

Blokiranje Y1 i Y2 receptora za neuropeptid Y ublažava bolno ponašanje u štakorskom modelu neuropatske i upalne bol

Kostić, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:693584>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Sandra Kostić

**BLOKIRANJE Y1 I Y2 RECEPTORA ZA NEUROPEPTID
Y UBLAŽAVA BOLNO PONAŠANJE U ŠTAKORSKOM
MODELU NEUROPATSKE I UPALNE BOLI**

Doktorska disertacija

Split, 2013.

Rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje boli na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Damir Sapunar

Zahvala

Zahvaljujem mentoru i kolegama na uloženom trudu i pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada, te mojoj obitelji na podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kronična bol	1
1.2. Eksperimentalni modeli neuropatske i upalne boli	2
1.3. Spinalni ganglij – mjesto nastanka početnih promjena koje dovode do neuropatske boli	4
1.4. Nociceptori i primarna aferentna vlakna	8
1.5. Nocicepcija i dorzalni rog	10
1.6. Neuropeptid Y	12
1.6.1. Fiziološka uloga neuropeptida Y	12
1.6.2. Neuropeptid Y i ozljeda stanica spinalnog ganglija	12
1.6.3. Receptori za neuropeptid Y	13
1.6.4. NPY inhibira otpuštanje tvari P	14
1.6.5. NPY selektivno inhibira ili pojačava kalcijске struje u neuronima	15
1.6.6. NPY u regulaciji boli	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Etička načela	19
3.2. Pokusne životinje	19
3.3. Eksperimentalni modeli	19
3.3.1. Model neuropatske boli	20
3.3.2. Model upalne boli	20
3.4. Kirurški postupci	20
3.4.1. Podvezivanje spinalnog živca	21
3.4.2. Upala šape izazvana injiciranjem karagenana	21
3.4.3. Injiciranje u L5 spinalni ganglij	22
3.5. Testiranje ponašanja	23
3.5.1. Von Frey vlakna	23
3.5.2. Test uboda iglom (engl. pin-prick test)	23
3.5.3. Termalna alodinija – osjetljivost na sniženu temperaturu	24
3.5.4. Termalna alodinija – osjetljivost na povišenu temperaturu	24
3.5.5. Test rotirajućeg cilindra (engl. rotarod test)	24
3.6. Imunofluorescencijsko bojanje	25

3.7. Kvantitativna analiza imunofluorescencijskog bojanja	26
3.8. Kemikalije	26
3.9. Statistički postupci	27
4. REZULTATI	28
4.1. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu neuropatske boli	28
4.2. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu upalne boli	38
5. RASPRAVA	48
5.1. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu neuropatske boli	48
5.2. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu upalne boli	51
6. ZAKLJUČCI	54
7. SAŽETAK	55
8. SUMMARY	56
9. LITERATURA	57
10. ŽIVOTOPIS	75

POPIS KRATICA

ANOVA – analiza varijance

ATF-3 – aktivirajući transkripcijski čimbenik 3 (engl. activating transcription factor 3)

$[Ca^{2+}]_i$ – slobodni kalcij u citosolu

c-AMP – ciklički adenzin-monofosfat

CCI – kronična konstriksijska ozljeda (engl. chronic constriction injury)

CGRP – peptid vezan za gen kalcitonina (engl. calcitonin-gene related peptide)

DAG – diacil-glicerol

DH – stražnji rog (engl. dorsal horn)

DIC – diferencijalni interfazni kontrast

DMSO – dimetil sulfoksid

DREZ – područje ulaza korijena u dorzalni rog kralježnične moždine (engl. dorsal root entry zone)

DRG – spinalni ganglij (engl. dorsal root ganglion)

ER – endoplazmatski retikulum

GABA – gama-amino-maslačna kiselina (engl. gamma-aminobutyric acid)

GDNF – neurotropni faktor rasta glija stanica (engl. glial-derived neurotrophic factor)

GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. glial fibrillary acidic protein)

GPCR – receptor vezan za G protein (engl. G-protein coupled receptor)

I_{Ca} – kalcijске struje

i.g. – intraganglijska injekcija

i.p. – intraplantarna injekcija

IASP – Međunarodna udruga za istraživanje boli (engl. International Association for the Study of Pain)

IB4 – izolektin B4

InsP₃ – inozitol trifosfat

NGF – faktor rasta živaca (engl. nerve growth factor)

NPY – neuropeptid Y

NT3 – neurotrofin-3

PBS – fosfatna puferska otopina (engl. phosphate buffered saline)

PIP₂ – fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat

PKC – protein kinaza C

PLC – fosfolipaza C

PTX – pertusis toksin

SEM – standardna pogreška srednje vrijednosti

SD – standardna devijacija

SNL – podvezivanje spinalnog živca (engl. spinal nerve ligation)

SP – tvar P (engl. substance P)

SŽS – središnji živčani sustav

TrkA – tirozin-kinazni receptor A

Y1R – NPY Y1 receptor

Y2R – NPY Y2 receptor

w/v – maseno/volumni postotak

1. UVOD

1.1. Kronična bol

Bol je, prema definiciji Međunarodnog udruženja za liječenje boli (International Association for the Study of Pain – IASP), neugodno osjetno i emocionalno iskustvo, povezano sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili opisano kao takvo. To je iskustvo koje štiti organizam od oštećenja ili upozorava na mogućnost nastanka oštećenja [1].

Bol je najčešći razlog zbog kojeg bolesnici odlaze liječniku. Možemo je podijeliti na akutnu i kroničnu. Akutna bol nastaje aktivacijom nociceptora pri oštećenju tkiva. Ona je izravni ishod štetnog podražaja i klasificira se kao simptom koji prati ozljedu tkiva ili bolest. Akutna bol traje kratko, a izlječenjem njezina uzroka nestaje i bol. Primjeri akutne boli su bol nakon ozljede, postoperativna bol, glavobolja, zubobolja ili menstruacijska bol.

Kronična bol traje dugo nakon cijeljenja prvobitne ozljede tkiva i ne mora biti izravno povezana s tom ozljedom ili bolesti, nego je rezultat sekundarnih promjena, trajnih patoloških poremećaja u detekciji i obradi signala za bol. U kroničnoj boli često dolazi do hiperalgezije tj. preosjetljivosti na uobičajene bolne podražaje ili alodinije, tj. boli nakon podražaja koji inače ne izazivaju bol [2]. Značajni simptomi su i spontana bol, disestezije i parestezije pa čak i paradoksalna neosjetljivost zahvaćenog područja [3].

Kronična bol koja nastaje kao posljedica izravnog oštećenja ili poremećaja funkcije somatosenzornog sustava naziva se neuropatska bol [1]. Primjeri neuropatske boli su postherpetična neuralgija, fantomska bol, ishijalgija, dijabetička neuropatija, trigeminalna neuralgija i bol u multiploj sklerozi [4].

Upalna bol nastaje nakon oštećenja tkiva, uslijed infiltracije upalnih stanica [5]. Upalna bol može biti akutna i kronična. Upalnu komponentu nije moguće izdvojiti jer svaku ozljedu prati upalna reakcija [2]. U neuropatskoj boli kombinacija promjena izazvanih oštećenjem živčanih vlakana i povećano otpuštanje upalnih posrednika u blizini živčanih vlakana dovodi do boli. U području ozljede tkiva kombinacija upalnih medijatora značajno mijenja funkciju nociceptora i povećava njihovu podražljivost [6].

Pored upalnih stanica, na bol mogu utjecati citokini, serotonin, histamin, tvar P (engl. substance P), bradikinin, prostaglandini i niz tvari koje se otpuštaju prilikom ozljede ili imunološke reakcije. Navedeni spojevi djeluju izravno na nociceptore tako da se vežu na membranske receptore, primjerice receptore vezane za G protein (engl. G-protein coupled receptor – GPCR) [7]. Najčešći terapijski postupci za smanjenje upalne boli uključuju inhibiciju sinteze ili nakupljanja upalnih tvari. Najčešće se koriste nesteroidni protu-upalni lijekovi poput aspirina ili ibuprofena, koji smanjuju upalnu bol blokiranjem ciklooksigenaze uključene u sintezu prostaglandina [7].

1.2. Eksperimentalni modeli neuropatske i upalne boli

Napredak u poznavanju i razumijevanju mehanizama nastanka boli ovisi o korištenju prikladnih pokusnih životinjskih modela. Životinje koje se najčešće koriste u istraživanjima neuropatske boli su štakori [8]. Postoje brojni modeli neuropatske boli koji se koriste u istraživanjima, a temelje se na kontroliranom oštećenju živčanog tkiva u laboratorijskim uvjetima. Modeli neuropatske boli mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine prema: mjestu na kojem se izaziva oštećenje (dorzalni ili ventralni korijen, spinalni živac, spinalni ganglij ili periferni živci) i prema vrsti ili tipu oštećenja (transekcija, krioneuroлиза, podvezivanje, gnječenje, infiltracija tumorskim stanicama ili izazivanje upale).

