Uloga astrocita u eksperimentalnom modelu kronične mišićne boli uzrokovane karagenanom

Barišić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:296762

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivona Barišić

Uloga astrocita u eksperimentalnom modelu kronične mišićne boli uzrokovane karagenanom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky koja mi je omogućila izradu diplomskog rada u području koje me zanima. Zahvaljujem se na pokazanom strpljenju, pruženoj podršci i pomoći tijekom izrade mog rada.

Veliko hvala asistentici Višnji Drinovac Vlah, mag. pharm. na svoj pomoći koju mi je pružila tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada i obrade dobivenih podataka.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, koji su mi studentske dane učinili nezaboravnim. Hvala im na podršci, smijehu, pomoći, iznenađenjima i prekrasnom vremenu koje smo proveli zajedno.

Najviše sam zahvalna svojoj obitelji bez koje ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala im na svoj ljubavi, strpljenju, podršci i razumijevanju koje mi pružaju sve ove godine. Hvala im na pokazanom povjerenju. Hvala im što znam da su uvijek uz mene, da se na njih uvijek mogu osloniti.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 BOL 1
1.1.1. Podjela boli 1
1.1.2. Receptori za bol i prijenos bolnog impulsa 3
1.1.3. Neurotransmitori u prijenosu boli 4
1.1.4. Modulacija nocicepcije 5
1.2. UPALNA BOL 6
1.2.1. Senzitizacija i mehanizmi nastanka upalne boli 7
1.2.2. Hiperalgezija i alodinija 8
1.3. GLIJA STANICE 9
1.3.1. Mikroglija 10
1.3.2. Astrociti 10
1.3.3. Neuron-astrocit i mikroglija-astrocit interkacija 12
1.4. LIJEČENJE BOLI 14
2. OBRAZLOŽENJE TEME 17
3. MATERIJALI I METODE 18
3.1. TKIVO 18
3.1.1. Metoda izazivanja kronične mišićne boli 18
3.1.2. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu 19
3.2. KEMIKALIJE 19
3.3. IMUNOHISTOKEMIJA 20
3.4. ANALIZA IMUNOFLUORESCENCIJE GFAP 21
3.5. STATISTIČKA ANALIZA 21
4. REZULTATI I RASPRAVA 22
4.1. KVALITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE GFAP 22
4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE GFAP 23
5. ZAKLJUČAK 26
6. LITERATURA 27
7. SAŽETAK / SUMMARY 30

1. UVOD

1.1 BOL

Međunarodna udruga za istraživanje boli (IASP – Internacional Association for the Study of Pain) definirala je bol kao „...neugodno senzorno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnom ili mogućom ozljedom tkiva...“. Bol se pojavljuje prilikom oštećenja tkiva te potiče pojedinca na reakciju uklanjanja bolnog podražaja. Prema tome, bol je zaštitni mehanizam. Međutim, bol može biti i patološka te je poznavanje uzroka i vrste boli potrebno za postavljanje točne dijagnoze određenih bolesti, kao i određivanje optimalne terapije (Guyton i Hall, 2011).

1.1.1. Podjela boli

Bol dijelimo s obzirom na trajanje, porijeklo, etiologiju, intenzitet i simptome (Bach-Rojecky, 2006).

Dva glavna tipa boli s obzirom na duljinu trajanja su akutna i kronična bol.

Akutna bol je normalni, predvidljivi fiziološki odgovor na štetni mehanički, kemijski ili termički podražaj (Carr i Goudas, 1999). Najčešće se ne osjeti u dubokom tkivu, a pojavljuje se 0,1 sekundu nakon ozljede koja je uglavnom mehaničkog ili termalnog tipa te potiče na rekaciju uklanjanja bolnog podražaja (Guyton i Hall, 2011). Akutna bol nestaje uklanjanjem njenog uzroka, odnosno završetkom procesa cijeljenja.

Kronična bol je definirana kao trajna ili isprekidana bol koja traje više od 3 mjeseca (Tennat i Hermann, 2000). Ova vrsta boli obično je povezana s mehaničkim, kemijskim ili termalnim oštećenjem tkiva. Pojavljuje se u površinskom i dubokom tkivu i organima te uzrokuje često nepodnošljivu patnju pacijentima zbog čega negativno utječe na njihovu kvalitetu života (Guyton i Hall, 2011).

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

Prema etiologiji možemo izdvojiti tri najvažnija oblika boli: nociceptivna, upalna i neuropatska bol.

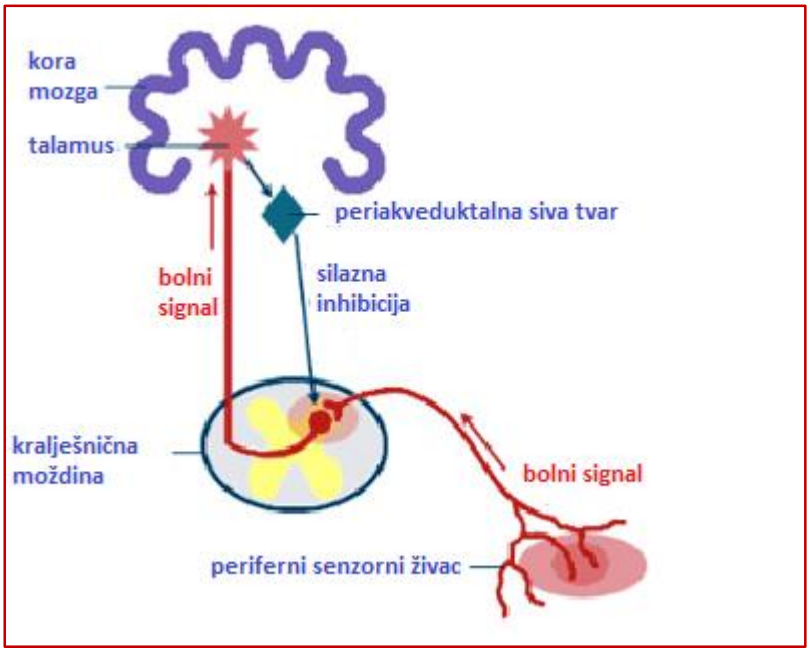
Nociceptivna bol je vrsta boli koju uzrokuje akutni podražaj visokog intenziteta na periferne nociceptore u fiziološkim uvjetima. Spomenuti akutni podražaj, kemijskog, mehaničkog ili

termalnog (>47ºC) tipa, dovodi do aktivacije ionskih kanala ili specifičnih receptora na perifernim živčanim završecima. Aktivacija vaniloidnog receptora 1 ili TRPV1 (engl. *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) receptora potiče lučenje glutamata iz perifernih okončina. Glutamat ostvaruje svoje učinke preko AMPA (α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina), NMDA (N-metil-D-aspartat) i kainatnih receptora te daje svoj doprinos nocicepciji. Nastaje akcijski potencijal koji se s periferije prenosi u kralješničnu moždinu, gdje dolazi do aktivacije drugih neurona u osjetnom putu. Ova je vrsta boli zbog svog upozoravajućeg karaktera ključna za preživljavanje jer potiče obrambene mehanizme organizma (Scholz i Woolf, 2002).

Upalna bol je vrsta boli koja se javlja nakon upale ili ozljede tkiva. Dolazi do aktivacije nociceptora upalnim medijatorima ili do njihove povećane osjetljivosti preko utjecaja na signalnu kaskadu, nakon čega se živčani impuls aksonima prenosi do kralješnične moždine (Bach-Rojecky, 2006).

Neuropatska bol je bol inducirana disfunkcijom ili bolesti perifernog i/ili središnjeg živčanog sustava (Baron, 2005). Ova vrsta boli može biti uzrokovana raznim bolestima, poput dijabetesa, karcinoma, HIV infekcije, multiple skleroze, infekcije herpes zoster virusom (Zimmermannm, 2001). Brojne patološke promjene kod neuropatske boli se događaju kako na periferiji, odnosno mjestu ozljede živca, tako i na razini kralješnične moždine, što čini patofiziolgiju neuropatske boli iznimno složenom. Na primjer, nakon periferne ozljede živca prvo će aksoni blizu mjesta ozljede provoditi bolne signale. S vremenom će i drugi dijelovi zahvaćenog živca pridonijeti širenju i održavanju bolnih signala, uključujući postsinaptičke neurone dorzalnog roga. Dakle, iako je ozljeda bila periferna, bol se proširila i do središnjeg živčanog sustava (Slika 1) jer su patološke promjene nastupile na obje razine (Zimmermann, 2001).

S obzirom na etiologiju, neuropatsku bol dijelimo na fokalne i multifokalne ozljede perifernog živčanog sustava (posttraumatička neuralgija, postherpetička neuralgija, ishemijska neuropatija, fantomska bol uda), generalizirane ozljede perifernog živčanog sustava ili polineuropatije (neuropatija uzrokovana HIV infekcijom, alkoholom, dijabetesom, deficitom vitamina B ili trovanjem različitim metalima i lijekovima, poput arsena, zlata, kloramfenikola, metronidazola, izoniazida), ozljede središnjeg živčanog sustava (multipla skleroza, ozljeda leđne moždine, mozga) te kompleksne neuropatske poremećaje (kauzalgija) (Baron, 2005).



Slika 1. Prijenos bolnog impulsa nakon periferne ozljede u neuropatskoj boli.
(preuzeto s: http://www.spinesurgery-wecareindia.com/condition/neuropathic_pain.html)

1.1.2. Receptori za bol i prijenos bolnog impulsa

Nocicepcija je proces kojim se termalni, mehanički ili kemijski podražaj nakon podraživanja perifernih živčanih okončina prenosi do središnjeg živčanog sustava (Basbaum i Jessell, 2000). Proces nocicepcije možemo podijeliti na nekoliko faza. Prva se zove transdukcija (prevođenje štetnog podražaja u akcijski potencijal), nakon koje slijedi transmisija (proces provođenja živčanog impulsa vlaknima do kralješnične moždine i mozga). Treća faza je modulacija, odnosno obrada informacija o boli koje su stigle u središnji živčani sustav s periferije, dok se posljednja faza zove percepcija (doživljaj boli) (Kogler i sur., 2013).

