Kuljis RO, Karten HJ. Laminar organization of peptide-like immunoreactivity in the anuran optic tectum. *J Comp Neurol* 1982;212(2):188-201.
- Merchenthaler I, Lazar G, Maderdrut JL. Distribution of proenkephalin derived peptides in the brain of *Rana esculenta*. *J Comp Neurol* 1989;281(1):23-39.
- Hirai K, Katayama Y. Methionine enkephalin presynaptically facilitates and inhibits bullfrog sympathetic ganglionic transmission. *Brain Res* 1988;448:299-307.
- Kozicz T, Lazar G. Colocalization of GABA, enkephalin and neuropeptide Y in the tectum of the green frog *Rana esculenta*. *Peptides* 2001;22:1071-7.
- Hajek I, Teisinger J, Sykova E. The effect of opioids and of naloxone on Na⁺, K⁺ adenosine triphosphatase activity in frog spinal cord membrane fractions. *Neurosci Lett* 1985;59:291-5.
- Stevens CW, Rothe KS. Supraspinal administration of opioids with selectivity for μ , δ and κ opioid receptors produces analgesia in amphibians. *Eur J Pharmacol* 1997;331:15-21.
- Stevens CW, Martin KK, Stahlheber BW. Nociceptin produces antinociception after spinal administration in amphibians. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;91:436-40.
- Cheng PY, Svingos AL, Wang H, Clarke CL, Jenab S, Beczkowska IW, Inturrisi CE, Pickel VM. Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of δ opioid receptor within both enkephalin and nonenkephalin containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci* 1995;15(9):5976-88.

25. Carratu MR, Dubois JM, Chieppa DM. Block of sodium current in myelinated nerve fibre with enkephalins. *Neuropharmacology* 1982;21:619-23.
26. Frank GB, Sudha TS. Effects of enkephalin, applied intracellularly, on action potentials in vertebrate A and C nerve fibre axons. *Neuropharmacology* 1987;26(1):61-6.
27. Mizuta K, Fujita T, Nakatsuka T, Kumamoto E. Inhibitory effects of opioids on compound action potentials in frog sciatic nerves and their chemical structures. *Life Sci* 2008;83:198-207.