U većini eksperimentalnih modela neuropatske boli oštećenje se izaziva na ishijadičkom živcu kojeg čine vlakna spinalnih segmenata od L3 do L6 [9, 10], s time da se većina tijela stanica ishijadičnog živca (98-99%) nalazi u L4 i L5 segmentima [11]. Važan razlog zbog kojeg se bira ishijadični živac je dostupnost inervacijskog područja tog živca za testiranje podražljivosti. Eksperimentalni modeli oštećenja živca koji se najčešće koriste u istraživanjima su: presijecanje ishijadičnog živca (engl. axotomy, neuroma model) [12], kronična konstriksijska ozljeda (engl. chronic constriction injury – CCI) [13], parcijalno podvezivanje živca (engl. partial nerve ligation) [14], djelomična ozljeda živca (engl. spared nerve injury model) [15], podvezivanje spinalnog živca (engl. spinal nerve ligation – SNL) [16], konstrikcija dorzalnog korijena (engl. dorsal root constriction) [17], presijecanje stražnjeg korijena (engl. dorsal rhizotomy) [18] i

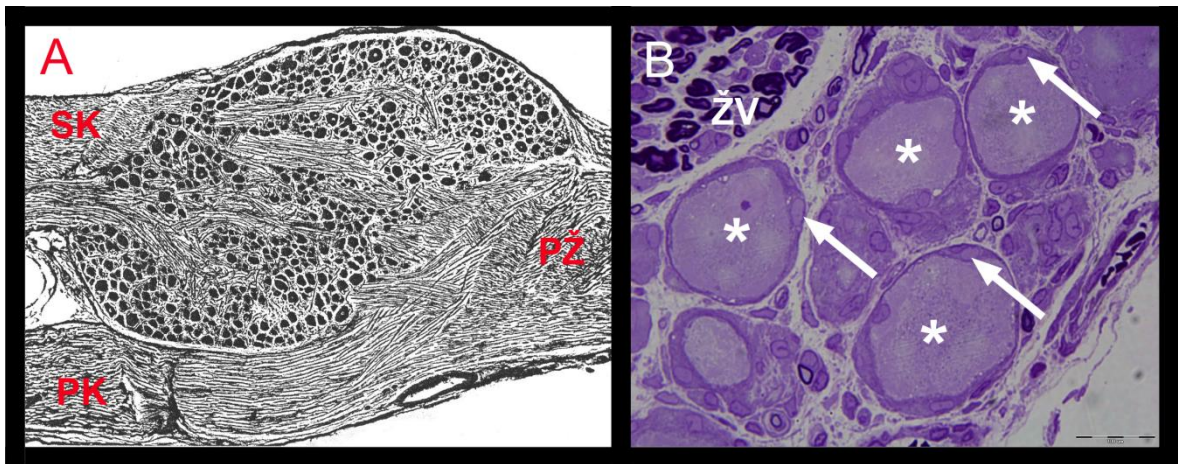
Eksperimentalni modeli u kojima neuropatska bol nastaje kao posljedica upalnih zbivanja, a ne ozljede živca, temelje se na injiciranju iritirajućih tvari u šapu životinje. Tvari koje se najčešće koriste za induciranje boli su karagenan, Freundov adjuvans i kapsaicin [20].

Izravna analiza boli u životinjskim modelima, zbog nemogućnosti komunikacije, nije moguća. Stoga se koriste testovi ponašanja u kojima se nastoje prepoznati ponašanja povezana s boli, tj. ponašanja za koja pretpostavljamo da su odraz boli. Ponašanja životinja koja se najčešće upotrebljavaju kao indikatori boli su autotomija (samosakaćenje, pojava kada životinja izgrize svoju šapu), hiperalgezija (pojačana osjetljivost na bolni podražaj) i alodinija (bolna reakcija na podražaj koji inače ne izaziva bol). Nažalost ti znakovi ne odražavaju simptomatologiju neuropatske boli u ljudi. Naime, pored tih simptoma, neuropatsku bol u ljudi prate simptomi poput spontane boli, disestezijske, parestezijske ili čak potpune neosjetljivosti na određene osjetne modalitete [21, 22].

1.3. Spinalni ganglij – mjesto nastanka početnih promjena koje dovode do neuropatske boli

Spinalni ganglij smješten je između dorzalnog korijena i spinalnog živca. Sadrži pseudounipolarne neurone koji provode osjetne informacije od periferije prema središnjem živčanom sustavu (Slika 2). U jednom gangliju nalazi se oko 15 000 tijela neurona. Pošto su aksoni neurona perifernog živčanog sustava vrlo dugi, a njihova tijela relativno malena (promjera 20-50 μm), može se izračunati da je samo 0,2% njihove citoplazme smješteno u tijelu, dok se 99,8% nalazi u aksonu [23]. Zbog tih odnosa, ozljeda aksona predstavlja strahovitu traumu za neuron. Također, opskrba dugačkih aksona vrlo je metabolički zahtijevan proces, pogotovo stoga što se sinteza proteina i organela zbiva u tijelu neurona.

Nakon ozljede živca ili upale, neuroni spinalnog ganglija mogu postati važan izvor nociceptivnih signala zbog povećane podražljivosti i nastanka ektopičnih akcijskih potencijala [24, 25]. Ova činjenica sugerira mogućnost preveniranja razvoja neuropatske boli kirurškim odvajanjem izvora patoloških signala od središnjeg živčanog sustava ili injiciranjem anestetika u to područje [26].



Slika 2. Temeljne odrednice histološke građe spinalnog ganglija. A) Shematski prikaz građe spinalnog ganglija. B) Polutanki presjek spinalnog ganglija. Na slici se uočavaju tijela pseudounipolarnih neurona okružena satelitskim stanicama. Mjerilo za B: 100 μ m. Legenda: SK – stražnji korijen; PK – prednji korijen; PŽ – periferni živac; ŽV – živčano vlakno; strelice – satelitske stanice; * – tijela pseudounipolarnih neurona.

Za razliku od perineurijuma koji štiti periferne živce i regulira njihovo unutarnje okruženje, spinalnom gangliju nedostaje čvrsta zaštitna vezivna ovojnica [27]. Spinalni ganglij i periferni aksoni nemaju učinkovitu neurovaskularnu barijeru, kao što je barijera krv-mozak u središnjem živčanom sustavu (SŽS-u), što omogućava laku difuziju tvari velike molekulske mase u intersticij koji okružuje neurone spinalnog ganglija [27]. Položaj izvan krvno-moždane barijere i propusna vezivna ovojnica spinalni ganglij čine izvrsnim mjestom za apliciranje lijekova [27]. Propusnosti vezivne ovojnice doprinosi i vrlo velika gustoća krvnih kapilara u tkivu ganglija [28]. Zbog ove guste mreže kapilara spinalni ganglij je otporan na toksično djelovanje anestetika jer velika perfuzija onemogućava lako dostizanje toksičnih koncentracija. [23].

Spinalni ganglij izložen je ozljedama i zbog svoje specifične pozicije. Jukstapozicija osjetnih neurona i koštanih struktura česti je razlog ozljede spinalnog ganglija. Kronična kompresija spinalnog ganglija ili obližnjih korijena živaca nakon ozljede kralježnice, hernijacije intervertebralnog diska ili stenozе intervertebralnog foramena važan je čimbenik koji dovodi do križobolje i ishijalgije. Godine 1998. opisana je metoda

kronične kompresije L5 spinalnog ganglija, s očekivanjem da će ovaj životinjski model pomoći u razjašnjenju križobolje i ishijalgije [29].

Ozljeda perifernog živca ili korijena živca zbog ozljede kosti inducira sintezu i otpuštanje brojnih medijatora upale koji mogu podražiti nociceptore i pojačati bol [30, 31]. Nakon ozljede primarnih osjetnih neurona dolazi do brojnih promjena u ekspresiji gena. Razvoj oligonukleotidnih mikročip (engl. micro-array) tehnologija omogućio je istodobnu procjenu razine izražaja nekoliko tisuća mRNA transkripta korištenjem visoko-protočnih postupaka (engl. high-throughput procedures). Ovim studijama identificirane su tisuće gena čije se ekspresija mijenja i koji su potencijalni kandidati za terapijske zahvate u stanjima kronične boli. Da bi se potvrdila pouzdanost podataka dobivenih u mikročip studijama, napravljen je sustavni pregled meta-analizom. Utvrđeno je da se samo određeni broj gena opetovano pojavljuje u nezavisnim studijama [32]. Među genima čija se ekspresija nakon ozljede potvrdila u više od četiri studije je i neuropeptid Y (engl. neuropeptide Y – NPY) (Tablica 1). Navedena činjenica bila je važan razlog izbora ove molekule za predmet našeg istraživanja.

Tablica 1. Popis gena za koje je potvrđeno da se njihova ekspresija značajno mijenja u četiri ili više mikročip pokusa. U tablici su navedeni geni za koje postoji dokaz uzročno-posljedične veze s boli. Prilagođeno prema [32].

Entrez ID gena	Broj studija (od 20)	Smjer regulacije	Neuropatska (14) / upalna (6)	Naziv gena	Naziv proteina
50654	9	↑	8/1	<i>Ctss</i>	Katepsin S
24604	7	↑	7/0	<i>Npy</i>	Neuropeptid Y
29461	7	↑	4/3	<i>Vgf</i>	VGF živčani faktor rasta
25399	6	↑	6/0	<i>Cacna2d1</i>	Kalcijski kanal ovisan o naponu
81657	6	↓	3/3	<i>Gabbr1</i>	GABA receptor 1
29141	6	↑	6/0	<i>Gal</i>	Galanin
24797	6	↑	6/0	<i>Sst</i>	Somatostatin
24806	6	↑	5/1	<i>Tac1</i>	Tahikinin 1
24241	5	↑	4/1	<i>Calca</i>	Kalcitonin/Polipeptid povezan s kalcitoninom
29571	5	↓	5/0	<i>Scn10a</i>	Natrijski kanal ovisan o naponu, tip 10
24230	5	↑	5/0	<i>Tspo</i>	Benzodiazepinski receptor
117064	5	↑	5/0	<i>Vip</i>	Vazoaktivni intestinalni polipeptid
25728	4	↑	3/1	<i>Apoe</i>	Apolipoprotein E
25390	4	↑	2/2	<i>Atp1b3</i>	ATPaza
24770	4	↑	4/0	<i>Ccl2</i>	Monocitni kemotaksijski protein
25101	4	↓	4/0	<i>Chrna3</i>	Nikotinski kolinergički receptor
24330	4	↑	2/2	<i>Egr1</i>	Protein ranog odgovora rasta
25454	4	↑	4/0	<i>Gfra1</i>	Receptor za neurotrofički faktor glijalne stanične linije
29559	4	↓	4/0	<i>Grik1</i>	Glutamatni receptor
79246	4	↓	3/1	<i>Htr3a</i>	Serotoninski receptor 3a
64636	4	↓	3/1	<i>Ntsr2</i>	Neurotenzinski receptor 2
29701	4	↓	4/0	<i>Scn11a</i>	Natrijski kanal ovisan o naponu (NaV1.9)

Brojna istraživanja usmjerena su na traženje razloga patološke aktivnosti unutar neurona spinalnog ganglija. Neuroni nisu jedini koji pridonose stvaranju i održavanju boli. Stanice imunološkog odgovora, isto kao i glija stanice, mijenjaju funkciju neurona u perifernom i središnjem živčanom sustavu [33]. Neuroni spinalnog ganglija okruženi su satelitskim glija stanicama koje sadrže receptore za brojne neuroaktivne tvari, te na taj način primaju signale od ostalih stanica i odgovaraju na promjene u svom okolišu (Slika 2). Aktivacija satelitskih glija stanica tako može utjecati na susjedne neurone, čime te stanice sudjeluju u obradi i prijenosu signala u osjetnom gangliju [34]. Izražaj glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. glial fibrillary acidic protein – GFAP) koristi se kao biljeg aktiviranih astrocita i satelitskih stanica nakon ozljede živca. Pojačana ekspresija GFAP-a nije samo biljeg aktivacije tih stanica, već ima ulogu i u aktivnom održavanju neuropatske boli [35].

