Enkefalini u neuropatskoj boli

Jurić, Andrej

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:619920

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Andrej Jurić

Enkefalini u neuropatskoj boli

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na strpljenju, pomoći i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.
Također, zahvaljujem Višnji Drinovac, mag. pharm. znanstvenoj novakinji Zavoda za farmakologiju na pruženoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada i obrade podataka.
Najveće hvala mojoj obitelji koja je uvijek bila tu za mene, hvala im na svoj ljubavi, razumijevanju i podršci.
Hvala svim mojim prijateljima koji su mi najljepše godine odrastanja učinili nezaboravnima.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. BOL 1

1.1.1. PODJELA BOLI 1

1.1.2. PRIJENOS BOLNOG IMPULSA 2

1.1.3. NEUROTRANSMITORI U PRIJENOSU BOLI 4

1.1.4. SUSTAV KONTROLE BOLI 5

1.2. NEUROPATSKA BOL 7

1.2.1. SENZITIZACIJA - HIPERALGEZIJA I ALODINIJA 7

1.2.2. MEHANIZAM NASTANKA NEUROPATSKE BOLI 8

1.2.3. ULOGA GLIJA STANICA U NEUROPATSKOJ BOLI 11

1.3. LIJEČENJE NEUROPATSKE BOLI 12

1.3.1. IZBOR LIJEKOVA U NEUROPATSKOJ BOLI 13

1.4. ENDOGENI OPIOIDNI SUTAV 15

1.4.1. OPIOIDNI RECEPTORI 16

1.4.2. ENDOGENI OPIOIDI I NEUROPATSKA BOL 17

2. OBRAZLOŽENJE TEME 21

3. MATERIJALI I METODE 22

3.1. TKIVO 22

3.1.1. METODA IZAZIVANJA EKSPERIMENTALNE NEUROPATSKE BOLI 22

3.1.2. PRIPREMA TKIVA ZA IMUNOHISTOKEMIJSKU ANALIZU 23

3.2. KEMIKALIJE 23

3.3. IMUNOHISTOKEMIJA 23

3.4. ANALIZA IMUNOFLUORESCENCIJE LEU/MET ENKEFALINA 24

3.5. STATISTIČKA ANALIZA 25

4. REZULTATI I RASPRAVA 26

4.1. KVALITATIVNA ANALIZA IMUNOREAKTIVOSTI 26

4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOREAKTIVOSTI 27

5. ZAKLJUČAK 31

6. LITERATURA 32

7. SAŽETAK/SUMMARY 37

1. UVOD

1.1. BOL

Prema definiciji svjetskog udruženja za bol (engl. International Associaton for the Study of Pain, IASP), bol je neugodan emocionalni i senzorni doživljaj povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (www.iasp-pain.org).

Bol je mehanizam zaštitne prirode, nužan za opstanak i preživljavanje koji aktivira refleksne reakcije radi uklanjanja bolnog podražaja (Guyton i Hall, 2006).

1.1.1. PODJELA BOLI

Bol dijelimo na različite načine: prema patofiziološkom uzroku, podrijetlu, intenzitetu, simptomima i trajanju, koja se pak dijeli na akutnu i kroničnu, odnosno na protektivnu i patološku.

Akutna bol ukazuje na stvarno oštećenje tkiva i ima zaštitnu ulogu, a najčešće je uzrokovana ozljedom. Javlja se naglo i traje do tri mjeseca ili vrijeme potrebno za izlječenje, sve dok uzrok boli ne nestane.

Kronična bol traje dulje i nakon oporavka od ozljede (više od tri mjeseca), dovodi do značajnog narušavanja kvalitete života, a može biti bez otkrivenog štetnog uzroka i ponekad nije uzrokovana ozljedom. Zbog kroničnog trajanja, ona više nema protektivnu ulogu, nego i sama može oštetiti organizam.

Patofiziološki bol se dijeli na nociceptivnu, upalnu i neuropatsku.

Nociceptivna bol nastaje djelovanjem visokointenzivnog podražaja u fiziološkim uvjetima na periferne nociceptore. Akutni bolni podražaj mehaničkog (pritisak, ubod), kemijskog ili termičkog (>47 ºC) porijekla aktivira ionske kanale (npr. ASIC – na kiselinu osjetljive ionske kanale) ili pak specifične receptore (npr. kapsaicinske, odnosno vaniloidne TRPV1 receptore) na perifernim živčanim završecima Aδ i C vlakana. Podražaj kapsaicinskih receptora dovodi do lokalnog lučenja glutamata iz perifernih okončina koji doprinosi nocicepciji preko NMDA, AMPA i kainatnih receptora. Nastaje akcijski potencijal koji putuje kralježničkom moždinom aktivirajući dalje neurone u osjetnom putu. U središnjim sinapsama dolazi do lučenja

glutamata koji svoje djelovanje ostvaruje vezajući se za NMDA receptore na postsinaptičkim neuronima, koji se aktiviraju uslijed učestalog ulaza impulsa s periferije, te preko AMPA receptora koji služe za brzu sinaptičku transmisiju. Spori neurotransmitor, supstancija P pojačava postsinaptičku ekscitaciju spinalnih neurona, ako je podražaj dovoljno jakog intenziteta.

Upalna bol nastaje kao posljedica upale ili ozljede tkiva. Na periferiji, iz stanica smještenih oko nociceptora (trombociti, mastociti, leukociti, fibroblasti) luče se različite tvari (kinin, eikosanoidi, citokini, serotonin itd). Neke tvari, poput supstancije P i peptida sličnog genu za kalcitonin (engl., calcitonin gene related peptide, CGRP) luče se iz kolateralnih živčanih završetaka istog nociceptora (aksonski refleks). Nastanak živčanog signala u jednom ogranku prenosi se aksonom u leđnu moždinu, ali se širi i u ostale kolateralne ogranke antidromno, što uzrokuje lučenje neuropeptida u koži. CGRP povećava permeabilnost kapilara, a supstancija P uzrokuje vazodilataciju. Medijatori upale mogu djelovati izravno na nociceptore (poput serotonina, protona i ATP-a) i neizravno interferirajući sa signalima unutar samog nociceptora. Posljedično dolazi do povećanja podražljivosti membrane aferentnog završetka i smanjenog praga aktivacije nociceptora, odnosno do periferne senzitacije. Upalnim procesom aktiviraju se tzv. „silent“ nociceptori, odnosno C nociceptori u koži koji se u fiziološkim uvjetima ne aktiviraju bolnim podražajima. Djelovanjem medijatora upale dolazi do aktivacije „silent“ nociceptora i odgovora na podražaje niskog i visokog intenziteta mehaničke, toplinske i kemijske prirode.

Neuropatska bol nastaje kao posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog i/ili središnjeg živčanog sustava (SŽS). Može nastati kao posljedica dijabetesa, kroničnog alkoholizma, ozljede kralježničke moždine, infekcije HIV-om, primjenom citostatika i sl. Patofiziološki je vrlo složena i uključuje brojne promjene na mjestu ozljede živca, te na spinalnoj i supraspinalnoj razini (Bach-Rojecky, 2006).

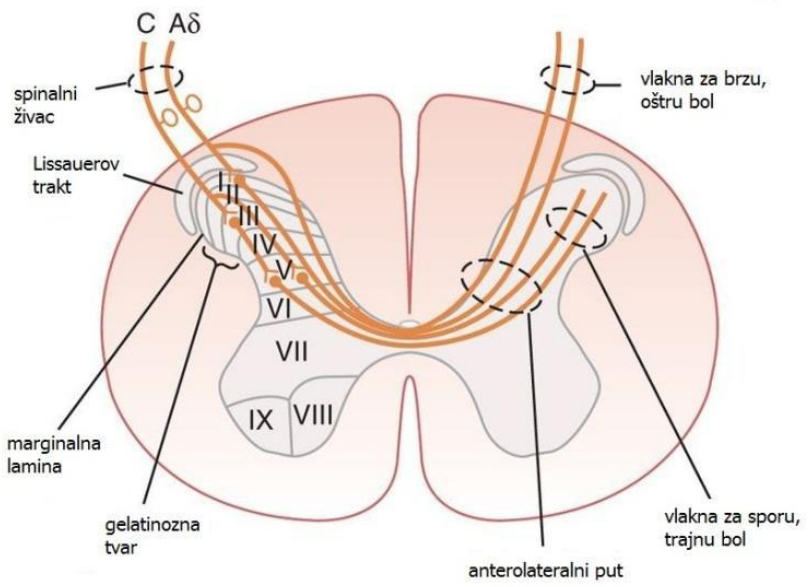
Prema porijeklu bol se dijeli na kutanu, visceralnu, mišićno-koštanu itd.

1.1.2. PRIJENOS BOLNOG IMPULSA

Nociceptori, odnosno receptori za bol su slobodni živčani završeci koji služe za provođenje različitih bolnih impulsa u mozak, gdje nastaje osjećaj boli. Bol mogu uzrokovati različiti podražaji, poput mehaničkih, toplinskih i kemijskih. Podjela nociceptora temelji se na

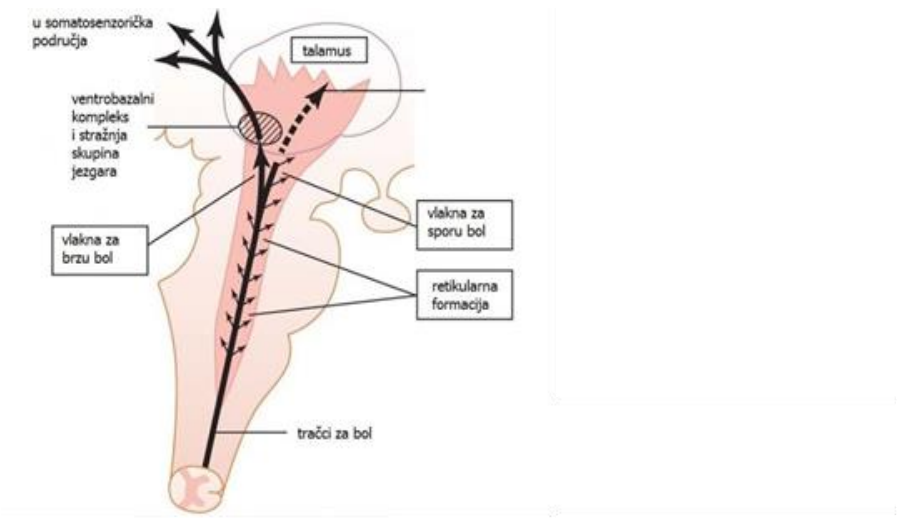
podjeli živčanih vlakana koja prenose impuls do kralježničke moždine. Za prinos bolne informacije važne su dvije vrste živčanih vlakana: C vlakna koja su tanka i nemijelizirana, te akcijski potencijal provode sporo (0.5-2 m/s) i Aδ vlakna koja su mijelizirana, šireg promjera, a sam signal prenose većom brzinom (6-30 m/s). Aδ receptori odgovaraju na mehaničke i mehano-toplinske podražaje, dok C nociceptori polimodalno reagiraju na toplinske, mehaničke i kemijske podražaje. Bolni podržaji često uzrokuju dvije faze boli – prva faza koja traje oko jednu sekundu, a očituje se kao brza i oštra (epikriptička) bol koju prenose Aδ vlakna, te druga faza koja je karakterizirana tupom i sporom (protopatskom) boli koju prenose C vlakna. Aδ i C vlakna ulaze u leđnu moždinu stražnjim spinalnim korijenima. Nakon ulaska, bolni impulsi putuju prema mozgu neospinotalamičkim i paleospinotalamičkim traktom (Slika 1).

Prijenos impulsa s periferije Aδ vlaknima, koji završavaju u marginalnoj lamini stražnjih rogova nastavlja se neospinotalamičkim traktom do talamusa, odnosno do vertebralnog kompleksa, dok manji broj završava u retikularnim područjima moždanog debla. Pojedina vlakna završavaju u stražnjoj skupini talamičkih jezgara, odakle se signali prenose u somatosenzoričku koru i druge bazalne dijelove moga.



