Eksperimentalni rinosinusitis u štakora i neurogena upala dure

Lovrenčić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:119717

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Luka Lovrenčić

Eksperimentalni rinosinusitis u štakora i neurogena upala dure

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Ivice Mataka i prof.dr.sc. Zlatka Lackovića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

Mentor diplomskog rada: dr.sc. Ivica Matak

Popis i objašnjenje kratica korištenih u ovom radu:

%vol – volumni postotak

5-HT – 5-hidroksitriptofan (serotonin)

ATP – adenozin trifosfat

B2 – bradikinin 2 receptor

BDNF – faktor rasta izveden iz mozga (*brain derived growth factor*)

BTXA – botulinum toksin A

c-Fos – stanični FBJ osteogeni sarkom protein (*cellular FBJ murine osteogenic sarcoma protein*)

cAMP – ciklički adenozin monofosfat

CFA – kompletni Freundov adjuvans (*complete Freund's adjuvant*)

CGRP – peptid povezan s genom kalcitonina (*calcitonin gene-related peptide*)

DAG – diacilglicerol

EP – receptor za prostaglandin E

GABA – gama-aminomaslačna kiselina (*gamma-Aminobutyric acid*)

IL1β – interleukin 1-beta

IL6 – interleukin 6

IL8 – interleukin 8

IP – receptor za prostaglandin I

NGF – živčani čimbenik rasta (*neural growth factor*)

NGS – normalni kozji serum (*normal goat serum*)

NK1 – receptor za neurokinin 1 (receptor za tvar P)

NKA – neurokinin A

P2Y – purinski receptor

PAR – proteinazom aktivirani receptor

PBS – otopina puferirana fosfatom (*phosphate buffered saline*)

PBST – 0.25%vol otopina Triton X-100 u PBS

PGE_2 – prostaglandin E2

PGI_2 – prostaglandin I2

PLC – fosfolipaza C

RGS - ljestvica izraza lica štakora (*rat grimace scale*)

RIA – radio-imuno esej (*radioimmunoassay*)

SAD – Sjedinjene američke države

SEM – standardna pogreška aritmetičke sredine (*standard error of the mean*)

SNAP25 – protein povezan sa sinaptosomom (*synaptosomal-associated protein 25*)

SNARE – SNAP receptor

SP – tvar P (*substance P*)

Sp5C – spinalna kaudalna jezgra trigeminalnog živca (*spinal trigeminal caudal nucleus*)

TMZ – temporomandibularni zglob

TNFα – faktor tumorske nekroze alfa (*tumor necrosis factor*)

TrkA – tropomiozinska receptorska kinaza A (receptor za NGF)

TRPV – vaniloidni receptori – kanali prolaznog potencijala (*transient receptor potential cation channels - vanilloid*)

Sadržaj

Sažetak VII

Summary VIII

1 Uvod 1

1.1 Životinjski modeli za istraživanje rinosinusitisa 1

1.2 Neurogena upala 2

1.2.1 Molekularni mehanizmi neurogene upale 2

1.2.2 Neuropeptidni medijatori neurogene upale 3

1.2.3 Interakcija A delta i C vlakana s mastocitima i upalnim stanicama 4

1.2.4 Promjena osjetljivosti senzornih neurona za izazivanje neurogene upale 4

1.2.5 Alodinija i hiperalgezija 5

1.2.6 Fenomen udaljene neurogene upale 6

1.3 Neurogena upala dure mater izazvana upalom u trigeminalnom području 7

1.3.1 Specifičnost kranijalne dure 8

1.3.2 Upala dure nakon periferne stimulacije trigeminalnog živca je neurogenog porijekla 8

1.3.3 Mehanizam nastanka neurogene upale dure nakon periferne stimulacije trigeminalnog živca 9

1.3.4 Neurogena upala dure kao moguća podloga migrene 10

1.4 Glavobolja 10

1.4.1 Primarna glavobolja i alodinija 11

1.4.2 Povezanost glavobolje s poremećajima u području trigeminalne inervacije 13

1.4.3 Povezanost primarne glavobolje s poremećajima temporomandibularnog zgloba (TMZ) 13

1.4.4 Povezanost primarne glavobolje s poremećajima nosa i sinusa 13

2 Hipoteza 14

3 Ciljevi rada 14

4 Materijali i metode 15

4.1 Eksperimentalne životinje 15

4.2 Ispitivane tvari 15
4.2.1 Kapsaicin 15
4.2.2 Formalin 15
4.3 Korištene tvari (reagensi, kemikalije i otapala) 16
4.4 Određivanje upale tvrde moždane ovojnice i nosne sluznice 16
4.4.1 Eksperimentalne skupine i tretiranje životinja 16
4.4.2 Priprema tkiva 17
4.4.3 Kvantifikacija upale 17
4.5 Određivanje aktivacije neurona kaudalne jezgre trigeminalnog živca 17
4.5.1 Eksperimentalne skupine i tretiranje životinja 17
4.5.2 Priprema tkiva 17
4.5.3 Imunohistokemijsko bojanje 18
4.5.4 Kvantifikacija ekspresije c-Fos 18
4.6 Bihevioralni testovi za mjerenje boli 18
4.6.1 Eksperimentalne skupine i tretiranje životinja 19
4.6.2 Mjerenje ponašanja životinja prema RGS 19
4.7 Statistička obrada rezultata 19
5 Rezultati 20
5.1 Odnos upale nosne suznice i upale dure. 20
5.2 Aktivacija neurona kaudalne spinalne trigeminalne jezgre 23
5.3 Bihevioralne promjene 21
6 Rasprava 25
6.1 Upala nosne sluznice povezana je s upalom tvrde moždane ovojnice 25
6.2 Aktivacija neurona kaudalne spinalne jezgre trigeminalnog živca. 26
7 Zahvale 27
8 Bibliografija 28
9 Životopis 39

Sažetak

Eksperimentalni rinosinusitis u štakora i neurogena upala dure

Uvod. Epidemiološki su podaci pokazali povezanost različitih bolesti i stanja iz područja trigeminalne inervacije i povećane učestalosti primarnih glavobolja (migrena, tenzijska glavobolja, klaster glavobolja). Štakorski eksperimentalni modeli upale temporomandibularnog zgloba, upale mišića i potkožnog tkiva lica te neuropatske boli porijekla iz ogranaka trigeminalnog živca pokazali su da određena bolna stanja u kraniofacijalnoj regiji mogu biti praćena neurogenom upalom tvrde moždane ovojnice.

Ciljevi. Cilj je ovoga rada istražiti je li neurogena upala dura povezana i s upalom nosne šupljine i paranazalnih sinusa budući da su upalni (alergijski rinitis, kronični sinusitis) i anatomski (septalni izbojak, intranazalne kontaktne točke) poremećaji epidemiološki povezani s višom učestalošću primarnih glavobolja.

Materijali i metode. Upala nosne šupljine i sinusa štakora je izazvana intranazalnom instilacijom formalina (2.5%) ili kapsaicina (0.1%). Upala nosne sluznice i dure mater kvantificirana je spektrofotometrijskim mjerenjem ekstravazacije kompleksa boje Evans Blue s proteinima plazme. Bol je mjerena semikvantitativnom analizom facijalne grimase u štakora tijekom 40 min od izazivanja upale. Aktivacija neurona kaudalne spinalne trigeminalne jezgre (Sp5C) je određena brojenjem imunofluorescencijom obojenih c-Fos (+) neurona.

Rezultati. Kapsaicin i formalin dani u nosnu šupljinu štakora uzrokuju jaču ekstravazaciju Evansovog modrila tj. upalu u nosnoj sluznici i duri mater u odnosu na fiziološku otopinu ($p < 0.05$). Postoji korelacija intenziteta upale dure mater s intenzitetom upale nosne sluznicu ($R^2 = 0,2712$; $p = 0.0155$). Aktivacija c-Fos (+) neurona u Sp5C i facijalni izražaj boli su veći u životinja intranazalno tretiranih formalinom u usporedbi s fiziološkom otopinom ($p < 0.01$, odnosno $p < 0.05$).

Zaključak. Rezultati pokazuju da i upala nosne šupljine može izazvati upalu tvrde moždane ovojnice te upućuju da bi upala dure mater mogla biti jedna od patogenetskih podloga primarnih glavobolja povezanih s bolestima nosa i paranazalnih sinusa.

Ključne riječi: rinosinusitis, neurogena upala dure, primarne glavobolje

Summary

Rat experimental rhinosinusitis and dural neurogenic inflammation

Introduction. Epidemiologic data shows an association of various diseases and conditions in the trigeminal innervation area with an increased incidence of primary headaches (migraine, tension type and cluster headache). Rat experimental models of temporomandibular joint, facial muscle and facial subcutaneous tissue inflammation, as well as of neuropathic pain stemming from trigeminal nerve branches, showed that certain painful conditions in craniofacial region are accompanied by neurogenic dura mater inflammation and that this phenomenon is specific for the cranial dura, i.e. it is not observed in the spinal dura.

Objectives. Herein it was examined if nasal cavity and paranasal sinus inflammation is associated with neurogenic dural inflammation, since many inflammatory (allergic rhinitis, chronic sinusitis) or anatomical (septal spur, intranasal contact points) disorders are associated with higher primary headache incidence.

Materials and methods. Nasal cavity and paranasal sinus inflammation was induced by intranasal formalin (2.5%) or capsaicin (0.1%) injection. Nasal mucosa and dural inflammation was quantified by spectrophotometric measurement of extravasated Evans blue and plasma protein complex. Pain was measured by rat grimace scale during 40 minutes after induction of inflammation. Activation of spinal caudal trigeminal nucleus (Sp5C) was measured by counting immunohistochemically c-Fos (+) neurons.

Results. Capsaicin and formalin administered in rat nasal cavity cause more intense Evans blue extravasation, i.e. inflammation in the nasal mucosa and dura compared to saline ($p < 0.05$). There is a correlation between inflammation intensity of the nasal mucosa and dura ($R^2 = 0,2712$; $p = 0.0155$). Activation of c-Fos (+) neuron sin Sp5C and facial pain expression were higher in group administered formalin compared to saline ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively).

Conclusion. The results show that nasal cavity inflammation can induce dural inflammation, and suggest that dural inflammation could be one of the pathogenetic mechanisms of primary headaches associated with conditions of the nasal cavity and paranasal sinuses.

Keywords: rhinosinusitis, dural neurogenic inflammation, primary headaches

1 Uvod

Epidemiološke studije su pokazale da su primarne glavobolje povezane sa različitim bolestima i poremećajima u području glave kao što su bolesti temporomandibularnog zgloba, neuralgije trigeminalnog živca i bolesti nosne šupljine i paranazalnih sinusa (1–4). Međutim, patofiziologija te povezanosti nije do kraja razjašnjena. Predloženi mehanizmi uključuju perifernu i centralnu senzitizaciju koja dovodi do preosjetljivosti moždanih ovojnica na inače benigne podražaja kao što je vazodilatacija meningealnih arterija i jačeg otpuštanja medijatora neurogene upale lokalno u moždanim ovojnicama (5,6). Nedavno je opažen novi fenomen koji bi mogao biti u podlozi tih glavobolja. Naime, upalni podražaji potkožnog i mišićnog tkiva lica i temporomandibularnog zgloba štakora, kao i neuropatska lezija ogranaka trigeminalnog živaca dovode do neurogene upale kranijalne tvrde moždane ovojnice (7–9). Budući da se primarne glavobolje povezuju i sa upalama nosa i paranazalnih sinusa ovdje smo istražili ima li i upala sluznice nosne šupljine mogućnost izazivanja neurogene upale tvrde moždane ovojnice kao i mogući mehanizmi nastanke te upale.

1.1 Životinjski modeli za istraživanje rinosinusitisa

Postoji nekoliko modela za istraživanje rinosinusitisa u životinja. Razvijeni su radi razjašnjavanja patogeneze akutnog i kroničnog rinosinusitisa, promatranja dugotrajnih učinaka upale na nosnu sluznicu i razvijanje potencijalnih terapijskih pristupa. Najrašireniji modeli su: kunić (10), miš (11) te štakor. Štakor je model koji se koristi za istraživanje rinosinusitisa vrlo raznolike etiologije: bakterijski, gljivični, kemijski, alergijski (Tablica 1). Štakor se uspostavio kao dobar model za istraživanje rinosinusitisa zbog dobro poznate i karakterizirane anatomije paranazalnih sinusa i njihove primjerene veličine (12) što omogućava pouzdanu inokulaciju upalnih agensa u nos i/ili paranazalne sinuse. Dva su najraširenija pristupa uvođenja upalnog agensa u nos štakora: izravno ukapavanje određenog volumena otopine upalnog agensa u nosnu šupljinu (13) i uvođenje upalnog agensa u nos na nekom nosaču, najčešće spužvi (14). Upala nosne sluznice se kvantificira histološki (15), imunohistokemijski (13) uz moguće praćenje hematoloških parametara (broj leukocita) kao znakova sistemske upale.