Slobodni živčani završeci koji registriraju štetne podražaje zovu se *nociceptori*. Oni inerviraju kožu, mišiće, unutarnje organe, krvne žile i kosti (Julius i Basbaum, 2001). Prelaze u ekscitirano stanje samo kod podražaja visokog intenziteta, što im omogućava da detektiraju i reagiraju samo na potencijalno štetne podražaje. Nastali akcijski potencijali se dalje šalju u dorzalni rog kralješnične moždine perifernim aferentnim vlaknima koja dijelimo u dvije glavne skupine s obzirom na vrstu podražaja na koju reagiraju: Aδ-vlakna i C-vlakna.

Aδ-vlakna su mijelinizirana vlakna koja posreduju u prijenosu akutne, lokalizirane, oštre, brze boli i prenose impulse brzinom 12-36 m/s. Potiču osobu na brzu reakciju kojom bi se uklonio bolni podražaj. Dijelimo ih u dva razreda: tip I i tip II. Tip I reagira na mehaničke i kemijske podražaje, ali ima relativno visok prag podražljivosti za toplinske podražaje (>50ºC). Reagirat će na niže temperature samo ako se takav podražaj održi određeno vrijeme. Za ovaj tip Aδ-vlakana je bitna pojava senzitizacije na mjestu ozljede, što znači da će se smanjiti mehanički ili toplinski prag podražljivosti. Tip II Aδ-nociceptora ima puno niži prag podražljivosti na toplinske i znatno veći na mehaničke podražaje. Zbog toga je aktivnost vlakana tipa II odgovorna za prvu reakciju na štetnu toplinu, dok tip I Aδ-vlakana posreduje kod pojave mehanički uzrokovane boli (Basbaum i sur., 2009).

C-vlakna su tanka demijelinizirana vlakna polimodalnog karaktera, odnosno osjetljiva su na više vrsta podražaja, poput mehaničkih, toplinskih i kemijskih (Perl, 2007). Prenose sporu, tupu, difuznu bol brzinom 0,5-1,2 m/s (Bach-Rojecky, 2006).

Obje skupine vlakana ulaze u kralješničnu moždinu preko spinalnog korijena, nakon čega se bolni signali prenose do mozga neospinotalamičkim ili paleospinotalamičkim traktom.

Neospinotalamičkim traktom se prenosi brza bol. Većina Aδ-vlakana završava u marginalnoj lamini ili lamini I dorzalnog roga te izlučuje glutamat na svojim okončinama. Izlučeni glutamat dalje aktivira neurone drugog reda neospinotalamičkog trakta koji dalje prenose bolni signal sve do razine mozga.
Paleospinotalamički put prenosi uglavnom sporu kroničnu bol koju provode nemijelinizirana C-vlakna, iako se ponekad prenose i bolni signali putem Aδ-vlakana. U ovom signalnom putu središnje grane perifernih C-vlakana završavaju u želatinoznoj tvari dorzalnog roga, koju čine lamine II i III. Tamo iz svojih okončina otpuštaju supstanciju P i glutamat. Glutamat djeluje brzo i kratko, dok se za supstanciju P smatra da je bitniji neurotransmitor koji se luči iz završetaka C-vlakana. Otpušta se sporije te je više odgovorna za daljnji prijenos signala neuronima s kratkim vlaknima do lamine V dorzalnog roga. Odatle se bolni signal prenosi do mozga (Guyton i Hall, 2011).

1.1.3. Neurotransmitori u prijenosu boli

Neurotransmitori su tvari bitne za prijenos bolnih signala između dva neurona ili neurona i druge stanice.

Glutamat je ekscitacijska aminokiselina i najvažniji ekscitacijski neurotransmitor u cijelom živčanom sustavu, zbog čega je ključan za signalizaciju boli na svim razinama (D'Mello i Dickenson, 2008). Uzrokuje depolarizaciju membrane putem ionotropnih AMPA (α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) i NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora koji se nalaze na membranama perifernih okončina aferentnih živaca, neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine i neuronima talamusa. Zajedno s glutamatom se periferno otpuštaju supstancija P i peptid srodan genu za kalcitonin (CGRP, engl. c*alcitonin gene related peptide*), što je posebno izraženo kod perifernih upalnih procesa (Carlton i Coggeshall, 1999). Glutamat također može djelovati na presinaptičke NMDA receptore u dorzalnom rogu kralješnične moždine, što za posljedicu ima povećano lučenje neurotransmitora u središnje sinapse (Milan, 1999).

Osim glutamata, za prijenos bolnih signala bitni su i supstancija P, CGRP, somatostatin, vazoaktivni intestinalni peptid, faktor lučenja kortikotropina, kolecistokinin. Uz spomenute neurotransmitore, postoje još neki medijatori, poput adenozin-trifosfata (ATP-a), dušikovog (II) oksida i prostaglandina, koji se izlučuju iz ne-živčanih izvora u kralješničnoj moždini, a djelovanje im može biti ekscitacijsko ili inhibicijsko.

1.1.4. Modulacija nocicepcije

Stupanj boli koji uzrokuje reakciju se znatno razlikuje od osobe do osobe. Razlog tome je mogućnost mozga da potiskuje ulazak bolnih signala u središnji živčani sustav aktivacijom sustava za kontrolu boli. Taj se sustav zove *analgezijski sustav*. Sastoji se od sive tvari oko akvedukta i periventrikularnog područja, velike jezgre rafe i kompleksa za inhibiciju boli smještenog u stražnjim rogovima kralješnične moždine (Guyton i Hall, 2011).

Nakon stimulacije sive tvari oko akvedukta u mezencefalonu, signali se prenose do velike jezgre rafe. Aksoni neurona, koji izlaze iz spomenute jezgre, prenose bolni signal sve do kompleksa za inhibiciju boli smještenog u dorzalnom rogu kralješnične moždine. Tada analgezijski sustav može blokirati bol prije nego li bolni signal krene prema mozgu (Guyton i Hall, 2011).

Silazni putovi mogu djelovati inhibicijski ili ekscitacijski na transmisiju u dorzalnom rogu. Analgetsko djelovanje ostvaruje se inhibicijskim signalnim putovima. Inhibiraju se ekscitacijski interneuroni, dok se inhibicijski, primjerice opioidni, ekscitiraju te se tako

smanjuje lučenje ekscitacijskih neurotransmitora iz okončina aferentnih neurona (Vanegas i Schaible, 2004).

Enkefalin i serotonin su najznačajniji neurotransmitori analgezijskog sustava, a izlučuju ih mnogi neuroni iz periventrikularne jezgre i periakveduktalnog područja. Serotonin izlučen u dorzalnom rogu kralješnične moždine potiče lučenje enkefalina. Za enkefalin se smatra da je ključan za presinaptičku i postsinaptičku inhibiciju bolnih signala koji u kralješničnu moždinu dolaze putem C-vlakana i Aδ-vlakana (Guyton i Hall, 2011).

1.2. UPALNA BOL

Upala je odgovor imunosnog sustava na infekciju ili ozljedu. Uključena je u patogenezu artritisa, tumora, infarkta, kao i neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti. Koristan je događaj koji dovodi do uklanjanja štetnih faktora. Akutna faza upale je karakterizirana brzim nakupljanjem granulocita, posebno neutrofila, te monocita koji sazrijevaju u upalne makrofage te kasnije postaju tkivni makrofagi (Ricciotti i FitzGerald, 2011). Jedna od posljedica ovog procesa je upravo pojava *upalne boli*, (dolor). Također se javljaju: rubor (crvenilo), calor (toplina), tumor (oticanje) i gubitak funkcije. Upalna bol u ovakvom stanju ima zaštitnu ulogu jer ograničava kretnje dijela tijela zahvaćenog upalom te tako sprječava daljnju štetu tijekom procesa zacjeljivanja (Walsh i McWilliams, 2014). Kada se štetni uzročnik ukloni fagocitozom, upalna reakcija se polako smanjuje i nestaje (Ricciotti i FitzGerald, 2011).

Trombociti, mastociti, leukociti i druge stanice koje se nalaze oko nociceptora luče razne tvari, kao što su citokini, prostaglandini, kinini, serotonini. Dolazi do aktivacije nociceptora, što za posljedicu ima daljnje lučenje tvari, poput supstancije P i CGRP-a iz kolateralnih živčanih završetaka istog nociceptora. Nastaje živčani impuls koji se prenosi aksonom u kralješničnu moždinu, ali i u kolateralne aksonske ogranke. Zbog toga dolazi do lučenja neuropeptida u koži, pri čemu je supstancija P odgovorna za vazodilataciju, a CGRP za povećanje kapilarne permeabilnosti (Sann i Pierau, 1998).

Izlučeni medijatori upale mogu aktivirati nociceptore izravno, poput protona, ATP-a i serotonina, ili pak djeluju na signalne procese koji se odvijaju unutar samog nociceptora (Scholz i Woolf, 2002), što za posljedicu ima smanjenje praga aktivacije nociceptora i povećanje podražljivosti membrane aferentnog završetka. To je stanje periferne senzitizacije (Bach-Rojecky, 2006).

Također dolazi do aktivacije tihih („silent“) nociceptora koji čine 10-20% nemijeliniziranih C-vlakana koji se nalaze u koži, zglobovima i organima te u fiziološkim uvjetima ne odgovaraju na akutne bolne podražaje. Međutim, u stanju upale dolazi do njihove senzitizacije i aktivacije pomoću raznih medijatora upale (Milan, 1999).

Promjene na periferiji uzrokuju i promjene na razini središnjeg živčanog sustava (Slika 2). Dolazi do aktivacije glija stanica u središnjem živčanom sustavu i središnje senzitizacije tako što se mijenja transkripcija gena za neke molekule uključene u proces nocicepcije. Na primjer, faktori rasta živčanih stanica, koji su oslobođeni na periferiji, se prenose u stanična tijela C-vlakana u dorzalnom korijenu (Woolf i Costigan, 1999). Tu dolazi do modifikacije transkripcije gena za mnoge molekule (podjedinice receptora, neurotransmitore, enzime) na način da se poveća njihovo stvaranje (Milan, 1999).