Slika 1. Prijenos bolnih signala u kralježničnu moždinu i kroz nju, na putu do moždanog debla (Guyton i Hall, 2006)

Prijenos impulsa C vlaknima završava u gelatinoznoj tvari (laminama II i III stražnjih rogova) i dalje se prenosi paleospinotalamičkim putom. Signal dalje putuje kroz jedan ili više neurona kratkih vlakana, zatim dugim aksonima i na kraju dolazi u talamus, retikularnim formacijama produžene moždine moždanog debla i mezencefalona u sivom području akvedukta ili u tekalnom području mezencefalona (Slika 2).



Slika 2. Prijenos bolnih signala u moždano deblo, talamus i moždanu koru (Guyton i Hall, 2006)

1.1.3. NEUROTRANSMITORI U PRIJENOSU BOLI

Glavni ekscitacijski neurotransmitor u prijenosu bolnog podražaja je glutamat. Svoje djelovanje ostvaruje preko ionotropnih AMPA i NMDA receptora koji su smješteni na perifernim završecima aferentnih neurona, sekundarnim neuronima dorzalnog roga kralježničke moždine, te u talamusu. On se luči i u procesu upale kao i CGRP, te supstancija P.

Djelovanjem glutamata na presinaptičke NMDA receptore dodatno se povećava lučenje neurotransmitora u sinaptičke pukotine. Drugi važni neurotransmitori u prijenosu bolnih signala, koji se oslobađaju iz središnjih okončina aferentnog živčanog vlakna u dorzalnom rogu su somatostatin, kolecistokinin, vazoaktivni intestinalni peptid, faktor lučenja kortikotropina i ostali medijatori iz neživčanih izvora poput dušikovog-2-oksida, adenozin-3-

fosfata, te prostaglandina. Njihovo djelovanje na proces širenja boli može biti ekscitacijsko i inhibicijsko.

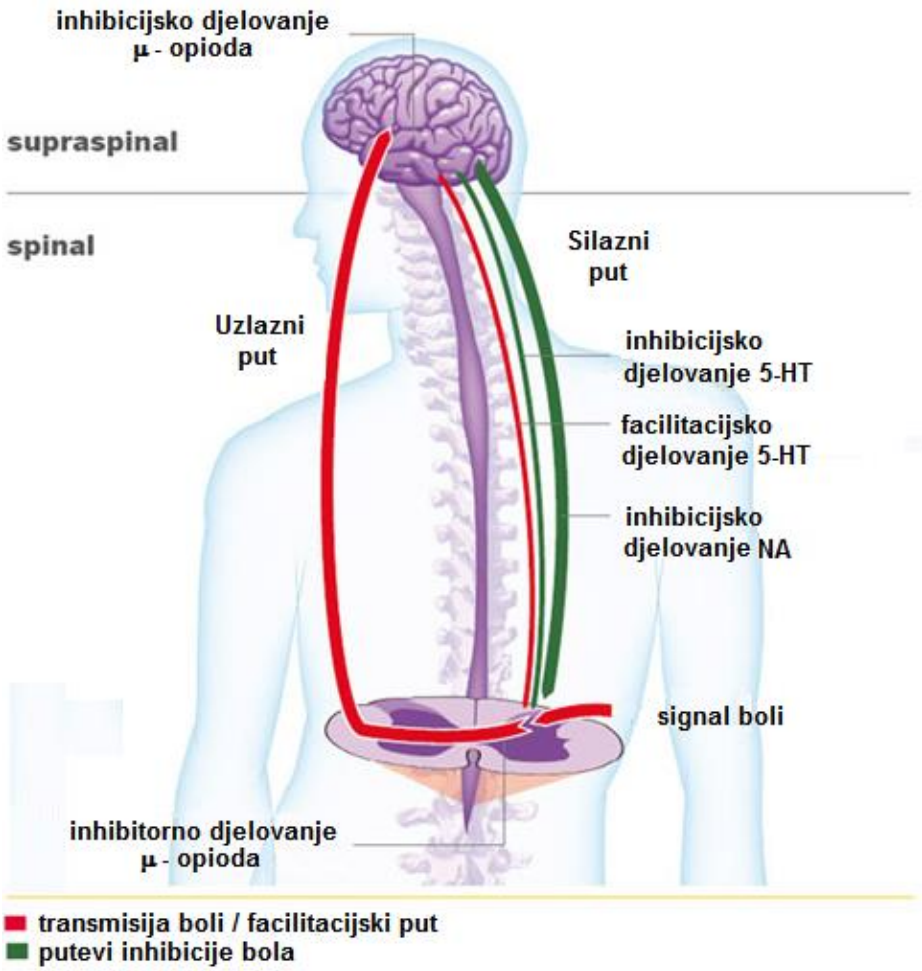
1.1.4. SUSTAV KONTROLE BOLI

Sam intenzitet boli je relativan i individualno različit. On je posljedica sposobnosti endogenih analgetskih putova da širenje bolne informacije inhibiraju u različitim dijelovima SŽS-a.

Silazni, odnosno descedentni sustav kontrole boli možemo podijeliti na *inhibicijski* i *facilitacijski*.

Inhibicijski, sustav za suzbijanje boli sastoji se od nekoliko putova uključenih u endogenu analgeziju. Vjerojatno najznačajniji utjecaji inhibicije počinju u moždanom deblu, odnosno u periakveduktalnoj sivoj tvari (PAG) i dijelovima rostralne ventromedijalne jezgre (RVM) – velike jezgre rafe i paragigantocelularne jezgre. Sam proces počinje širenjem impulsa iz kortikalnih i subkorikalnih centara do periakveduktalne sive tvari. Descedentni putovi iz PAG-a uglavnom se šire do rostroventralne medule, a manjim dijelom direktno do spinalnih neurona (Millan, 2002). Aktivacijom tzv. *„off" stanica* u RVM-u, signali drugog reda prenose se serotoninergičkim i noradrenergičkim neuronima silaznom putanjom, ostvarujući veze s inhibitornim interneuronima dorzalnog roga. Serotoninski inhibicijski sustav počinje u velikoj jezgri rafe, a noradrenalinski u LC. Serotonin i noradrenalin preko receptora na interneuronima, ili izravno, inhibiraju aktivaciju neurona drugog reda. Nedavno je otkriveno da se vezanjem noradrenalina samo na α_2 adrenoreceptore ostvaruje antinociceptivni učinak (Silveira i sur., 2010). U samoj analgeziji posebno se ističu serotonin i enkefalini. Mnoga vlakna koja potječu iz paraventrikularnih jezgara na svojim završecima luče enkefaline. Oni se oslobađaju u jezgri rafe iz mnogih živčanih završetaka. Vlakna koja završavaju u stražnjim rogovima kralježničke moždine, a potječu iz te jezgre luče na svojima završecima serotonin, koji pak potiče lokalne neurone moždine na lučenje enkefalina. Važniji inhibicijski interneuroni su kolinergički, opioidni i interneuroni koji djeluju putem GABA-e (Bach-Rojecky, 2006). Opioidni receptori smješteni su na neuronima superficijalnih lamina (I i II) dorzalnog roga (Marvizon i sur, 2010). Ekspresija opioidnih receptora ovisi o stanju boli, pa je tako u neuropatskoj primijećeno smanjenje broja μ-opiodnih receptora, dok je ekspresija κ-receptora povećana (Pan i sur., 2008).

Enkefalini svoj utjecaj u dorzalnom rogu ostvaruju na dva načina: presinaptički inhibicijom otvaranja kalcijevih ionskih kanala na aferentna vlakna koja pristižu s periferije i postsinaptički povećanjem provodljivosti kalijevih ionskih kanala (Guyton i Hall, 2006). Time se smanjuje oslobađanje ekscitacijskog neurotransmitora glutamata, a postsinaptičkom inhibicijom dolazi do posljedične hiperpolarizacije (Khaelfa i sur., 2012).



Slika 3. Sustav kontrole boli (www.labanim.hr)

Facilitacijski put počinje iz rostralne ventromedijalne medule, odnosno iz populacije neurona tzv. *„on" stanica*, čija se aktivnost povezuje sa spinalnom nocicepcijom. Aktivacijom silaznog serotoninskog puta, serotonin vezanjem preko 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT3 u dorzalnom rogu djeluje pronociceptivno aktivirajući mikroglija stanice i astrocite, te smanjuje lučenje endogenih opioida, čime se dokazuje njegova uloga u neuropatskoj boli (Guo, 2014). Nedavno je otkriveno da pronociceptivno djelovanje može ostvariti noradrenalin preko α_1 adrenoreceptora (Silveira i sur., 2010).

1.2. NEUROPATSKA BOL

Neuropatska bol definira se kao kronični poremećaj uzrokovan direktnim oštećenjem živca ili kao posljedica bolesti somatosenzornog dijela živčanog sustava. Karakterizira ju hipereksictabilnost senzornih neurona, odnosno pojava periferne i središnje senzitizacije, što se manifestira kao hiperalgezija, alodinija i spontana bol.

Etiološki ju možemo podijeliti na periferne fokalne i multifokalne ozljede perifernog živčanog sustava (posttraumatska neuralgija, postherpetična neuralgija, fantomska bol uda, itd.), generalizirane ozljede perifernog živčanog sustava (neuroborelioza, neuropatija uzrokovana alkoholom, infekcijom HIV-a, hipotiroidizmom, deficijencijom vitamina B, različite neuropatije uzrokovane trovanjem lijekovima i metalima, poput arsena, talija, zlata, kloramfenikola, metronidazola, *vinca* alkaloida, izoniazida, itd.), ozljede središnjeg živčanog sustava (ozljede leđne moždine, talamusa, moždanog debla, multipla skleroza, itd.) i kompleksne neuropatske poremećaje (kauzalgija, refleksna simpatička distrofija) (Baron i sur., 2000).

Simptome možemo podijeliti na *negativne* i *pozitivne.*

Negativni simtomi su hipoestezija (smanjena osjetljivost na dodir), palhipoestezija (smanjena osjetljivost na vibracije), hipoalgezija (smanjena osjetljivost na bol) i termohipoestezija (smanjena osjetljivost na na termalne podražaje).

Pozitivne simptome čine različiti poremećaji osjeta, poput parestezije (trci, bockanje, peckanje, „hodanje mrava“), paroksizmalne boli i površne boli, pa do hiperalgezije i alodinije.

1.2.1. SENZITIZACIJA - HIPERALGEZIJA I ALODINIJA

Senzitizacija, odnosno pojačanje osjeta uslijed ponovljenog i učestalog podraživanja nociceptora svojstvena je samo kompleksnom osjetu boli. Dok kod drugih osjetnih stanica dugotrajniji podražaji uzrokuju smanjenu podražljivost i prilagodbu, kod senzornih neurona koji prenose bolne impulse bol se pojačava. Dugotrajnim podraživanjem nociceptora ona prelazi iza akutne u kroničnu.

Hiperalgezija i alodinija su pojave koje se povezuju uz različita klinička bona stanja poput neuropatske boli. Njihova je pojava veoma bitna u eksperimentalnim modelima boli.

Hiperalgeziju karakterizira povećana osjetljivost na bolne podražaje. Može nastati na mjestu ozljede živca – primarna ili na mjestu izvan ozljede – sekundarna. Primarnu hiperalgeziju izazivaju termalni, mehanički i kemijski podražaji, a mogu ju uzrokovati ozljeda tkiva, dugotrajni bolni podržaji ili upalni medijatori. Mehanizam nastanka objašnjava se promjenama fizioloških i farmakoloških svojstava perifernih C i Aδ vlakana. Sekundarnu hiperalgeziju izazivaju mehanički podražaji, a mogu je uzrokovati ozljeda tkiva ili ozljeda živca. Mehanizam nastanka objašnjava se povećanom podražljivosti središnjih neurona, a djelomično je neovisna o ulazu impulsa preko C i Aδ vlakna s periferije.