Tablica 1: štakorski modeli rinosinusitisa

Uzročni agens	Soj štakora	Evaluacija upale	Referenca
stafilokokni enterotoksin B	Sprague-Dawley	histologija	(15)
Aspergillus fumigatus +/- ciklofosfamid	Wistar	histologija, mikološka kultura, hematologija	(16)
Streptococcus pneumoniae	Sprague-Dawley	histologija	(14)
senzitizacija ovalbuminom	brown Norway	histologija, IgE, imunohistokemija	(17)
faktor aktivacije trombocita	Sprague-Dawley	histologija, imunohistokemija	(13)

1.2 Neurogena upala

Neurogena upala je aseptička vrsta upale koju započinju ili pojačavaju tvari izlučene iz završetaka aksona. U klasičnom smislu ona je posljedica aksonskog refleksa pa se kao takva javlja samo lokalno uz okončine podraženog aksona. Pretpostavlja se da je uključena u etiopatogenezu mnogih stanja: astme, kronične opstruktivne plućne bolesti, upalnih bolesti crijeva, artritisa i, vezano uz temu ovog rada, migrene (18). Budući da je to relativno nedavno otkriveni fenomen i da je uključen u patogenezu brojnih stanja, predmet je brojnih istraživanja na životinjskim modelima i kliničkih eksperimenata.

1.2.1 Molekularni mehanizmi neurogene upale

Početkom neurogene upale smatra se otpuštanje neuropeptida iz okončina slabo mijeliniziranih Aδ i nemijeliniziranih C senzornih vlakana (19). Ta vlakna na sebi imaju TRPV1 i srodne receptore koji služe za osjet temperature, ali reagiraju i na vaniloide od kojih je najpoznatiji kapsaicin (20) i protone tj. H^+. Ostale tvari koje aktiviraju tu vrstu neurona i omogućuju oslobađanje neuropeptida su: bradikinin preko svojih receptora te tripsin i triptaza preko proteinazom aktiviranog receptora (PAR) (18) (Tablica 2).

TRPV1 je neselektivni ionski kanal koji se nakon vezanja liganda otvara i postaje propustan za mnoge katione (Na^+, Ca^{2+}) što dovodi do nakupljanja unutarstaničnog kalcija i depolarizacije stanične membrane. Depolarizacija dovodi do otvaranja voltažnih kalcijevih kanala i daljnjeg nakupljanja kalcija u stanici. Nakupljanju kalcija u citoplazmi moguće pridonosi i otvaranje TRPV1 kanala na endoplazmatskom retikulumu (21). Kalcij u

citoplazmi dovodi do egzocitoze neuropeptida iz vezikula koje se nalaze u okončinama aksona.

Bradikinin potiče neurogenu upalu vezanjem na B2 receptore. B2 receptori su receptori vezani s G-proteinom koji aktiviraju fosfolipazu C koja stvara inozitol 1,4,5-trifosfat koji vezanjem za svoje receptore na endoplazmatskom retikulumu oslobađa unutarstanične rezerve kalcijevih iona (22). Tripsin i triptaza cijepanjem i vezanjem za proteinazom aktivirane receptore (PAR) također povisuju razinu unutarstaničnog kalcija i potiču egzocitozu neuropeptida (23).

Tablica 2: tvari koje uzrokuju egzocitozu SP i CGRP ili snižavaju prag podražaja za egzocitozu (senzitiziraju) izravnim djelovanjem na periferne završetke aksona

Tvar	Receptor	Drugi glasnik	Efekt
kapsaicin	TRPV1	Ca^{2+}, depolarizacija	egzocitoza
tripsin, triptaza	PAR	PLC, Ca^{2+}	egzocitoza
bradikinin	B2	PLC, Ca^{2+}	egzocitoza, senzitizacija
ATP	P2Y	PLC, Ca^{2+}	senzitizacija
PGE_2, PGI_2	EP, IP	cAMP	senzitizacija

1.2.2 Neuropeptidni medijatori neurogene upale

Klasični medijatori neurogene upale spadaju u skupinu neuropeptida tj. peptidnih neurotransmitera. Oni uključuju tvar P (SP), neurokinin A (NKA) i peptid povezan s genom za kalcitonin (CGRP). Ti se peptidi sintetiziraju u tijelima osjetnih neurona, spremaju u vezikule te tankim vlaknima (A delta, C) anterogradnim transportom putuju do okončina aksona (24). Iz perifernih se aksonskih završetaka oslobađaju pod utjecajem prije opisanih podražaja. Nakon što se oslobode oni djeluju parakrino na više vrsta stanica: mastocite, endotel, glatke mišiće krvnih žila te stvaraju sliku akutne upale.

SP i NKA spadaju u grupu tahikinina te se vežu za neurokininske receptore (NK). Ti su receptori spregnuti s G-proteinima te preko njih aktiviraju fosfolipazu C što dovodi do otpuštanja kalcija iz endoplazmatskog retikuluma. U kontekstu neurogene upale bitni su NK1 receptori na endotelu krvnih žila, čijom aktivacijom kalcij ulazi u citoplazmu endotela te dovodi do kontrakcije endotelnih stanica što povećava propusnost krvnih žila za proteine i rezultira edemom (25,26).

CGRP se veže za svoj receptor na stanicama glatkog mišića krvnih žila. CGRP receptor je združen s G_s-proteinima i preko njih aktivira adenilil ciklazu što dovodi do opuštanja glatkih mišića i vazodilatacije te ima za posljedicu crvenilo karakterističnog za upalu (27,28). Treba napomenuti da i SP i CGRP imaju oba djelovanja (na propusnost i vazodilataciju), ali CGRP djeluje jače na vazodilataciju dok SP djeluje 10 puta jače na propusnost stjenke krvne žile (25).

1.2.3 Interakcija A delta i C vlakana s mastocitima i upalnim stanicama

Neuropeptidi ne izazivaju znakove upale djelujući samo na krvne žile, nego aktiviraju i upalne stanice i mastocite koji lučenjem upalnih medijatora pojačavaju upalni odgovor tkiva. Da bi ta interakcija parakrinim putem bila moguća nužan je bliski smještaj živčanih završetaka i upalnih stanica sto je pokazano imunohistokemijskim ispitivanjima (29).

Mastociti izražavaju receptore za tvar P (NK1) (30) te pod njenim utjecajem vrše degranulaciju (31). Za neke od tvari koje mastociti otpuštaju pokazano je da izravno potiču otpuštanje SP i CGRP iz živčanih završetaka. Među njih spada triptaza. Za druge pak je pokazano da senzitiziraju živčane završetke za otpuštanje neuropeptida. Među njih spadaju ATP, prostaglandini i NGF (30). Mastociti također otpuštaju i histamin koji također izaziva lokalnu vazodilataciju. Postoji mogućnost i da histamin djeluje i na periferne živčane završetke preko H1 receptora i tako dodatno pojačava otpuštanje SP i CGRP (32). Tako se preko djelovanja spomenutih parakrinih čimbenika stvara pozitivna povratna sprega između mastocita i perifernih živčanih završetaka koja pojačava i održava lokalnu upalnu reakciju.

Neutrofili također izražavaju receptore NK1. Njihova aktivacija dovodi proizvodnje slobodnih kisikovih radikala, adhezije neutrofila na endotel krvnih žila i kemotaksije na mjesto aktivacije živčanih završetaka (33–35). Neutrofili lučenjem enzima (elastaze, kolagenaze) i proizvodnjom kisikovih radikala pojačavaju lokalnu upalnu reakciju.

1.2.4 Promjena osjetljivosti senzornih neurona za izazivanje neurogene upale

Neke tvari ne izazivaju direktno otpuštanje neuropeptida iz perifernih živčanih završetak nego čine te završetke osjetljivijima na prije navedene tvari koje izravno dovode do otpuštanja neuropeptida, što se naziva senzitizacija. Taj se učinak postiže snižavanjem praga podražaja koji je potreban za egzocitozu ili povećavanjem količine neuropeptida koji se otpusti prilikom jednog supraliminalnog (koji je veći od praga) podražaja (18). Do sada su poznate mnoge tvari koje izazivaju perifernu hiperalgeziju povećavanjem osjetljivosti prvih neurona puta za prijenos osjeta boli. Neke od njih su: kinini, katekolamini, histamin, serotonin, proupalni

citokini (IL1β, IL6, TNFα, IL8), prostaglandini (PGE_2, PGI_2), ATP i faktori rasta (NGF) (18,36). Ipak, za samo neke od njih je do sada eksplicitno pokazano da izravno povećavaju egzocitozu neuropeptidnih medijatora neurogene upale iz perifernih živčanih završetaka. To su: ATP, PGE_2, PGI_2, bradikinin (Tablica 2). Za proupalne citokine i NGF je pokazano da povećavaju egzocitozu neuropeptida, ali nije jasno je li to njihov izravan učinak na živčane završetke ili je posredovan nekim drugim stanicama (37,38). NGF bi mogao djelovati izravno na periferne završetke budući da su njegovi receptori (TrkA) dokazani na njima i pokrenuti signalnu kaskadu (MAPK) što bi rezultiralo transkripcijom određenih gena, ali učinak preko upalnih stanica nije isključen (39).

Bradikinin se veže za svoj receptor B2 i ATP se veže za svoj receptor (purinski P2Y). Oba su receptora združena s G_q-proteinima i kao takvi aktiviraju fosfolipazu C i preko diacilglicerola (DAG) protein kinazu C (PKC) (40). PKC zatim fosforilira TRPV1 receptore i time povećava njihovu vodljivost za ione kad su aktivirani temperaturom ili kapsaicinom (41,42). Zašto ATP usprkos istom molekularnom mehanizmu djelovanja poput bradikinina i triptaze ne uzrokuje izravno otpuštanje neuropeptida, nego samo senzitizaciju, još uvijek nije jasno. Moguće je da se radi o kvantitativnom fenomenu tj. da je količina otpuštenih neuropeptida pod izravnim djelovanjem ATP-a ispod razine opažanja.

Prostaglandini PGE_2 i PGI_2 se vezu za svoje receptore (EP i IP receptore) koji spadaju u skupinu receptora združenih s Gs-proteinima. Oni aktiviraju adenilil ciklazu koja sintezom cAMP aktivira protein kinazu A (PKA) (43). PKA zatim fosforilira neke od kanala za Na^+ i Ca^{2+} čime povećava njihovu vodljivost, a time i ulazak Ca2+ u citoplazmu te egzocitozu neuropeptida (42).

1.2.5 Alodinija i hiperalgezija

Alodinija je osjet boli izazvan podražajem koji uobičajeno ne izaziva bol. Povezuje s pojmom hiperalgezija koja označava osjet boli koji je prejak u odnosu na podražaj (44). Alodinija se dijeli s obzirom na modalitet osjeta kojim je izazvana (mehanička i temperaturna) i s obzirom na mjesto nastanka (periferna i centralna). Alodinija nastaje procesom senzitizacija u kojem neuroni puta osjeta boli postaju osjetljiviji na podražaje koji ih aktiviraju.

Periferna alodinija nastaje senzitizacijom prvih neurona puta boli. To se događa pod utjecajem lokalnih kemijskih tvari koje se oslobađaju u tkivo u stanjima oštećenja ili upale. Primjeri takvih tvari su: bradikinin, PGE_2, PGI_2, faktor aktivacije trombocita, dušični monoksid, histamin, serotonin, neki leukotrieni, NGF, proupalni citokini (45). Oni se vežu na svoje

receptore na živčanim završecima i potiču unutarstanične signalne procese koji povećavaju propusnost ionskih kanala za natrij i kalcij ili povećavaju osjetljivost receptora za algogene tvari te time povećavaju podražljivost neurona (36).

Centralna alodinija nastaje senzitizacijom neurona kralježnične moždine ili viših razina puta boli. Nastaje posredovanjem brojnih mehanizama. Aktivacija neurona na periferiji dovodi do otpuštanja CGRP i tvari P u kralježničku moždinu i time dovodi do senzitizacije drugog neurona puta boli (46). Mikroglija potaknuta ozljedom živca može otpuštati faktor rasta izveden iz mozga (BDNF) i tako dovesti do senzitizacije neurona stražnjih rogova kralježničke moždine (47). Također, centralna alodinija može nastati preko dezinhibicije spinotalamičkog puta. Postoje dokazi da pretjerana aktivacija TRPV1 receptora na inhibitornim GABAergičkim interneuronima dovodi do njihove dugotrajne depresije čime nestaje inhibicija spinotalamičkog puta i nastaje alodinija i hiperalgezija (48).

Na povezanost neurogene upale i alodinije upućuje činjenica da mnoge tvari koje uzrokuju ili pojačavaju neurogenu upalu djeluju kao senzitizatori perifernih neurona (npr. bradikinin, PGE_2, PGI_2) i tako uzrokuju alodiniju. Također, neurogena upala uzrokuje trajni i jaki bolni podražaj čime se stvara podloga za centralnu senzitizaciju. To potkrepljuje i činjenica da se u području kapsaicinom izazvane neurogene upale javlja i hiperalgezija (49–51).