Nakon periferne aksotomije, dolazi do povećanog izražaja neurotrofičnih faktora, poput faktora rasta živca (engl. nerve growth factor – NGF) i neurotrofina-3 (NT3) u satelitskim stanicama koje okružuju tijela neurona u spinalnom gangliju. Ti neurotrofini mogu potaknuti mehaničku alodiniju u spinalnom gangliju, pokazujući time da su važan sudionik u mehanizmu nastanka nociceptivnih podražaja nakon periferne ozljede živca [36]. Nakon ozljede perifernog živca dolazi i do urastanja simpatičkih vlakana unutar spinalnog ganglija, što doprinosi razvoju neuropatske boli [37].

U istraživanju Lia i sur. iz 2011. pokazano je da jedna injekcija kortikosteroida u blizini aksotomiziranog ganglija može oponašati mnoge učinke sistemske administracije kortikosteroida, ublažavajući abnormalnosti u stanicama spinalnog ganglija [38]. U SNL modelu ova terapija smanjuje mehaničku osjetljivost, urastanje simpatičkih vlakana u spinalni ganglij, te aktivaciju mikroglije u stražnjem rogu i satelitskih glija stanica u gangliju. Navedeni rezultati idu u prilog teoriji da je lokalizirana upala na razini spinalnog ganglija važna komponenta u razvoju neuropatske boli [38].

1.4. Nociceptori i primarna aferentna vlakna

Primarna aferentna vlakna koja se nalaze u perifernim živcima glavni su put osjetnih informacija iz periferije prema kralježničnoj moždini. Ona inerviraju kožu i sve unutrašnje organe, uključujući i kost. Nociceptori su podvrsta perifernih živčanih vlakana koja reagiraju na intenzivni termalni, mehanički ili kemijski podražaj. Neuralni proces kodiranja i obrade štetnog podražaja naziva se nocicepcija [39]. Nociceptori su pobuđeni samo kada intenzitet podražaja dosegne granicu štetnosti, time pokazujući da posjeduju biofizička i molekularna svojstva koja im omogućuju da selektivno detektiraju i odgovaraju na potencijalno štetne podražaje.

Postoje dvije veće skupine nociceptora [40]. Prva uključuje srednje velika mijelinizirana A δ vlakna koja provode akutnu, lokaliziranu „prvu“ tj. brzu bol. Druga skupina nociceptora uključuje tanka nemijelinizirana C vlakna koja provode slabo lokaliziranu, „drugu“ ili sporu bol.

A δ vlakna značajno se razlikuju od velikih A β vlakana koja odgovaraju na neštetne mehaničke podražaje, npr. lagani dodir. Većina debelih mijeliniziranih A β vlakana kože su mehanoreceptori niskog praga povezani sa specijaliziranim tvorbama

kože (taktilni ili završeci povezani s folikulom dlake) [41]. A β vlakna koja inerviraju Merkelove stanice, Pacinijeva tjelešca i folikule dlaka detektiraju teksturu, vibracije i lagani pritisak. Navedene podjele ipak su arbitrarne jer dio nociceptora provodi podražaj brzinama koje odgovaraju A β vlaknima [42]. A β vlakna poprimaju svojstva nociceptora kada su izložena upali koja snižava njihov prag podražljivosti [43].

Elektrofiziološka istraživanja dovela su do daljnje podjele A δ nociceptora u dvije glavne skupine. Tip I su nocicepcijski mehanoreceptori visokog praga (engl. high-threshold mechanical nociceptors) koji reagiraju na mehaničke i kemijske podražaje, ali imaju relativno visok prag za podražaj visokom temperaturom (>50°C). Ako se međutim podražaj toplinom zadrži duže vrijeme, ova aferentna vlakna reagirat će na nižim temperaturama. Ovim vlaknima se snižava toplinski i mehanički prag podražljivosti u okruženju ozljede tkiva (senzitivizacija). Tip II A δ nociceptori imaju značajno manji prag za toplinu, ali vrlo visok prag za mehanički podražaj. Aktivnost tih aferentnih vlakana povezana je s „prvom“ akutnom boli koja nastaje kao odgovor na štetni toplinski podražaj. Kompresijsko blokiranje mijeliniziranih perifernih živčanih vlakana eliminira "prvu", ali ne i "drugu" bol. Vlakna tipa I najvjerojatnije provode prvu bol koja nastaje kao odgovor na ubod iglom (engl. pin-prick) ili na druge intenzivne mehaničke podražaje [44].

Nemijelinizirana C vlakna su također heterogena. Većina ih je polimodalna, tj. uključuju populacije koje su osjetljive na toplinski i na mehanički podražaj [45]. Od posebnog interesa su nemijelinizirana vlakna koja odgovaraju na toplinski, ali su neosjetljiva na mehanički podražaj, tzv. tihi nociceptori, koji razvijaju mehaničku osjetljivost samo u okruženju ozljede [46]. Ta aferentna vlakna su osjetljivija na kemijski podražaj (kapsaicin ili histamin) od C vlakana koja su osjetljiva i na toplinu i na mehanički podražaj, te se vjerojatno uključuju u odgovor kada kemijsko okruženje izazvano upalom promijeni njihova svojstva. Dio ovih vlakana reagira na brojne tvari koje izazivaju svrbež. Međutim, nisu sva C vlakna nociceptori. Neka odgovaraju na hlađenje, a posebno zanimljiva populacija nemijeliniziranih vlakana odgovara na neštetno glađenje dlakave kože, ali ne i na toplinski ili kemijski podražaj. Ta vlakna provode ugodan dodir [47]. Heterogenost C vlakana vidljiva je i kroz druge podjele [48]. Mogu se podijeliti na peptidergička i nepeptidergička. Peptidergička C nociceptori otpuštaju neuropeptide, tvar P i peptid vezan za gen kalcitonina (engl. calcitonin-gene related peptide – CGRP). Oni također izražavaju TrkA neurotrofni receptor, za koji se

veže NGF. Nepeptidergički C nociceptori izražavaju c-Ret neurotrofinski receptor koji je ciljno mjesto vezanja neurotrofnog faktora rasta glija stanica (engl. glial-derived neurotrophic factor – GDNF). Veliki broj c-Ret-pozitivnih populacija također veže IB4 izolektin, kao i specifične purinergične podtipove receptora, prvenstveno P2X3 [49].

Iako se ne može reći da postoje vlakna i živčani putovi koji prenose bol, ipak govorimo o anatomske i funkcionalno specijaliziranim perifernim osjetnim neuronima – nociceptorima koji odgovaraju na jake štetne podražaje. Ti podražaji putuju u kralježničnu moždinu kao niz električkih signala duž C i A δ vlakana smještenih u spinalnim ili kranijalnim živcima. Signali putuju različitim vlaknima, različitim brzinama i frekvencijama. Kompresija živca blokira debela vlakna i nebolne podražaje dok gubitak boli nestaje posljednji. Lokalni anestetici prvo blokiraju tanka nemijelinizirana vlakna i osjet boli [50].

1.5. Nocicepcija i dorzalni rog

Impulsi koje prenose primarna aferentna vlakna prolaze tzv. T ogrankom, pored tijela neurona u spinalnim ganglijima, zatim duž dorzalnih korijenova i završavaju u dorzalnom rogu na sekundarnim osjetnim neuronima. Centralni aksoni uzlaze ili silaze kroz nekoliko segmenata kao dio Lissauerovog puta, a pritom njihove kolaterale ulaze u sivu tvar i sinaptički završavaju na neuronima dorzalnog roga u Rexedovim slojevima. Lamine I-X čine deset Rexedovih slojeva sive tvari, a dio lamina važan je za prijenos nocicepcijskih podražaja. A δ -vlakna i C-vlakna se nakon ulaska u kralježničnu moždinu granaju na uzlaznu i silaznu granu. Na razini dorzalnog roga silazna vlakna koja proizvode enkefaline djeluju na pre- i post-sinaptičke stanice kako bi inhibirale prijenos podražaja u više centre. Na toj razini zbivaju se ključni momenti "teorije nadziranog ulaza" Melzacka i Walla. Tu ulazna A β vlakna perifernih živaca mogu umanjiti djelovanje signala C i A δ vlakana na post-sinaptičke stanice dorzalnog roga [51].

Sva primarna aferentna vlakna kao glavni ekscitacijski neurotransmiter koriste glutamat. Oslobođanje glutamata aktivira postsinaptičke AMPA glutamatne receptore. Nakon prelaska sinaptičke pukotine složenim signalnim mehanizmima, signal prelazi u sljedeći neuron. Pri tome nocicepcijska primarna aferentna vlakna izravno ili neizravno djeluju na projekcijske sekundarne osjetne neurone, ekscitacijske interneurone koji

prenose osjetne informacije na projekcijske neurone, i na inhibicijske interneurone koji nadziru tijek nocicepcijskih informacija od prvog do drugog neurona nocicepcijskog puta [52]. Projekcijske neurone čine specifična i manje specifična vlakna (engl. nociceptive specific ili wide dynamic range neurons, WDR). Nocicepcijski specifični neuroni nalaze se u području lamine I (marginalni sloj) i lamine II (substantia gelatinosa) te reagiraju isključivo na nocicepcijske podražaje. Većina ovih neurona prima izravni sinaptički ulaz A δ i C vlakana. Dio neurona lamine II, tzv. neuroni širokog dinamičkog raspona (WDR neuroni) primaju ulaz štetnih i neštetnih podražaja [53].

Lamine III i IV imaju ulogu u prijenosu boli. One pridonose spinotalamičkom putu koji prenosi osjet za bol, temperaturu i dodir. Određena nociceptivna primarna aferentna vlakna završavaju u tom području i brojni neuroni koji se nalaze u tim laminama (uključujući i neke projekcijske stanice) aktiviraju se štetnim podražajem. Aferentna vlakna folikula dlake koja također završavaju u tim laminama jednim su dijelom odgovorna za taktilnu alodiniju (bol koja nastaje kao odgovor na dodir) [54]. Lamina V sadrži WDR neurone koji primaju podražaje A β , A δ i C vlakana. Dio neurona lamine V prima vlakna iz visceralnih organa [52].