Alodiniju karakterizira povećana osjetljivost na podražaje koji nisu bolni, poput dodira. Osim mehanički, alodiniju može izazvati hladnoća. Uzrokuje je ozljeda živčanog sustava. Mehanizam nastanka uključuje aktivaciju Aβ vlakana, središnju senzitizaciju, reorganizaciju neurona u dorzalnom rogu, promjene u ekspresiji različitih medijatora i njihovih receptora i dr. (Bach-Rojecky, 2006).

1.2.2. MEHANIZAM NASTANKA NEUROPATSKE BOLI

Patofiziologija ove vrste boli je vrlo složena, te uključuje brojne promjene na periferiji, kao i na spinalnoj i supraspinalnoj razini živčanog sustava.

Na mjestu ozljede neurona dolazi do upalnog odgovora i lučenja medijatora upale, poput serotonina, ATP-a, NO, prostaglandina, citokina, uključujući acidozu i infiltraciju stanicama imunog sustava. Upalni medijatori mogu povećavati bol izravnim ili neizravnim putem.

Periferne promjene uključuju ektopičko pražnjenje, promjene u broju ionskih kanala, kolateralno širenje primarnih aferentnih neurona, širenje simapatetičkih neurona u dorzalni rog kralježničke moždine, te senzitizaciju nociceptora.

Oštećenjem vlakana malog i velikog promjera dolazi do promjena u njihovoj podražljivosti i provodljivosti. Ektopičko pražnjenje primijećeno je u Aδ i C vlaknima, ali i Aβ vlaknima. Povećanje membranske ekscitabilnosti dovodi do nastajanja spontanih, o podražaju neovisnih akcijskih potencijala. Uočene su i različite intraneuralne interakcije, poput pojave depolarizacije na neoštećenim C vlaknima zbog učestalog izbijanja Aβ oštećenih neurona, te prijelaza napona s mjesta demijenlinizacije oštećenog neurona na susjedne neoštećene (Bach-Rojecky, 2006).

Glavnu ulogu u navedenim promjenama ima disbalans u gustoći i funkcionalnosti ionskih kanala, poput N tipa Ca^{2+} kanala, te Na^{+} i K^{+} kanala. Zabilježena je povećana ekspresija Ca^{2+} kanala i tetrodotoksin (TTX)-osjetljivih Na^{+} kanala i smanjenja ekspresija TTX-rezistentnih Na^{+} kanala. Smatra se da su upravo Na^{+} kanali odgovorni za smanjenje praga podražaja i posljedičnu hiperaktivnost (Bridges i sur, 2001). Primijećeno je i smanjenje pragova aktivacije ionskih kanala i receptora, poput ASIC ionskih kanala osjetljivih na protone, te TRPV1 receptora na termalni podražaj.

Oštećenjem živca dolazi i do povećane ekspresije adrenergičkih receptora na kutanim aferentnim vlaknima i senzornim ganglijima, povećanja broja i funkcionalnosti adrenergičkih receptora, zbog čega se pojačano aktivira simpatikus. Uočeno je da produkti poput *faktora rasta neurona*, koji se otpuštaju u okolinu neoštećenih vlakana, a povezani su s Waller-ovom degeneracijom, mogu potaknuti širenje simpatetičkih neurona, lučenje faktora nekroze tumora (TNF-α) i dr. (Bridges i sur., 2001).

U kralježničkoj moždini dolazi do značajnih promjena kao posljedica hiperaktivnosti nociceptora, nakon periferne ozljede živca.

Možemo je podijeliti na *brzu* i *odgođenu.*

Brza senzitizacija

Nakon bolne stimulacije, dolazi do lučenja neuropeptida i glutamata, iz središnjih aksona primarnih aferentnih neurona u dorzalnom rogu. Postsinaptički, neuroni drugog reda dorzalnog roga abnormalno eksprimiraju Na^{+} kanale, dok se presinaptički smanjuje prag podražljivosti za otpuštanje glutamata i supstancije P (Hains i sur., 2007). Svoj ekscitacijski učinak glutamat ostvaruje preko postsinaptičkih NMDA receptora, a u dorzalnom rogu može se vezati i presinaptički, čija je posljedica dodatno lučenje neurotransmitora u središnje sinapse. U navedeni proces je uključen i glicin, kao modulator agonističkog učinka glutamata na NMDA receptor. Aktivacijom NMDA receptora povećava se koncentracija glutamata i aspartata u sinaptičkoj pukotini, čime se održava centralna senzitizacija. Povećanje broja i podražljivosti NMDA receptora ostvaruje se indirektno, preko kalcija, SP-a i ostalih kinina koji aktiviraju protein kinaze A i C, što rezultira fosoforilacijom samih receptora (Coull i sur., 2003).

Posljedično, dolazi do povećanja koncentracije kalcija postsinaptički, što uzrokuje aktivaciju neuronalne NO sintetaze koja katalizira stvaranje NO. Difuzijom kroz membranu u presinaptičku stanicu, NO aktivira kaskadu NO-cGMP (ciklički gvanozin monofosfat), što vodi povećanom lučenju ekscitacijskih aminokiselina i SP-a u središnje sinapse.

Osim toga, dolazi i do redukcije inhibicijskih mehanizama uslijed gubitka inhibicijskih interneurona, kao i do smanjenja sinteze inhibicijskih neurotransmitora GABA-e i glicina u dorzalnom rogu, odnosno do tzv. središnje dezinhibicije. Novija istraživanja pokazuju da smanjenjem ekspresije molekule transportera K^+/Cl^- u lamini I, dolazi do narušavanja homeostaze gradijenta aniona u neuronima. Posljedično, GABA svoje inhibicijsko djelovanje paradoksalno mijenja u ekscitacijsko, pojačavajući centralnu senzitizaciju (Bach-Rojecky, 2006; Coull i sur., 2003).

Odgođena senzitizacija

Nastaje kao posljedica različitih transkripcijskih promjena u neuronima dorzalnog roga. Aktivacijom i oslobađanjem različitih transkripcijskih faktora (npr. citokina iz glija stanica) povećava se ekspresija gena za *c-fos* i ciklooksigenazu$_2$ (COX_2). Povećava se i ekspresija gena za neurokinin, različite receptore i prodinorfin. Povećanom sintezom prostaglandina i njihovim djelovanjem presinaptički i postsinaptički dolazi do redukcije inhibicijskog djelovanja i povećanja ekscitacijskog djelovanja. Smatra se da se aktivacijom kinaza aktiviranih mitogenom (MAP kinaza) povećava bolna transmisija, a uključene su i u transkripcijske promjene (Ji i Woolf, 2001).

Uočena je i anatomska reorganizacija vlakana malog i velikog promjera. Aδ mjelinizirana i nemijelinizirana C vlakna malog promjera završavaju u površinskim laminama dorzalnog roga (lamina I i II), dok Aβ vlakna velikog promjera završavaju u laminama III i IV. Ozljedom perifernog živca, dolazi do širenja Aβ vlakana velikog promjera u laminu II, već prvi tjedan nakon ozlijede. Unatoč regeneraciji perifernih neurona, promjene organizacije vlakana velikog promjera su postojane. Kao rezultat navedenog, neuroni drugog reda kralježničke moždine, koji inače primaju signale jačeg podržaja, počinju primati signale niskog podražaja i interpretiraju ih kao bolne (Woolf i sur., 1999). Smatra se da ovaj fenomen objašnjava alodiniju.

Ponavljana stimulacija C vlakana pospješuje transmisiju kroz stražnje rogove kralježničke moždine („w*ind up"* fenomen), što rezultira produženim oslobađanjem glutamata, povećanom

osjetljivošću NMDA receptora i smanjenim pragom odgovora sekundarnih neurona (Bach-Rojecky, 2006). Ovaj fenomen mogao bi biti uzrok hiperalgezije.

U mozgu su također uočeni senzitizirani neuroni talamusa i somatosenzornog korteksa u eksperimentalnim modelima boli i kod pacijenata s fantomskom boli. Smatra se da glavnu ulogu ima glutamat, a da transkripcijske promjene nastaju pod utjecajem MAP kinaza. Međutim, mehanizmi transkripcijske regulacije još uvijek su u velikoj mjeri nerazjašnjeni (Baron i sur., 2000).

1.2.3. ULOGA GLIJA STANICA U NEUROPATSKOJ BOLI

Uz neurone, glija stanice su druge glavne stanice živčanog sustava. Brojnost glija stanica nad neuronima višestruko prednjači, omjerom 10:1. Do nedavno se smatralo da imaju ulogu isključivo u održavanju homeostaze i zaštite neurona, no istraživanja su pokazala da pojave poput hiperalgezije i alodinije uzrokuju aktivaciju glija stanica. Produkti lučenja glija stanica, poput citokina direktno doprinose patofiziologiji neuropatske boli.

Glavnu ulogu u neuropatskoj boli imaju mikroglija stanice. To su specijalizirani makrofagi koji imaju mogućnost fagocitoze, nalaze se u svim regijama mozga i kralježničke moždine, a čine 5-10% ukupnog broja glija stanica. Narušavanjem homeostaze dolazi do njihove aktivacije, odnosno do promjena u morfologiji, genskoj ekspresiji, funkciji i broju. Aktivacija mikroglija posredovana je različitim putovima koji uključuju citokine, kemokine, faktore rasta i druge neuromodulatore. Neki imaju aktivacijsko, drugi inhibicijsko djelovanje, a sama aktivacija je reverzibilan proces. Osim što fagocitiraju oštećene stanice, mikroglija otpušta različite medijatore, koji mogu promijeniti funkciju neurona. Nedavno je otkriven i put signalizacije od neurona preko mikroglija stanica do povećane aktivacija AMPA receptora. Neuroni preko fraktalkina aktiviraju mikroglija stanice koje dalje aktiviraju astrocite preko interleukina-18. Astrociti pak, preko interleukina-1β signaliziraju neuronima, što dovodi do povećane aktivacije AMPA receptora u dorzalnom rogu (Wei Guo i sur., 2014).

1.3. LIJEČENJE NEUROPATSKE BOLI

Liječenje neuropatske boli, unatoč velikom broju provedenih kliničkih istraživanja i dalje nije zadovoljavajuće, jer se kod manje od polovice bolesnika postiže zadovoljavajući analgetski učinak. Kako bi se postigla veća učinkovitost, odabir lijeka trebao bi se individualizirati s obzirom na klinički fenotip same boli. To podrazumijeva razumijevanje molekularnih mehanizama nastanka boli, povezivanje navedenih sa simptomima i mehanizmima djelovanja lijekova na navedene procese (Finger i sur., 2006).