1.2.6 Fenomen udaljene neurogene upale

U prethodnim dijelovima ovog teksta govorilo se o klasičnom poimanju neurogene upale. To znači da neurogena upala nastaje lokalno tj. u okolini podraženih živčanih završetaka Aδ i C vlakana. Ta se pojava objašnjava aksonskim refleksom. Međutim, postoje eksperimentalni dokazi da se neurogena upala može izazvati i na mjestima udaljenima od mjesta podražaja.

Fenomenom neurogene upale pokušala su se objasniti stanja: respiratorne, zglobne ili migrenske manifestacije nutritivnih alergija, anafilaksija te zglobne i probavne manifestacije reakcija na iritanse dišnog sustava (52). Pretpostavka je da podražaji izazvani medijatorima alergijske reakcije ili iritansima aktiviraju živce na nekom mjestu u tijelu te se prekapčanjem u središnjem živčanom sustavu nekim drugim živcem podražaj prenese u udaljeni organ i tamo izazove neurogenu upalu. Taj bi se fenomen nazivao živčano prekapčanje (*neurogenic switching*). Eksperimentalni modeli koji potkrepljuju ovu teoriju su: smanjenje smrtnosti štakora od anafilaksije nakon vagotomije (53) i smanjenje lučenja mastocitnih upalnih medijatora u plućima domaćeg zamorčića (*Cavia porcellus*) nakon stimulacije prednjeg hipotalamusa elektrodama (54). Ipak takvo se tumačenje nije održalo te je prevladalo

humoralno objašnjenje tih fenomena prema kojem medijatori upale putuju krvotokom i izazivaju upalu na udaljenim mjestima.

Drugi fenomen koji upućuje na mogućnost razvitka neurogene upale na udaljenom mjestu od inicijalnog podražaja je eksperimentalno opažanje na štakorima da upala izazvana u području inervacije trigeminalnog (petog moždanog) živca izaziva upalu dure.

1.3 Neurogena upala dure mater izazvana upalom u trigeminalnom području

Krvne žile tvrde moždane ovojnice (dura mater, u daljnjem tekstu dura) su inervirane simpatički iz cervikalnog ganglija, parasimpatički iz otičkog ganglija i, najbitnije, osjetno Aδ i C vlaknima iz trigeminalnog ganglija i mnogo manje iz prvog cervikalnog spinalnog ganglija (55,56). Da se neurogena upala pojavljuje u duri pokazano je pokusima na štakorima u kojima je intravenski dan kapsaicin izazvao ekstravazaciju proteina plazme u duri. Da je taj proces ovisan o Aδ i C vlaknima osjetljivim na kapsaicin pokazuje rezultat da je ta ekstravazacija mnogo manja kod životinja koje su u neonatalno doba bile tretirane kapsaicinom i tako su im ta vlakna uništena (57). Također, ekstravazacija u duri (i u području lica) štakora javlja se nakon električne stimulacije trigeminalnog ganglija. Tada je ekstravazacija istostrana primijenjenom podražaju (57).

Fenomen udaljene neurogene upale primijećen je u eksperimentima u kojima je upala izazvana u obrazu, temporomandibularnom zglobu i nosu štakora izaziva upalu dure (Tablica 3). Sva navedena područja su u inervirana trigeminalnim živcem. Također, operativna konstrikcija (podvezivanje) infraorbitalnog ili velikog okcipitalnog živca štakora također dovodi do upale dure.

Tablica 3: načini izazivanja upale dure postupcima u području trigeminalne inervacije. RIA – radio-imuno esej; CFA – kompletni Freundov adjuvans; *neobjavljeni rezultati prikazani u odlomku Rezultati

Mjesto izazvane upale	Upalni agens	Metoda evaluacije duralne upale	Referenca
obraz	formalin	ekstravazacija Evansovog plavila	(7)
temporomandibularni zglob	CFA	ekstravazacija Evansovog plavila, histologija, RIA na CGRP u duri	(8)

infraorbitalni živac	konstrikcija živca	ekstravazacija Evansovog plavila, histologija	(7,9)
veliki okcipitalni živac	konstrikcija živca	ekstravazacija Evansovog plavila	(9)
nos	formalin, kapsaicin	ekstravazacija Evansovog plavila	*

1.3.1 Specifičnost kranijalne dure

Taj se fenomen pokazao specifičnim za kranijalnu duru. Naime, konstrikcija ili ozljeda ishijadičnog živca štakora, provedena na isti način kao i konstrikcija infraorbitalnog živca, ne dovodi do upale lumbalne ni kranijalne dure (9). Upala je u tom pokusa mjerena preko ekstravazacije Evansovog plavila i histološkim brojenjem i karakteriziranjem upalnih stanica. Uzrok te specifičnosti kranijalne dure možda je opažanje da lumbalna dura štakora ima mnogo manje živčanih završetaka pozitivnih na tvar P i CGRP i manje mastocita nego što je slučaj s kranijalnom durom (58).

1.3.2 Upala dure nakon periferne stimulacije trigeminalnog živca je neurogenog porijekla

Upala dure nastala nakon boli izazvane u području trigeminalne inervacije je neurogenog porijekla. U prilog tome govori pronalazak da botulinum toksin tip A (BTXA) smanjuje upalu dure ako aplicira na isto mjesto kao i noksa koja izaziva upalu dure. BTXA je varijanta neurotoksina bakterije *Clostridium botulinum*. Djeluje tako da proteolitički cijepa protein SNAP25. Taj je protein jedna od ključnih komponenti sinaptičkog SNARE kompleksa koji je zadužen za egzocitozu sinaptičkih vezikula (59). Time BTXA onemogućuje oslobađanje neurotransmitera u sinapsi. Dugo se smatralo da on djeluje samo periferno na mjestu, izvan središnjeg živčanog sustava. Međutim, zadnji dokazi upućuju i na njegovo djelovanje u središnjem živčanom sustavu kamo dolazi retrogradnim aksonskim transportom (7,8).

Taj je fenomen primijećen u pokusima s davanjem kompletnog Freundovog adjuvansa u temporomandibularni zglob pri čemu je BTXA smanjio ekstravazaciju Evansovog modrila, infiltraciju dure upalnim stanicama i sadržaj CGRP u ekstraktu dure (8). BTXA smanjuje duralnu ekstravazaciju Evansovog plavila i nakon injiciranja formalina u obraz i nakon konstrikcije infraorbitalnog živca (7). Sustavni učinci su bili isključeni praćenjem motoričke aktivnosti štakora. Također, kolhicin, blokator aksonskog retrogradnog transporta, poništava efekt BTXA, što znači da BTXA smanjuje upalu dure mehanizmom vezanim uz živčana vlakna (7,8). To govori u prilog neurogenom porijeklu upale dure.

Sumatriptan je spoj koji se koristi u liječenju migrene, a djeluje kao serotoninski agonist na 5-HT_{1D} i 5-HT_{1B} receptorima koji se nalaze . Na migrenu djeluje tako da smanjuje otpuštanje CGRP (60). To je djelovanje ovisno o 5-HT_1 receptorima na neuronima (61). Pokazano je da sumatriptan smanjuje ekstravazaciju u duri nakon izazivanja upale temporomandibularnog zgloba sa CFA (8). Budući da sumatriptan djeluje preko neuralnih mehanizama, to govori u prilog da je upala dure neuralnog porijekla. To je u skladu s opažanjima da sumatriptan sprečava duralnu ekstravazaciju nakon električne stimulacije trigeminalnog ganglija i intravenskog davanja kapsaicina štakorima (62).

1.3.3 Mehanizam nastanka neurogene upale dure nakon periferne stimulacije trigeminalnog živca

Točan put prijenosa signala koji dovode do neurogene upale dure nakon periferne stimulacije trigeminalnog živca nije jasan. Naime, aktivacija živčanih vlakana s periferije se mora nekako prenijeti na vlakna koja završavaju na duri. Postoji nekoliko mogućih točaka prijenosa. Prva je da isti aksoni trigeminalnog živca grananjem inerviraju kožu i vezivo lica kao i duru pa se aktivnost prenese aksonskim refleksom. Druga je da se aktivnost prenosi s neurona koji inerviraju lice na one koji inerviraju duru unutar trigeminalnog ganglija. Treća je mogućnost da je ta pojava posljedica prijenosa aktivacije u središnjem živčanom sustavu tj. moždanom deblu.

Mogućnost da je aksonski refleks taj koji uzrokuje neurogenu upalu je mala budući da samo 1% neurona trigeminalnog ganglija koji inerviraju kožu čela štakora ima kolaterale za duralne krvne žile (63,64). To znači da je neurogena upala dure po mehanizmu nastanka drugačija od neurogene upale drugdje u tijelu budući da ona na drugim mjestima nastaje aksonskim refleksom za koji je potrebno da ogranci istog aksona djeluju kao senzori za noksu i inicijatori neurogene upale lučenjem tvari P i CGRP.

Ideja da se aktivnost neurona koji inerviraju ekstrakranijalne strukture prenosi na neurone koji inerviraju duru i njene krvne žile dolazi iz studija koje su pronašle pravilan prostorni raspored tijela neurona u trigeminalnom (Gasserovom) gangliju. Pokazalo se da oko svakog neurona koji inervira krvne žile dure postoji nakupina neurona koji inerviraju ekstrakranijalne strukture. To je posebno izraženo u dijelu ganglija koji se odnosi na prvu (oftalmičku) granu trigeminalnog živca (63). Osim anatomske podloge, postoje i funkcionalni dokazi. Stanice trigeminalnog ganglija kao odgovor na stimulaciju kapsaicinom mogu lučiti CGRP u ganglij i tako pobuditi susjedne stanice na aktivnost (65).

Najvjerojatnija je ideja da prijenos aktivnosti događa na razini moždanog debla. Pokazano je da aferentna vlakna iz dure i ekstrakranijalnih struktura konvergiraju na iste neurone spinalne jezgre trigeminalnog živca (66,67). Ta je konvergencija pokazana kod štakora i kod čovjeka. Također, pojava obostrane duralne upale nakon jednostrane bolne stimulacije u trigeminalnom području govori u prilog centralnom prijenosu aktivnosti budući da se pojava neurogene upale na drugoj strani ne može objasniti na razini aksona ili trigeminalnog ganglija. Taj je fenomen prisutan kod konstrikcije infraorbitalnog živca, davanja formalina u obraz i kod upale temporomandibularnog zgloba (7,8). Treba međutim napomenuti da je kod električne stimulacije trigeminalnog ganglija nađena samo istostrana upala dure (57).

1.3.4 Neurogena upala dure kao moguća podloga migrene

Vazodilatacija u sklopu neurogene upale dure bi mogla, prema vaskularnoj teoriji migrene, izazvati bol duralnog porijekla (68). Također, tvari koje luče mastociti (triptaza, ATP, prostaglandini, histamin) pod utjecajem tvari P uzrokuju depolarizaciju Aδ i C živčanih vlakana ili ih senzitiziraju i tako stvaraju potencijalnu podlogu za bolne senzacije duralnog porijekla (69). Nadalje, lijekovi koji su učinkoviti u liječenju migrene smanjuju i neurogenu upalu dure u eksperimentalnim modelima. To je pokazano za ergot alkaloide (70) i za triptane (8,60,62). Klinička opažanja i epidemiološke studije govore o komorbiditetu migrene i stanja koja bi se mogla povezati sa spomenutim eksperimentalnim modelima (disfunkcija temporomandibularnog zgloba, sinusitis, vidjeti odlomak 1.4.2). Ti podaci upućuju na neurogenu upalu kao jedan od mogućih patofizioloških mehanizama migrene.

1.4 Glavobolja

Prema trećem izdanju Međunarodne klasifikacije glavobolja (ICHD-3) glavobolja se definira kao bol iznad orbitomeatalne crte tj. crte koja spaja vanjski kut oka i sredinu vanjskog otvora zvukovoda (71). Dijeli se na primarnu i sekundarnu. Sekundarne imaju neki poznati uzrok (trauma, vaskularni uzrok, infekcija, tumor, ovisnost, psihijatrijski poremećaj), dok primarne nemaju. U primarne se glavobolje ubrajaju: tenzijska glavobolja, migrena, trigeminalne autonomne cefalgije i ostale primarne glavobolje (72). Klasifikacija se temelji na karakteru, jačini, mjestu i trajanju boli te pratećim simptomima.

Tenzijska glavobolja se javlja u epizodama koje traju 30 minuta do 7 dana. Bol je srednje jaka, stišćućeg je karaktera, bilateralna, lokalizirana frontalno ili okcipitalno. Može biti praćena fotofobijom ili fonofobijom ali nije praćena mučninom ili povraćanjem. Ne pogoršava se fizičkom aktivnošću (73). Prevalencija u odrasloj populaciji je oko 42% (74).