Dorzalni rog je i mjesto centralne senzitivacije, jedne od važnijih značajki kronične boli [55]. Dugotrajni podražaji dovode do fizioloških, ali i do strukturnih promjena. Genetske promjene dovode do promjena u količini i tipu enzima i neuropeptida koji se proizvode u neuronima što dovodi do dugotrajnih promjena u postsinaptičkim stanicama [56]. Ove strukturalne promjene zasigurno su jedan od čimbenika koji može objasniti patološko širenje impulsa.

1.6. Neuropeptid Y

1.6.1. Fiziološka uloga neuropeptida Y

Neuropeptid Y (NPY) pripada porodici polipeptida gušterače i jedan je od najrasprostranjenijih neuropeptida živčanog sustava [57, 58]. NPY ima raznolike i brojne biološke učinke [59]. Osim uloge u regulaciji aktivnosti neurona, rada kardiovaskularnog sustava te u prehrani, NPY ima i ključnu ulogu u procesiranju boli [60-62]. Mehanizam djelovanja NPY-a vrlo je složen i još uvijek nedovoljno razjašnjen. U zdravim neuronima spinalnih ganglija NPY prisutan je u vrlo niskoj koncentraciji [63, 64]. Jedini izvor NPY-a u intaktnom spinalnom gangliju su simpatički neuroni koji inerviraju arterije i vene [65].

1.6.2. Neuropeptid Y i ozljeda stanica spinalnog ganglija

Nakon periferne aksotomije ili nekih drugih vrsta eksperimentalne ozljede živca dolazi do dugotrajnih promjena u izražaju neuropeptida i njihovih receptora u primarnim osjetnim neuronima. Prvi pokazatelj plastičnosti u izražaju peptida nakon aksotomije je značajan porast koncentracije tvari P u dorzalnom rogu [66]. Nakon periferne ozljede živca zabilježen je značajan porast koncentracije NPY-a u velikim i srednjim neuronima spinalnog ganglija [63, 67-70]. Opisani porast uočen je i u istraživanjima na miševima [71] te potvrđen tehnikama *in situ* hibridizacije [72]. Pojačan izražaj NPY-a potvrđen je u različitim modelima ozljede živca, uključujući presijecanje i podvezivanje živca [69, 73], CCI [68], SNL [72, 74] te čak i u dijabetičkoj neuropatiji izazvanoj streptozotocinom [75]. Pojačan izražaj NPY-a pronađen je i na mjestu neuroma, tj. batrljka presječenog živca [67, 76]. Podražaj koji dovodi do pojačanog izražaja NPY-a još nije razjašnjen. Međutim, čini se da je ozljeda živca važniji povod za sintezu NPY od aferentnih nociceptivnih signala [73].

1.6.3. Receptori za neuropeptid Y

Fiziološki učinak NPY ostvaruje pomoću receptora koji pripadaju jednoj od najraznovrsnijih grupa unutar velike porodice GPCR receptora [77, 78].

Porodica NPY peptida u ljudi i štakora veže se na 4 GPCR receptora: Y1, Y2, Y4 i Y5. Neke vrste, uključujući miševе, imaju dodatni Y6 receptor, koji nije funkcionalan u ljudi, a nedostaje i u štakora [79].

Y1 receptor (Y1R) sudjeluje u regulaciji hranjenja [80-83], kardiovaskularnih funkcija poput smanjenja krvnog tlaka i broja otkucaja srca [84] i u emocionalnim stanjima poput depresije i anksioznosti [85-87]. NPY Y1 receptor ima ulogu i u neurogenoj upali [88].

Y2 receptor (Y2R) uglavnom je smješten presinaptički gdje putem autoreceptorske funkcije inhibira daljnje otpuštanje neurotransmitera [89-91]. Ovo djelomično objašnjava zašto Y1 agonisti imaju anksiolitičko [85, 86], a Y2 agonisti anksiogeno djelovanje [85, 92]. Y2R izravno je uključen u kardiovaskularne funkcije NPY-a [93], a njegova aktivacija potiče angiogenezu induciranu NPY-om [94, 95], te sudjeluje u regulaciji hranjenja [96-99].

Y4 receptor specifičan je zbog toga što se veoma razlikuje, ovisno o vrsti organizma. Kada se uspoređuje njegova građa u štakora i čovjeka, samo 75% aminokiselina je identično, što čini ovaj receptor jednim od najbrže evoluirajućih GPCR receptora [100, 101]. Istraživanja su pokazala i značajne razlike u farmakologiji peptida štakora u odnosu na čovjeka [101, 102]. Agonist Y4 receptora inhibira unos hrane, slično kao i Y2 receptor [103].

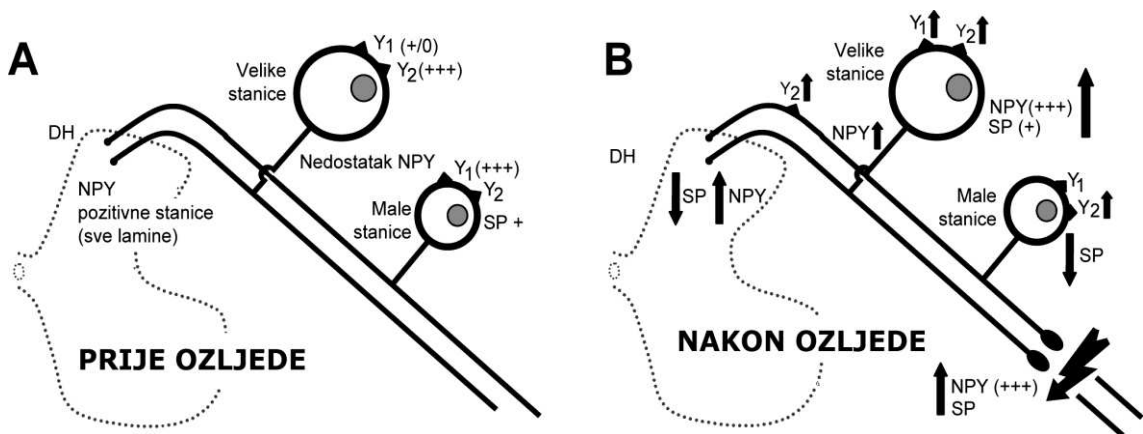
Y5 receptor sudjeluje u regulaciji hranjenja [104], reprodukcije [105] i podražljivosti živčanih stanica u mozgu [106, 107].

Osjetni neuroni izražavaju funkcijski povezane Y1 i Y2 receptore, iako je njihov izražaj ovisan i o tipu stanica i o vrsti organizma u kojem se istražuju [108-110]. U neuronima spinalnih ganglija mRNA Y2R-a izražava se u CGRP-pozitivnim, velikim i srednjim neuronima, dok se Y1R izražava u malim CGRP i IB4 pozitivnim neuronima [88, 109]. Smatra se da su u stražnjem rogu kralježnične moždine Y2 receptori presinaptički i da su uključeni u suprimiranje otpuštanja transmitera, dok su Y1 receptori većinom postsinaptički i imaju aktivacijsku ulogu. Periferna aksotomija pojačava izražaj Y2R u malim i velikim neuronima spinalnog ganglija, dok je Y1R jače

izražen samo u velikim neuronima [109, 111-113] (Slika 3). Y1R zadržava se u tijelu neurona, dok se Y2R transportira u dorzalni rog u velikim količinama, posebno nakon aksotomije [112, 114, 115].

1.6.4. NPY inhibira otpuštanje tvari P

NPY antinocicepcijski učinak ostvaruje djelomično i kroz inhibiranje otpuštanja tvari P i drugih algogenih tvari [60-62]. Kada se NPY doda u staničnu kulturu spinalnog ganglija, on inhibira otpuštanje tvari P izazvano depolarizacijom [116]. Pokazano je da tvar P ima ulogu u provođenju nocicepcijskih informacija prema kralježničnoj moždini [117], dok na periferiji sudjeluje u podržavanju neurogene upale aktivacijom upalnih stanica, degranulacijom mastocita, vazodilatacijom, ekstravazacijom plazme s posljedičnim otpuštanjem tvari koje uzrokuju bol (primjerice histamina, bradikinin, serotonin itd.) [118-120]. Slika 3 prikazuje izražaj NPY i njegovih receptora, te tvari P, prije i poslije ozljede perifernog živca.

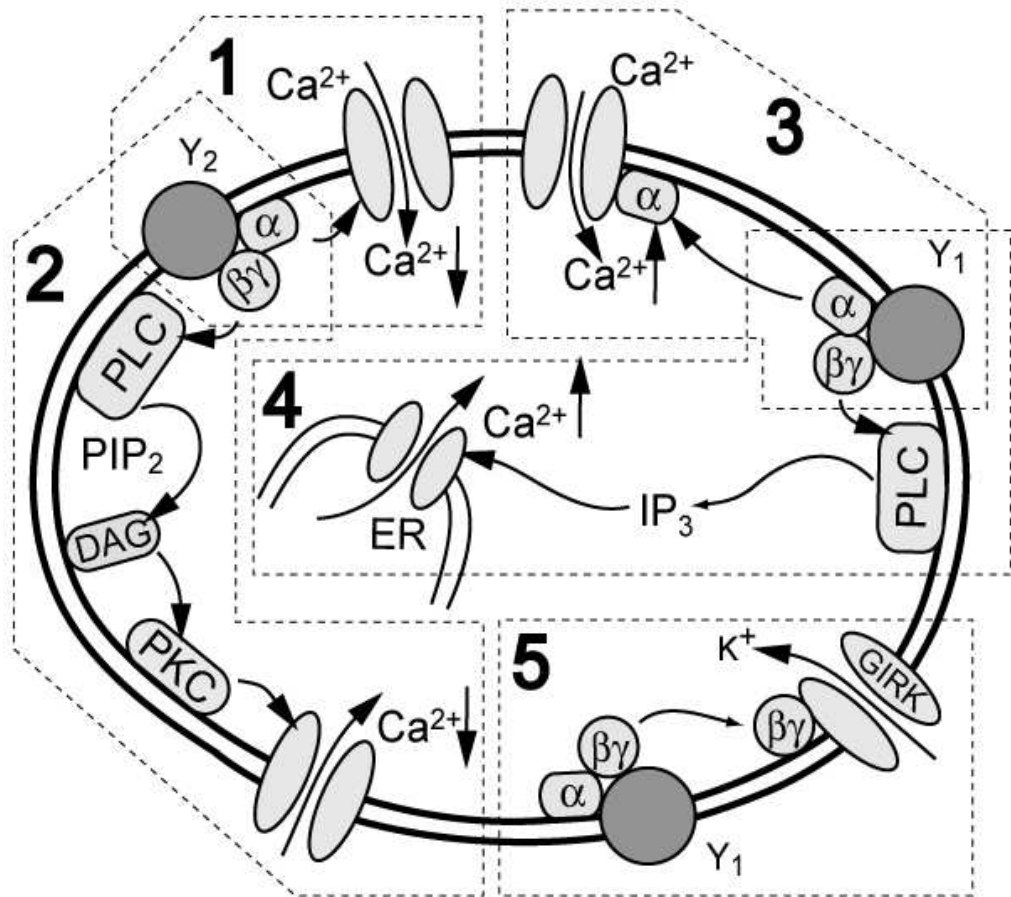


Slika 3. Izražaj NPY i njegovih receptora, te tvari P (SP) A) prije i B) poslije ozljede perifernog živca. Legenda: NPY – neuropeptid Y; SP – tvar P; DH – stražnji rog.