1.2.1. Senzitizacija i mehanizmi nastanka upalne boli

Senzitizacija je pojava karakteristična za osjet boli, a označava pojačanje osjeta uslijed ponovljenog i učestalog podraživanja nociceptora. Zbog toga dugotrajno podraživanje nociceptora uzrokuje pojačavanje boli i prijelaz boli iz akutne u kroničnu, dok se druge osjetne stanice (za njuh, vid, sluh) prilagode dugotrajnom podražaju koji u konačnici dovede do smanjenja njihove podražljivosti (Bach-Rojecky, 2006).

Pojava periferne i središnje senzitizacije je specifična za upalnu i neuropatsku vrstu boli (Bach-Rojecky, 2006).

Povećanje podražljivosti nociceptora zove se *periferna senzitizacija*. Medijatori upale koji su oslobođeni periferno aktiviraju protein kinaze A i C preko receptora spregnutih s G-proteinima. Aktivirane kinaze dalje fosforiliraju receptore i ionske kanale, zbog čega se smanjuju njihovi pragovi aktivacije, dok se podražljivost membrane nociceptora povećava (Petersen-Felix i Curatolo, 2002).

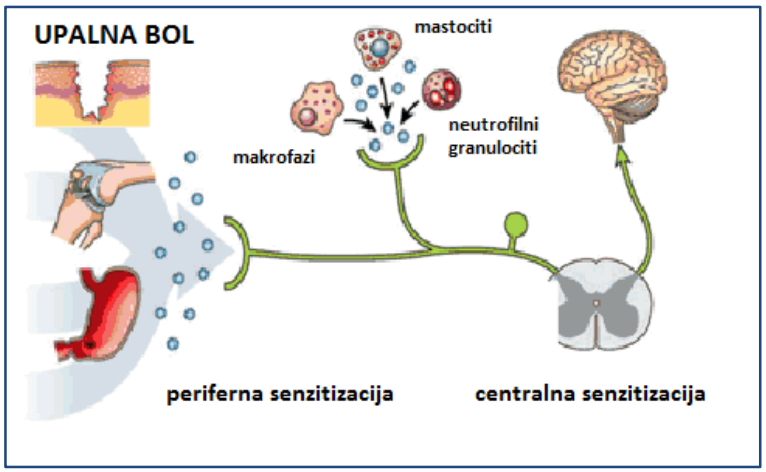
Kao posljedica hiperaktivnosti perifernih nociceptora, javljaju se sekundarne promjene u dorzalnom rogu kralješnične moždine, tj. dolazi do *središnje senzitizacije*, koja može biti brza i odgođena (Petersen-Felix i Curatolo, 2002).

Brza senzitizacija se javlja prilikom otpuštanja glutamata koji dalje ostvaruje svoje učinke preko poststinaptičkih NMDA receptora. Povećanje broja i podražljivosti NMDA receptora ostvaruje se indirektno, preko kalcija, SP i ostalih kinina koji aktiviraju protein kinaze A i C,

što rezultira fosforilacijom samih receptora (Coull i sur., 2003). Aktivacija NMDA receptora glutamatom uzrokuje postsinaptičko povećanje koncentracije Ca^{2+} koji u konačnici dovodi do povećane sinteze NO i akivacije NO-cGMP (ciklički gvanozin monofosfat) puta u presinaptičkom neuronu. Na taj se način poveća lučenje ekscitacijskih aminokiselina i supstancije P u središnje sinapse (Jones i Sorkin, 2003; Ji i Woolf, 2001). Uočena je također povećana ekspresija Na^{+} kanala na postsinaptičkim neuronima te N-tipa Ca^{2+} kanala na presinaptičkim neuronima, što je bitno za proces brze centralne senzitizacije (Baron, 2005).

Izlučeni neurotransmitori i medijatori upale mogu aktivirati glija stanice te tako potaknuti lučenje proupalnih citokina, ATP-a i NO, što dodatno povećava lučenje eksitacijskih neurotransmitora i supstancije P iz presinaptičkih okončina živaca (Watkins i sur.,2001).

Transkripcijske promjene u neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine vjerojatan su uzrok *odgođene* središnje senzitizaciji. Između ostalih, povećava se ekspresija gena za c-fos i ciklooksigenazu-2 (COX-2), što posljedično povećava sintezu prostaglandina. Oni, djelujući postsinaptički ili presinaptički, povećavaju ekscitacijsku, odnosno reduciraju inhibicijsku transmisiju (Scholz i Woolf, 2002).



Slika 2. Patofiziologija upalne boli uključuje procese periferne i centralne ili središnje senzitizacije. (modificirano prema Scholz i Woolf, 2002)

1.2.2. Hiperalgezija i alodinija

Hiperalgezija i alodinija su simptomi različitih kroničnih bolnih stanja, uključujući upalnu bol (Jensen i Finnerup, 2014).

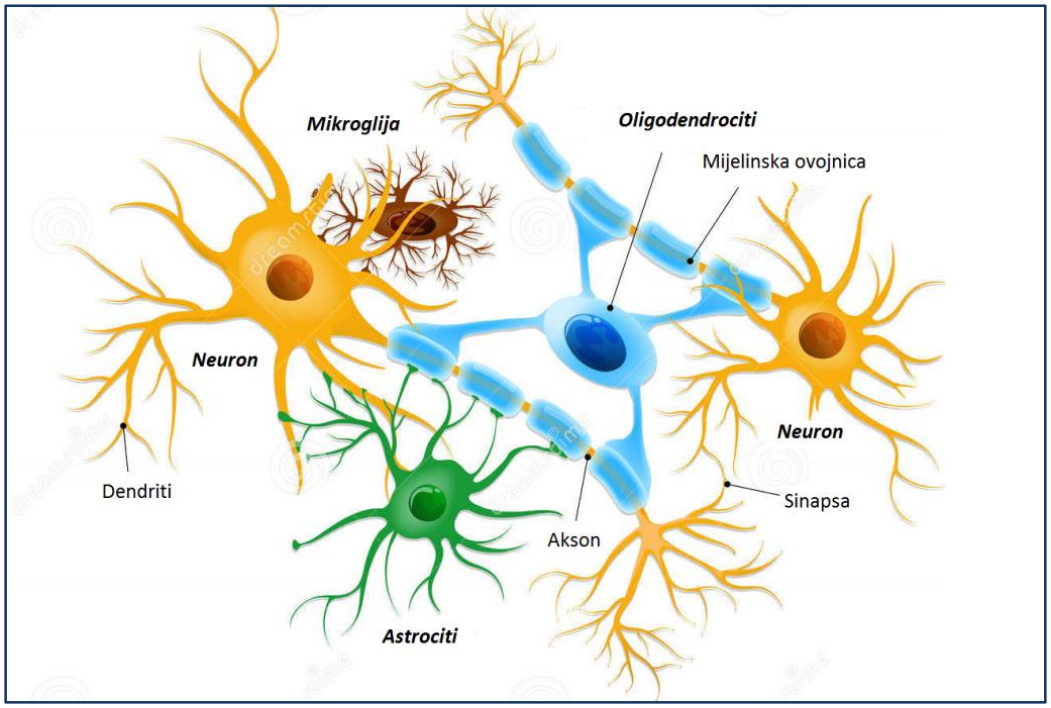
Hiperalgezija je pojam koji označava povećanu osjetljivost na bolne podražaje. Može biti primarna i sekundarna. Primarna hiperalgezija se javlja na mjestu upale ili ozljede živca ili tkiva te može biti uzrokovana termalnim, kemijskim ili mehaničkim podražajem, a nastaje zbog promjena na razini nociceptora (Coutaux i sur., 2005). Sekundarna hiperalgezija je uzrokovana mehaničkom ozljedom živca, pri čemu dolazi do povećane podražljivosti središnjih neurona. Nakon nekog vremena postaje neovisna o signalima koji dolaze s periferije (Milan, 1999).

Alodinija je stanje povećane osjetljivosti na podražaje koji nisu bolni. Javlja se kao posljedica ozljede živčanog sustava hladnoćom ili mehaničkim podražajem. Mehanizam nastanka alodinije uključuje središnju senzitizaciju, reorganizaciju i aktivaciju senzitiziranih neurona u dorzalnom rogu kralješnične moždine (Bach-Rojecky, 2006).

1.3. GLIJA STANICE

Stanice središnjeg živčnog sustava možemo podijeliti u dvije glavne skupine: neurone i glija stanice (Slika 3) (Raghavendra i DeLeo, 2003).

Glija stanice čine 70% populacije stanica u mozgu i kralješničnoj moždini. Imaju nekoliko uloga: osigurati strukturnu potporu neuronima te regulirati njihov mikrookoliš, opskrbiti ih nutrijentima i tvarima za biosintezu, odijeliti jedan neuron od drugoga te ukloniti ozlijeđeni ili nefunkcionalni neuron. Postoje tri vrste glija stanica u središnjem živčanom sustavu, a to su astrociti, mikroglija i oligodendrociti (Raghavendra i DeLeo, 2003). Uključene su u neuroimunosni odgovor koji slijedi nakon ozljede živca ili upalne reakcije, a rezultira pojavom trajne, kronične boli (Raghavendra i DeLeo, 2003). Nakon bolnog podražaja dolazi do promjene u koncentraciji određenih iona (npr. Ca^{2+} u astrocitima), posttranslacijskih promjena (npr. fosforilacija protein kinaze aktivirane mitogenom – MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinases*), translacijskih i transkripcijskih promjena (npr. promjena molekula eksprimiranih na površini glija stanica), morfoloških promjena (npr. hipertrofija – rast glija stanica) i proliferacije (povećanje broja glija stanica) (Ru-Rong i sur., 2013).