Migrena je također epizodičnog tipa s trajanjem od 4 do 72 sata. Bol je jača nego kod tenzijske glavobolje, probijajuća i pulsirajuća, jednostrana. Najčešće počinje oko oka ili frontotemporalno a kasnije napreduje okcipitalno. Može biti praćena fotofobijom, fonofobijom, mučninom i povraćanjem. Kod nekih joj ljudi prethodi aura u obliku vizualnih, drugih senzornih ili motoričkih simptoma. Prevalencija u odrasloj populaciji je oko 11% (74).

Trigeminalne autonomne cefalgije su skupni naziv za više vrsta glavobolja povezanih s autonomnim simptomima u području glave. Pojavljuju se mnogo rjeđe od ostalih primarnih glavobolje. Bolovi i simptomi autonomnog živčanog sustava su jednostrani i smješteni u području inervacije trigeminalnog živca. Dijeli se na klaster glavobolju, paroksizmalnu hemikraiju, kratkotrajne jednostrane neuralgiformne napade glavobolje i hemikraniju kontinuu.

- Epizode klaster glavobolje se u nakupinama (klasterima) koji traju između 2 tjedna i 3 mjeseca. Obično se na godinu pojave jedna do dvije nakupine. Bol se najčešće javlja u snu ili rano jutro, vrlo je jaka, probadajućeg karaktera, lokalizirana u blizini ili iza oka i temporalno. Praćena je istostranim suzenjem, rinorejom, miozom, edemom kapka ili znojenjem čela (75).
- Kod paroksizmalne hemikranije, bol se javlja 10 do 20 puta dnevno u epizodama koje traju 2 do 25 minuta i nisu vezane uz doba dana. Bol je vrlo jaka, probadajuća i praćena autonomnim simptomima koji su slični kao kod klaster glavobolje (76).
- Kratkotrajne jednostrani neuralgiformni napadi glavobolje javljaju kao jaka probadajuća bol u okolici oka. Napadaji traju 5 sekundi do 10 minuta i nisu vezani uz doba dana i mogu se javiti do 200 puta na dan. Praćeni su suzenjem, edemom vjeđa, znojenjem, nazalnom kongestijom ili rinorejom (77,78).
- Hemikrania kontinua je dugotrajna jednolična glavobolja koju prekidaju napadaji jakog intenziteta koji su praćeni istim autonomnim simptomima kao i klaster glavobolja. Karakteristično je da se bol vrlo dobro smanjuje na indometacin (79).

1.4.1 Primarna glavobolja i alodinija

Neke su vrste primarne glavobolje praćene alodinijom u području glave. Migrena je u 60% do 80% oboljelih povezana s kožnom alodinijom u području lica za vrijeme napada (80,81). Kožna je alodinija i neovisni rizični čimbenik za kronifikaciju migrene (81). Također je pokazano da je refleks treptanja specifičan za nocicepciju facilitiran kod osoba s migrenom što nije slučaj kod osoba s sinusnom glavoboljom kao oblikom sekundarne glavobolje (82).

U podlozi alodinije kod migrene stoji proces periferne i centralna senzitizacije. Što se tiče periferne senzitizacije tj. senzitizacije duralnih aferenta, pokazano je da neuroni koji inerviraju duru imaju sposobnost senzitizacije nakon primjene upalnih tvari (histamin i sl.) na duru ili sagitalni sinus. Time ti neuroni postaju osjetljivi na bezazlene podražaje kao što je malo povećanje intrakranijalnog tlaka. To bi moglo objasniti pojavu da radnje koje povećavaju intrakranijalni tlak (saginjanje) pojačavaju bol u migreni (83). Centralna se senzitizacija događa na razini moždanog debla odnosno trigeminalne kaudalne jezgre i talamusa. U kaudalnoj trigeminalnoj jezgri aksoni primarnih neurona koji dolaze iz dure i iz lica konvergiraju na iste sekundarne neurone (84). Aktivacija duralnih aferenti upalnim tvarima može dovesti do senzitizacije na razini sekundarnih neurona trigeminalne jezgre i tako smanjiti prag boli u području lica (85). Na razini talamusa se događa mnogo šira senzitizacija. Nakon kemijske stimulacije dure štakora, dolazi do jačeg okidanja talamičkih neurona kod bolnog podražaja na dijelovima tijela koji nisu inervirani trigeminalnim živcem, kao što je šapa, nego kad dura nije kemijski stimulirana (86). Sličan je fenomen nađen kod pacijenata s migrenom. Oni nakon podražaja na dorzumu šake imaju jaču aktivaciju posteriornog talamusa (dio talamusa uključen u prijenos osjeta boli) mjerenu funkcionalnom magnetskom rezonancom nego zdrave osobe (86). Molekularni su mehanizmi nastanka alodinije ukratko opisani u odlomku 1.2.5. Ovi podaci ukazuju da bi patogeneza migrene započinjala u duri. Podražaji dure dovode do centralne senzitizacije u trigeminalnoj kaudalnoj jezgri ili talamusu što uzrokuje alodiniju i hiperalgeziju u području lica. Međutim, postoje opažanja koja govore u prilog suprotnom procesu, a to je da bi lezije u području ekstrakranijalne inervacije trigeminalnog živaca mogle izazvati centralnu senzitizaciju i tako stvoriti podlogu za bol duralnog porijekla (odlomak 1.4.2) i da aktivnost neurona u trigeminalnoj kaudalnoj jezgri više ovisi o signalima iz lica nego iz dure (87).

Tenzijska je glavobolja također povezana s povećanom osjetljivošću na bol. Tako bolesnici koji pate od kronične tenzijske glavobolje imaju povećanu osjetljivost na pritisak na žvačne mišiće a efekt je još veći ako je tenzijskoj glavobolji pridruženi i migrena (88,89). Osim pojačane osjetljivosti područja glave, hiperalgezija se javlja i na drugim dijelovima tijela kao što je potkoljenica (90). U tom su ispitivanju pacijenti koji pate od tenzijske glavobolje imali niži prag boli na podraživanje električnom strujom potkoljenice od zdravih osoba. Za razliku od migrene, kod tenzijske se glavobolje pretpostavlja da ne nastaje zbog senzitizacije nekim podražajem, nego da je generalizirana povećana osjetljivost za bol perifernih struktura (fascija i mišića) koja uzrokuje centralnu senzitizaciju preduvjet za razvoj tenzijske glavobolje (91).

Klaster glavobolja se također povezuje s alodinijom. Alodinija se javlja u području glave, ali i, u manjem intenzitetu, drugdje na tijelu (92). Javlja se u 35% do 50% pacijenata (93,94). Studije o tome javlja li se samo u napadima ili i između njih nisu dale konzistentne rezultate.

1.4.2 Povezanost glavobolje s poremećajima u području trigeminalne inervacije

Za nekoliko se tipova glavobolja pokazalo da su povezane bolestima koje se javljaju u dijelovima glave koje inervira trigeminalni živac. Najviše se povezanosti pokazalo za migrenu, manje za tenzijsku glavobolju, dok su ostale glavobolje rjeđe te nema dovoljno podataka. Mnoga od stanja o kojima će se govoriti imaju u ICHD-3 klasifikaciji pridružene sekundarne glavobolje. Na primjer, glavobolja povezana s poremećajima temporomandibularnog zgloba ili sinusa mora imati sljedeće karakteristike da se klasificira kao sekundarna tom poremećaju: dokazana organska lezija, vremenska povezanost glavobolje i organske lezije i jačina glavobolje mora pratiti težinu organskog oštećenja (71). Međutim, ovdje će se govoriti o slučajevima kada se klinička slika glavobolje u potpunosti uklapa u neku od primarnih glavobolja te se pojava boli ne može jednostavno objasniti nađenom organskom patologijom.

1.4.3 Povezanost primarne glavobolje s poremećajima temporomandibularnog zgloba (TMZ)

Migrena se povezuje s bolestima TMZ (95). Mnoge epidemiološke studije ukazuju na tu povezanost. Tako je migrena najčešća primarna glavobolja kod osoba s poremećajima TMZ (3), što se razlikuje od opće populacije u kojoj je tenzijska glavobolja najčešća (74). Također, prevalencija nekog od simptoma poremećaja TMZ (bol zgloba ili žvačnih mišića, krepitacije u zglobu) je veća kod ljudi s migrenom. Ta je povezanost veća, što je više simptoma izraženo i jača je za migrenu nego za tenzijsku glavobolju (4).

1.4.4 Povezanost primarne glavobolje s poremećajima nosa i sinusa

Brojna patološka stanja nosne šupljine i sinusa su epidemiološki povezana s primarnim glavoboljama, poglavito migrenom. To je pokazano za neka upalna stanja (kronični sinusitis, alergijski rinitis) i anatomske abnormalnosti (septalni izbojak, intranazalne kontaktne točke) (1,2,96–103), ali patofiziološka osnova te povezanosti nije do sada istraživana niti su razvijeni životinjski modeli za proučavanje te povezanosti.

2 Hipoteza

Pretpostavljamo da je upalna bol izazvana u nosnoj šupljini praćena upalom tvrde moždane ovojnice (*dura mater*) i aktivacijom neurona u kaudalnoj jezgri trigeminalnog živca te da je bol praćena promjenom ponašanja eksperimentalnih životinja.

3 Ciljevi rada

Cilj je ovog rada se razviti eksperimentalni model za istraživanje upale nosne šupljine (rinosinusitis) i posljedične upalne boli. Bol će se mjeriti ponašanjem eksperimentalnih životinja i aktivacijom neurona kaudalne jezgre trigeminalnog živca. Daljnji je cilj ispitati je li eksperimentalni rinosinusitis povezan s upalom dure kao mogućom etiopatogenetskom podlogom migrene.

4 Materijali i metode

4.1 Eksperimentalne životinje

Za sve su pokuse korišteni mužjaci Wistar soja štakora stari četiri do pet mjeseci. Okoćeni su i uzgajani na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U dizajniranju i provođenju pokusa poštovala su se načela humanog postupanja sa životinjama: zamjena, smanjivanje i poboljšanje, odredbe Zakona o dobrobiti životinja (Narodne novine 19/1999) i Međunarodnog udruženja za proučavanje boli (104), a pokus je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (dozvola broj 07–76/2005–43). U pokusima u kojima su davanje intravenske injekcije i prilikom žrtvovanja životinje su bile u dubokoj anesteziji izofluranom ili ketamin/ksilazinom.

U pokusima kod kojih je određivana duralna upala i promatrano ponašanje životinja svaka eksperimentalna skupina sadržavala je 6 do 8 životinja, dok su skupine u pokusima s imunohistokemijskim bojanjem i određivanjem biheviora bile veličine 3 do 5 životinja.

4.2 Ispitivane tvari

4.2.1 Kapsaicin

U pokusima je korišten kapsaicin otopljen u metanolu do masenog udjela 20% s daljnjim razrjeđivanjem u fiziološkoj otopini. Instiliran je u dozi od 10 µL masenog udjela 0.1% u nosnu šupljinu u područje gdje se maksilarni sinus otvara nosni hodnik. Volumen od 10 µL određen je prema veličini nosnih šupljina i paranazalnih sinusa (12). Instiliranje se provodilo iglom (Hamilton 705 LT 50µl, Hamilton Company, Reno, Nevada, SAD) štakorima anesteziranim izofluranom ili pipetom kod budnih životinja.

4.2.2 Formalin

U pokusima je korišten formalin (formaldehid masene koncentracije 36%) (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) razrijeđen fiziološkom otopinom (otopina natrijevog klorida masene koncentracije 0.9%). Instiliran je u dozi 10 µL volumnog udjela 2.5% u nosnu šupljinu u područje gdje se maksilarni sinus otvara nosni hodnik. Instiliranje se provodilo iglom (Hamilton 705 LT 50µl, Hamilton Company, Reno, Nevada, SAD) štakorima anesteziranim izofluranom ili pipetom kod budnih životinja.

4.3 Korištene tvari (reagensi, kemikalije i otapala)

Životinjama su injicirane slijedeće tvari u otopinama: Evansovo modrilo (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), ketamin (Richter Pharma AG, Wels, Austrija), ksilazin (Alfasan, Woerder, Nizozemska), fiziološka otopina.

Za inhalacije su korištene slijedeće tvari: izofluran (Forane, Baxter, Deerfield IL, SAD).

Za obradu tkiva korištene su slijedeće tvari: saharoza, fosfatom puferirana otopina (PBS), formalin (Formaldehid 36%, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska), fiziološka otopina, formamid (Formamide, Honeywell, Muskegon, Michigan SAD: zečja primarna protutijela na c-Fos (sc-52, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), sekundarna fluorescentno obilježena protutijela koze protiv zečjih Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), normalni kozji serum (NGS) (Monosan, Uden, Holland), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sredstvo za uklapanje uzoraka za rezanje na kriostatu (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Japan), sredstvo za lijepljenje pokrovnica (FluoroGel, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

4.4 Određivanje upale tvrde moždane ovojnice i nosne sluznice

Budući da svaku upalu prati ekstravazacija proteina plazme, intenzitet upale dure i sluznice nosa određivan je neizravnim mjerenjem te ekstravazacije. Za to je korišten Milesov esej. U njemu se koristi boja Evansovo modrilo koja se veže za proteine plazme, najviše albumin, te zajedno s njima izlazi iz krvnih žila u tkivo u uvjetima povećane propusnosti krvnih žila (105) kao što je slučaj u upali (106). Ova je metoda i prije uspješno korištena za kvantifikaciju upale dure (7–9) i nosne sluznice (107).