1.6.5. NPY selektivno inhibira ili pojačava kalcijске struje u neuronima

U neuronima spinalnih ganglija NPY inhibira kalcijске struje (većinom N-tip i L-tip) [116, 121, 122], što naposljetku inhibira otpuštanje neurotransmitera. Inhibicija kalcijških struja (I_{Ca}) N-tipa posredovana NPY-om regulirana je putem presinaptičkog Y2R i to signalnim putem osjetljivim na pertusis toksin (engl. pertussis toxin sensitive pathway) [123-125]. Postoji i nekoliko linija dokaza koji pokazuju da je i aktivacija protein kinaze C (PKC) uključena u inhibiciju I_{Ca} reguliranu receptorima u neuronima spinalnog ganglija [121]. Stoga, aktivatori PKC, primjerice forbol esteri i sintetski analozi diacil-glicerola (DAG) djelomično oponašaju inhibicijski učinak na I_{Ca} u neuronima ganglija pilića [126]. Također, inhibicija I_{Ca} u spinalnim ganglijima posredovana neurotransmiterima može se smanjiti inhibicijom PKC [127]. Navedeni primjeri pokazuju da PKC ima ulogu u smanjenju I_{Ca} , vjerojatno na temelju selektivnosti, prema stanici i prema tipu Ca^{2+} kanala.

NPY može i povećati koncentraciju unutarstaničnog Ca^{2+} . U mnogim tipovima stanica [128-130], uključujući i neurone spinalnih ganglija [131], NPY inducira povećanje slobodnog ($[Ca^{2+}]_i$) u citosolu, nakon stimulacije Y1R [132, 133]. Najvjerojatniji izvor Ca^{2+} koji se oslobađa nakon aktivacije Y1R je endoplazmatski retikulum [131, 134]. NPY stimulira sintezu inozitol trifosfata ($InsP_3$) i DAG-a u neuronima spinalnih ganglija, što dovodi do povećane koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ putem G-proteina osjetljivih na pertusis toksin [116, 123, 131]. Iako nije opisan u stanicama spinalnog ganglija, postoji i drugi put koji rezultira povećanjem $[Ca^{2+}]_i$ bez uključivanja unutarstaničnih glasnika kao što su $InsP_3$ ili ciklički AMP [128, 129]. Stoga, brojni putevi potaknuti aktivacijom receptora za NPY mogu imati suprotne učinke na Ca^{2+} signalizaciju u osjetnim neuronima (Slika 4), a koliko važnu ulogu ima određeni put ovisi o vrsti stanice i modelu ozljede.



Slika 4. Shematski prikaz mnogobrojnih učinaka NPY-a na unutarstanični kalcij u neuronima spinalnog ganglija. 1) Inhibicija izravnim djelovanjem na N-tip Ca^{2+} kanala: PTX osjetljiva inhibicija (G_i/G_o) uključuje Y_2R i nastaje izravnim djelovanjem na Ca^{2+} kanale osjetljive na napon, kroz α -podjedinicu; 2) Inhibicija I_{Ca} putem PKC: PTX osjetljiva inhibicija uključuje L-tip Ca^{2+} kanala. Aktivacija PLC odvija se putem $\beta\gamma$ -podjedinice G_i/G_o proteina; 3) Povećanje unutarstaničnog kalcija putem Y_1R : NPY Y_1 receptor vezan za PTX osjetljivi G-protein koji regulira fosfolipazu C i aktivira kalcij-fosfatidilinozitol signalni put s posljedičnim oslobađanjem Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma; 4) Povećanje I_{Ca} zbog izravnog djelovanja na naponske Ca^{2+} kanale; 5) Aktivacija Y_1R može potaknuti kalijске struje djelovanjem na G_i -protein $\beta\gamma$ -podjedinicu. NPY može utjecati na unutarstanični Ca^{2+} putem četiri istodobna i djelomično suprotstavljajuća puta. Legenda: PLC – fosfolipaza C; PIP_2 – fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat; DAG – diacilglicerol; PKC – fosfolipaza C; ER – endoplazmatski retikulum.

1.6.6. NPY u regulaciji boli

Uloga NPY-a u neuropatskoj boli još uvijek je nedovoljno razjašnjena, a istraživanja pokazuju različite pa čak i proturječne rezultate [60, 61, 88, 135]. Pokazano je da farmakološka primjena NPY-a uzrokuje analgeziju u zdravim i u ozlijeđenim štakorima [60, 136-138]. Taj antinocicepcijski učinak može se polučiti samo malim dozama NPY-a [139]. Dokazano je da su miševi koji ne izražavaju NPY skloni autotomiji, što također sugerira da NPY ima analgezijski učinak [140]. Ovaj učinak je najvjerojatnije reguliran preko Y1R, budući da je smanjena antinocicepcija primjećena u miševa kojima nedostaje Y1 receptor [88]. NPY i Y1R imaju važnu antinocicepcijsku ulogu u središnjem živčanom sustavu (osobito u periaqueductalnom sivom području, engl. periaqueductal grey) u štakora s upalom [137]. Pored toga, neke druge studije pokazale su, primjerice, da intratekalna primjena NPY-a pojačava hiperalgeziju nakon ozljede živca, i to putem aktivacije Y1 receptora smještenih u mijeliniziranim živčanim vlaknima [141], a NPY apliciran subkutano, u stražnju šapu životinja s kroničnom ozljedom živca, uzrokuje pojačani hiperalgezijski odgovor na bolni podražaj [141, 142]. Opisane proturječnosti mogu biti rezultat sudjelovanja različitih NPY receptora ali i različitih mjesta aplikacije NPY-a.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prvi cilj je istražiti djelovanje neuropeptida Y injiciranog u spinalni ganglij na bolno ponašanje štakora u eksperimentalnom modelu neuropatske i upalne boli. Hipoteza je da će ciljani unos neuropeptida Y u spinalni ganglij pojačati bolno ponašanje u štakora u navedenim eksperimentalnim modelima.

Drugi cilj je istražiti je li moguće spriječiti razvoj bolnog ponašanja blokiranjem Y1 i Y2 NPY receptora primjenom specifičnih antagonista. Hipoteza je da će izravna primjena selektivnih antagonista Y1 i Y2 receptora ublažiti bolno ponašanje u štakorskom modelu neuropatske i upalne boli.

Treći cilj je istražiti može li primjena antagonista Y1 i Y2 receptora utjecati na upalnu reakciju u području spinalnog ganglija i odgovarajućeg dorzalnog roga potaknutu upotrijebljenim eksperimentalnim modelima. Hipoteza je da će primjena antagonista Y1 i Y2 NPY receptora smanjiti upalnu reakciju u spinalnom gangliju i odgovarajućem segmentu kralježnične moždine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etička načela

Svi eksperimentalni postupci temeljeni su na etičkim smjernicama IASP-a. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH (Rješenje za rad s pokusnim životinjama, ur.br: 525-6-08-2-LJ.Z.).

3.2. Pokusne životinje

U istraživanju su upotrijebljeni mužjaci štakora soja Sprague-Dawley težine od 190-240 g, uzgojeni u Nastambi za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu.

Tijekom pokusa štakori su boravili u pričuvnoj nastambi za eksperimentalne životinje Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu u odvojenim plastičnim kavezima, uz odgovarajuće klimatske uvjete i dvanaestosatni ciklus dan-noć. Životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani.

Veličina uzorka u svim pokusima određena je programom StatMate (GraphPad, San Diego, CA, SAD). Za procjenu veličine uzorka upotrijebljeni su podaci iz pilot istraživanja i to oni dobiveni von Frey testom ponašanja u kojem se određuje prag uzmicanja šape izražen u gramima.

3.3. Eksperimentalni modeli

U istraživanju su upotrijebljena dva eksperimentalna modela boli, podvezivanje spinalnog živca kao model neuropatske boli (SNL) [16] i injekcija karagenana kao model upalne boli [143].

3.3.1. Model neuropatske boli

Za pokuse u kojima je upotrijebljen SNL model 67 štakora podijeljeno je u sljedeće skupine: kontrolna skupina bez injekcije (n=5), kontrolna skupina kojoj je injicirana fiziološka otopina u spinalni ganglij (n=5), kontrolna skupina kojoj je injicirana NPY u spinalni ganglij (n=5), SNL skupina kojoj je injicirana fiziološka otopina u spinalni ganglij (SNL/NaCl) (n=5), te skupine kojima su u spinalni ganglij injicirane različite koncentracije neuropeptida Y (n=17), BIBO3304 (n=16), i BIIE0246 (n=11). Zbog potpune denervacije stražnje šape, koja je vjerojatno bila rezultat ozljede L4 spinalnog živca, iz pokusa su isključene tri životinje.

3.3.2. Model upalne boli

U ispitivanju je upotrijebljeno 46 mužjaka koji su slučajnim odabirom raspoređeni u sljedeće pokusne skupine: kontrolna skupina bez injekcije (n=5), kontrolna skupina kojoj je injicirana fiziološka otopina u spinalni ganglij (n=5), kontrolna skupina s intraplantarno uštrcanom fiziološkom otopinom (n=5), štakori kojima je injiciran karagenan u desnu stražnju šapu (n=5), štakori kojima je injiciran karagenan u šapu te fiziološka otopina (n=5), NPY (n=7) ili jedan od antagonista Y1R (n=7) ili Y2R (n=7) u spinalni ganglij.

3.4. Kirurški postupci

Za uspavljivanje štakora upotrijebljen je 5%-tni izofluran s kisikom (Forane®, Abbott laboratories Ltd., Queenborough, UK). Tijekom kirurških zahvata upotrijebljen je 2%-tni izofluran u kisiku. Za perfuziju štakori su anestetizirani intramuskularnom injekcijom ketamina (Ketaminol, 210 µl, Intervet, Unterschleibheim, Njemačka, 60 mg/ml) i xylazina (Xylapan, 30 µl, Vetoquinol, Bern, Švicarska, 50 mg/ml).