Slika 3. Stanice središnjeg živčanog sustava: neuroni i glija stanice (astrociti, mikroglija i oligodendrociti)

(preuzeto s: https://www.dreamstime.com/stock-illustration-glial-cells-brain-neurons-neuroglial-non-neuronal-there-different-types-oligodendrocyte-image47546395)

1.3.1. Mikroglija

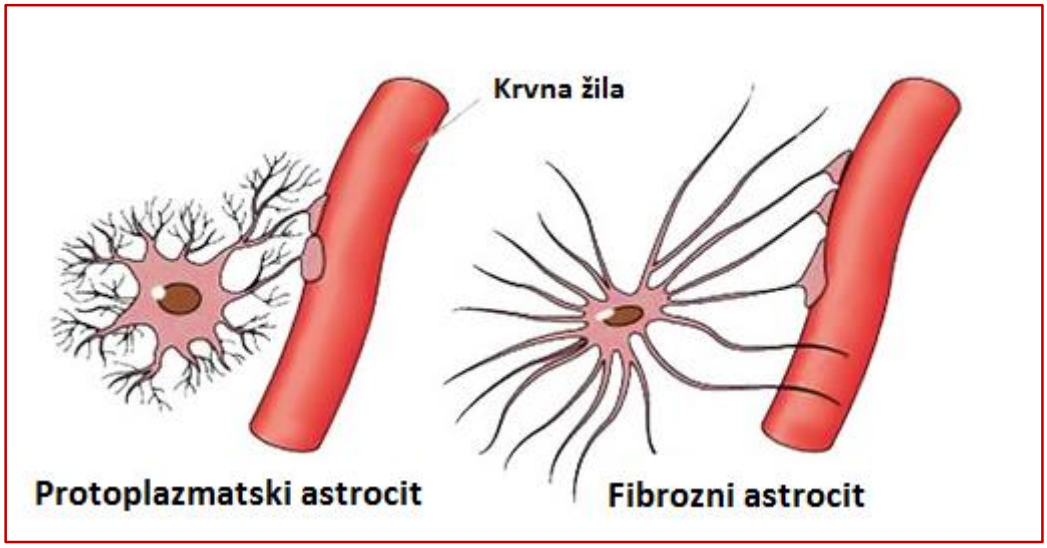
Mikroglija su makrofazima slične stanice smještene u središnjem živčanom sustavu te su najmanje od svih glija stanica (Ling i Wong, 1993). U fiziološkim uvjetima stupaju u interakcije sa sinapsama te tako doprinose njihovoj funkciji (Tremblay i sur., 2011). Bitnu ulogu imaju u neuroinflamatornom odgovoru organizma na ozljedu živčanog sustava ili prodor mikroorganizama (Aschner i sur., 1999). Dolazi do promjene njihovog oblika iz razgranatog u ameboidni, mijenja se broj i vrsta molekula na njihovoj površini te se odvija proces proliferacije, pri čemu se njihov broj znatno poveća već dva dana nakon ozljede. Brojnim studijama dokazana je značajna uloga mikroglije u razvoju neuropatske i akutne upalne boli (Ru-Rong i sur., 2013).

1.3.2. Astrociti

Astrociti su specijalizirane glija stanice zvjezdastog oblika, puno ih je više od neurona te su prvo opisane kao potporne stanice. Međutim, u posljednjim desetljećima je otkriveno da su

oni odgovorni za velik broj kompleksnih funkcija u zdravom središnjem živčanom sustavu, što uključuje ulogu u sinaptičkoj transmisiji i obradi informacija koje dolaze do neurona (Sofroniew i Vinters, 2010).

Nalazimo ih u cijelom središnjem živčanom sustavu. Podijeljeni su u dvije skupine (Slika 4) s obzirom na razlike u morfologiji i anatomskoj lokaciji: protoplazmatski astrociti, koji se nalaze u sivoj tvari, i fibrozni astrociti, koji se nalaze u bijeloj tvari (Sofroniew i Vinters, 2010).



Slika 4. Skupine astrocita s obzirom na morfologiju i lokaciju: protoplazmatski i fibrozni astrocit (preuzeto s: http://biol469.tumblr.com/post/102308669175/chapter-22-nerve-cells-neural-circuity-and)

Detekcija astrocita moguća je imunohistokemijskim tehnikama. Spomenuta metoda omogućuje detekciju specifičnih molekulskih markera na razini stanice. U slučaju astrocita prati se ekspresija GFAP (engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*) na njihovoj površini. Taj je protein prvo izoliran u visokim koncentracijama u starim demijeliziranim nakupinama kod pacijenata s mulitplom sklerozom te ga se povezalo s reaktivnim astrocitima u takvim nakupinama. Može se koristiti kao pouzdan marker reaktivnih astrocita koji reagiraju na ozljedu središnjeg živčanog sustava. Međutim, GFAP nije uočljiv na astrocitima koji se nalaze u zdravom tkivu središnjeg živčanog sustava ili dijelu udaljenom od ozljede te zbog toga nije potpuni marker svih astrocita (Sofroniew, 2009). Osim GFAP, kao markeri za astrocite mogu se koristiti i vimentin, S-100 protein i glutamin-sintetaza (Ridet i sur., 1997).

Na svojoj površini astrociti eksprimiraju K^+ i Na^+ ionske kanale, ali ne provode akcijski potencijal, za razliku od neurona. Kod njih je za komunikaciju s neuronom ili astrocit-astrocit komunikaciju bitno regulirano povećanje koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+} (Nedergaard i sur., 2003).

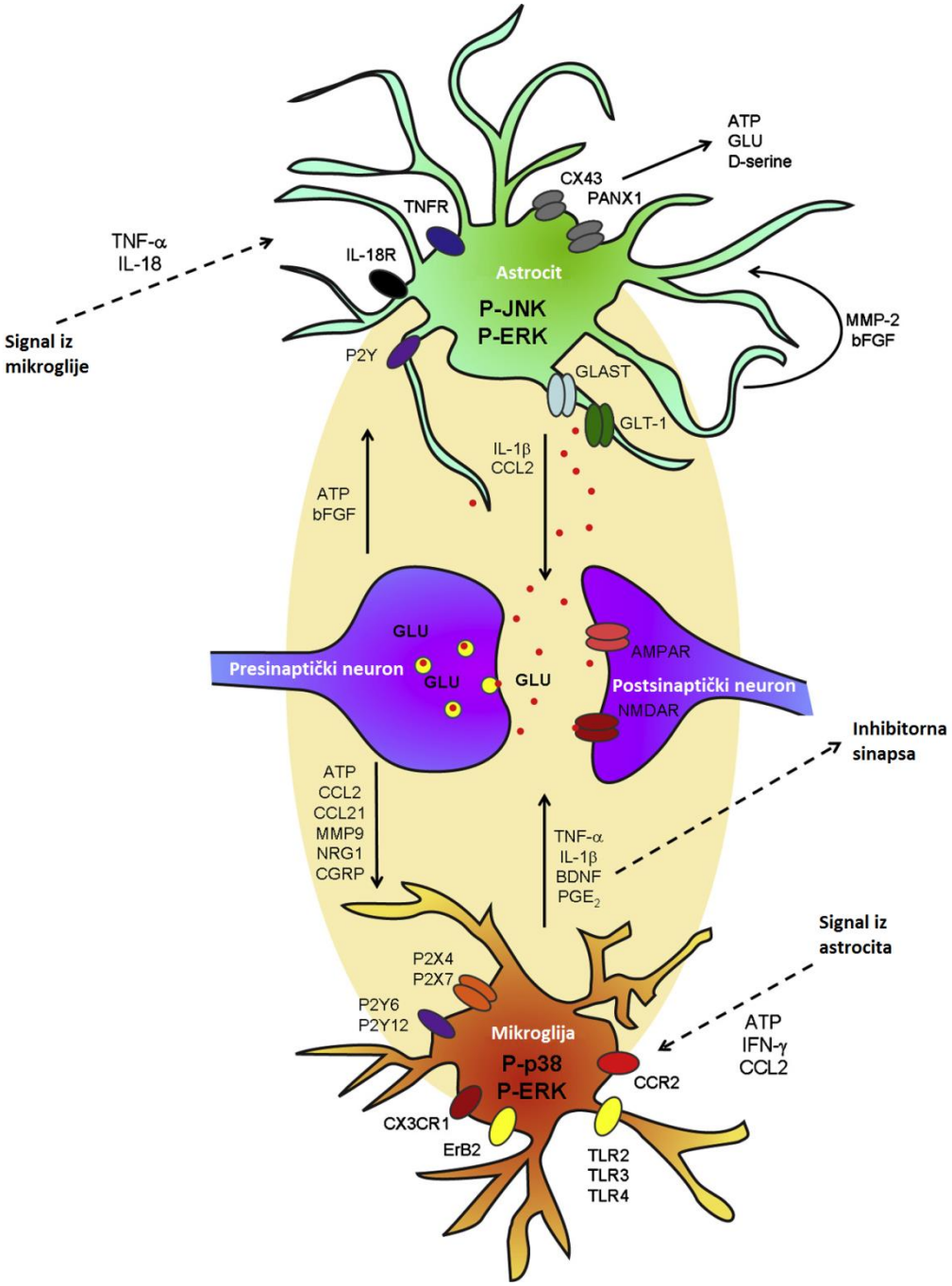
Oštećenje perifernog živčanog sustava ozljedom ili upalom uzrokuje središnju senzitizaciju i značajnu aktivaciju astrocita u dorzalnom rogu kralješnične moždine (Raghavendra i DeLeo, 2003). Uzrok aktivacije astrocita mogu biti ozljeda živca, ozljeda kralješnične moždine, kronična primjena opioida, primjena antineoplastičnih lijekova, tumor kostiju i kože, neuropatija uzrokovana HIV infekcijom (Ru-Rong i sur., 2013). Povećani broj određenih neurotransmitora, koji se otpuštaju u dorzalnom rogu kralješnične moždine zbog periferne ozljede, uzrokuju promjene astrocita. Dolazi do povećanja njihovog broja i ekspresije određenih molekula na njihovoj površini, poput GFAP, vimentina i S-100, koji se zbog toga i koriste kao markeri za praćenje aktivnosti astrocita. Na površini ove vrste glija stanica nalaze se i brojni receptori za glutamat, supstanciju P, CGRP, citokine i kemokine, poput receptora za interleukin 18 (IL-18), faktor nekroze tumora (TNF, engl. *tumor necrosis factor*), što spomenute molekule čini potencijalnim aktivatorima astrocita (Old i sur., 2015).