4.4.1 Eksperimentalne skupine i tretiranje životinja

Pokus je obuhvaćao 21 životinje koje su podijeljene u tri skupine: skupina tretirana kapsaicinom (7 životinja), skupina tretirana formalinom (8 životinja) i kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom (6 životinja). Životinjama anesteziranim izofluranom je u lateralnu repnu venu injicirana otopina Evansovog modrila u dozi 40 mg/kg tjelesne mase u volumenu od 1 mL. Prije injiciranja rep štakora je zagrijan u toploj vodi i korijen repa je lagano pritisnut da se repne vene napune i tako olakša injiciranje. Nakon oporavka od anestezije (30 min) životinje su ponovno anestezirane izofluranom te su intranazalno tretirane fiziološkom otopinom, kapsaicinom ili formalinom kao što je opisano u odlomku 4.2.

4.4.2 Priprema tkiva

Nakon 45 minuta životinje su anestezirane ketamin/ksilazinom, torakotomirane i transkardijalno perfundirane sa 500 mL fiziološke otopine da se ispere krv i Evansovo modrilo koje nije u tkivu. Dura je izvađena nakon kraniotomije i vađenja mozga. Prikupljana je dura iz prednje i srednje lubanjske jame i kalote lubanje jer su ta područja inervirana ograncima trigeminalnog živca (108). Budući da su životinje tretirane u desnu nosnicu, sluznica je izvađena iz donjeg desnog nosnog hodnika nakon što je lubanja uzdužno prepolovljena i izvađen nosni septum.

4.4.3 Kvantifikacija upale

Prikupljeno tkivo je izvagano i ostavljeno u 2 mL otopine formamida na temperaturi od 37˚C kroz 48 sati da se Evansovo modrilo ekstrahira iz tkiva u otopinu (105). Otopina se zatim dekantira u epruvete te joj se mjeri apsorbancija spektrofotometrom (Iskra, Ljubljana, Slovenija) na valnoj duljini 620 nm (109). Iz dobivenih se apsorbancija, prema baždarnoj krivulji dobivenoj za to mjerenje, izračuna količina Evansovog modrila u otopini. Dobivena sa vrijednost podijeli s masom tkiva dure odnosno nosne sluznice i tako se dobije maseni udio Evansovog modrila (ng Evansovog modrila / mg tkiva).

4.5 Određivanje aktivacije neurona kaudalne jezgre trigeminalnog živca

Neuroni koji inerviraju područje nosne šupljine i duru mater prednje i srednje lubanjske jame se prekapčaju u kaudalnoj jezgri trigeminalnog živca (Sp5C) (110–112). Stoga je mjerenje aktivnost neurona u Sp5C dobar pokazatelj postojanja i jačine boli u području trigeminalne inervacije te korelira s bihevioralnim testovima za bol (113). Mjerenje aktivnosti se provodi imunohistokemijskim bojanjem prereza Sp5C na c-Fos koji je marker rane aktivacije neurona na bolni podražaj dok se na lagani podražaj on ne eksprimira (114).

4.5.1 Eksperimentalne skupine i tretiranje životinja

Pokus je obuhvaćao 8 životinja koje podijeljene u dvije skupine: skupina tretirana formalinom i kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom. Štakori su bez anestezije tretirani formalinom i fiziološkom otopinom kao što je opisano u odlomku 4.2 Ispitivane tvari. Životinje su potom promatrane 40 minuta.

4.5.2 Priprema tkiva

Nakon toga životinje su anestezirane ketamin/ksilazinom, torakotomirane i transkardijalno perfundirane sa 500mL fiziološke otopine da se ispere krv i 250mL fiksativa (4% formaldehid

u PBS) kako prilikom vađenja tkiva za analizu ne bi došlo do oštećenja. Nakon kraniotomije, moždana su debla izvađena te su ostavljena u 15% otopini saharoze u fiksativu na 4˚C dok tkivo ne potone, a potom su premještena u 30% otopinu saharoze u PBS kroz 24 sata na 4˚C. Tkivo je potom smrznuto na -80˚C uklopljeno u Tissue-Tek i rezano na kriotomu na debljinu od 30μm. Rezovi regija od interesa (Sp5C) su stavljeni u jažice s 0.25%vol otopinom deterdženta Triton X-100 u PBS (u daljnjem tekstu PBST).

4.5.3 Imunohistokemijsko bojanje

U imunohistokemijskom bojanju korišteno je primarno protutijelo na C-Fos i sekundarno fluorescentno obilježeno protutijelo. Reprezentativni prerezi su izabrani i stavljeni u jažice, tri puta isprani u 500mL PBST po 5 minuta uz njihanje. Nakon ispiranja, u svrhu blokiranja nespecifične imunoreaktivnosti, uzorci su inkubirani u 500mL 10%vol NGS kroz 60 minuta i potom se postupak od tri ispiranja u PBST ponovio. Zatim je dodano 200mL otopine primarnog protutijela na c-Fos u razrjeđenju 1:500 u PBST i ostavljeno na inkubaciju 24 sata. Potom je ponovljen postupak ispiranja 3 puta sa PBST te je dodano fluorescentno obilježeno sekundarno protutijelo za inkubaciju 2 sata u mraku. Nakon ispiranja 3 puta sa PBST, prerezi su posloženi na stakalca i nakon sušenja pokriveni sredstvom za lijepljenje pokrovnica i pokrovnim stakalcima.

4.5.4 Kvantifikacija ekspresije c-Fos

Stakalca s prerezima su promatrana pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX-51, Olympus, Tokyo, Japan), odabrana su 3 ili 4 prereza svake životinje u razini Sp5C te je cijela površina Sp5C fotografirana u 3 dijela digitalnom kamerom (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan). Za brojenje stanica pozitivnih na c-Fos korišten je računalni program (cellSens Dimension, Olympus, Tokyo, Japan). Ručno je na svakoj fotografiji određeno područje na kojem se broje signali da se izbjegne dvostruko prebrojavanje zbog preklapanja fotografija. Broj signala je zbrojen za svaku životinju, posebno za lijevu i desnu stranu.

4.6 Bihevioralni testovi za mjerenje boli

Za mjerenje boli na osnovu ponašanja štakora korištena je ljestvica izraza lica štakora (*rat grimace scale* – RGS) (115). To je semikvantitativna metoda procjene stupnja boli štakora na osnovu 4 parametra: stisnutost kapaka, zaravnavanje nosa i obraza, promjene ušiju i promjene brkova. Svakoj od tih kategorija daje se vrijednost od 0 do 2 boda u odnosu na poznate standarde. Izračuna se zbroj vrijednosti pojedinih parametara te se dobije vrijednost za svaku životinju.

4.6.1 Eksperimentalne skupine i tretiranje životinja

U pokus je uključeno 12 štakora (8 onih koji su korišteni za određivanje c-Fos u Sp5C i 4 dodatna) koji su podijeljeni u 3 eksperimentalne skupine: skupina koja nije ničim tretirana (3 životinje), skupina tretirana fiziološkom otopinom (4 životinje), skupina tretirana formalinom (5 životinja). Štakori su bez anestezije tretirani formalinom i fiziološkom otopinom kao što je opisano u odlomku 4.2 Ispitivane tvari. Pristup bez anestezije je korišten jer se pokazalo da anestezija izofluranom utječe na ponašanje životinja i smanjuje bihevioralno izražavanje boli.

4.6.2 Mjerenje ponašanja životinja prema RGS

Životinje su potom promatrane 40 minuta te su fotografirane digitalnom kamerom u intervalima od 3 minute. Od 4 moguća parametra u ovom su pokusu korištena tri dok zaravnavanje nosa i obraza nije jer životinje nisu pokazivale nikakvu promjenu u tom parametru. Fotografije su bile obilježene na način nevidljiv ocjenjivaču.

4.7 Statistička obrada rezultata

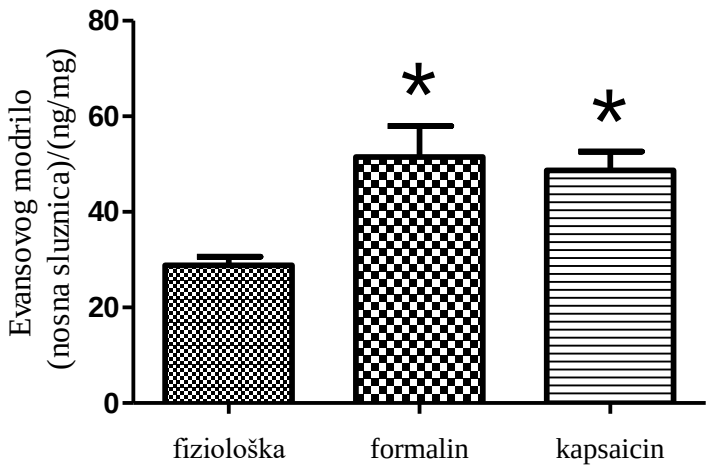
Za statističku obradu rezultata korišten je program GaphPad Prism v.5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD). Nakon analize varijance statistička značajnost je provjerena s Newman-Keuls post hoc testom. Za analizu povezanosti varijabli korišteni su Pearsonov koeficijent korelacije (r) i linearna regresija. Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine i standardne pogreške aritmetičke sredine (SEM). Statistički značajnom se smatrala vrijednost p manja od 0.05 ($p < 0.05$).

5 Rezultati

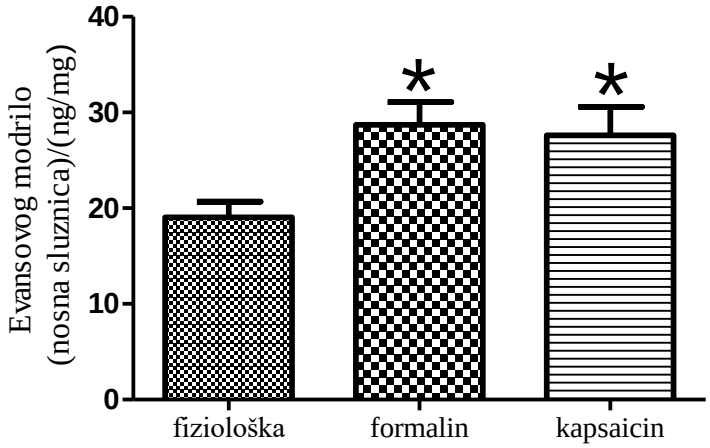
5.1 Odnos upale nosne suznice i upale dure.

Kao što je i očekivano, kapsaicin i formalin dovode upale nosne sluznice što se vidi povećanom ekstravazacijom Evansovog modrila u nosnoj sluznici životinja koje su tretirane kapsaicinom ili formalinom u odnosu na životinje tretirane fiziološkom otopinom (Slika 1) što znači da je upala u nosu životinja uspješno izazvana. Upala je bila lokalizirana najviše oko mjesta instiliranja formalina ili kapsaicina (ulaz u maksilarni sinus) što je primijećeno prilikom vađenja nosne sluznice.

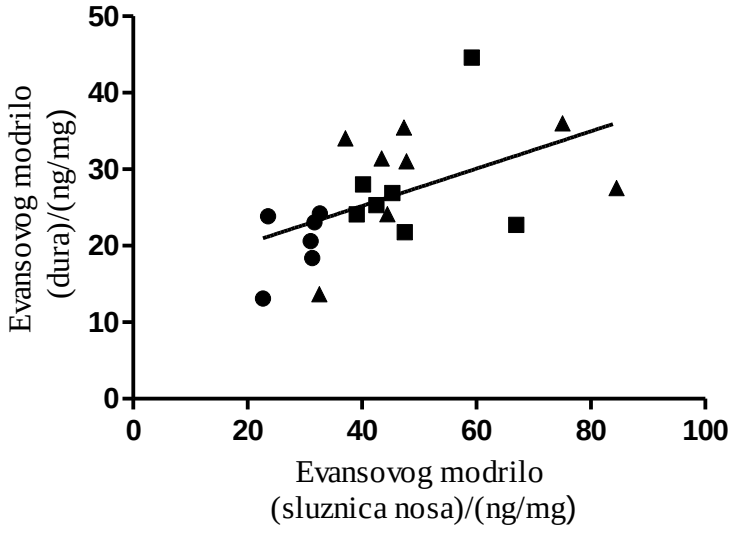
Kapsaicin i formalin dani intranazalno također dovode do pojačane ekstravazacije Evansovog modrila u duri što se može pripisati upali dure (Slika 2). Korelacija između ekstravazacije Evansovog modrila nosne sluznice i dure je prisutna što znači da što je jača upala nosne sluznice to je i upala dure jačeg intenziteta (Slika 3).