3.4.1. Podvezivanje spinalnog živca

Podvezivanje spinalnog živca napravljeno je po već prije opisanom postupku [16]. Nakon što se štakoru napravi rez skalpelom na leđima, mišićno tkivo se razmakne sve dok se ne otkrije desna paravertebralna regija. Zatim se odstrani šesti lumbalni poprečni nastavak kako bi se prikazali spinalni nastavci. Spinalni živci L5 i L6 spinalnih ganglija podvezani su svilenim koncem 6-0 i presječeni distalno od ligature. Za razliku od originalno opisane metode, zglobni nastavci i paraspinalni mišići nisu uklonjeni. Naime, istraživačka skupina Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu dokazala je da su ti nastavci važni za stabilizaciju kralježnice te da njihovo uklanjanje dovodi do pojave bolnog ponašanja u štakora [144, 145].

Štakorima iz kontrolne skupine je nakon uspavljivanja napravljen rez na leđima na identičan način kao i pokusnoj skupini kako bi se osiguralo slijepo testiranje ponašanja.

3.4.2. Upala šape izazvana injiciranjem karagenana

Za istraživanje upalne boli upotrijebljen je prethodno opisan model injiciranja karagenana u stražnju šapu štakora [143]. Karagenan je glikoprotein izoliran iz morske trave koji se često upotrebljava za indukciju eksperimentalne upale i upalne boli, i smatra se standardnim modelom za klinički važna upalna stanja [146, 147].

Širina šape, definirana udaljenošću plantarne i dorzalne površine šape, mjerena je na dan injiciranja karagenana. Nakon mjerenja štakorima je intraplantarno, u stražnju desnu šapu, injiciran 0,1 ml 2%-tnog karagenana otopljenog u 0,9%-tnoj sterilnoj fiziološkoj otopini. Kontrolnoj skupini je u isto područje injiciran 0,1 ml sterilne 0,9%-tne fiziološke otopine.

Širina šape mjerena je 5 h, 24 h, 5 dana i 8 dana nakon intraplantarnog injiciranja karagenana ili fiziološke otopine. Podaci su prikazani kao razlika u širini šape (u mm) prije i poslije injiciranja.

3.4.3. Injiciranje u L5 spinalni ganglij

Neuropeptid Y, te antagonisti BIBO3304 i BIIE0246 izravno su injicirani u L5 spinalni ganglij odmah nakon podvezivanja živca u SNL modelu i odmah nakon injiciranja karagenana u šapu u modelu upalne boli, metodom ciljane primjene tvari u spinalni ganglij štakora koju je prethodno objavila istraživačka skupina Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu [148, 149]. Ukratko, nakon reza kože na leđima prikaže se desna paravertebralna regija. Desni paraspinalni mišići odvoje se od poprečnog nastavka u razini L5 spinalnog živca, a vezivno tkivo i mišići odvoje se škalicama, sve dok ne postane vidljiv desni L5 intervertebralni foramen. Vrh igle veličine 29 G (engl. gauge) lagano se zakrivi, tako da se omogući ulazak u foramen u duljini od 2-4 mm. Injiciranje u spinalni ganglij provelo se pod kutem od 60 stupnjeva u odnosu na kralježnicu.

Spinalni ganglij L6 nije se injicirao zbog anatomske položaja i vrlo teškog pristupa koji onemogućuje precizno injiciranje, te zbog činjenice da ishijadični živac prima većinu, tj. 98% osjetnih vlakana iz L4 i L5 spinalnih ganglija [11].

Volumen koji se injicirao u spinalni ganglij iznosio je 4 μL u slučaju modela neuropatske boli, odnosno 3 μL u pokusima upalne boli. Prethodna istraživanja Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu pokazala su da se navedeni volumeni mogu precizno injicirati u spinalni ganglij i da se jednoliko rasporede, bez prodora u okolno tkivo [148].

U prethodnoj studiji [150], upotrijebljen je aktivirajući transkripcijski čimbenik 3 (engl. Activating Transcription Factor 3 – ATF-3), kao marker ozljede neurona u spinalnom gangliju nakon intraganglijske injekcije, te nismo pronašli znakove ozljede živčanog tkiva.

3.5. Testiranje ponašanja

U modelu neuropatske boli ponašanje štakora testirano je dan prije operacije podvezivanja spinalnog živca, tri puta postoperativno (4., 8. i 15. dan), a u slučaju modela upalne boli, testiranja su provedena dan prije injiciranja tvari u spinalni ganglij te četiri puta postoperativno (5 h, 24 h, 5. te 8. dan nakon injiciranja).

Testiranje se provodilo na stalku s podlogom koju čini žičana površina (s otvorima 3x3 mm), gdje su se štakori smjestili pojedinačno u prozirne plastične kaveze bez dna (10 x 25 x 30 cm). U testiranju ponašanja upotrijebljeni su testovi von Frey vlaknima, testovi uboda iglom i testovi termalne alodinije.

3.5.1. Von Frey vlakna

Von Frey vlakna (North Coast Medical Inc., USA) upotrijebljena su za izazivanje mehaničkog podražaja. Kontakt von Frey vlakana s ozlijeđenom desnom šapom u koju je injiciran karagenan trajao je dvije sekunde. Testiranje se provodilo na deset mjesta na plantarnoj površini stražnjih šapa, pazeći da se izbjegnu plantarni jastučići i rubni dijelovi šape prekriveni dlakama. Vlakna su kalibrirana i označena (3.61, 3.84, 4.08, 4.17, 4.31, 4.56, 4.74, 4.93, 5.07, 5.18 i 5.46) te se koriste od najslabijeg prema najjačem kako bi se odredio prag pri kojem vlakno u 50% slučajeva izaziva uzmicanje šape. Prag od 50% izračunat je prema metodi koju je opisao Dixon [151]. Rezultati su prikazani kao prag uzmicanja šape izražen u gramima. Životinje su testirane cijelim rasponom vlakana. Uzmicanje šape ocjenjivalo se kao pozitivan odgovor na podražaj ukoliko bi štakor odmaknuo šapu. Ako niti jedno vlakno ne poluči 50% uzmaka, vrijednost najdebljeg vlakna uzima se kao 50%-tni prag [22].

3.5.2. Test uboda iglom (engl. pin-prick test)

Vrh igle za spinalnu anesteziju veličine 22 G prisloni se u sredinu šape silom koja je potrebna da udubi kožu šape. U ovom testu registriraju se dvije vrste odgovora: brzo

uzmicanje šape uz trenutno vraćanje na podlogu ili produženo podizanje šape popraćeno trešnjom, lizanjem i timarenjem. Ovaj oblik reakcije nazvan je hiperalgezijskim odgovorom zbog svoje složenosti i trajanja [22]. Hiperalgezijski tip ponašanja je vjerodostojan pokazatelj boli [22, 152]. Nakon deset uboda iglom u plantarnu površinu stražnje šape bilježila se učestalost ovog tipa odgovora (u vremenskim intervalima od najmanje 15 sekundi) te se izračunala srednja vrijednost.

3.5.3. Termalna alodinija – osjetljivost na sniženu temperaturu

Kap acetona na vršku štrcaljke prisloni se na središnji dio plantarne površine stražnje šape, bez kontakta štrcaljke s kožom [153]. Odgovor na podražaj može biti negativan, ili pozitivan ako životinja uzmakne šapu. Pozitivni odgovori su kratki (kraći od 3 sekunde), a testiranje se provodilo kroz tri ponavljanja u razmaku od 30 sekundi.

3.5.4. Termalna alodinija - osjetljivost na povišenu temperaturu

Izvor topline opremljen potenciometrom za regulaciju temperature i s kontaktnom površinom (3x3 mm) prisloni se na donju površinu žičanog kaveza izbjegavajući izravni kontakt sa šapom štakora. Takav pristup osigurava postupno povećanje temperature do vremenskog praga od 20 sekunda i maksimalne temperature od $\approx 42^{\circ}\text{C}$. Mjerali smo vrijeme do uzmicanja stražnje šape, tri puta u vremenskim intervalima od jedne minute, te izračunali srednju vrijednost.

3.5.5. Test rotirajućeg cilindra (engl. rotarod test)

Test rotirajućeg cilindra upotrijebljen je za prikupljanje podataka o mogućim motornim oštećenjima te poremećajima ravnoteže. Štakori se smjeste na rotirajući cilindar (Rota-rod 7750, Ugo Basile, Comerio, Italija). Mjeri se vrijeme koje štakor provede održavajući ravnotežu na cilindru. Životinje su se privikavale na rotirajući cilindar dva puta dnevno, tri dana prije testa. Izračunat je postotak vremena proveden na

cilindru šest sati nakon injekcije u odnosu na vrijeme provedeno na cilindru u predtestiranju.

3.6. Imunofluorescencijsko bojanje

Dva tjedna nakon operacije (16. postoperativni dan) u modelu podvezivanja spinalnog živca, te osam dana nakon injiciranja (8. postoperativni dan), u modelu upalne boli, štakori su uspavani prethodno spomenutom kombinacijom anestetika te su perfundirani kroz uzlaznu aortu. Za perfuziju se koristila fiziološka otopina, a zatim 300 ml Zambonijeva fiksativa (4%-tni paraformaldehid i 15%-tna pikirinska kiselina u 0,1 M fosfatnom puferu (PBS, pH 7,4) [154]. Nakon perfuzije odstranjen je L5 spinalni ganglij te pripadajući dio kralježnične moždine. Odstranjena tkiva naknadno smo fiksirali 2 h u istom fiksativu pripremljenom za perfuziju. Nakon ispiranja u 0,1 M PBS-u i prekonocne krioprotekcije u 30%-tnoj saharozi, spinalni gangliji i dijelovi kralježnične moždine uklopljeni su u Optimal Cutting Temperature (OCT) medij za smrzavanje (Tissue Tek, Tokyo, Japan) te su izrezani na kriotomu (Thermo Shandon Cryotome, Pittsburgh, PA, SAD). Rezovi debljine 10 μ m položeni su na silanizirana predmetna stakalca.