Smanjenje neuropatske boli možemo ostvariti na 4 načina:

1. *Redukcijom periferne senzitizacije* (primjeri: -lidokain, kapsaicin, lamotrigin, karbamazepin)

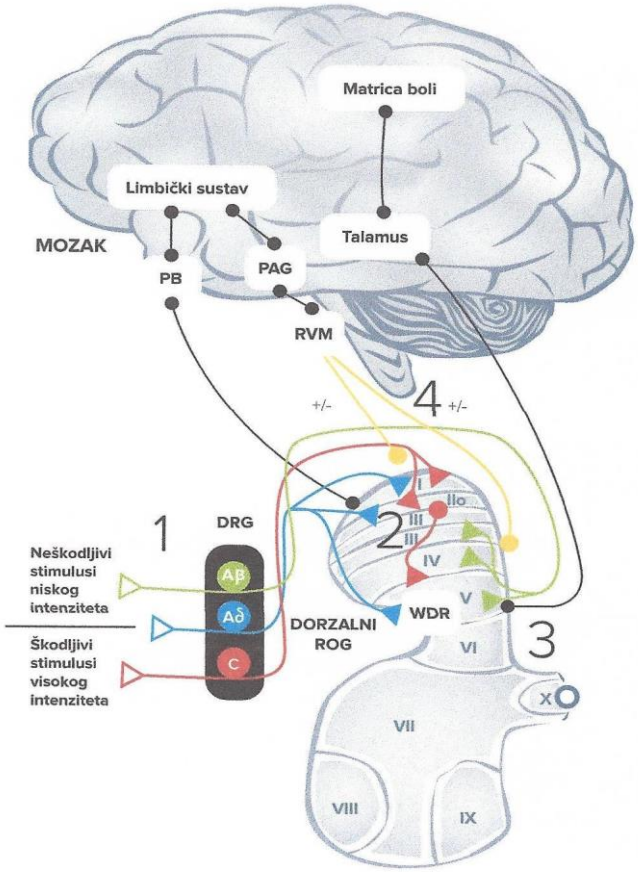
   Lidokain djeluje kao blokator natrijevih kanala ovisnih o naponu čime stabilizira membranu neurona. Kapsaicin djelovanjem preko vaniloidnih receptora TRPV1 depolarizira membranu neurona, inicijalno stimulira, a zatim blokira nociceptore u koži. Lamotrigin inhibira otpuštanje glutamata, veže se za natrijeve kanale u inaktivnom stanju i inhibira ih, te inhibira i voltažne kalcijeve kanale, posebice N i P/Q tipa. Karbamazepin djeluje vežući se na natrijeve kanale, te na adenozinske receptore čija funkcija u neuroptskoj boli još nije razjašnjena.
2. *Redukcijom presinaptičkog otpuštanja neurotransmitora* (primjeri: -pregabalin, gabapentin, opioidi)

   Gabapantin i pregabalin, kao strukturni analozi GABA-e moduliraju njeno sinaptičko i izvansinaptičko otpuštanje. Vezanjem na voltažne kalcijeve kanale posljedično smanjuju utok kalcija i inhibiraju lučenje glutamata. Opioidi djeluju presinaptički inhibicijom otvaranja kalcijevih kanala.
3. *Redukcijom postsinaptičke inhibicije* (primjeri: ketamin, opioidi)

   Opioidi postsinaptički otvaraju kalijeve kanale zbog čega dolazi do hiperpolarizacije membrane neurona i njihove inhibicije. Ketamin blokira NMDA receptore i na taj način onemogućava učinak ekscitacijakog neurotransmitora glutamata
4. *Pojačanjem descedentne inhibicije* (primjeri: inhibitori ponovnog povrata serotonina i noradrenalina-SNRI, triciklički antidepresivi-TCA, opioidi)

   SNRI inhibiraju ponovni unos serotonina i noradrenalina u neurone i na taj način pojačavaju djelovanje silaznih inhibicijskih putova. TCA djeluju na isti način kao i

SNRI, osim što su manje selektivni i djeluju na histaminske, kolinergičke i adrenergičke receptore. Opioidi aktivnost *"off" stanica* povećavaju inhibirajući inhibicijsko djelovanje GABA-e (Barada, 2014).



Slika 4. Mehanizam djelovanja lijekova u terapiji neuropatske boli (Barada, 2014.)

1.3.1. IZBOR LIJEKOVA U NEUROPATSKOJ BOLI

Prilikom prvog izbora lijeka, osim relativne učinkovitosti, potrebno je obratiti pozornost na odnos učinovitosti i sigurnosti.

Lijekovi prvog izbora, s najbolje istraženom učinkovitosti u različitim neuropatskim stanjima su triciklički antidepresivi, gabapentin i pregabalin.

TCA se čine učinkovitijima, no to nije potvrđeno pouzdanim izravnim poredbenim pokusima. Kod starijih pacijenata ih treba primjenjivati uz oprez, zbog povećanog kardiovaskularnog rizika.

Kao drugi izbor, preporučuju se lijekovi nedovoljno dokazanog djelovanja, poput topičkog lidokaina, SNRI-venlafaksina i duloksetina, te lamotrigina i tramadola. Međutim, topički lidokain čak ima prednost kod bolesnika s post-herpetičkom neuralgijom i fokalnom neuropatijom s malim područjem boli, osobito kod starijih.

U nekoliko pokusa s različitim neuropatskim stanjima, opioidi su se pokazali učinkovitima (stupanj preporuke A), ali se primjenjuju tek kao drugi ili treći izbor u liječenju kronične boli koja nije uzrokovana karcinomom, zbog potencijalnih sigurnosnih pitanja, primjerice razvoja ovisnosti i moguće zlouporabe. Jaki opioidi, poput oksikodona, metadona i morfina, te tramadol u randomiziranim kontroliranim studijama nisu pokazali značajne učinke na raspoloženje i mjere kvalitete života. Najčešće nuspojave koje su se pojavile pri terapiji su sedacija, konstipacija, mučnina, omaglica i povraćanje. Doze svakog opioida bi se trebale titrirati individualno do zadovoljavajuće učinkovitosti uz minimalne nuspojave.

Nema dovoljno dokaza za upotrebu karbamazepina i okskarbazepina (osim kod trigeminalne neuralgije), kapsaicina (osim kod post-herpetičke neuralgije), meksiletina, antagonista NMDA, SSRI-a i topiramata, zbog sigurnosti, slabe učinkovitosti i proturječnih rezultata. Unatoč dugotrajnoj upotrebi valproata u liječenju epilepsije, tek se nedavno počeo istraživati u liječenju periferne neuropatske boli (Finger i sur., 2006).

Što se tiče komorbiditeta i kvalitete života, samo su gabapentin, pregabalin i duloksetin pokazali pozitivne učinke i stoga ih treba preporučiti kod bolesnika kod kojih bol u velikoj mjeri utječe na kvalitetu života ili koji pate od značajnih komorbiditeta (stupanj preporuke A), dok je izostanak učinkovitosti opioida na spomenuti ishod uočen u većini pokusa.

SNRI se preporučuju kao drugi izbor zbog usporedivo slabije učinkovitosti, međutim mogu imati i prednost nad trickiličkim antidepresivima kod bolesnika s čimbenicima kardiovaskularnog rizika. Lidokainski flasteri (razina dokaza B) mogu se preporučiti kao prvi izbor bolesnicima s malim područjima boli i alodinijom, osobito kod starijih, zbog vrlo dobre podnošljivosti. Lamotrigin, zbog potencijalno teških kožnih osipa, preporučuje se kao drugi/treći izbor. Okskarbazepin (razina dokaza B) se preporučuje kao prvi izbor u neuralgiji trigeminusa, zbog bolje podnošljivosti i veće sigurnosti u usporedbi s karbamazepinom. Vrlo

malo pokusa se bavilo centralnom boli pa se preporuke za većinu lijekova uglavnom temelje na razini dokaza B.

U svezi simptoma i znakova boli, samo su se antidepresivi i opioidi/tramadol pokazali učinkovitima u ublažavanju trenutne i paroksizmalne boli, dok se ublažavajući učinak na dodirom izazvanu alodiniju uočio primjenom topičkog lidokaina i opioida/tramadola (stupanj preporuke B). Topički lidokain može biti lijek izbora kod bolesnika s mehaničkom alodinijom.

Kombinirana terapija može se primijeniti u slučajevima kada se monoterapija pokaže neučinkovitom, a trebali bi se kombinirati lijekovi s međusobno dopunjujućim mehanizmima djelovanja. Korisnom se pokazala kombinacija gabapetina i morfina (stupanj preporuke A) (Finger i sur., 2006).

1.4. ENDOGENI OPIOIDNI SUTAV

Prije više od 35 godina, ubrizgavanjem vrlo malih količina morfina u sivu tvar oko akvedukta u moždanom deblu ili u periventrikularnu jezgru oko trećeg ventrikula, uočeno je postizanje izrazito visokog stupnja analgezije. Uskoro je otkriveno da tvari slične morfinu djeluju na mnogim drugim mjestima analgetskog sustava, poput stražnjih rogova kralježničke moždine.

Saznanjem da se učinak većine lijekova, koji moduliraju podražljivost neurona postiže djelovanjem na sinaptičke receptore, pretpostavilo se da bi "receptori za morfin" mogli biti receptori za neki endogeni neurotransmitor koji se normalno luči u mozgu i sličan je morfinu. Istraživanjima je otkriveno nekoliko tvari koje su slične opijatima, poput β-endorfina, Met-enkefalina, Leu-enkefalina i dinorfina. Te tvari produkti su većih prekursorskih molekula (Guyton I Hall, 2006). Met-enkefalin i Leu-enkefalin produkti su preproenkefalina, od kojeg svaka molekula tvori višestruke kopije Met-enkefalina i jednu molekulu Leu-enkefalina. Iz propiomelanokortina nastaje β-endorfin, melanocit-stimulirajući hormon i adrenokortikotropni hormon, dok dvije kopije endorfina (A i B) i α-neoendorfin nastaju iz treće velike molekule preprodinorfina (Katzung i sur., 2011).

Nedavno je otkriven novi sustav receptor-ligand srodan endogenim peptidima, odnosno N/OFQ sustav. Glavni receptor, ORL1 (opioidnom receptoru sličan receptor za orfanin) ili NOP spregnut je s G proteinima. Endogeni ligand nazvan je nociceptinom ili orfaninom NQ.

N/OFQ sutav povezuje se s pronociceptivnom i antinociceptivnom aktivnošću. Široko je rasprostranjen, u SŽS-u i na periferiji, zbog čega vjerojatno ima vrlo raznoliku biološku ulogu i potencijalno farmakološko značenje (Katzung i sur., 2011).

1.4.1. OPIOIDNI RECEPTORI

Tri najvažnija podtipa receptora su μ, κ i δ receptori. Prvi karakterizirani receptor bio je delta receptor iz stanica miša.

Opioidni receptori spadaju u porodicu metabotropnih receptora spregnutih s G-proteinima. Ti receptori sadrže sedam hidrofobnih transmembranskih domena povezanih kratkim petljama i pokazuju intracelularni C-terminalni rep i ekstracelularnu N-terminalnu domenu. Receptori se razlikuju po ekstraceluarnim petljama, te N- i C- krajevima, a homologni su po intracelularnim petljama i transmembranskim domenama. Ekstracelularne domene uspostavljaju prvi kontakt s ligandom, zbog čega su važne za selektivnost. Nasuprot tome, transmembranske domene su visoko očuvane i tvore vežući džep. Predloženi su mnogi podtipovi navedenih receptora, no do sada su uspješno izolirani geni koji kodiraju po jedan podtip svake skupine receptora. Smatra se da različiti podtipovi receptora nastaju posttranslacijskom obradom mRNA prepisane s istog gena (Katzung i sur, 2011). Iako anatomske studije indiciraju da se enkefalini otpuštaju u blizini μ i δ receptora, nije potpuno jasno koji endogeni opioid djeluje preko kojeg receptora. Met- I Leu- enkefalini pokazuju veći afinitet za μ u odnosu na κ receptor. Zbog velikog afiniteta dinorfina za κ receptor, generalno je dogovoreno da su oni endogeni ligandi tog receptora. β-endorfin, poput enkefalina pokazuje otprilike jednak afinitet za μ i δ receptor, te manji za κ receptor (Tablica 1).

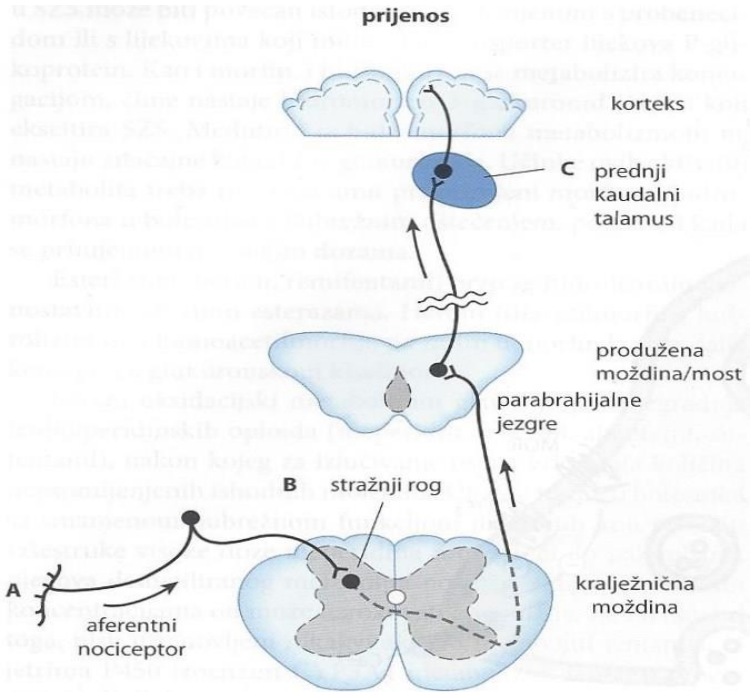
Tablica 1. Podtipovi, funkcija i afiniteti endogenih opioda za opioidne receptore (Katzung i sur., 2011).