Slika 1: Davanje kapsaicina (0.1%) ili formalina (2.5%) u nos štakora praćeno je upalom nosne sluznice i posljedičnom ekstravazacijom Evansovog modrila u sluznicu nosne šupljine (izraženo u nanogramu Evansovog modrila po miligramu tkiva). *$p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu fiziološkom otopinom



Slika 2: Davanje kapsaicina (0.1%) ili formalina (2.5%) u nos štakora praćeno je ekstravazacijom Evansovog modrila u tkivo dure (izraženo u nanogramu Evansovog modrila po miligramu tkiva). *p < 0.05 u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu fiziološkom otopinom

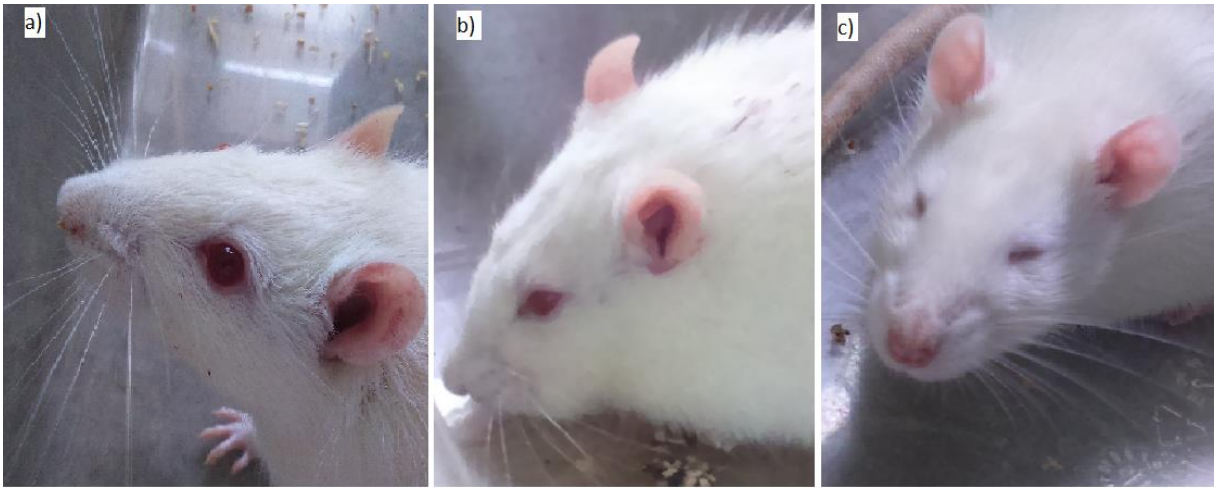


Slika 3: Pravac linearne regresije između upale nosne sluznice i upale dure. Prikaz za sve eksperimentalne skupine zajedno: krug – fiziološka, trokut – formalin, kvadrat – kapsaicin. (R^2 = 0,2712; p = 0.0155)

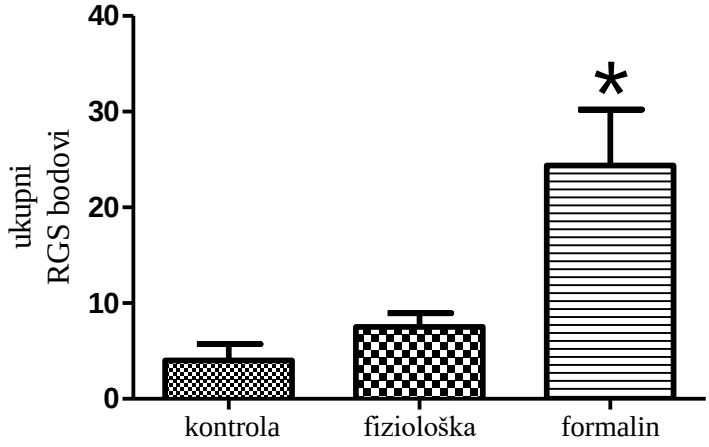
5.2 Bihevioralne promjene

Ponašanje životinja mjereno preko promjene izraza lica se mijenja pod utjecajem intranazalnog davanja formalina (Slika 4). Životinje kojima je dan formalin imaju veće RGS bodove u odnosu na skupinu tretiranu fiziološkom otopinom ili skupinu bez intranazalnog tretmana (Slika 5). Također postoji mala, ali značajna korelacija između promjene ponašanja

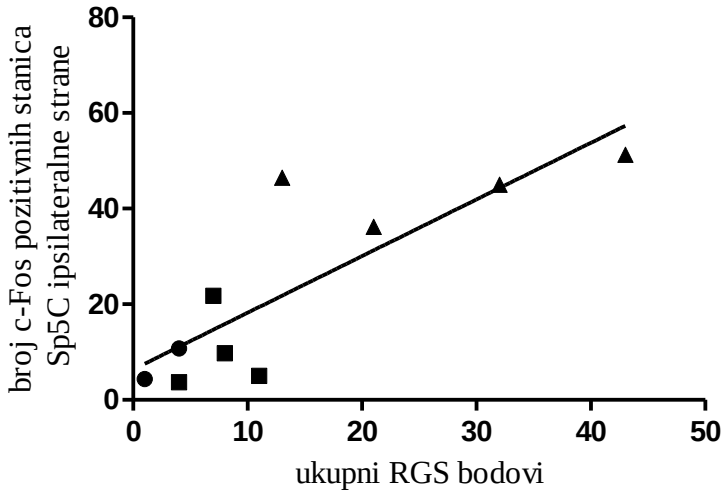
životinja pod utjecajem boli mjerene RGS metodom i broja c-Fos pozitivnih stanica po prerezu Sp5C (Slika 6) što pokazuje da je aktivnost Sp5C zadovoljavajuća posredna mjera boli u ovom modelu.



Slika 4: Reprezentativne fotografije izraza lica životinja nakon davanja fiziološke otopine (slika a, bez boli) ili formalina (slike b i c, srednja odnosno jaka bol) u nos. Vide se promjene u položaju brkova, stisnutosti očnih kapaka te položaju i obliku uški.



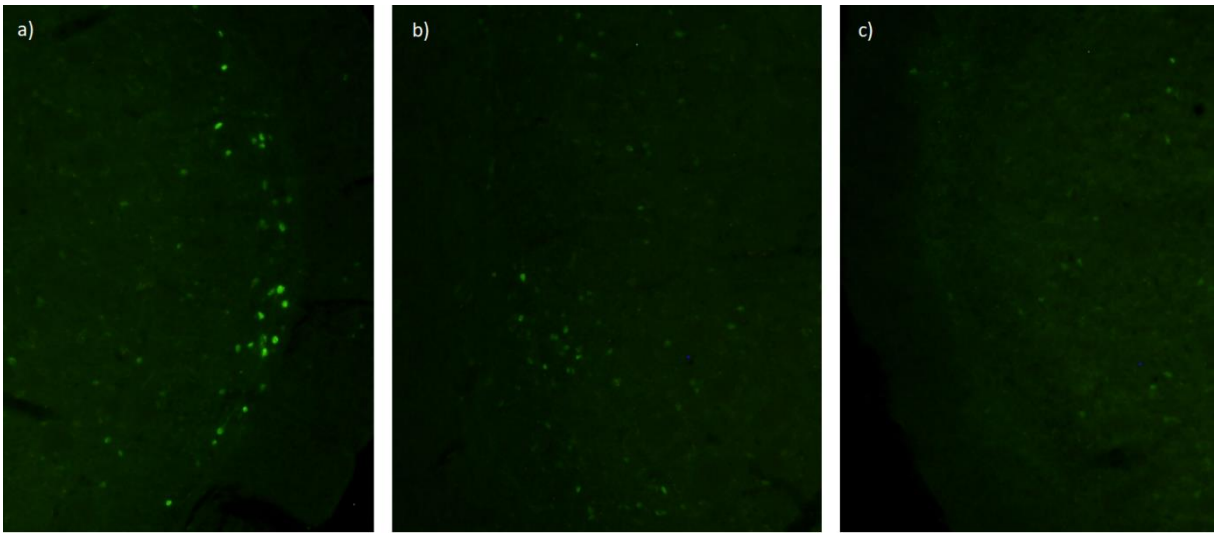
Slika 5: RGS bodovi skupljeni tijekom promatranja životinja kroz 39 minuta nakon intranazalnog davanja formalina ili fiziološke otopine u odnosu na skupinu životinja koja nije tretirana intranazalno. *$p < 0.05$ u odnosu na skupinu tretiranu fiziološkom otopinom i kontrolnu skupinu.



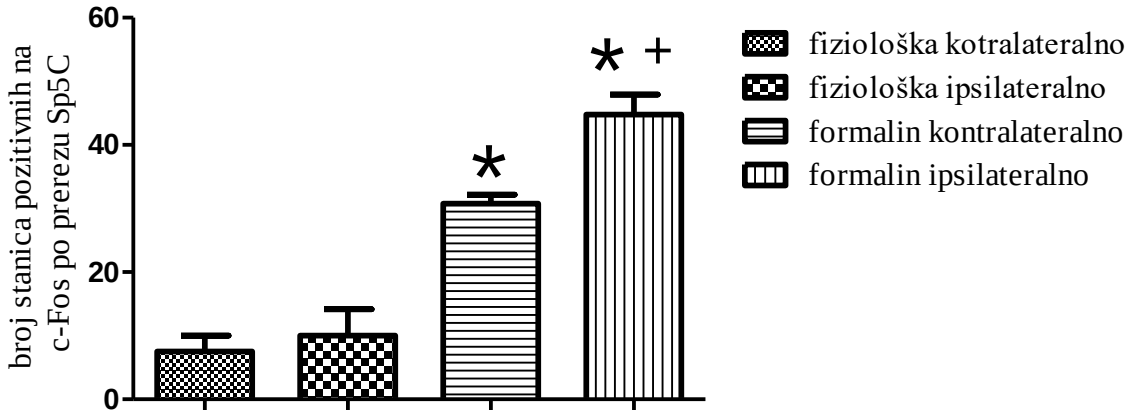
Slika 6: Korelacija između ukupnih RGS bodova tijekom 40 minuta promatranja životinja (vodoravna os) i broja c-Fos pozitivnih stanica po prerezu Sp5C ipsilateralne tretiranoj nosnici ili prosjeka obje Sp5C ukoliko se radi o životinjama bez tretmana (okomita os) za sve eksperimentalne skupine zajedno: krug – bez tretmana, kvadrat – fiziološka otopina, trokut – formalin. (R^2 = 0,6948; p = 0.0027)

5.3 Aktivacija neurona kaudalne spinalne trigeminalne jezgre

Prema očekivanjima, upala i bol izazvana instiliranjem formalina izaziva aktivaciju Sp5C što se može pratiti imunohistokemijskim mjerenjem ekspresije gena ranog odgovora c-Fos. Životinje tretirane formalinom imaju viši izražaj c-Fos u Sp5C u odnosu na životinje tretirane fiziološkom otopinom što se vidi promatranjem prereza na fluorescentnom mikroskopu (Slika 7) i nakon kvantifikacije fluorescentnog signala (Slika 8). Također, jezgra koja je na istoj strani (ipsilateralna) kao i nosnica u koju je formalin instiliran pokazuje jaču aktivaciju od one na suprotnoj strani (kontralateralna).



Slika 7: Fluorescentna mikroskopska fotografija Sp5C štakora kojima je dan formalin (2.5%) u jednu nosnicu obojane monoklonskim protutijelima na c-Fos koji je marker rane aktivacije neurona puta boli. a) Jezgra na istoj strani kao i davanje formalina. b) Jezgra na suprotnoj strani od davanja formalina. c) Jezgra životinje kojoj je dana fiziološka otopina.



Slika 8: Broj imunohistokemijski pozitivnih stanica na c-Fos po jednom prerezu Sp5C jedne strane. Termini ipsilateralno i kontralateralno označavaju stranu na kojoj je analiziran broj c-Fos – pozitivnih stanica u Sp5C u odnosu na stranu intranazalnog tretmana (fiziološka otopina ili 2.5% formalin). * $p < 0.001$ u odnosu na fiziološka kontralateralno i ipsilateralno. + $p < 0.01$ u odnosu na formalin kontralateralno.

6 Rasprava

6.1 Upala nosne sluznice povezana je s upalom tvrde moždane ovojnice

Od prije je poznato da eksperimentalna upala u području trigeminalne inervacije izaziva neurogenu upalu dure (Tablica 3). Do sada je istraživana upala u potkožnom i mišićnom tkivu lica (7) i u temporomandibularnom zglobu (8). Obje strukture spadaju u mezenhimska vezivna ili mišićna tkiva. Rezultati prikazani ovdje pokazuju da i djelovanje upale izazvane kemijskim sredstvima na epitelnom tkivu kao što je sluznica nosa mogu izazvati upalu dure (Slika 2). Ovdje je mjerena samo jedna komponenta upale dure: povećana propusnost krvnih žila preko ekstravazacije Evansovog modrila. Međutim, već je pokazano da je propusnost krvnih žila dure praćena i drugim komponentama upale kao što je infiltracija upalnim stanicama kad je upala dure izazvana manipulacijom grana trigeminalnog živca (9). Odnos između intenziteta upale nosne sluznice i dure je proporcionalan što znači da je jača upala nosne sluznice povezana s jačom upalom dure (Slika 3). Takav kvantitativan odnos nije u tolikoj mjeri prisutan kod upale dure izazvane upalom u potkožnom i mišićnom tkivu lica ili TMZ (7,8).