Za detekciju aktiviranih astrocita dorzalnog roga i satelitskih stanica spinalnog ganglija, rezovi su izloženi poliklonalnom protutijelu protiv glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) razvijenom u kuniću (1:1000, Chemicon International Inc., Temecula, CA, SAD, Kat. br. AB5804). Kao sekundarno protutijelo korišteno je kozje sekundarno protutijelo označeno biotinom (IgG-B)(1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD; Kat. br. sc-2040), a za vizualizaciju upotrijebljen je konjugat Streptavidin Alexa Fluor 488 (1:500; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, SAD; Kat. br. S-32354). Rezovi su inkubirani protutijelima tijekom noći na sobnoj temperaturi, a ispirani su otopinom 0,2% Triton X-100 u PBS-u. Nakon posljednjeg ispiranja u PBS-u, stakalca su prekrivena pokrovnica na kojima se nalazila tekućina Immuno-Mount (Shandon, Pittsburgh, PA, SAD), te su ostavljena da se osuše na zraku. Negativne kontrole uključivale su izostavljanje primarnog protutijela što je rezultiralo neobojenim tkivom spinalnih ganglija i kralježnične moždine.

3.7. Kvantitativna analiza imunofluorescencijskog bojanja

Svaki četvrti rez spinalnog ganglija i kralježnične moždine (3 do 4 reza po štakoru) snimljen je mikroskopom (Olympus, BX61, Tokyo, Japan) opremljenim digitalnom kamerom (Olympus DP71, Tokyo, Japan) pomoću računalnog programa Cell A Imaging Software for Life Sciences Microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). Slike su snimljene ujednačenim postupcima. Povećanje (40x), vrijeme ekspozicije, objedinjavanje piksela (eng. binning), pojačanje signala (engl. gain) identični su za svaku sliku. Slike kralježnične moždine unešene su u računalni program MetaMorph (ver. 6.2.r5, Molecular Devices, Downington, PA, SAD) i analizirane kao monokromatske mikrofotografije (2040x1536 piksela, 12 bit, 0-4096 nijansi sive). Intenzitet fluorescencije izračunat je duž linije postavljene između ulaznog mjesta stražnjeg korijena u dorzalni rog i centralnog kanala (opcija skeniranja linije širine 15 piksela). Analiza spinalnih ganglija uključivala je određivanje ukupnog broja neurona i broja neurona okruženih satelitskim stanicama označenih GFAP-om. Postotak se izračunao dijeljenjem neurona koji su imali GFAP-pozitivni prsten, s ukupnim brojem neurona koji su se nalazili u promatranom polju (svaka mikrofotografija spinalnih ganglija podijeljena je u kvadrate veličine 150 x 150 µm, s najmanje 80% površine prekrivene neuronima). Brojali su se samo neuroni koji su imali jasno vidljivu jezgru. Od neurona smještenih ispod granica kvadrata brojali su se samo oni smješteni na desnoj i gornjoj granici kvadrata.

3.8. Kemikalije

Karagenan je razrijeđen u 0,9% sterilnoj fiziološkoj otopini do koncentracije od 2% (Kat. br. C1867-5g, Sigma, St. Louis, MO, SAD). Neuropeptid Y kupljen je od NeomPS tvrtke (Kat. br. SC115, Strasbourg, Francuska) i pohranjen tako da su napravljeni alikvoti koji su uskladišteni prema uputstvima proizvođača. BIBO3304, antagonist Y1 [82] i BIIE0246, antagonist Y2 [155] poklon su H. Doodsa (Boehringer Ingelheim Pharma KG, Njemačka). BIBO3304 pripremljen je kao zasićena otopina koja se razrijeđuje s ddH₂O neposredno prije eksperimenta. BIIE0246 je otopljen u 10%-tnom DMSO u ddH₂O, pomoću sonikatora i uskladišten na -20°C. Prije korištenja,

aliquoti BIIE0246 bili su dodatno razrijeđeni fiziološkom otopinom do krajnje koncentracije. Krajnja koncentracija DMSO-a u otopini bila je 0.2%, što je manje od koncentracije za koju je pokazano da ima utjecaj na stanice [156].

Za pokuse s modelom neuropatske boli, koncentracija neuropeptida Y (0.01, 0.1 i 0.5 nM) određena je prema istraživanju Lia i suradnika, [157]. Koncentracija BIIE0246 (0.02, 0.2 i 2 μ M) određena je prema istraživanju vezivanja za receptore [155] te studiji Adewala i suradnika [158]. Koncentracija BIBO3304 (0.01, 0.1, 1 i 10 nM) izabrana je temeljem prethodnih istraživanja [159, 160].

Za pokuse s modelom upalne boli, koncentracija NPY-a (0.01 nM) određena je prema prethodnom istraživanju Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu [161] i prema istraživanju Lia i sur. [157]. Koncentracija BIIE0246 (2 μ M) određena je prema već navedenim istraživanjima [155] i prethodnom istraživanju Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu [161]. Koncentracija BIBO3304 (0.01 nM) izabrana je na temelju prethodnih istraživanja [159-161].

3.9. Statistički postupci

Podaci su obrađeni računalnim programima Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD) i Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Podaci dobiveni testovima ponašanja analizirani su analizom varijance s ponovljenim mjerenjima (engl. repeated measurements, ANOVA). Razlike u intenzitetu fluorescencije u istraživanjima s modelom neuropatske boli testirane su jednosmjernom analizom varijance. U oba slučaja nakon analize varijance primijenjen je Bonferronijev post-hoc test. Za kvantitativnu analizu imunofluorescencije upotrijebljeni su ANOVA i t-test. Svaka razlika s $P < 0,05$ smatrala se statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu neuropatske boli

Uloga neuropeptida Y u modulaciji boli istražena je promatranjem bolnog ponašanja nakon njegove lokalne primjene u ganglij ozlijeđen podvezivanjem spinalnog živca.

Mehanička alodinija testirana je von Frey vlaknima. Kao što je prikazano na Slici 5A, podvezivanje spinalnog živca (SNL), zajedno s injekcijom fiziološke otopine u spinalni ganglij, rezultiralo je očekivanim smanjenjem praga uzmicanja šape (ANOVA, $P < 0,001$). Post hoc analiza pokazala je značajne razlike između početne vrijednosti i vrijednosti 4. i 8. postoperativnog dana.

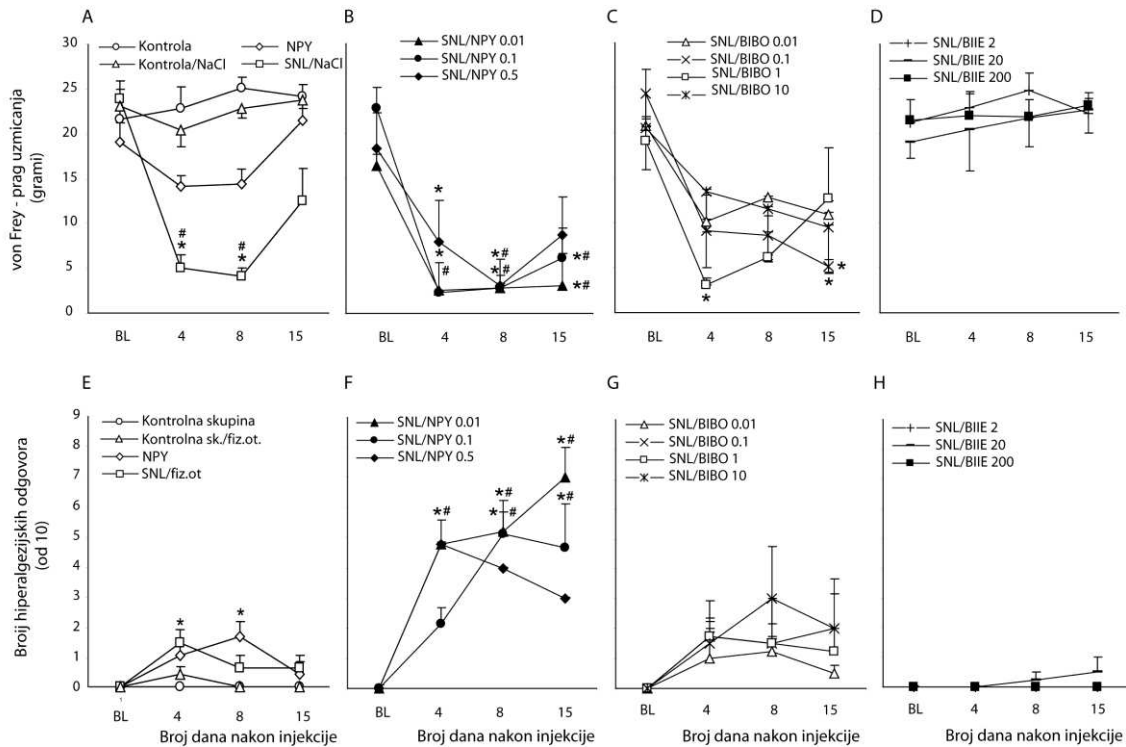
Kad se umjesto fiziološke otopine u ganglij injiciraju različite doze NPY-a, prag uzmicanja šape kao reakcija na stimulaciju von Frey vlaknima u SNL/NPY skupinama bio je također znatno niži od onoga u kontrolnoj skupini (ANOVA, $P < 0,001$). U SNL/NPY skupinama smanjio se prag uzmicanja, slično kao u SNL/NaCl skupini (Slika 5A i B).

Kako bi utvrdili ima li injekcija NPY-a ili fiziološke otopine izravan utjecaj na bolno ponašanje u neozlijeđenih štakora, injicirali smo 0,1 nM NPY ili fiziološku otopinu u L5 spinalni ganglij. Ti postupci nisu povećali broj hiperalgezijskih reakcija, niti broj pozitivnih odgovora u testovima termalne ili mehaničke alodinije, u odnosu na kontrolne životinje (Slike 5A, E, i 6A, E).

Test uboda iglom (engl. pin-prick test) korišten je za testiranje mehaničke hiperalgezije. Nakon uboda iglom moguće je izazvati dva tipa reakcije: kratko, refleksno uzmicanje i složeni hiperalgezijski odgovor kojeg karakterizira držanje šape duže vremena u zraku, trešnja te lizanje [22]. Broj hiperalgezijskih odgovora nakon podražaja iglom povećan je u SNL/NaCl skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 5E, ANOVA, $P < 0,05$). Post-hoc analiza pokazala je značajne razlike četvrtog postoperativnog dana u SNL/NaCl skupini u odnosu na početne (engl. baseline) vrijednosti.

Značajan porast hiperalgezijskih odgovora bio je vidljiv u SNL/NPY skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 5F; ANOVA, $P < 0,001$). Osim toga, broj odgovora

nakon testa uboda iglom u skupinama s injiciranim NPY-om bio je veći nego u SNL/NaCl skupini (ANOVA, $P < 0,001$).