Smanjenje glutamatnih transportera GLT1 (engl. *glutamate transporter-1*) i GLAST (engl. *glutamate and aspartic acid transporter*) nakon aktivacije astrocita je jedna od glavnih promjena za koju se vjeruje da je najviše odgovorna za doprinos astrocita procesu održavanja boli. Posljedica je povećanje razine izvanstaničnog glutamata koji doprinosi procesu senzitizacije preko NMDA i AMPA receptora (Old i sur., 2015).

Posljednja istraživanja su pokazala da astrociti postaju vidljivi i prolaze kroz proces proliferacije nekoliko dana nakon periferne ozljede živca, odnosno nakon odgovora mikroglije. Također je važno naglasiti da ostaju u aktiviranom stanju duže od mikroglije, zbog čega možemo reći da mikroglija ima bitnu ulogu u inicijaciji boli, dok su astrociti zaslužni za njeno održavanje (Old i sur., 2015).

1.3.3. Neuron-astrocit i mikroglija-astrocit interkacija

Budući se bolni signal prenosi neuronima, glija stanice moraju stupati u interakciju s neuronima kako bi utjecali na bolni podražaj, a također stupaju i u međusobne interakcije (Slika 5) (Ru-Rong i sur., 2013).



Slika 5. Shematski prikaz neuron-glija i glija-glija interakcija u kralješničnoj moždini tijekom kronične boli. Nakon ozljede dolazi do otpuštanja ATP-a, kemokina, CGRP-a iz okončina primarnog aferentng neurona, što dovodi do aktivacije mikroglije u dorzalnom rogu. Ona u aktiviranom stanju proizvodi proupalne citokine (TNF-α, IL-1β, IL-18) i faktor rasta, što ima za posljedicu pojavu središnje senzitizacije. Astrociti mogu biti aktivirani medijatorima iz mikroglije (TNF-α i IL-18). Posljedična fosforilacija protein kinaze JNK u astrocitima dovodi do stvaranja i otpuštanja kemokina i citokina. Aktivirani astrociti smanjuju broj transportnih proteina za glutamat na svojoj površini (GLT1 i GLAST) te otpuštaju ATP i IFN-γ koji održavaju mikrogliju u aktiviranom stanju.
(modificirano prema: Ru-Rong i sur., 2013)

Signali koji se prenose neuronima su bitni za aktivaciju astrocita. Na okončinama primarnih senzornih neurona luči se faktor rasta fibroblasta (FGF, engl. *fibroblast growth factor*) koji ima važnu ulogu u komunikaciji neuron-astrocit. FGF, kao aktivator astrocita, potiče njihovu mitozu, rast i diferencijaciju, što je bitno za njihovo održavanje boli (Ji i sur., 2006).

Nakon pojave bolnog podražaja prvo se aktivira mikroglija. Ona luči signalne molekule, od kojih su najbitnije TNF-α i interleukin 18 (IL-18). TNF-α uzrokuje fosforilaciju JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinases*) u astrocitima. To je enzim koji pripada skupini protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*) te utječe na biosintezu proupalnih citokina na transkripcijskoj i translacijskog razini (Mehan i sur., 2011). Interleukin 18, otpušten iz mikroglije, aktivira specifični receptor u astrocitima, što dalje dovodi do aktivacije transkripcijskog faktora NF-κB (engl. *nuclear factor κB*). Međutim, astrociti također otpuštaju brojne molekule nakon svoje aktivacije, a neke od njih povratno utječu na aktivnost mikroglija stanica, poput ATP-a (adenozin trifostafa) i interferona-γ (Ru-Rong i sur., 2013).

1.4. LIJEČENJE BOLI

Dvije osnovne skupine lijekova koji se koriste u liječenju boli su nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAIL) i opioidni agonisti.

Nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi postižu analgetski učinak inhibicijom ciklooksigenaze (COX), enzima koji sudjeluje u sintezi prostaglandina iz arahidonske kiseline. Ovi lijekovi djeluju na periferiji, kao i na razini kralješnične moždine. COX ima dvije strukturne izoforme, COX-1 i COX-2, pa lijekove iz ove skupine razlikujemo po selektivnosti za određenu izoformu ciklooksigenaze. COX-1 je bitna u stvaranju prostaglandina uključenih u normalne fiziološke procese, poput zaštite želučane sluznice, regulacije renalnog protoka krvi, dok je COX-2 eksprimirana u upalnim stanicama. Zbog toga je novija generacija lijekova iz ove skupine dizajnirana na način da što selektivnije inhibira COX-2, kako bi se izbjegla gastrotoksičnost i nefrotoksičnost. Zajednički naziv tih lijekova je koksibi (npr. celekoksib). Neki od neselektivnih NSAIL su: acetilsalicilna kiselina, ibuprofen, ketoprofen, naproksen, indometacin, diklofenak (Lynch i Watson, 2006).

Opioidni agonisti su jaki analgetici koji ostvaruju svoj učinak vezanjem na opioidne receptore. Postoje tri različite vrste opiodinih receptora, ali za analgetski učinak su najbitniji μ-opioidni receptori (Rosenblum i sur., 2008). Opiodini agonisti pojačavaju silaznu inhibiciju

u mozgu, dok se na razini kralješnične moždine i periferije smanjuje lučenje ekscitacijskih neurotransmitora. Nuspojave karakteristične za ovu skupinu lijekova su: sedacija, mučnina, konstipacija i znojenje (Lynch i Watson, 2006). Uz ovu vrstu analgetika također je povezan pojam tolerancije, koji je definiran kao smanjen subjektivni i objektivni učinak jednake količine opioida nakon određenog vremena, zbog čega je potrebno povećanje doze lijeka za postizanje istog učinka (Rosenblum i sur., 2008). Glavni prestavnik ove skupine lijekova je mofin, a ostali lijekovi s ovim mehanizmom djelovanja su: fentanil, oksikodon, tramadol (Lynch i Watson, 2006).

Međutim, kako u terapiji kronične boli standardni analgetici nisu djelotvorni, koriste se lijekovi koji po svojoj primarnoj ulozi nisu analgetici, poput antidepresiva (amitriptilin, desimipramin, nortriptilin), antiepileptika (gabapentin, pregabalin, okskarbazepin, karbamazepin, topiramat), lokalnih anestetika (lidokain), kanabinoida. Lijekovi iz ovih terapijskih skupina smanjuju aktivnost natrijevih i kalcijevih kanala, djeluju antagonistički na NMDA receptore, sprječavaju nastajanje i provođenje bolnih signala te tako smanjuju osjet boli (Lynch i Watson, 2006).

Budući je u patofiziološkim procesima kronične boli zabilježena značajna uloga glija stanica, proučavan je utjecaj nekih lijekova na glija stanice i njihova potencijalna primjena u stanju kronične boli. Jedan od tih lijekova je leflunomid, lijek indiciran za reumatoidni artritis. Njegov aktivni oblik inhibira aktivaciju glija stanica u kralješničnoj moždini nakon periferne ozljede. Drugi istraživani lijek je fluorocitrat. On je metabolički inhibitor glija stanica. Međutim, zbog svoje toksičnosti i neselektivnog uništavanja glija stanica nije prikladan za kliničku upotrebu. Nadalje, proučavani su i derivati ksantina. Ovi lijekovi smanjuju aktivaciju glija stanica, inhibiraju otpuštanje proupalnih citokina te potiču preuzimanje izvanstaničnih ekscitatornih aminokiselina pomoću transportera na glija stanicama. Lako prolaze krvno-moždanu barijeru i dokazana je njihova sigurnost primjene (Raghavendra i DeLeo, 2003). Prema tome, lijekovi koji izravno ili neizravno djeluju na glija stanice mogu djelovati na signalni put povezan s MAPK, na aktivatore glija stanica ili na medijatore otpuštene iz glija stanica (Ru-Rong i sur., 2013).

Novije studije su pokazale da lipidni medijatori, poput rezolvina, protektina i lipoksina, imaju protuupalni učinak te bi mogli smanjiti upalu i postoperativnu bol, i to primijenjeni u niskim dozama. Receptori za ove medijatore su široko rasprostranjeni u neuronima, glija stanicama i stanicama imunosnog sustava. Ukoliko im se dokaže potentnost i sigurnost primjene, ovi

endogeni lipidni medijatori, njihovi analozi ili agonisti bi mogli imati važnu ulogu u terapiji kronične boli (Ru-Rong i sur., 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Na temelju brojnih istraživanja zaključeno je da se glija stanice, uključujući astrocite, aktiviraju u modelima kronične boli te imaju značajnu ulogu u njenom održavanju. Nakon periferne ozljede ili upale, bolni impuls se prenosi neuronima do kralješnične moždine, gdje dolazi prvo do aktivacije mikroglije, a zatim i astrocita. To rezultira promjenama u njihovom broju, veličini, ekspresiji molekula na njihovoj površini te količini i vrsti medijatora koje otpuštaju. Spomenute promjene doprinose središnjoj senzitizaciji i imaju bitnu ulogu u patofiziologiji kronične boli.

Cilj ovog rada je imunohistokemijskom metodom istražiti aktivaciju astrocita u dorzalnom rogu kralješnične moždine u eksperimentalnom modelu kronične mišićne boli uzrokovane intramuskularnom primjenom karagenana. Rezultati ovog istraživanja mogli bi ukazati na ulogu aktiviranih astrocita u održavanju kronične boli mišićnog porijekla i usmjeriti daljnja istaživanja u tom području.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. TKIVO

U istraživanju su korišteni uzorci poprečnih prereza lumbalnog dijela kralješnične moždine mužjaka štakora soja Wistar, dobiveni transkardijalnom perfuzijom životinja nakon provedenih bihevioralnih mjerenja od strane osoba osposobljenih za rad s pokusnim životinjama. U pokusima koji su bili provođeni na laboratorijskim životinjama slijedio se Zakon o zaštiti životinja (NN 125/13) te smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. 0-26/2005-439).