Epidemiološke i kliničke studije su pokazale povezanost različitih patoloških stanja nosne šupljine i sinusa s migrenom. Studija koja je istraživala povezanost širokog spektra respiratornih simptoma od kojih neki nisu primarno patologija nosa (astma, kronični bronhitis, peludna groznica) s migrenom, pokazala je da migrena 1.5 puta češća kod bolesnika s tim poremećajima nego u općoj populaciji (116). Studije koje su istraživale koliko dio glavobolja koje su pripisivane bilo kojoj patologiji sinusa odgovara kliničkoj slici migrene pokazale su da više od 86% tih pacijenata ispunjava kriterije za migrenu ili vjerojatnu migrenu (96,97). Alergijski rinitis povezan je s migrenom (2), a mogao bi biti jedan od uzročnih čimbenika budući da je kohortna studija na djeci pokazala relativni rizik obolijevanja od migrene 3.2 ako dijete boluje od alergijskog rinitisa (98). Također, frekvencija epizoda migrene je veća kod pacijenata koji boluju od miješanog rinitisa (99). Kronični sinusitis je također povezan s migrenom, ali je povezanost još jača kod trigeminalne autonomne cefalgije (100).

Osim upalnih bolesti nosa i sinusa, i anatomske su abnormalnosti povezane s migrenom. Ipak, treba reći da dokazi u ovom polju još nisu toliko opsežni. Anatomske varijante koje se povezuju s migrenom su: septalni izbojak, bulozna srednja nosna školjka, sinusne patologija i intranazalne kontaktne točke (1). Intranazalne kontaktne točke (mjesta gdje se sluznica nosa

dodiruje, a ne bi trebala biti u kontaktu) i septalni izbojak (koštana izraslina septuma koja može vršiti kontakt s srednjom nosnom školjkom) su najviše proučavani. Pacijenti koji imaju migrenu češće imaju intranazalne kontaktne točke (102), a njihovo operativno uklanjanje može kod nekih pacijenata dovesti do poboljšanja migrene (101). Također, operativno uklanjanje septalnog izbojka može dovesti do olakšavanja migrene (103).

Ovdje pokazana povezanost upale nosne sluznice i upale dure bi mogla biti jedna od patofizioloških podloga epidemiološke veze između patologije nosne šupljine i primarne glavobolje.

6.2 Aktivacija neurona Sp5C i bihevioralne promjene

Formalinom izazvana upala i posljedična bol uzrokuje aktivaciju neurona Sp5C mjerenu ekspresijom markera rane aktivacije c-Fos (Slika 8) i promjenu ponašanja životinja mjerenu preko izraza lica (Slika 5). Praćenje tih parametara bi mogla biti dobra mjera u budućim ispitivanjima analgetskog učinka nekih tvari na bol porijekla nosne šupljine ili sinusa. Naime, te bi tvari ako imaju analgetski učinak trebale smanjiti ekspresiju c-Fos u Sp5C i promjenu ponašanja kao što je pokazano u slučaju davanja formalina u obraz štakora i korištenja botulinum toksina kao analgetika (113). Također bi bilo zanimljivo istražiti ovisi li promjena ponašanja životinja više o intenzitetu upale nosne sluznice ili dure.

Alodinija i hiperalgezija izazvana perifernom ili centralnom senzitizacijom trigeminalnog puta boli (odlomci 1.2.5 i 1.4.1) bi također mogle biti patofiziološka podloga veze poremećaja nosne šupljine i sinusa sa primarnim glavoboljama budući da smo ovdje pokazali da upala nosne šupljine izaziva aktivaciju stanica Sp5C (Slika 8). Budući da prvi neuroni puta boli iz nosne šupljine i dure konvergiraju na iste sekundarne neurone u Sp5C (67), njihova aktivacija bolnim podražajem iz nosa može ih senzitizirati te oni postanu osjetljivi na inače neškodljive podražaje dure što se manifestira kao glavobolja.

7 Zahvale

Hvala mentoru ovoga rada dr. sc. Ivici Mataku koji me je neumorno vodio kroz praktični i pisani dio ovoga rada i prof. dr. sc. Zdravku Lackoviću na prilici da se i studenskim danima bavim jednim dijelom znanstvenim radom. Zahvalio bih i Katedri za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pruženim resursima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć te gospođi Božici Hržan na velikoj pomoći u izvođenju pokusa.

Htio bih zahvaliti svojoj zaručnici i cijeloj obitelji na podršci koju mi pružaju kako kroz život, studiranje i pisanje ovog rada.

8 Bibliografija

1. Lee M, Erickson C, Guyuron B. Intranasal Pathology in the Migraine Surgery Population: Incidence, Patterns, and Predictors of Surgical Success. Plast Reconstr Surg. 2017;139(1):184–9.

2. Ku M, Silverman B, Prifti N, Ying W, Persaud Y, Schneider A. Prevalence of migraine headaches in patients with allergic rhinitis. Ann Allergy, Asthma Immunol. 2006;97(2):226–30.

3. Franco AL, Gonçalves DAG, Castanharo SM, Speciali JG, Bigal ME, Camparis CM. Migraine is the most prevalent primary headache in individuals with temporomandibular disorders. J Orofac Pain. 2010;24(3):287–92.

4. Gonçalves DAG, Bigal ME, Jales LCF, Camparis CM, Speciali JG. Headache and Symptoms of Temporomandibular Disorder: An Epidemiological Study. Headache J Head Face Pain. 2010;50(2):231–41.

5. Goadsby P. Pathophysiology of migraine. Ann Indian Acad Neurol Suppl 1. 2012;15:15–22.

6. Burstein R, Noseda R, Borsook D. Migraine: Multiple Processes, Complex Pathophysiology. J Neurosci. 2015;35(17):6619–29.

7. Filipović B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central action of peripherally applied botulinum toxin type a on pain and dural protein extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. PLoS One. 2012;7(1):1–8.

8. Lacković Z, Filipović B, Matak I, Helyes Z. Activity of botulinum toxin type A in cranial dura: implications for treatment of migraine and other headaches. Br J Pharmacol. 2016;173(2):279–91.

9. Filipović B, Matak I, Lacković Z. Dural neurogenic inflammation induced by neuropathic pain is specific to cranial region. J Neural Transm. 2014;121(5):555–63.

10. Jia M, Chen Z, Du X, Guo Y, Sun T, Zhao X. A simple animal model of Staphylococcus aureus biofilm in sinusitis. Am J Rhinol Allergy. 2014;28(2):115–9.

11. Kim JH, Yi JS, Gong CH, Jang YJ. Development of Aspergillus protease with ovalbumin-induced allergic chronic rhinosinusitis model in the mouse. Am J Rhinol Allergy. 2014;28(6):465–70.

12. Phillips JE, Ji L, Rivelli MA, Chapman RW, Corboz MR. Three-dimensional analysis of rodent paranasal sinus cavities from X-ray computed tomography (CT) scans. Can J Vet Res. 2009;73(3):205–11.

13. Kim J--P, Kim E-A, Ahn S-K, Kim B-G. Rat model of platelet-activating factor-induced rhinosinusitis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2005;114:393–8.

14. Ye J, He JP, Liu ZJ. Olfactory mucosal microstructural changes in a rat model of acute rhinosinusitis with dysosmia. Genet Mol Res. 2014;13(2):3859–68.

15. Ahn S-K, Jeon S-Y, Khalmuratov R, Kim D-J, Kim J-P, Park J-J, et al. Rat Model of Staphylococcal Enterotoxin B-Induced Rhinosinusitis. Clin Exp Otorhinolaryngol. 2008;1(1):24.

16. Zhang F, An Y, Li Z, Zhao C. A novel model of invasive fungal rhinosinusitis in rats. Am J Rhinol Allergy. 2013;27(5):361–6.

17. Chung Y-J, Kim HY, Chung S-K, Dhong H-J. A time course study on the development of allergen-induced nasal airway remodeling in a rat model. Am J Rhinol Allergy. 2012;26(6):421–7.

18. Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. J Pharmacol Exp Ther. 2002;302(3):839–45.

19. Belvisi MG. Sensory nerves and airway inflammation: Role of Aδ and C-fibres. Pulm Pharmacol Ther. 2003;16(1):1–7.

20. Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P. The transient receptor potential vanilloid 1: Role in airway inflammation and disease. Eur J Pharmacol. 2006;533(1–3):207–14.

21. Olah Z, Szabo T, Karai L, Hough C, Fields RD, Caudle RM, et al. Ligand-induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1. J Biol Chem. 2001;276(14):11021–30.

22. Tang H Bin, Inoue A, Iwasa M, Hide I, Nakata Y. Substance P release evoked by capsaicin or potassium from rat cultured dorsal root ganglion neurons is conversely modulated with bradykinin. J Neurochem. 2006;97(5):1412–8.

23. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. Nat Med. 2000;6(2):151–8.

24. Kashihara Y, Sakaguchi M, Kuno M. Axonal transport and distribution of endogenous calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve. J Neurosci. 1989;9(11):3796–802.

25. Haass M, Skofitsch G. Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptidein the pithed rat: comparison with substance P. Life Sci. 1985;37:2085–90.

26. Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR. CGRP and migraine: Neurogenic inflammation revisited. J Headache Pain. 2005;6(2):61–70.

27. Dickerson IM. Role of CGRP-Receptor Component Protein (RCP) in CLR/RAMP. Curr Protein Pept Sci. 2013;14(5):407–15.

28. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature. 1985;313(3):54–6.

29. Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(9):2975–9.

30. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. Br J Pharmacol. 2013;170(1):38–45.

31. Nakanishi M, Furuno T, Words K. Molecular Basis of Neuroimmune Interaction in an. Immunology. 2008;(4).

32. Tani E, Ishikawa T. Histamine Acts Directly on Calcitonin Gene-Related Peptide- and Substance P-Containing Trigeminal Ganglion Neurons as Assessed by Calcium Influx and Immunocytochemistry. Auris Nasus Larynx. 1990;17(4):267–74.

33. Richter J, Andersson R, Edvinsson L, Gullberg U. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) activates human neutrophils - Inhibition by chemotactic peptide antagonist BOC-MLP. Immunology. 1992;77(3):416–21.

34. Helme RD, Eglezos A, Hosking CS. Substance P induces chemotaxis of neutrophils in normal and capsaicin-treated rats. Immunol Cell Biol. 1987;65 (Pt 3):267–9.

35. Kitamura A. NII-Electronic Library Service. TranProcPaleontSocJapan. 1991;(162):767–80.

36. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. Jt Bone Spine. 2005;72(5):359–71.

37. Watkins LR, Maier SF. THE PAIN OF BEING SICK: Implications of Immune-to-Brain Communication for Understanding Pain. Annu Rev Psychol. 2000;51:29–57.

38. Liu L, Shenoy M, Pasricha PJ. Substance P and calcitonin gene related peptide mediate pain in chronic pancreatitis and their expression is driven by nerve growth factor. JOP. 2011;12(4):389–94.

39. Woolf CJ. Phenotypic modification of primary sensory neurons: the role of nerve growth factor in the production of persistent pain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1996;351(1338):441–8.

40. Stucky CL, Medler KA, Molliver DC. The P2Y agonist UTP activates cutaneous afferent fibers. Pain. 2004;109(1–2):36–44.

41. Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. Pharmacol Res. 2007;55(6):578–589.

42. Malmberg AB. Protein kinase subtypes involved in injury-induced nociception. Prog Brain Res. 2000;129(650):51–9.

43. Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. J Neurosci. 1995;15(7 Pt 2):5411–9.

44. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. Lancet Neurol. 2014;13(9):924–35.

45. Petho G, Reeh PW. Sensory and Signaling Mechanisms of Bradykinin, Eicosanoids, Platelet-Activating Factor, and Nitric Oxide in Peripheral Nociceptors. Physiol Rev. 2012;92(4):1699–775.

46. Lolignier S, Eijkelkamp N, Wood JN. Mechanical allodynia. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2014;467(1):133–9.

47. Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. Nat Neurosci. 2008;15(8):1068–1073.

48. Kim YH, Back SK, Davies AJ, Jeong H, Jo HJ, Chung G, et al. TRPV1 in GABAergic Interneurons Mediates Neuropathic Mechanical Allodynia and Disinhibition of the Nociceptive Circuitry in the Spinal Cord. Neuron. 2012;74(4):640–7.

49. Di Giminiani P, Petersen LJ, Herskin MS. Capsaicin-induced neurogenic inflammation in pig skin: A behavioural study. Res Vet Sci. 2014;96(3):447–53.

50. LaMotte RH, Shain CN, Simone D a, Tsai EF. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. J Neurophysiol. 1991;66(1):190–211.