Podtip receptora	Funkcija	Afinitet endogenih opioida
μ	supraspinalna i spinalna analgezija, sedacija, depresija disanja, usporenje peristaltike, modulacija izlučivanja hormona i neurotransmitora	endorfini>enkefalini>dinorfini
δ	supraspinalna i spinalna analgezija, modulacija izlučivanja hormona i receptora	enkefalini>endorfini i dinorfini
κ	supraspinalna i spinalna analgezija, psihotomimetski učinci, usporenje peristaltike	dinorfini>endorfini i enkefalini

1.4.2. ENDOGENI OPIOIDI I NEUROPATSKA BOL

Mehanizam analgetskog djelovanja objašnjava se vezanjem opioidnih agonista na specifične receptore, smještene u specifičnim regijama mozga i kralježničke moždine za modulaciju boli (Slika 5). Neki od učinaka mogu biti posredovani opioidnim receptorima smještenih na završecima perifernih senzornih neurona (Katzung i sur., 2011).

Na razini stanice, vezanjem agonista na opioidne receptore aktiviraju se G proteini i utječu na otvaranje ionskih kanala čime se mijenja fosforilacija proteina i količina unutarstaničnih kalcijevih iona. Otpuštanje neurotransmitora smanjuje se zatvaranjem voltažnih kalcijevih kanala na presinaptičkim završecima neurona, a otvaranjem kalijevih kanala na postsinaptičkim neuronima dolazi do hiperpolarizacije, odnosno inhibicije (Katzung i sur., 2011).



Slika 5. Pretpostavljena mjesta djelovanja opioidnih analgetika (Katzung i sur., 2011).

Na *spinalnoj razini*, dokazano je da su unutar kralježničke moždine opioidni receptori uglavnom smješteni na površinskim slojevima dorzalnog roga, tj. superficijalno (lamina I i II), a manjim dijelom u dubljim slojevima. Oni se sintetiziraju u ganglijima dorzalnih korjenova i transportiraju centralno i periferno. To dokazuje da je glavni mehanizam opioidima posredovane spinalne analgezije, aktivacija presinaptičkih receptora, čime se selektivno smanjuje lučenje transmitora iz nociceptivnih završetaka, pa tako i sama nociceptivna transmisija. Opioidni receptori nalaze se i na perifernim okončinama senzornih neurona gdje doprinose aktivaciji nociceptora i senzitizaciju, a njihova je ekspresija povećana tijekom upale (Dickenson i Kieffer, 2006).

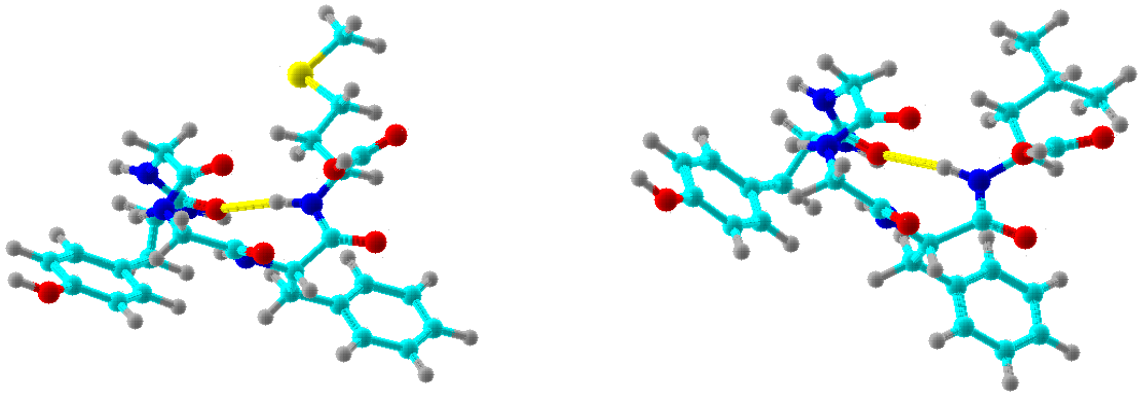
Najpotentniji opioidi su ligandi μ receptora, zatim δ opioidi, dok su agonisti κ receptora najmanje potentni.

Osim kod bolnih stanja, aktivnost endogenog opioidnog sustava povećana je u različitim stanjima, poput stresa (Parikh i sur., 2011), placebo ispitivanja (Eippert i sur, 2009; Zubita i sur, 2005), infekcija (Glattard i sur., 2010), tjelovježbe (Goldfarb i Jamurtas, 1997) i dr. Opće taj fenomen kod neuropatske boli objašnjava se gubitkom perifernog djelovanja opioida, smanjenjem broja spinalnih opioidnih receptora i povećanom aktivnošću fizioloških antagonističkih mehanizama koji smanjuju aktivnost opioidnog sustava (Bridges i sur, 2001).

Dokazi tome proizlaze iz fundamentalnih istraživanja na animalnim modelima pri čemu je primjerice u pokusu ozljede perifernog živca, primijećen gubitak opioidnih receptora na aksonima senzornih neurona. Također, gubitak μ-receptora potvrđen je u dorzalnom rogu u studiji kod periferne aksotomije u majmuna i štakora (Zhang i sur., 1998.). Istovremeno, zabilježena je povećana sinteza mRNA kolecistokinina u dorzalnom rogu, prirodnog opioidnog antagonista, što rezultira smanjenjem antinociceptivnog djelovanja samih opioida (Bridges i sur, 2001).

Enkefalin, kao prirodni opioidni peptid, identificiran je 1974. kao mješavina dva peptida (Slika 6), metionin-enkefalina i leucin-enkefalina (Beluzzi i sur., 1976). Brojni antomski, farmakološki i elektrofiziološki podaci sugeriraju da je spinalni enkefalinski sustav uključen u kontrolu ulaza nociceptivnih informacija sa periferije u koru velikog mozga, no moguće je da mehanizam nije ograničen samo na moždinu već da uključuje i supraspinalne strukture (Cesselin i sur.,1985). Mjerenjem plazmatskih koncentracija enkefalina kod pacijenata s dijabetičkom neuropatijom, zabilježeno je značajno smanjenje enkefalina u odnosu na kontrolne skupine (Fallucca i sur., 1996) što ukazuje na disfunkciju enkefalinskog sustava kod neuropatskih boli.

Enkefalini i endorfini ostvaruju inhibitorni učinak preko μ i δ opioidnih receptora, poput sintetskih opioida. Primijenjen zajedno s morfinom Leu-enkefalin potencira analgetski učinak morfina (Lee and Leybin, 1980; Beluzzi i sur., 1976), a primijenjen prije metadona i levorfanola, pojačava njihov analgetski učinak (Vaught and Takemori, 1979).



Slika 6. Kemijska struktura Met i Leu enkefalina (http://chemistry.umeche.maine.edu)

Zanimljiv je pristup liječenja neuropatskih boli virusnim vektorima enkefalina (*herpes simplex*), pri čemu je na neuropatskom modelu u štakora pokazano da vektor smanjuje

alodiniju, sprječava aktivaciju ranih gena (*c-fos* ekspresija) u senzornim neuronima drugog reda u dorzalnom rogu, pojačava učinak morfina, a nema neželjenih nuspojava tipičnih za opijate, poput razvoja tolerancije (Hao i sur., 2003).

Sprječavanje katabolizma endogenih enkefalina pokazalo se kao mogući pristup otkrivanju novih analgetika. Otkriveno je da se enkefalini razgrađuju dvjema metalopeptidazama, neutralnom endopeptidazom i aminopeptidazom N, koje mogu biti inhibirane sintetskim dualnim inhibitorima i upravo tu leži mogućnost za razvijanje novih analgetika. Ovi inhibitori također imaju potencijal i antidepresivno djelovanje pri čemu bi djelovanjem preko δ opioidnih receptora utjecali na emocionalnu komponentu boli (Noble i Rogues, 2007).

Endorfini imaju inhibitorni učinak, poput enkefalina i ostvaruju ga vežući se na μ i δ receptore. Najpotentniji je β-endorfin, koji se pokazao 20-33 puta potentnijim od morfina. U pacijenata s neuralgijom trigeminusa i reumatidnim artritisom zabilježen je pad koncentracije β-endorfina, čime se dokazuje njihova uloga u neuropatskim bolima. Također, zabilježeno je da sintetski opioidi poput morfina i fentanila smanjuju stvaranje endorfina u pokusu s morfinom i fentanilom. Taj fenomen objašnjava se negativnom povratnom spregom. Opioidni analgetici blokiraju uzlazne putove boli i tako indirektno smanjuju stvaranje endorfina (Hartwig, 1991). Ne-opioidni lijekovi djeluju na lučenje endorfina preko različitih nepoznatih mehanizama, npr. rofekoksib (COX_2 inhibitor) ostvario je puno bolji učinak kod pacijenata s osteoartitritisom i plazmatske koncentracije endorfina se nisu mijenjale, dok je paracetamol bio manje djelotvoran i plazmatske koncetracije endorfina bile su značajno snižene. Navedeni mehanizmi moraju se još detaljno istražiti (Sprouse-Blum i sur., 2010).

Dinorfini imaju brojne neželjene učinke, točnije dinorfin A, različite od tipičnog opioidnog djelovanja. U nekim neuronima djeluju inhibicijski, a u drugima facilitacijski. Povišena razina dinorfina uočena je u dorzalnim rogovima nakon ozljede i upale tkiva. Inhibicijski učinak dinorfini ostvaruju primarno preko κ receptora, dok se facilitacijski učinak ostvaruje na nekoliko načina, poput vezanja na bradikininske receptore. Aktivacijom bradikininskih receptora dolazi do otvaranja o naponu ovisnih Ca^{2+} kanala, što rezultira ulaženjem Ca^{2+} iona u stanicu, održavanju i pojačavanju boli. Neke studije zabilježile su aktivaciju mikroglija i astrocita, posredovanu fosforilacijom MAP kinaza (Lai i sur., 2006; Svensson i sur., 2005).

Pretpostavlja se da preko tih mehanizama dinorfin doprinosi razvoju hiperalgezije i pojačanju boli. Dinorfin se može vezati i na NMDA receptore koji je danas meta potencijalnih lijekova (Katzung i sur., 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

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

Iako je primarno inhibitornog djelovanja, uloga opioidnog sustava kod kroničnih boli može biti značajno promijenjena.

Upravo je uloga opioidnog sustava kod neuropatskih boli kompleksne patofiziologije i kroničnog trajanja najčešće istraživana, a dobiveni rezultati fundamentalnih istraživanja ponekad daju kontradiktorne rezultate.

Cilj ovog rada je istražiti moguću promjenu u aktivaciji enkefalina na štakorskom modelu ozljede perifernog živca parcijalnim zarezivanjem. Primjenom specifičnog protutijela za Met/Leu enkefalin imunohistokemijski će se analizirati prerezi kralježničke moždine kontrolnih i životinja s neuropatijom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. TKIVO

U ovom diplomskom radu analizirani su uzorci poprečnih prereza lumbalnog dijela leđne moždine mužjaka štakora soja Wistar, prethodno pripremljeni nakon provedenih testova i praćenja bolnog ponašanja, kako je opisano u nastavku. U opisanim pokusima na laboratorijskim životinjama, slijedio se zakon o dobrobiti životinja (Narodne novine 19/1999), te smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. 0-26/2005-439).