3.1.1. Metoda izazivanja kronične mišićne boli

U životinja starih od 3 do 4 mjeseca, težine 300 do 400 g, uzgajanih na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, izazvana je kronična bilateralna mišićna bol 2 tjedna nakon injiciranja 100 µL 3%-tnog karagenana, otopljenog u fiziološkoj otopini (0,9% NaCl), u trbušasti mišić lista (musculus gastrocnemius) (Radhakrishnan i sur., 2003). Nastanak bilateralne boli praćen je pojavom mehaničke alodinije na objema stražnjim šapama, u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Kontrolna je skupina životinja, umjesto karagenana, injicirana istim volumenom fiziološke otopine, te se u njih mehanička alodinija ne razvija. Osjetljivost desne i lijeve stražnje šape je testirana primjenom von Freyjevih filamenata (Slika 6), svaki drugi dan u vremenskom periodu od 21 dana. Primjenjivani su filamenti od 1, 2, 4, 8, 15, 26 Nm u trajanju od 2 sekunde i intervalima od 5 sekundi između pojedinih aplikacija. Zabilježena je najniža snaga filamenta na koju je životinja reagirala povlačenjem stražnje šape. 21. dan pokusa, 4 životinje iz svake grupe su podvrgnute procesu transkardijalne perfuzije paraformaldehidom radi uzimanja uzoraka lumbalnog dijela kralješnične moždine.



Slika 6. Von Freyjevi filamenti.

3.1.2. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu

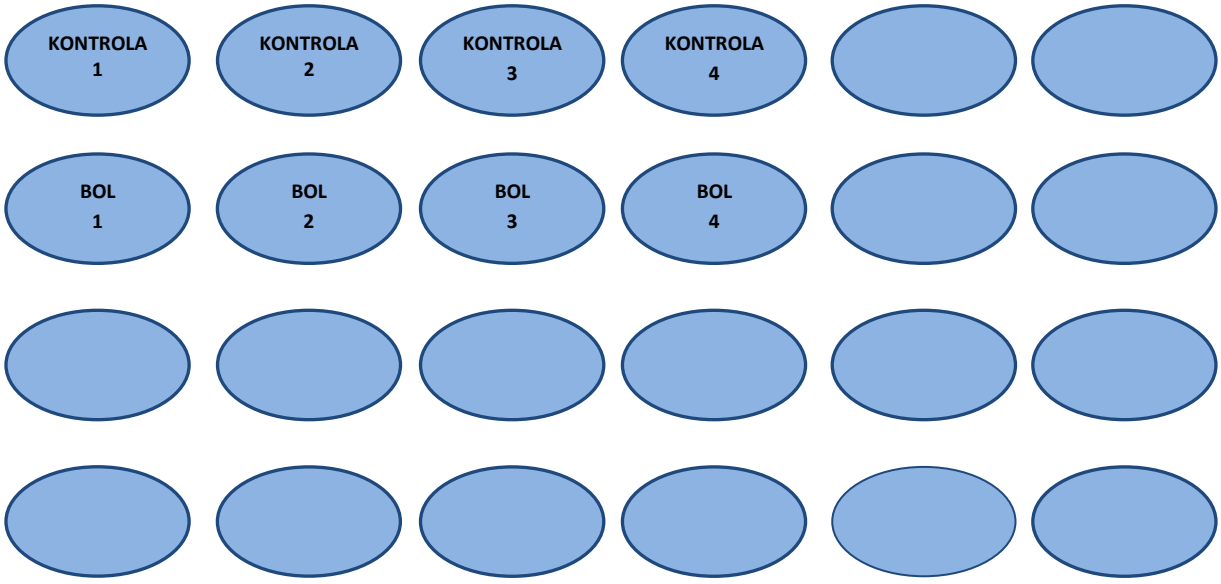
Lumbalni dio kralješnične moždine žrtvovanih životinja je najprije čuvan tijekom noći na 4ºC u 15%-tnoj otopini sukroze u paraformaldehidu. Sutradan su uzorci stavljeni na čuvanje u 30%-tnu otopinu sukroze u fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered saline,* PBS), nakon čega su smrznuti na -80ºC do upotrebe. Smrznuti su uzorci izrezani na kriostatu (Leica, Njemačka) na prereze debljine 30µm. Imunohistokemijska se analiza provodila na lumbalnom segmentu L3-L5.

3.2. KEMIKALIJE

Za imunohistokemijsku analizu korištene su sljedeće kemikalije: Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), kozji serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), primarno mišje monoklonsko protutijelo na GFAP (koncentracija 1:1000), sekundarno mišje protutijelo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel® (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD).

3.3. IMUNOHISTOKEMIJA

Odabrani L3-L5 segmenti lumbalnog dijela kralješnične moždine stavljeni su u jažice s fosfatnim puferom, na način prikazan na Slici 7 (8 prereza po jažici). Prerezi su ispirani 3 puta po 5 minuta u 0,25%-tnoj otopini PBS – TritonX100 (PBST), blokirani 10%-tnim kozjim serumom tijekom 1 sata i inkubirani tijekom noći na sobnoj temperaturi s primarnim mišjim protutijelom na GFAP (koncentracija 1:1000) razrijeđenim u 1%-tnom kozjem serumu. Sljedeći su dan uzorci ispirani 3 puta po 5 minuta PBST-om, nakon čega su inkubirani 2 sata na sobnoj temperaturi s fluorescentnim sekundarnim mišjim protutijelom Alexa Fluor 488 (1:400), razrijeđenim s 1%-tnim kozjim serumom u tami. Uzorci su opet ispirani 3 puta po 5 minuta, nakon čega su naneseni na predmetna stakalca. Kako bi se spriječio gubitak fluorescencije, na uzorke je nanesen Fluorogel® te je stavljeno pokrovno stakalce. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani koristeći 10x i 20x povećanje.



Slika 7. Shema nanošenja uzoraka u jažice

3.4. ANALIZA IMUNOFLUORESCENCIJE GFAP

Za prikaz imunofluorescencije proteina GFAP od svih je fotografiranih prereza izabran jedan koji reprezentativno opisuje kontrolnu skupinu i jedan koji prikazuje skupinu tretiranu karagenanom. Slike su spojene u programu *Microsoft Paint,* a potom su svjetlina i kontrast slike ugođeni u programu *Adobe Photoshop*.

Kvantitativna analiza provedena je primjenom programa *Image J* (imagej.nih.gov/ij/). To je program koji omogućava izračunavanje površine i određivanje vrijednosti piksela unutar zadanog odabira. Prema literaturnim podacima, astrociti se u bolnom podražaju aktiviraju, mijenjaju morfološka svojstva te ekspresiju nekih proteina, uključujući GFAP (engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*), koji se može detektirati u senzornim laminama 1-6 dorzalnog roga kralješnične moždine. Nakon što je u programu označena regija od interesa (ROI, engl. *Region Of Interest*), opcije programa mjerenja su postavljene tako da se na označenim regijama mjeri površina označene regije, koja je smještena unutar lamina 1-6, i intenzitet fluorescencije na označenoj regiji. Prilikom označavanja izbjegavao se površinski dio dorzalnog roga zbog nespecifičnog obojenja. U obje skupine su bile po 4 životinje te su analizirana po 3 prereza svake životinje. Nakon analize izračunata je srednja vrijednost pojedinog parametra za svaku životinju te u konačnici za svaku skupinu.

3.5. STATISTIČKA ANALIZA

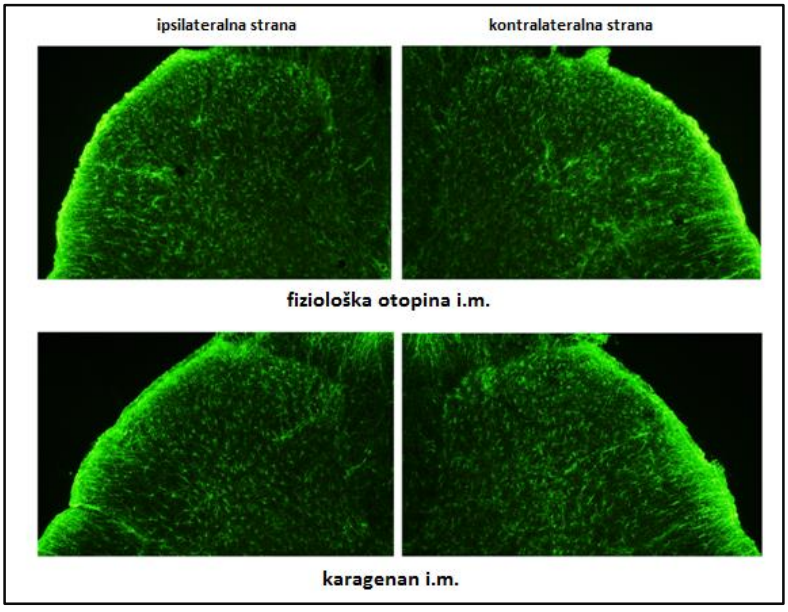
Rezultati, koji su dobiveni ovim eksperimentom, prikazani su kao srednja vrijednost skupine +/- standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM). Razlika varijanci je analizirana jednosmjernom analizom (One-Way ANOVA) i nakon toga Turkey *post hoc* testom za analizu razlika među skupinama. Kao statistički značajna razlika, smatra se ona za koju je vrijednost $p<0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom se diplomskom radu promatrala aktivacija astrocita u senzornim laminama kralješnične moždine, koristeći metodu imunohistokemije. Aktivacija astrocita analizirana je dvjema mjerama: intenzitetom fluorescencije, s obzirom da aktivirani astrociti eksprimiraju više GFAP (Raghavendra i DeLeo, 2003) te površinom koju fluorescencija zauzima na području interesa (ROI), s obzirom da aktivirani astrociti mijenjaju svoj oblik (Raghavendra i DeLeo, 2003).