51. Raja SN, Campbell JN, Meyer RA. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. Brain. 1984;107(4):1179–88.

52. Meggs WJ. Neurogenic switching: A hypothesis for a mechanism for shifting the site of inflammation in allergy and chemical sensitivity. Environ Health Perspect. 1995;103(1):54–6.

53. Levy RM, Rose JE, Johnson JS. Effect of vagotomy on anaphylaxis in the rat. Clin Exp Immunol. 1976;24(1):96–101.

54. Leslie CA, Mathe AA. Modification of guinea pig lung anaphylaxis by central nervous system (CNS) perturbations. J Allergy Clin Immunol. 1989;83(January 1989):94–101.

55. Mayberg M, Langer RS, Zervas NT, Moskowitz MA. Perivascular meningeal projections from cat trigeminal ganglia: possible pathway for vascular headaches in man. Science. 1981;213(4504):228–30.

56. Uddman R, Hara H, Edvinsson L. Neuronal pathways to the rat middle meningeal artery revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. J Auton Nerv Syst. 1989;26(1):69–75.

57. Markowitz S, Saito K, Moskowitz M a. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. J Neurosci. 1987;7(12):4129–36.

58. Kumar R, Berger RJ, Dunsker SB, Keller JT. Innervation of the spinal dura: Myth or reality? Vol. 21, Spine. 1996. p. 18–26.

59. Wheeler A, Smith HS. Botulinum toxins: Mechanisms of action, antinociception and clinical applications. Toxicology. 2013;306:124–46.

60. Nemeth J, Szolcsanyi J, Juhasz G, Zsombok T, Jakab B, Bagdy G. Sumatriptan causes parallel decreases in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during mitroglycerin induced mirgraine attack. Cephalalgia. 2005;25:179–83.

61. Durham PL, Russo AF. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion by a serotonergic antimigraine drug. JNeurosci. 1999;19(9):3423–9.

62. Buzzi MG, Moskowitz MA. The antimigraine drug, sumatriptan (GR43175), selectively blocks neurogenic plasma extravasation from blood vessels in dura mater. Br J Pharmacol. 1990;99(1):202–6.

63. O'Connor TP, van der Kooy D. Pattern of intracranial and extracranial projections of trigeminal ganglion cells. J Neurosci. 1986;6(8):2200–7.

64. Borges LF, Moskowitz MA. Do intracranial and extracranial trigeminal afferents represent divergent axon collaterals? Neurosci Lett. 1983;35:265–70.

65. Ulrich-Lai YM, Flores CM, Harding-Rose CA, Goodis HE, Hargreaves KM. Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from rat trigeminal ganglion: Evidence for intraganglionic neurotransmission. Pain. 2001;91(3):219–26.

66. Ellrich J, Andersen OK, Messlinger K, Arendt-Nielsen L. Convergence of meningeal and facial afferents onto trigeminal brainstem neurons: An electrophysiological study in rat and man. Pain. 1999;82(3):229–37.

67. Messlinger K, Ellrich J. Meningeal nociception: Electrophysiological studies related to headache and referred pain. Microsc Res Tech. 2001;53(2):129–37.

68. Moskowitz MA, Romero J, Reinhard JF, Melamed E, Pettibone DJ. Neurotransmitters and the Fifth Cranial Nerve: Is There a Relation To the Headache Phase of Migraine? Lancet. 1979;314(8148):883–5.

69. Lv X, Wu Z, Li Y. Innervation of the cerebral dura mater. Neuroradiol J. 2014;27(3):293–8.

70. Saito K, Marchkowitz S, Moskowitz MA. Ergot alkaloids block neurogenic extravasation in dura mater: Proposed action in vascular headaches. Ann Neurol. 1988;24(6):732–7.

71. Olesen J. International classification of headache disorders, 3rd Edition, beta version. Headache. 2013;33(9):629–808.

72. Ramadan NM, Olesen J. Classification of headache disorders. Semin Neurol. 2006;26(2):157–62.

73. Blanda M, Sargeant LK. Tension Headache: Background, Pathophysiology, Etiology [Internet]. [cited 2018 Jan 4]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/792384-overview

74. Stovner LJ, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton RB, Scher AI, et al. The global burden of headache: A documentation of headache prevalence and disability worldwide. Cephalalgia. 2007;27(3):193–210.

75. Blanda M, Dafer RM. Cluster Headache Clinical Presentation: History, Physical Examination [Internet]. [cited 2018 Jan 4]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/1142459-clinical

76. Singh MK, Patel J. Chronic Paroxysmal Hemicrania Clinical Presentation: History, Physical Examination [Internet]. [cited 2018 Jan 4]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/1142296-clinical

77. Tada Y, Ikuta N, Negoro K. Short-lasting unilateral neuralgiform headache attacks with cranial autonomic symptoms (SUNA). Headache. 2005;45(10):1427.

78. Pareja B, Caminero A, Sjaastad O. SUNCT Syn- drome: diagnosis and treatment. Headache J Head Face Pain. 2010;27(7):406–412.

79. Charlson RW, Robbins MS. Hemicrania continua. Curr Neurol Neurosci Rep. 2014;14(3).

80. Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML, et al. Cutaneous allodynia in the migraine population. Ann Neurol. 2008;63(2):148–58.

81. Louter MA, Bosker JE, Van Oosterhout WPJ, Van Zwet EW, Zitman FG, Ferrari MD, et al. Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. Brain. 2013;136(11):3489–96.

82. Katsarava Z, Lehnerdt G, Duda B, Ellrich J, Diener HC, Kaube H. Sensitization of trigeminal nociception specific for migraine but not pain of sinusitis. Neurology. 2002;59(9):1450–3.

83. Strassman AM, A. RS, Burstein R. Senzitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. Nature. 1996;384:560–4.

84. Schepelmann K, Ebersberger A, Pawlak M, Oppmann M, Messlinger K. Response properties of trigeminal brain stem neurons with input from dura mater encephali in the rat. Neuroscience. 1999;90(2):543–54.

85. Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. J Neurophysiol. 1998;79(2):964–82.

86. Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z, Hargreaves R, et al. Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. Ann Neurol. 2010;68(1):81–91.

87. Roch M, Messlinger K, Kulchitsky V, Tichonovich O, Azev O, Koulchitsky S. Ongoing activity in trigeminal wide-dynamic range neurons is driven from the periphery. Neuroscience. 2007;150(3):681–91.

88. Aaseth K, Grande RB, Lundqvist C, Russell MB. Pericranial tenderness in chronic tension-type headache: the Akershus population-based study of chronic headache. J Headache Pain. 2014;15(1):58.

89. Buchgreitz L, Lyngberg AC, Bendtsen L, Jensen R. Increased pain sensitivity is not a risk factor but a consequence of frequent headache: A population-based follow-up study. Pain. 2008;137(3):623–30.

90. Ashina S, Bendtsen L, Ashina M, Magerl W, Jensen R. Generalized hyperalgesia in patients with chronic tension-type headache. Cephalalgia. 2006;26(8):940–8.

91. Bezov D, Ashina S, Jensen R, Bendtsen L. Pain perception studies in tension-type headache. Headache. 2011;51(2):262–71.

92. Fernández-de-las-Peñas C, Ortega-Santiago R, Cuadrado ML, López-de-Silanes C, Pareja JA. Bilateral widespread mechanical pain hypersensitivity as sign of central sensitization in patients with cluster headache. Headache. 2011;51(3):384–91.

93. Wilbrink LA, Louter MA, Teernstra OPM, Van Zwet EW, Huygen FJPM, Haan J, et al. Allodynia in cluster headache. Pain. 2017;158(6):1113–7.

94. Marmura MJ, Abbas M, Ashkenazi A. Dynamic mechanical (brush) allodynia in cluster headache: A prevalence study in a tertiary headache clinic. J Headache Pain. 2009;10(4):255–8.

95. Gonçalves DAG, Camparis CM, Franco AL, Fernandes G, Speciali JG, Bigal ME. How to investigate and treat: Migraine in patients with temporomandibular disorders. Curr Pain Headache Rep. 2012;16(4):359–64.

96. Eross E, Dodick D, Eross M. The Sinus, Allergy and Migraine Study (SAMS). Headache. 2007;47(2):213–24.

97. Schreiber CP, Hutchinson S, Webster CJ, Ames M, Richardson MS, Powers C. Prevalence of Migraine in Patients With a History of Self-reported or Physician-Diagnosed “Sinus” Headache. Arch Intern Med. 2004;164(16):1769.

98. Wang IC, Tsai JD, Lin CL, Shen TC, Li TC, Wei CC. Allergic rhinitis and associated risk of migraine among children: A nationwide population-based cohort study. Int Forum Allergy Rhinol. 2016;6(3):322–7.

99. Martin VT, Fanning KM, Serrano D, Buse DC, Reed ML, Bernstein JA, et al. Chronic rhinitis and its association with headache frequency and disability in persons with migraine: Results of the American Migraine Prevalence and Prevention (AMPP) Study. Cephalalgia. 2014;34(5):336–48.

100. Zidverc-Trajkovic J, Pekmezovic T, Sundic A, Radojicic A, Sternic N. Comorbidities in cluster headache and migraine. Acta Neurol Belg. 2011;111(1):50–5.

101. Welge-Luessen A, Hauser R, Schmid N, Kappos L, Probst R. Endonasal Surgery for Contact Point Headaches: A 10-Year Longitudinal Study. Laryngoscope. 2003;113(12):2151–6.

102. Ferrero V, Allais G, Rolando S, Pozzo T, Allais R, Benedetto C. Endonasal mucosal contact points in chronic migraine. Neurol Sci. 2014;35(SUPPL. 1).

103. Gerbe RW, Fry TL, Fischer ND. Headache of Nasal Spur Origin: an Easily Diagnosed and Surgically Correctable Cause of Facial Pain. Headache J Head Face Pain. 1984;24(6):329–30.

104. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983;16(2):109–10.

105. Radu M, Chernoff J. An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability. J Vis Exp. 2013;(73):2–5.

106. Giri SN, Rice S, Bacchetti P. Characteristic features of actinomycin D-induced paw inflammation of the rat. Exp Mol Pathol. 1975;23(3):367–78.

107. Lundblad L, Saria A, Lundberg JM, Änggård A. Increased vascular permeability in rat nasal mucosa induced by substance p and stimulation of capsaicin-sensitive trigeminal neurons. Acta Otolaryngol. 1983;96(5–6):479–84.

108. Keller JT, Saunders MC, Beduk A, Jollis JG. Innervation of the posterior fossa dura of the cat. Brain Res Bull. 1985;14(1):97–102.

109. Saria A, Lundberg JM. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. J Neurosci Methods. 1983;8(1):41–9.

110. Anton F, Peppel P. Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: A horseradish peroxidase study in the rat. Neuroscience. 1991;41(2–3):617–28.

111. Hunter DD, Dey RD. Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. Neuroscience. 1998;83(2):591–9.

112. Bojsen-Møller F. Demonstration of terminalis, olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. J Comp Neurol. 1975;159(2):245–56.

113. Matak I, Rossetto O, Lacković Z. Botulinum toxin type A selectivity for certain types of pain is associated with capsaicin-sensitive neurons. Pain. 2014;155(8):1516–26.

114. Bullitt E. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neurol. 1990;296(4):517–30.

115. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Mol Pain. 2011;7(1):55.

116. Aamodt AH, Stovner LJ, Langhammer A, Hagen K, Zwart JA. Is headache related to asthma, hay fever, and chronic bronchitis? The Head-HUNT study. Headache. 2007;47(2):204–12.

9 Životopis

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Luka Lovrenčić

Datum rođenja: 19. 12. 1993.

Adresa: Gornja Šemnica 76, 49232 Radoboj

Broj telefona: +385 915551341

Adresa elektroničke pošte: lovrencic.luka@outlook.com

OBRAZOVANJE

2012. – 2018. Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet

2008. – 2012. Srednja škola Krapina, prirodoslovno-matematička gimnazija

2000. – 2008. Osnovna škola Side Košutić Radoboj

USPJEH U DOSADAŠNJEM FAKULTETSKOM OBRAZOVANJU

Osvojeni ECTS bodovi: 342.0

Prosjek ocjena: 4.923

Težinski prosjek ocjena: 4.962

Dekanova nagrada 2013. godine.

DODATNE AKTIVNOSTI:

ZIMS 2017 član Znanstvenog odbora za odabir i ocjenu radova.

Autor dva članka za studentski časopis Medicinar: Umjetne glasnice (2016) Mikrobiologija sporta (2017)

Sudjelovanje na ekipnom natjecanju Inter-Medical School Physiology Quiz 15, Kuala Lumpur, Indonezija. Ekipno 27 mjesto od 105 ekipa.

Predavač na tribini Nesigurnost u medicini Hrvatske liječničke komore.

Demonstrator na Katedri za anatomiju ak. god. 2013/14 i 2014/15.

Demonstrator na Katedri za patofiziologiju ak. god. 2016/17 i 2017/18.

Strani jezici: engleski, aktivno u govoru i pismu, njemački pasivno