3.1.1. METODA IZAZIVANJA EKSPERIMENTALNE NEUROPATSKE BOLI

U mužjaka štakora soja Wistar u dobi od 3 do 4 mjeseca, težine 300 do 400 g uzgajanih na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod kirurškom je anestezijom (kloralhidrat 300 mg/kg), izazvana ozljeda *n. ishiadicusa*, na način da je pola promjera živca prerezano. Dio životinja je podvrgnut „lažnom zahvatu“, te je u njih izveden isti postupak, sano živac nije prerezan (kontrola). Životinje su višekratno testirane na akutne podražaje tijekom 4 tjedna. U kontrolne skupine životinja nije bilo promjena tijekom perioda promatranja, dok su životinje podvrgnute parcijalnoj transekciji nakon 2 tjedna razvile karakteristike neuropatske boli, promatrane kao smanjen prag mehaničkog podražaja (testiran metodom pritiska šape i primjenom von Freyjevih filamenata), te bolna reakcija uzrokovana s kapi acetona, koje su bile prisutne do završetka pokusa (4 tjedna). Po 4 životinje iz svake skupine su žrtvovane, podvrgnute su transkardijalnoj perfuziji paraformaldehidom radi uzimanja uzorka lumbalnog dijela leđne moždine za imunohistokemijske analize.

3.1.2. PRIPREMA TKIVA ZA IMUNOHISTOKEMIJSKU ANALIZU

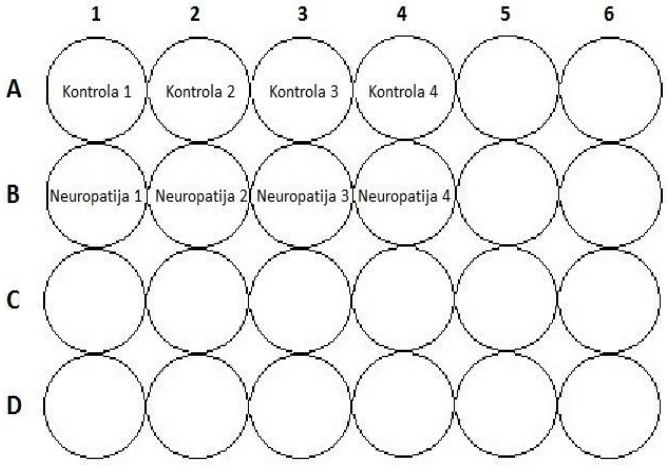
Lumbalni dio leđne moždine nakon žrtvovanja je najprije čuvan na 4 °C tijekom noći u 15%-tnoj otopini sukroze u PBS-u i konačno smrznut na -80 °C do uporabe. Smrznuti uzorci izrezani su na kriostatu (Leica, Germany) na prereze debljine 30 μm. Za imunohistokemijsku analizu korišten je lumbalni segment L5-L3, što odgovara području inervacije *n. ishiadicusa* u leđnoj moždini.

3.2. KEMIKALIJE

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

3.3. IMUNOHISTOKEMIJA

Odabrani prerezi lumbalnog L5-L3 dijela leđne moždine stavljeni su u jažice s fosfatima puferiranom fiziološkom otopinom (PBS), kako je prikazano na slici 7 (8 prereza po jažici). Ispirani su 3 puta po 5 minuta u 0.25%-tnoj otopini PBS – TritonX100 (PBST), blokirani 10%-tnim kozjim serumom tijekom 1 h i inkubirani tijekom noći na sobnoj temperaturi sa primarnim mišjim protutijelom na Leu/Met enkefalin (1:100) razrjeđenim u 1%-tnom kozjem serumu. Uzorci su sljedeći dan ispirani 3 puta po 5 minuta PBST-om i inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi sa fluorescentnim sekundarnim mišjim protutijelom Alexa Fluor-448 (1:400), razrjeđenim u 1%-tnom kozjem serumu, u tami. Uzorci su opet ispirani 3 puta po 5 minuta i potom naneseni na predmetna stakalca. Prije stavljanja pokrovnice, na prereze je nanesena supstanca koja spriječava gubitak fluorescencije. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani koristeći 10 × i 40 × povećanje.

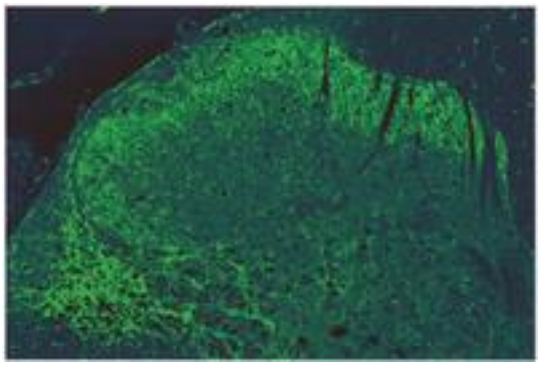


Slika 7. Shema nanošenja uzoraka u jažice

3.4. ANALIZA IMUNOFLUORESCENCIJE LEU/MET ENKEFALINA

Za vizualizaciju imunofluorescencije Leu/Met enkefalina, od svih je fotografiranih prereza izabrana po jedna reprezentativna slika koja opisuje pojedinu eksperimentalnu skupinu. Te su dvije slike spojene u programu Microsoft Paint, a potom je svjetlina/kontrast slike ugođen u programu Adobe Photoshop.

Kvantitativna analiza imunofluorescencije Leu/Met enkefalina izvedena je koristeći program Image J (**imagej**.nih.gov/ij/), koji može izračunati površinu i odrediti vrijednost piksela unutar zadanog odabira. Prema literaturnim podacima, u laminama dorzalnog roga leđne moždine Leu/Met enkefalin se detektira u površinskim laminama (I i II) (Slika 8). Na prerezima u ovom pokusu najprije je provjerena takva distribucija enkefalina analizom odnosa ukupne površine prereza i površine na kojoj se uočilo pojačano obojenje. Potom su opcije programa mjerenja podešene tako da se na označenim regijama od interesa mjeri površina označene regije (koja je smještena unutar lamina I i II) kao i intenzitet fluorescencije na označenoj regiji. U ovu su analizu uključena po 3 prereza od svake životinje; za svaku je životinju zatim izračunata srednja vrijednost, te je na kraju od srednjih vrijednosti za sve 4 životinje izračunata srednja vrijednost skupine.



Slika 8. Detekcija Leu/Met enkefalina u površinskim laminama dorzalnog roga leđne moždine sekundarnim protutijelom. (www.merckmillipore.com)

3.5. STATISTIČKA ANALIZA

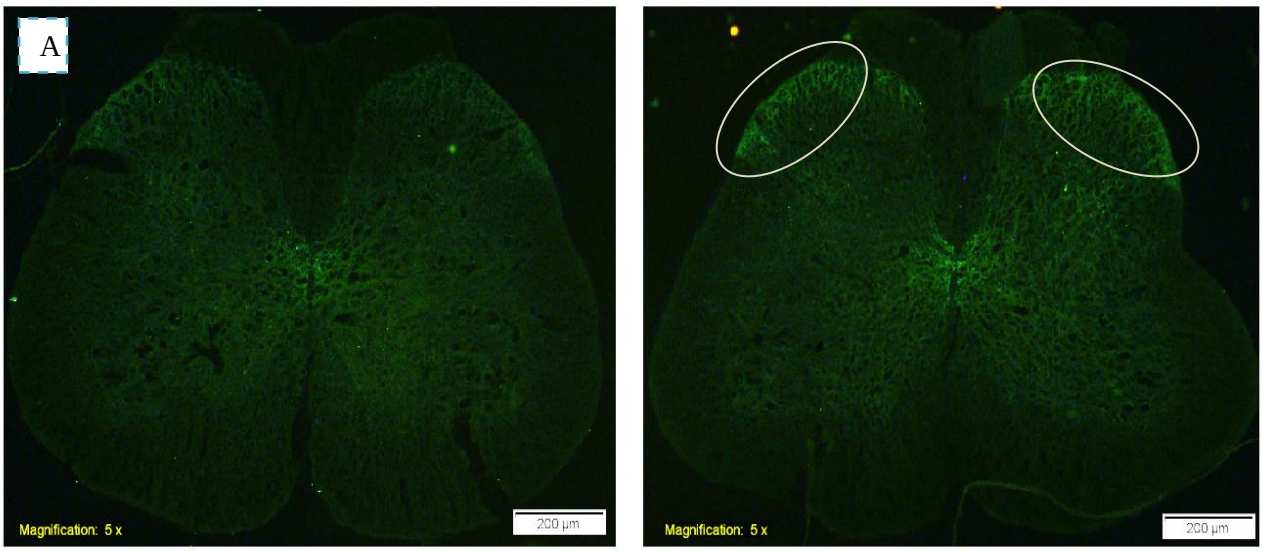
Svi rezultati dobiveni u ovom eksperimentu prikazani su kao srednja vrijednost skupine +/- standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM). Razlika varijanci analizirana je jednosmjernom analizom (One-way ANOVA). Kao statistički značajna, uzeta je vrijednost $p<0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

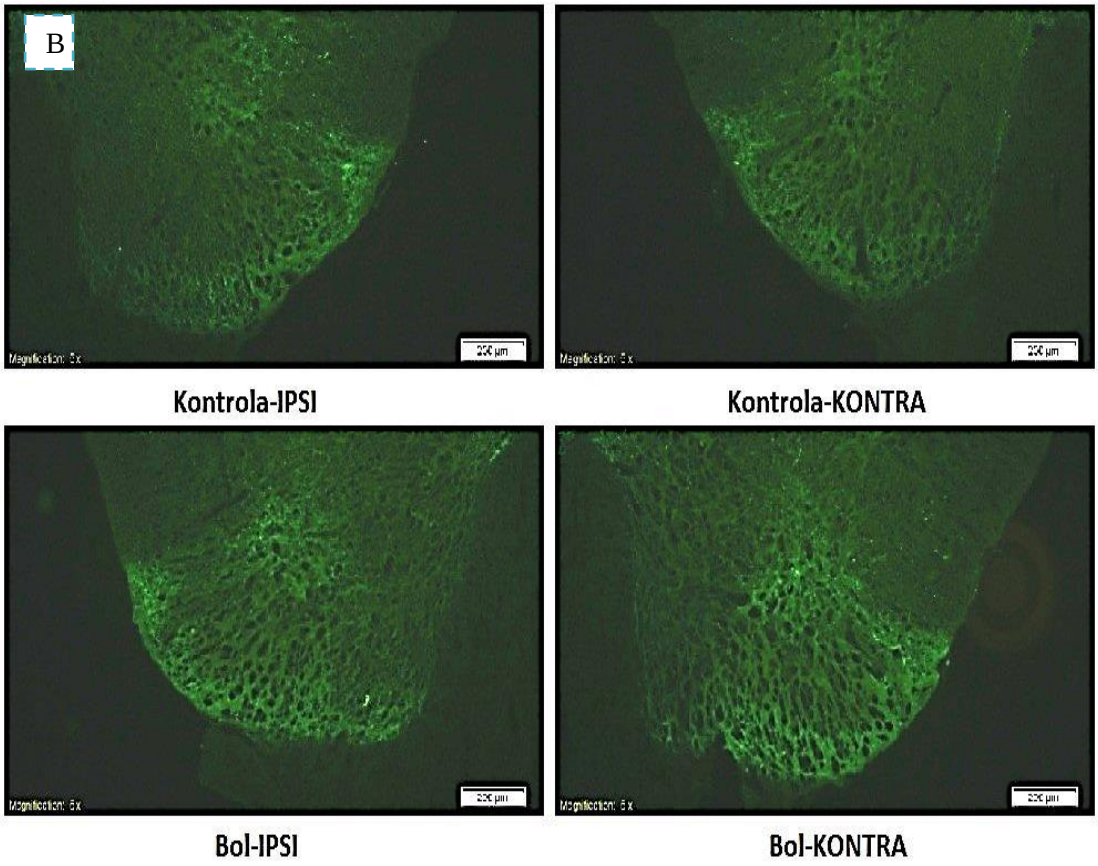
U ovom diplomskom radu metodom imunohistokemije je analizirana distribucija enkefalina u leđnoj moždini, te imunoreaktivnost enkefalina u površinskim laminama dorzalnog roga u dvije skupine životinja; kontrole kod koje je izveden „lažni“ zahvat i skupine s neuropatskom boli koja je uzrokovana parcijalnom transekcijom *n. ishiadicusa*. Analiza je provedena na lumbalnim segmentima L3-L5, koji odgovaraju inervaciji *n. ishiadicusa* u leđnoj moždini (Krmpotić-Nemanić i Marušić, 2004).