4.1. KVALITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE GFAP

Prema literaturnim podacima, promjena mikrookoliša astrocita, do koje dolazi u eksperimentalnim modelima kronične boli, uzrokuje njihove morfološke promjene. Astrociti prolaze kroz proces hipertrofije te dolazi do povećane ekspresije GFAP na njihovoj površini (Old i sur., 2015). Međutim, proučavanjem astrocita u senzornim laminama (1-6) dorzalnog roga u ovom pokusu nije uočeno povećanje broja astrocita ili ekspresije GFAP, koji se koristi kao marker za praćenje aktivacije astrocita. Ne postoji razlika u površini i količini imunoreaktivnosti između kontrolne skupine i skupine kojoj je injiciran 3%-tni karagenan niti ipsilateralno (na strani ozljede), niti kontralateralno (suprotno od mjesta ozljede) (Slika 8).



Slika 8. Ekspresija GFAP u astrocitima senzornih lamina (1-6) lumbalnog dijela (L3-L5) kralješnične moždine u ispitivanim eksperimentalnim skupinama.

4.2. KVANTITATIVNA ANALIZA EKSPRESIJE GFAP

Kako bi se provjerila opažanja kvalitativne analize i omogućila statistička obrada podataka u svrhu usporedbe dviju grupa životinja, bilo je nužno provesti kvantitativnu analizu pomoću programa *Image J*. Nakon prilagođavanja postavki tako da se što više fluorescencije pokrije, bilo je potrebno označiti regiju od interesa, ROI. Pri tome je bilo važno izbjeći površinski dio dorzalnog roga zbog nespecifične obojenosti, a analiza se provodila na slikama prereza s većim povećanjem (20x). Nakon analize po 3 prereza svake životinje, izračunata je srednja vrijednost za svaku životinju, pa srednje vrijednosti za svaku grupu životinja (Tablica 1). Rezultati su prikazani i grafički na Slici 9.

Tablica 1. U eksperimentalnom modelu kronične mišićne boli uzrokovane karagenanom nije uočena povećana ekspresija GFAP na astrocitima kralješnične moždine pokusnih životinja promatrano ipsilateralno i kontralateralno, mjerenjem: A) intenziteta fluorescencije i B) površine s imunofluorescencijom. Prikazana je srednja vrijednost sa standardnom devijacijom i pogreškom.

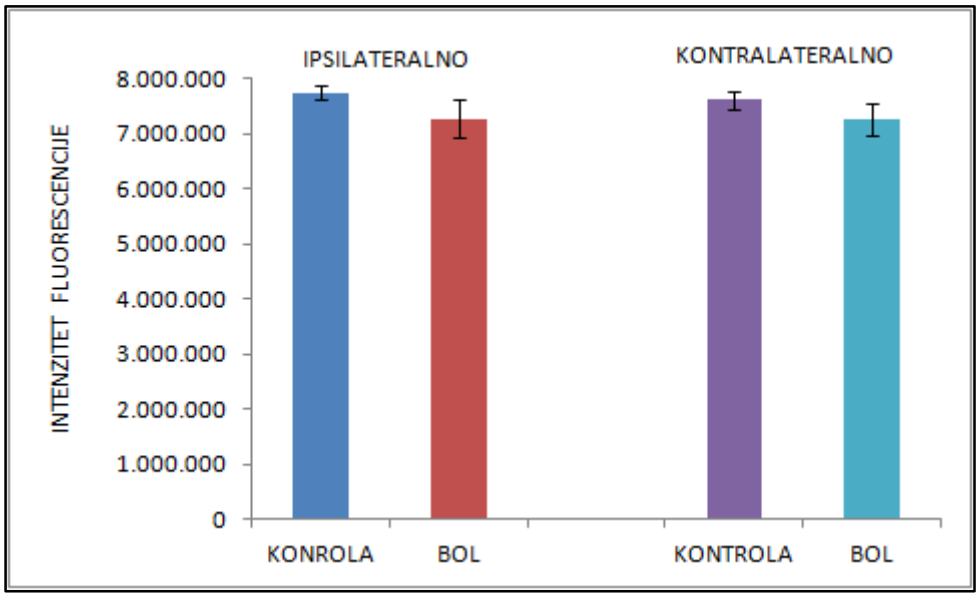
A)

INTENZITET FLUORESCENCIJE	**IPSILATERALNO**		**KONTRALATERALNO**	
	KONTROLA	BOL	KONTROLA	BOL
Srednja vrijednost	7.731.970	7.271.853	7.621.473	7.272.045
SD	252.173,33	701.515,20	333.585,82	573.165,21
SEM	126.086,66	350.757,60	166.792,91	286.582,60

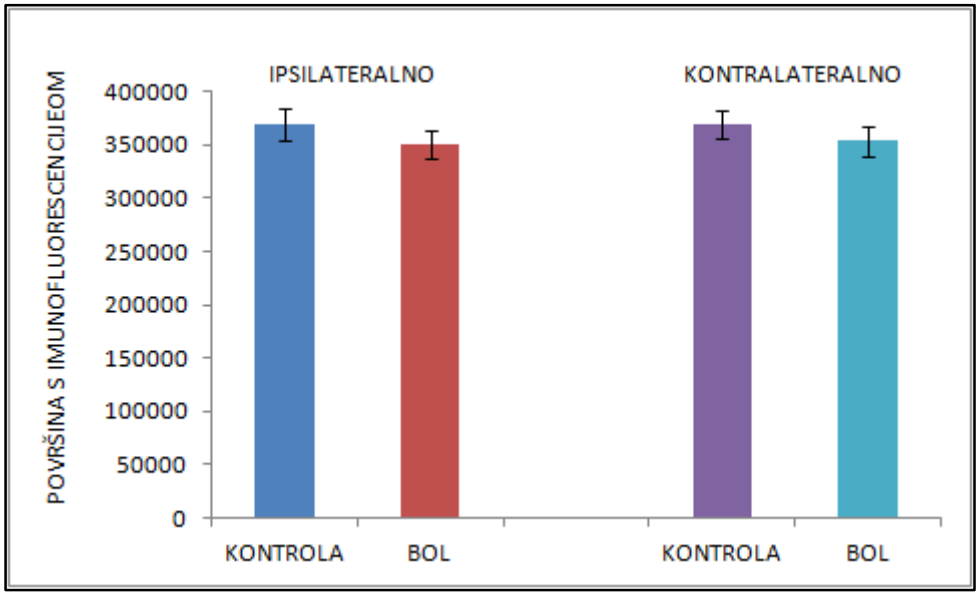
B)

POVRŠINA S IMUNOFLUORESCENCIJOM	**IPSILATERALNO**		**KONTRALATERALNO**	
	KONTROLA	BOL	KONTROLA	BOL
Srednja vrijednost	369487,25	350034,17	369490,42	353396,92
SD	30013,03	26171,7	26584,1	29033,98
SEM	15006,51	13085,85	13292,05	14516,99

A)



B)



Slika 9. U eksperimentalnom modelu kronične mišićne boli uzrokovane karagenanom nije uočena povećana ekspresija GFAP na astrocitima kralješnične moždine pokusnih životinja promatrano ipsilateralno i kontralateralno, mjerenjem: A) intenziteta fluorescencije i B) površine s imunofluorescencijom. Prikazana je srednja vrijednost sa standardnom devijacijom i pogreškom.

Iz rezultata analize je vidljivo da bilateralna hiperosjetljivost na mehanički podražaj uzrokovana injiciranjem 3%-tnog karagenana nije praćena povećanom ekspresijom GFAP,

odnosno aktivacijom astrocita 21 dan nakon ozljede. Prema tome, iako su astrociti aktivirani u neuropatskim i upalnim modelima boli, u ovom opisanom modelu očito ne pridonose održavanju kronične boli mišićnog porijekla.

Osim modela karagenanom uzrokovane mišićne boli koji je korišten za potrebe dijela istraživanja prikazanih u ovom diplomskom radu, kronična mišićna bol može se uzrokovati i injiciranjem fiziološke otopine u *m. gastrocnemius* (Radhakrishnan i sur., 2003). U tom je modelu također nakon imunohistokemijske analize aktivacije glija stanica u lumbalnom dijelu kralješnične moždine pokazano da nema značajne aktivacije glija stanica, uključujući astrocite (Ledeboer i sur., 2006). Prema tome, možemo zaključiti da bilateralna hiperosjetljivost nastala nakon ozljede mišića nije praćena aktivacijom glija stanica.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu mjeren je stupanj aktivacije astrocita imunohistokemijskom metodom u uzorcima kralješnične moždine pokusnih životinja kojima je uzrokovana kronična bol intramuskularnim injiciranjem 3%-tne otopine karagenana. Imunohistokemijskom analizom pokazali smo da nema statistički značajnog povećanja ekspresije markera aktivacije astrocita (GFAP) u dorzalnom rogu kralješnične moždine 21 dan nakon početne ozljede mišića. Dobiveni rezultati dovode do zaključka da, za razliku od kronične neuropatske boli, astrociti nemaju bitnu ulogu u nastajanju i održavanju kronične boli mišićnog porijekla.

S obzirom da je aktivacija astrocita u ovom radu analizirana samo u jednoj vremenskoj točki, potrebna su daljnja istraživanja koja bi u obzir uzela ranije i kasnije vremenske točke te druge pokazatelje aktivnosti astrocita i mikroglije kod kronične boli koštano-mišićnog porijekla.

6. LITERATURA

1. Aschner M, Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ. Glial cells in neurotoxicity development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1999, 39, 151–173.

2. Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 5-31.

3. Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain - clinical perspective. *Nature clinical practice Neurology*, 2005, 2, 95-106.

4. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 2009, 139, 267-284.

5. Basbaum AI, Jessell T. The Perception of Pain. U: Principles of Neuroscience. Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, urednici, New York, Appleton and Lange, 2000, str. 472-491.

Carr DB, Goudas LC. Acute Pain. *The Lancet*, 1999, 353, 2051-2058.

6. Carlton SM, Coggeshall RE. Inflammation induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Research* 1999, 820, 63-70.

7. 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.

8. Coutaux A, Adam F, Willer J-C, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 2005, 72, 359-371.

9. D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, 2008, 101, 8-16.

10. Guyton AC, Hall JE. Medical Physiology. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2011, str. 583-593.

11. Harden RN. Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis and treatment. *The Neurologist*, 2005, 11, 111-122.

12. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*, 2014, 13, 924-35.

13. Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Decosterd I. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biology*, 2006, 2, 259–69.

14. Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiology Of Disease*, 2001, 8, 1-10.

15. Jones TL, Sorkin LS. Basic neurochemistry of central sensitization. *Seminars in Pain Medicine*, 2003, 1, 184-192.

16. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001, 413, 203-210.

17. Ledeboer A, Mahoney JH, Milligan ED, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal cord Glia and Interleukin-1 Do Not Appear to Mediate Persistent Allodynia Induced by Intramuscular Acidic Saline in Rats. *The Journal of Pain*, 2006, 7, 757-767.

18. Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 1993, 7, 9–18.

19. Lynch ME, Watson CPN. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. *Pain Research and Management*, 2006, 11, 11-38.

20. Majerić Kogler V, Frković V, Kvolik S, Perković M, Kopić D, Pavičić Perković S, Elezović N, Butković D, Fingler M, Lončarić Katušin M. Smjernice za liječenje akutne boli, 2013, 3, 9.

21. Mehan S, Meena H, Sharma D, Sankhla R. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2011, 43, 376-90.

22. Milan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 1999, 57, 1-164.

23. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, 2003, 26, 523–530.

24. Old EA, Clark AK, Malcangio M. The Role of Glia in the Spinal Cord in Neuropathic and Inflamatory Pain. U: Pain Control. Schaibe HG, urednici, Jena, Springer, 2015, str. 145-160.

25. Perl ER. Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, 8, 71–80.

26. Petersen-Felix S, Curatolo M. Neuroplasticity - an important factor in acute and chronic pain. *Swiss Medical Weekly*, 2002, 132, 273-278.

27. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*, 2003, 104, 567-577.

28. Raghavendra V, DeLeo JA. The role of astrocytes and microglia in persistent pain. *Advances in molecular and cell biology*, 2003, 31, 951-966.

29. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis Thrombosis* and *Vascular Biology*, 2011, 31, 986-1000.

30. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in Neurosciences*, 1997, 20, 570-577.

31. Rosenblum A, Marsch LA, Joseph H, Portenoy RK. Opioids and the Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, and Future Directions. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2008, 16, 405-416.

32. Ru-Rong J, Temugin B, Maiken N. Glia and Pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 2013, 154, 10-28.

33. Sann H, Pierau F-K. Efferent function of C-fiber in nociception. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 1998, 57, 8-15.

34. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 2002, 5, 1062-1067.

35. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 2009, 32, 638–647.

36. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 2010, 119, 7-35.

37. Tennat F, Hermann L. Intractable of chronic pain. *Western Journal of Medicine*, 2000, 173, 306.

38. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *Journal of Neuroscience*, 2011, 31, 16064–16069.

39. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews*, 2004, 46, 295-309.

40. Walsh DA, McWilliams DF. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 2014, 10, 581–592.

41. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends in Neurosciences*, 2001, 24, 450-455.

42. Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96, 7723-7730.

43. Zimmermann M. Pathophysiology of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 429, 23-37 .

7. SAŽETAK

Upalna bol javlja se nakon upale ili ozljede tkiva prilikom čega dolazi do lučenja upalnih medijatora koji aktiviraju nociceptore. Periferne promjene uzrokovane upalom dovode do senzitizacije neurona u kralješničnoj moždini. Ti procesi, poznati kao periferna i središnja senzitizacija, doprinose prelasku akutne boli u kroničnu.

Električni impulsi nastali podraživanjem nociceptora na periferiji dolaze u dorzalni rog kralješnične moždine, gdje se nalaze astrociti. To su glija stanice zvjezdastog oblika za koje je dokazano da se aktiviraju u modelima kronične boli i otpuštaju medijatore koji doprinose procesu središnje senzitizacije.

U ovom diplomskom radu mjeren je stupanj aktivacije astrocita imunohistokemijskom metodom u uzorcima kralješnične moždine pokusnih životinja kojima je uzrokovana kronična bol mišićnog porijekla injiciranjem 3%-tne otopine karagenana. Imunohistokemijskom analizom pokazali smo da nema statistički značajnog povećanja ekspresije markera aktivacije astrocita (GFAP) u dorzalnom rogu kralješnične moždine 21 dan nakon početne ozljede mišića. Dobiveni rezultati dovode do zaključka da, za razliku od kronične neuropatske boli, astrociti nemaju bitnu ulogu u nastajanju i održavanju kronične boli mišićnog porijekla.

Potrebna su daljnja istraživanja uključenosti astrocita u procese razvoja kronične boli koja bi u obzir uzela promatranja njihove aktivacije u različitim vremenima od početne ozljede dubokih tkiva te interakciju s mikroglijom i neuronima. Rezultati tih istraživanja bi u konačnici mogli usmjeriti razvoj potencijalnih novih analgetika za liječenje kroničnih boli na modulaciju funkcije glija stanica u središnjem živčanom sustavu.

SUMMARY

Inflammatory pain occurs as a result of inflammation or tissue injury which causes the secretion of various inflammatory mediators that activate nociceptors. Peripheral changes caused by inflamation result in sensitization of spinal cord neurons. Those processes, known as peripheral and central sensitization, contribute to the transition from acute to chronic pain.

Electrical impulses generated by activated nociceptors on periphery are transmitted to the dorsal horn of the spinal cord, where are placed astrocytes. They are a star-shaped glia cells activated in experimental models of chronic pain and they release mediators that make contribution to the process of central sensitization.

This thesis is based on measurement of astrocyte activation, using an immunohistochemical method, in tissue samples of dorsal horn of the spinal cord of animals which had previously caused chronic muscle pain by using 3% carrageenan solution. Using an immunohistochemical analysis we revealed that there is no statistically significant increase in expression of astrocytes marker (GFAP) in the dorsal horn of the spinal cord 21 day after the initial muscle injury. These results lead us to the conclusion that, unlike the chronic neuropathic pain, astrocytes do not have an important role in appearance and maintenance of chronic muscle pain.

Further researches about the involvement of astrocytes in processes of development of chronic pain are needed. They should consider activation of astrocytes in different times after initial injury of deep tissues and their interaction with microglia and neurons. The results of those researches could direct development od new analgetic drugs for chronic pain on modulation of function of glia cells in central nervous system.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ULOGA ASTROCITA U EKSPERIMENTALNOM MODELU KRONIČNE MIŠIĆNE BOLI UZROKOVANE KARAGENANOM

Ivona Barišić

SAŽETAK

Upalna bol javlja se nakon upale ili ozljede tkiva prilikom čega dolazi do lučenja upalnih medijatora koji aktiviraju nociceptore. Periferne promjene uzrokovane upalom dovode do senzitizacije neurona u kralješničnoj moždini. Ti procesi, poznati kao periferna i središnja senzitizacija, doprinose prelasku akutne boli u kroničnu.
Električni impulsi nastali podraživanjem nociceptora na periferiji dolaze u dorzalni rog kralješnične moždine, gdje se nalaze astrociti. To su glija stanice zvjezdastog oblika za koje je dokazano da se aktiviraju u modelima kronične boli i otpuštaju medijatore koji doprinose procesu središnje senzitizacije.
U ovom diplomskom radu mjeren je stupanj aktivacije astrocita imunohistokemijskom metodom u uzorcima kralješnične moždine pokusnih životinja kojima je uzrokovana kronična bol mišićnog porijekla injiciranjem 3%-tne otopine karagenana. Imunohistokemijskom analizom pokazali smo da nema statistički značajnog povećanja ekspresije markera aktivacije astrocita (GFAP) u dorzalnom rogu kralješnične moždine 21 dan nakon početne ozljede mišića. Dobiveni rezultati dovode do zaključka da, za razliku od kronične neuropatske boli, astrociti nemaju bitnu ulogu u nastajanju i održavanju kronične boli mišićnog porijekla.
Potrebna su daljnja istraživanja uključenosti astrocita u procese razvoja kronične boli koja bi u obzir uzela promatranja njihove aktivacije u različitim vremenima od početne ozljede dubokih tkiva te interakciju s mikroglijom i neuronima. Rezultati tih istraživanja bi u konačnici mogli usmjeriti razvoj potencijalnih novih analgetika za liječenje kroničnih boli na modulaciju funkcije glija stanica u središnjem živčanom sustavu.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 10 grafičkih prikaza, 2 tablica i 43 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bol, upalna bol, astrociti, imunohistokemija, GFAP

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Iva Mucalo, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE ROLE OF ASTROCYTES IN EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC CARRAGEENAN-INDUCED MUSCLE PAIN

Ivona Baršić

SUMMARY

Inflammatory pain occurs as a result of inflammation or tissue injury which causes the secretion of various inflammatory mediators that activate nociceptors. Peripheral changes caused by inflamation result in sensitization of spinal cord neurons. Those processes, known as peripheral and central sensitization, contribute to the transition from acute to chronic pain.
Electrical impulses generated by activated nociceptors on periphery are transmitted to the dorsal horn of the spinal cord,where are placed astrocytes. They are a star-shaped glia cells activated in experimental models of chronic pain and they release mediators that make contribution to the process of central sensitization.
This thesis is based on measurement of astrocyte activation, using an immunohistochemical method, in tissue samples of dorsal horn of the spinal cord of animals which had previously caused chronic muscle pain by using 3% carrageenan solution. Using an immunohistochemical analysis we revealed that there is no statistically significant increase in expression of astrocytes marker (GFAP) in the dorsal horn of the spinal cord 21 day after the initial muscle injury. These results lead us to the conclusion that, unlike the chronic neuropathic pain, astrocytes do not have an important role in appearance and maintenance of chronic muscle pain.
Further researches about the involvement of astrocytes in processes of development of chronic pain are needed. They should consider activation of astrocytes in different times after initial injury of deep tissues and their interaction with microglia and neurons. The results of those researches could direct development od new analgetic drugs for chronic pain on modulation of function of glia cells in central nervous system.

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

Thesis includes: 31 pages, 10 figures, 2 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pain, inflammatory pain, astrocytes, immunohistochemistry, GFAP

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
Iva Mucalo, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2016.