4.1. KVALITATIVNA ANALIZA IMUNOREAKTIVOSTI

Disribucija enkefalina u ovom pokusu odgovarala je prethodno opisanom u literaturi (Glazer i Basbaum, 1981; Du i Dubois, 1988). Imunoreaktivnost je detektirana najviše u površinskim laminama dorzalnog roga (I i II), te oko centralnog kanala (lamina X), što je prikazano na slici 9. Na slici 9 se također može učiti da postoji razlika u intenzitetu imunoreaktivnosti, koji se čini većim u životinja s neuropatijom u odnosu na kontrolne životinje, kao i području imunoreaktivnosti, koje se također čini veće u životinja s neuropatijom.



KONTROLA **NEUROPATIJA**



Slika 9. Prikaz imunoreaktivnosti Leu/Met enkefalina u poprečnom prerezu L4 segmenata leđne moždine u ispitivanih eksperimetalnih skupina. A) Povećanje 20 ×; B) Povećanje 40 ×.

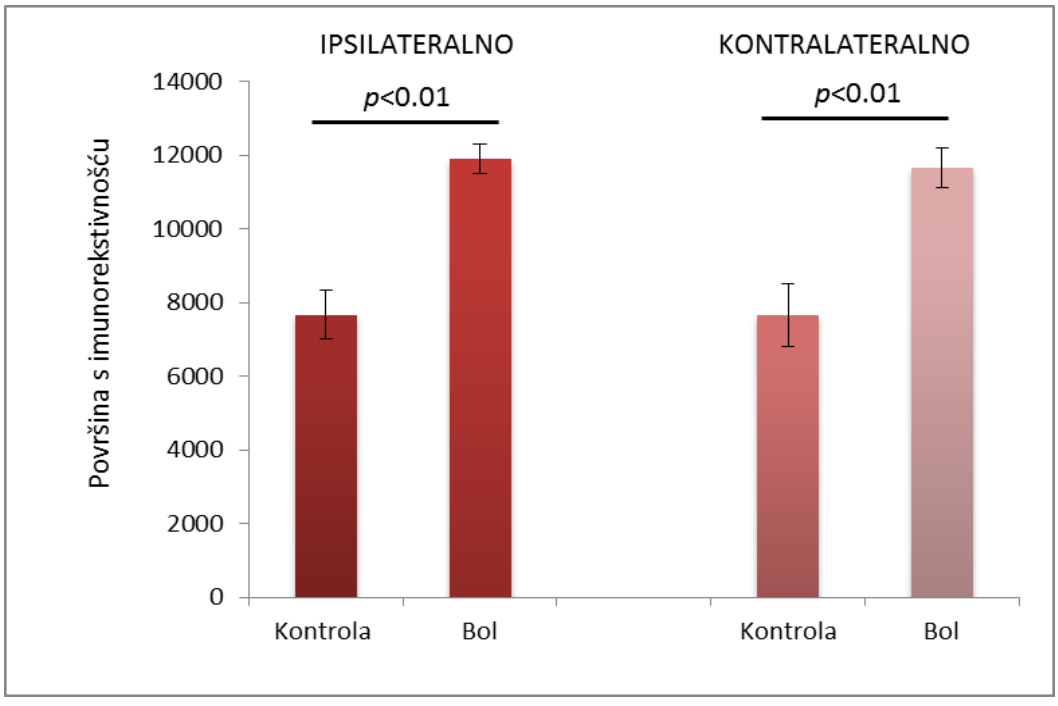
4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOREAKTIVOSTI

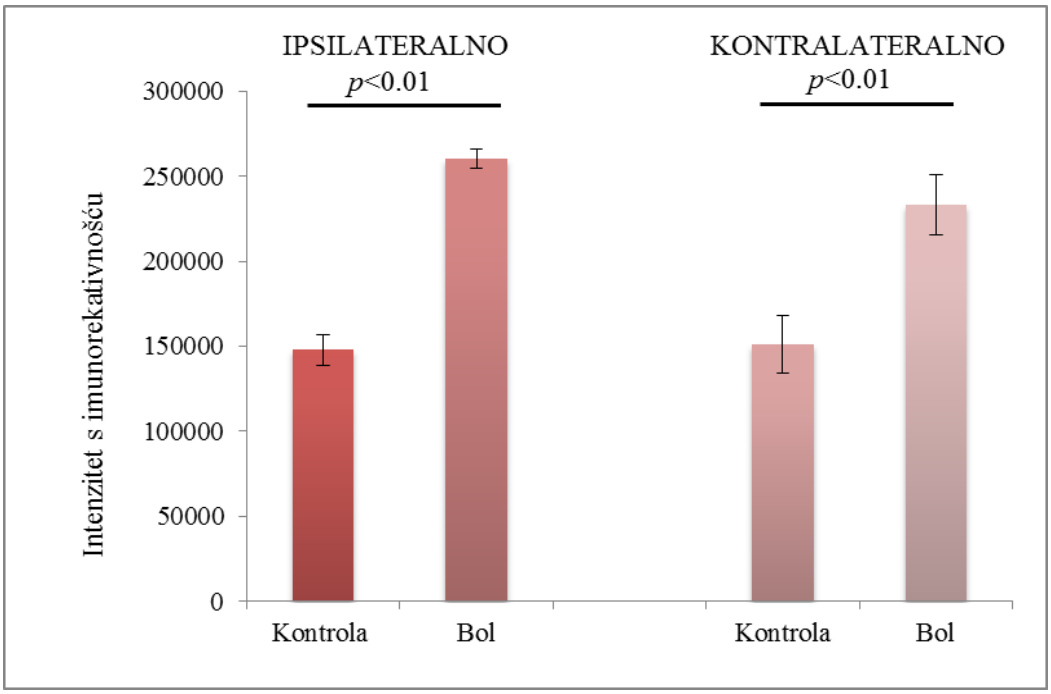
Kako bismo opažanja s kvalitativne analize vezana uz površinu imunofluorescencije, te razine imunoreaktivnosti u površinskim laminama mogli provjeriti, te kako bismo mogli napraviti statističku analizu među grupama, proveli smo kvantitativnu analizu sa slika prereza pomoću programa Image J. S obzirom da Image J analizira vrijednost piksela, te kako bismo izbjegli moguće pogreške u analizi, lamine I i II ipsilateralnog i kontralateralnog dorzalnog roga su analizirane s iste slike, odnosno s manjeg povećanja (20 ×). U tablici 2 prikazani su rezultati analize po 3 prereza od svake životinje u analizi iz kojih je izračunata srednja vrijednost, pa je iz srednjih vrijednosti pojedine životinje izračunata vrijednost za svaku skupinu. Rezultati su dodatno prikazani i grafički (Slika 10-A i 10-B).

Tablica 2. Prikaz rezultata kvantitativne analize imunoreaktivnosti izračunatih kao srednja vrijednost +/- SEM.

Porast površine s imunoreaktivošću	IPSILATERALNO		KONTRALATERALNO	
	Kontrola	Bol	Kontrola	Bol
SREDNJA VRIJEDNOST	7 666,50	11 897,50	7 656,83	11 669,33
STANDARDNA DEVIJACIJA (±)	1 316,02	805,66	1 676,73	1 073,98
SEM (+/-)	658,011	402,83	838,37	536,99

Porast razine imunoreaktivnosti	IPSILATERALNO		KONTRALATERALNO	
	Kontrola	Bol	Kontrola	Bol
SREDNJA VRIJEDNOST	147 926,17	260 322,67	150 924,42	233 313,17
STANDARDNA DEVIJACIJA (±)	18 173,80	11 807,55	33 966,04	35 350,93
SEM (+/-)	9 086,90	5 903,78	16 983,02	17 675,47





Slika 10. Porast Leu/Met enkefalina u eksperimentalnoj neuropatskoj boli ipsilateralno i kontralateralno, promatrano kao : A) porast površine s imunoreaktivnošću

B) porast intenziteta imunoreaktivnosti

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost +/- SEM.

Kvantitativna je analiza potvrdila nalaze, te je primijećen obostrani porast površine imunoreaktivnosti Leu/Met enkefalina u laminama I i II (p<0.01), kao i intenzitet imunoreaktivnosti (p<0.01) u životinja s jednostranom parcijalnom transekcijom živca.

Iz toga možemo zaključiti da se koncetracija enkefalina u dorzalnom rogu povećava s boli, i ipsilateralno i kontralateralno. U pokusima ozljede perifernog živca već je zabilježena povećana imunoreaktivnost Met enkefalina u kralježničkoj moždini (Fukushima i sur., 2011; Sommer i Myers, 1995).

Također, povećanje enkefalina opisano je u modelima ozljede kralježničke moždine (Abraham i sur., 2000), poliartritisa (Calzá i sur., 1998), električne stimulacije (Nishimori i sur., 1989) i dr.

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

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu mjerena je imunoreaktivnost enkefalina imunohistokemijskom metodom u uzorcima tkiva dorzalnog roga kralježnične moždine kontrolnih životinja i životinja s neuropatskom boli uzrokovanom parcijalnom transekcijom perifernog živca. Pokazali smo da se nakon jednostrane ozljede živca imunoreaktivnost enkefalina u dorzalnom rogu povećava obostrano. To nas dovodi do zaključka da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima kronične hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja μ, a vjerojatno i δ opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje fiziološke učinke.

6. LITERATURA

1. Abraham KE, Brewer KL, McGinty JF. Opioid peptide messenger RNA expression is increased at spinal and supraspinal levels following excitotoxic spinal cord injury. *Neuroscience*, 2000, 99, 189-197.

2. Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 8-16.

3. Bach-Rojecky L, Relja M, Lacković Z. Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *J Neural Transm*, 2005, 112, 215-219.

4. Barada A. Neuropatska bol. *Medicus*, 2014, 23, 2, 139-143.

5. Baron R. Neuropathic pain: a clinical perspective. *Handbook Exp Pharmacol*, 2009, 194, 3-30.

6. Beluzzi JD, Grant N, Garsky V, Sarantakis D, Wise CD, Stein L. Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. *Nature*, 1976, 260, 625 – 626.

7. Bridges D, Thompson SWN, Rice ASC. Mechanisams of neurophatic pain. *Brit J Anesth*, 2001, 87, 12-26.

8. Calzá L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hökfelt T. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvantinduced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 1998, 82, 575-589.

9. Cesselin F, Bourgoin S, Artaud F, Gozlan H, Hamon M. The spinal enkephalinergic and serotoninergic systems in the control of transmission of nociceptive message. *Brit J Pharmacol*, 1985, 16, 119-37.

10. Coull JA, Boudreau D, Bachard K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 2003, 424, 938-942.

11. Detekcija Leu/Met enkefalina u površinskim laminama dorzalnog roga leđne moždine sekundarnim protutijelom, http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Anti-Enkephalin-Antibody%2C-Met,MM_NF-AB5026, pristupljeno 25.06.2015.

12. Dickenson AH, Kieffer B. Opiates: basic mechanisms. U: Textbook of pain, McMachon SB, Koltzenburg M, urednici, Philadelphia, Elsevier, 2006, str. 427-442.

13. Eippert F, Bingel U, Schoell ED, Yacubian J, Klinger R, Lorenz J, Büchel C. Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. *Neuron*, 2009, 4, 533-543.

14. Fallucca F, Tonnarini G, Di Biase N, D'Allessandro M, Negri M. Plasma met-enkephalin levels in diabetic patients: influence of autonomic neuropathy. *Metabolism*, 1996, 45, 9, 1065-1068.

15. Finger M i sur. Smjernice za liječenje neuropatske boli, Hrvatsko društvo za liječenje boli, 2006.mrežna stranica?

16. Fukushima T, Tsuda M, Kofuji T, Hori Y. Physiological properties of enkephalin-containing neurons in the spinal dorsal horn visualized by expression of green fluorescent protein in BAC transgenic mice. *BMC Neuroscience*, 2011, 12, 36.

17. Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller AH, Laux A, Zhang D, Schmidt AR, Delalande F, Laventie BJ, Dirrig-Grosch S, Colin DA, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumonet Y. Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils. *PLoS One*, 2011, 5, 1, 8791.

18. Goldfarb AH, Jamurtas AZ. Beta-endorphin response to exercise. An update. *Sports Med*, 1997, 24, 1, 8-16.

19. Guo W, Miyoshi K, Dubner R, Gu M, Li M, Liu J, Yang J, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F. Spinal 5-HT3 receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glial signaling cascade, *Mol Pain*, 2014, 10, 35.

20. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 598-609.

21. Hains BC, Waxman SG. Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI, *Prog Brain Res*, 2007, 161, 195–203.

22. Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ. Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain. *Pain*, 2003, 102, 135-142.

23. Hartwig AC. Peripheral beta-endorphin and pain modulation. *Anesth Prog*, 1991, 38, 75-71.

24. International Association for the Study of Pain, (Internet), http://www.iasp-pain.org/, pristupljeno 21.5.2015.

25. Ji R-R, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*, 2001, 8, 1-10.

26. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 531-538.

27. Khalefa BI, Shaqura M, Al-Khrasani M, Fürst S, Mousa SA, Schäfer M. Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. *Eur J Pain*, 2012, 16, 690-705.

28. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 509-512.35

29. Lai J, Luo MC, Chen Q, Ma S, Gardell LR, Ossipov MH, Porreca F. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat Neurosci*, 2006, 9, 12, 1534–1540.

30. Lee NM, Leybin L. Opiate and peptide interaction: Effect of enkephalins on morphine analgesia. *Eur J Pharmacol*, 1980, 68, 181–185.

31. Marvizon JC, Ma Yao-Ying, Charles AC, Walwyn W, Evans CJ. U: Pharmacology of Opioid System. Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, urednici, Seattle, IASP Press, 2010, str. 87-111.

32. Millan MJ. Descending control of pain, *Progress in neurobiology*, 2002, 6, 355-474.

33. Modulacija boli, http://www.labanim.hr/wp-content/uploads/2013/02/D.%C5%A0vob-%C5%A0trac_Bol-i-otklanjanje-boli.pdf pristupljeno 04.06.2015.

34. Nishimori T, Buzzi MG, Moskowitz MA, Uhl GR. Preproenkephalin mRNA expression in nucleus caudalis neurons is enhanced by trigeminal stimulation. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989, 6, 203-210.

35. Noble F, Rogues BP. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11, 2, 145-159.

36. Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 2008, 117, 141-61.

37. Parikh D, Hamid A, Friedman TC, Nguyen K, Tseng A, Marquez P, Lutfy K. Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: the importance of stress duration. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650, 2-3, 563-567.

38. Silveira JWS, Dias QM, Del Bel EA, Prado WA. Serotonin receptors are involved in the spinal mediation of descending facilitation of surgical incision-induced increase of Fos-like immunoreactivity in rats, *Mol Pain*, 2010, 6, 17.

39. Sommer C, Myers RR. Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol*, 1995, 90, 478-485.

40. Sprouse-Blum AS, Smith G, Sugai D, Don Parsa F, Understanding Endorphins and Their Importance in Pain Management. Hawaii Med J, 2010, 69, 3, 70–71.

41. Strukturna formula Met- i Leu-enkefalina, 2015, http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY132/Enk-Stat.html, pristupljeno 13.06.2015.

42. Svensson CI, Hua XY, Powell HC, Lai J, Porreca F, Yaksh TL. Prostaglandin E2 release evoked by intrathecal dynorphin is dependent on spinal p38 mitogen activated protein kinase. *Neuropeptides*, 2005, 39, 5, 485–94.

43. Vaught JL, Takemori AE. Differential effects of leucine and methionine enkephalin on morphine-induced analgesia, acute tolerance and dependence. *J Pharmacol Exp Pharmac*, 1979, 208, 86-90.

44. Woolf CJ. Costigan M, Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain, *PNAS*, 1999, 14, 7723-7730.

45. Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hokfelt T. Down-regulation of mu-receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience*, 1998, 82, 223-240.

46. Zubieta JK, Bueller JA, Jackson LR, Scott DJ, Xu Y, Koeppe RA, Nichols TE, Stohler, CS. Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. *J Neurosci*, 2005, 25, 34, 7754-7762.

7. SAŽETAK

Mehanizmi nastanka i održavanja kronične neuropatske boli izuzetno su kompleksni te, između ostalog, uključuje brojne periferne i središnje promjene broja i funkcije različitih molekula, poput N tipa Ca^{2+} kanala, TRPV1 vaniloidnih receptora, tetrodotoksin (TTX)-osjetljivih Na^{+} kanala i ASIC ionskih kanala, kao i opioidnih mi, delta i kapa receptora.

Brojna istraživanja su pokazala značajnu ulogu endogenog opioidnog sustava u procesima transmisije i modulacije bolne informacije. Od tri glavne skupine opioidnih peptida, najviše dokaza o uključenosti u nociceptivne procese na spinalnoj razini dostupno je za enkefaline. Iako je primarno inhibitornog djelovanja, uloga opioidnog sustava kod kroničnih boli može biti značajno promijenjena.

Upravo je uloga opioidnog sustava kod neuropatskih boli kompleksne patofiziologije i kroničnog trajanja najčešće istraživana, a dobiveni rezultati fundamentalnih istraživanja ponekad daju kontradiktorne rezultate.

U ovom diplomskom radu mjerena je imunoreaktivnost enkefalina imunohistokemijskom metodom u uzorcima tkiva dorzalnog roga kralježnične moždine kontrolnih životinja i životinja s neuropatskom boli uzrokovanom parcijalnom transekcijom perifernog živca. Pokazali smo da se nakon jednostrane ozljede živca imunoreaktivnost enkefalina u dorzalnom rogu povećava obostrano. To nas dovodi do zaključka da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima kronične hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja μ, a vjerojatno i δ opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje fiziološke učinke.

Kako bi se skupili dodatni dokazi o navedenoj hipotezi, potrebna su daljnja istraživanja koja će doprinijeti boljem razumijevanju kompleksnog fenomena neuropatke boli, te u konačnici rezultirati učinkovitijim liječenjem oboljelih.

SUMMARY

Mechanism of development and maintenance of chronic neuropathic pain is extremely complex and, among other things, includes a number of peripheral and central changes in the number and function of various molecules such as N type Ca^{2+} channel, TRPV1 vanilloid receptor, tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^{+} channels and the ASIC ionic channels, as well as opioid mu, delta and kappa receptors.

Numerous research has shown the significant role the endogenous opioid system has in processes of transmission and modulation of painful stimuli. Of the three main opioid peptide groups, the best evidence for their involvement in the regulation of nociceptive processes on the spinal level has been found for enkephalins. Albeit primarily inhibitory, the role of the opioid system in chronic pain can be substantially altered.

It is precisely the role that the opioid system has in neuropathic pain of complex pathophysiology and chronic in its character that is primarily the subject of research, and the results of fundamental research sometimes show contradictory conclusions.

In this work was measured encephalin immunoreactivity by immunohistochemical methods in tissue samples of the dorsal horn of the spinal cord of control animals and animals with neuropathic pain induced by partial transection of a peripheral nerve. We have shown that after a unilateral nerve injury encephalin immunoreactivity in dorsal horn enhances both sides. This brings us to the conclusion that despite the increased concentration of encephalins, in conditions of chronic hypersensitivity is decreasing μ, and probably δ opioid receptors through which encephalins exercise their physiological effects.

In order to gather further evidence on the above hypothesis, further research is needed that will contribute to a better understanding of the complex phenomenon neuropathic pain, and ultimately result in more effective treatment of patients.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ENKEFALINI U NEUROPATSKOJ BOLI

Andrej Jurić

SAŽETAK

Mehanizmi nastanka i održavanja kronične neuropatske boli izuzetno su kompleksni te, između ostalog, uključuje brojne periferne i središnje promjene broja i funkcije različitih molekula, poput N tipa Ca^{2+} kanala, TRPV1 vaniloidnih receptora, Na^{+} kanala, kao i opioidnih mi, delta i kapa receptora.Brojna istraživanja su pokazala značajnu ulogu endogenog opioidnog sustava u procesima transmisije i modulacije bolne informacije. Od tri glavne skupine opioidnih peptida, najviše dokaza o uključenosti u nociceptivne procese na spinalnoj razini dostupno je za enkefaline. Iako je primarno inhibitornog djelovanja, uloga opioidnog sustava kod kroničnih boli može biti značajno promijenjena. Upravo je uloga opioidnog sustava kod neuropatskih boli kompleksne patofiziologije i kroničnog trajanja najčešće istraživana, a dobiveni rezultati fundamentalnih istraživanja ponekad daju kontradiktorne rezultate. U ovom diplomskom radu mjerena je imunoreaktivnost enkefalina imunohistokemijskom metodom u uzorcima tkiva dorzalnog roga kralježnične moždine kontrolnih životinja i životinja s neuropatskom boli uzrokovanom parcijalnom transekcijom perifernog živca. Pokazali smo da se nakon jednostrane ozljede živca imunoreaktivnost enkefalina u dorzalnom rogu povećava obostrano. To nas dovodi do zaključka da usprkos povećanoj koncentraciji enkefalina, u stanjima kronične hiperosjetljivosti dolazi do smanjenja broja μ, a vjerojatno i δ opioidnih receptora preko kojih enkefalini ostvaruju svoje fiziološke učinke. Kako bi se skupili dodatni dokazi o navedenoj hipotezi, potrebna su daljnja istraživanja koja će doprinijeti boljem razumijevanju kompleksnog fenomena neuropatke boli, te u konačnici rezultirati učinkovitijim liječenjem oboljelih.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 2 grafička prikaza, 2 tablice i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Enkefalini, neuropatska bol

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesoica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Branka Zorc, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Erim Bešić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

ROLE OF ENKEPHALINS IN NEUROPHATIC PAIN

Andrej jurić

SUMMARY

Mechanism of development and maintenance of chronic neuropathic pain is extremely complex and, among other things, includes a number of peripheral and central changes in the number and function of various molecules such as N type Ca^{2+} channel, TRPV1 vanilloid receptor, tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^{+} channels and the ASIC ionic channels, as well as opioid mu, delta and kappa receptors. Numerous research has shown the significant role the endogenous opioid system has in processes of transmission and modulation of painful stimuli. Of the three main opioid peptide groups, the best evidence for their involvement in the regulation of nociceptive processes on the spinal level has been found for enkephalins. Albeit primarily inhibitory, the role of the opioid system in chronic pain can be substantially altered. It is precisely the role that the opioid system has in neuropathic pain of complex pathophysiology and chronic in its character that is primarily the subject of research, and the results of fundamental research sometimes show contradictory conclusions. In this work enkephalin immunoreactivity was measured by immunohistochemical methods in tissue samples of the dorsal horn of the spinal cord of control animals and animals with neuropathic pain induced by partial transection of a peripheral nerve. We have shown that after a unilateral nerve injury enkephalin immunoreactivity in the dorsal horn enhances on both sides. This brings us to the conclusion that despite the increased enkephalin concentration, in conditions of chronic hypersensitivity decreases the number of μ and probably δ opioid receptors through which enkephalins exercise their physiological effects. In order to gather further evidence on the above hypothesis, further research is needed that will contribute to a better understanding of the complex phenomenon neuropathic pain, and ultimately result in more effective treatment of patients.

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

Thesis includes: 38 pages, 2 figures, 2 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: enkephalins, neurophatic pain

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

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Branka Zorc, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Erim Bešić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.