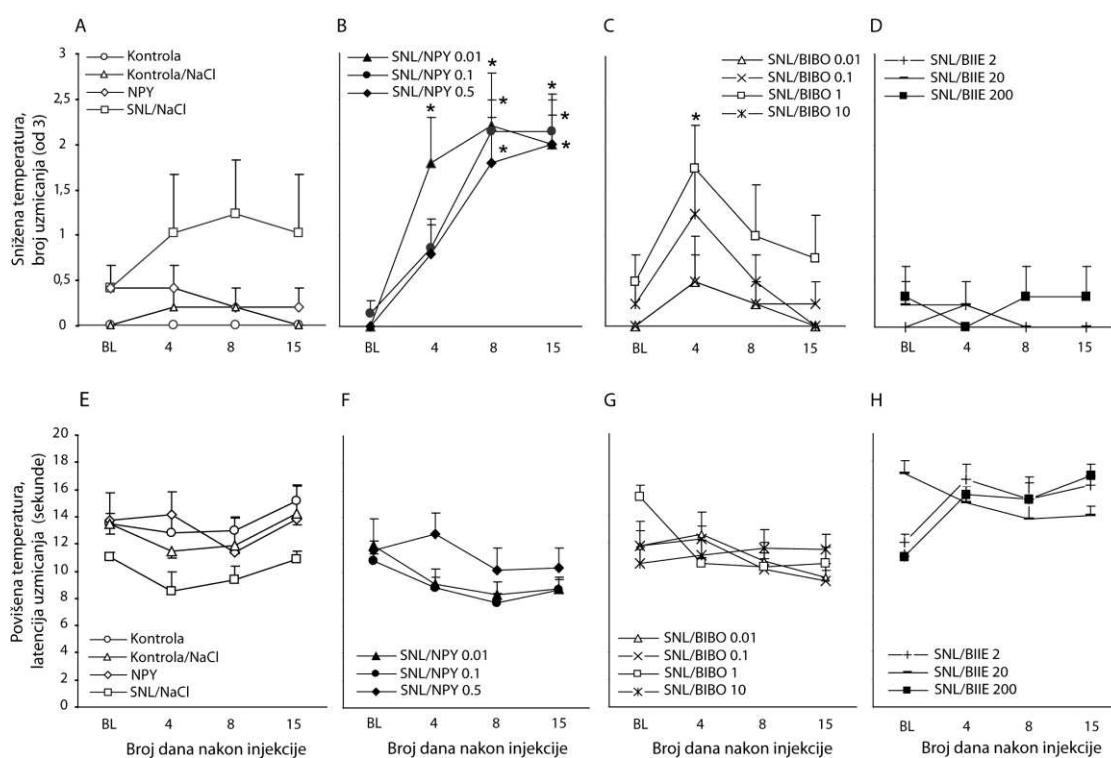
Slika 5. SNL je izazvao značajne promjene u pragu uzmicanja u von Frey testovima (A) i u hiperalgezijskom tipu odgovora (E). Injekcija NPY-a u spinalni ganglij neozlijeđenih životinja izazvala je značajno povećanje samo u broju hiperalgezijskih odgovora (E). Ciljani unos NPY-a u spinalni ganglij odmah nakon SNL-a dodatno je pogoršao mehaničku hiperalgeziju (F). Test mehaničke alodinije izazvao je smanjeni prag za von Frey vlakna (B), kao i u SNL/NaCl skupini. Kada je BIBO3304 injiciran u spinalni ganglij, izazvao je slično smanjenje praga za von Frey vlakna kao i u SNL/NaCl te SNL/NPY skupinama (C). Injiciranje BIIE0246 potpuno je poništilo učinak ozljede, tj. SNL-a te dodatni učinak NPY-a (D), u slučaju mehaničke hiperalgezije. Svaka vrijednost predstavlja prosječni 50%-tni prag za uzmicanje šape izražen u gramima (A, B, C, D) ili prosječni broj odgovora (E, F, G, H), za desnu šapu. Vrijednosti za lijevu šapu nisu prikazane jer nije bilo kontralateralnog učinka. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM). Zvijezdica označava statistički značajnu razliku od početne

vrijednosti. # označava razliku između kontrolne skupine i različitih doza u istom vremenskom intervalu (n=4-6 štakora po skupini).

Preosjetljivost na toplinske podražaje uočena je nakon izlaganja sniženim temperaturama. Primjena različitih doza NPY-a značajno je povećala broj uzmicanja u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 6B, ANOVA, $P < 0,05$) ali ne i u odnosu na SNL/NaCl skupinu. Porast broja pozitivnih odgovora nakon hladnog podražaja u SNL/NaCl skupini nije dosegao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne skupine (Slika 6A).

Osim uzmicanja šape kao odgovora, također je istražena učestalost hiperalgezijskih odgovora pomoću testa s acetonom. U kontrolnim i SNL/NaCl skupinama nije bilo takve reakcije. Međutim, u SNL/NPY 0,01 i 0,1 nM skupinama, bilo je 3% i 6% hiperalgezijskih odgovora. Najveća doza NPY-a nije utjecala na ovaj tip odgovora nakon ozljede (podaci nisu prikazani slikom).

Injekcije fiziološke otopine, odnosno NPY-a (SNL/NaCl i SNL/NPY skupine) nisu rezultirale skraćanjem latencije uzmicanja šape nakon toplinskog podražaja, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, nije bilo razlike između SNL/NaCl i SNL/NPY skupine (Slika 6E i 6F).



Slika 6. SNL nije izazvao statistički značajnu razliku u latenciji uzmicanja nakon hladnih ili toplih podražaja u testu termalne alodije (A i E). Injiciranje NPY-a u spinalni ganglij neozlijeđenih štakora nije izazvao značajne promjene u termalnoj osjetljivosti (A i E). Ciljani unos NPY-a u spinalni ganglij ozlijeđenih štakora pogoršao je osjetljivost na hladni podražaj (B), ali nije promijenio latenciju uzmicanja u testu s toplinskim podražajem (F). Injiciranje BIIE0246 potpuno je poništilo produženje latencije uzmicanja uzrokovano ozljedom u testu s hladnim podražajem (D). Blokiranje Y1 receptora nije utjecalo na odgovore životinja u testovima s hladnim podražajem (C). Prag uzmicanja nakon podražaja toplinom nije se promijenio nakon blokiranja Y1 ili Y2 receptora (G i H). Svaka vrijednost predstavlja prosječni broj odgovora (A, B, C, D) ili prosječnu latenciju, u sekundama (E, F, G, H), za desnu šapu. Vrijednosti za lijevu šapu nisu prikazane jer nije došlo do kontralateralnog učinka. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM). Zvezdica označava statistički značajnu razliku od početne vrijednosti (n=4-6 štakora po skupini).

Napravljena je i statistička usporedba između kontrolne skupine i skupina tretiranih različitim dozama NPY-a, u istom vremenskom periodu nakon injekcije. Ova analiza pokazala je sličan ishod, osim u slučaju injekcije različitih doza NPY (Slika 5 i 6).

Rotarod test nije pokazao znakove oštećenja motoričke koordinacije ili ravnoteže dva sata nakon injiciranja testiranih tvari (podaci nisu prikazani slikom).

Kako bi saznali koji su receptori odgovorni za uočene proalgezijske učinke neuropeptida Y, istražen je utjecaj lokalne primjene NPY Y1 i NPY Y2 antagonista na ponašanje ozlijeđenih štakora.

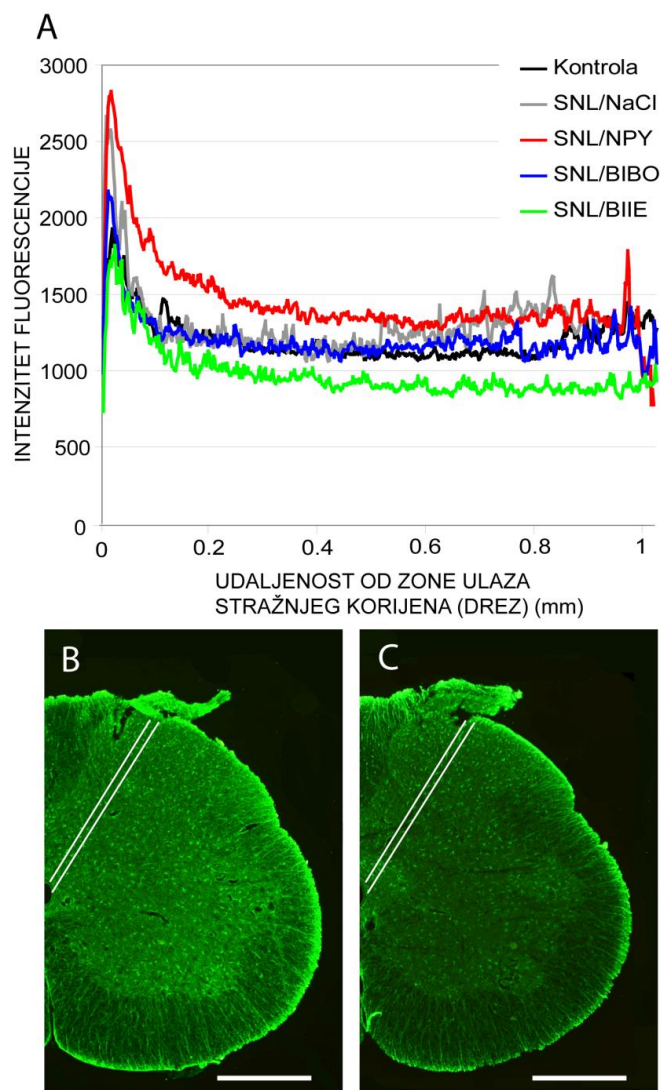
Injekcija BIBO3304, antagonista receptora Y1, u spinalni ganglij, dovela je do smanjenja praga u von Frey testovima, slično kao u SNL/NaCl i SNL/NPY skupinama (Slika 5A-C). Smanjenje praga značajno se razlikuje od vrijednosti u kontrolnim skupinama (ANOVA, $P < 0,05$). Antagonist NPY Y2R spriječio je NPY-posredovano pogoršanje neuropatske boli koje je nastalo kao posljedica ozljede živca (SNL), te su vrijednosti testova ponašanja slične onima u kontrolnoj skupini (Slika 5D). To je vidljivo u smanjenju odgovora uzmicanja nakon ozljede u skupini kojoj je injiciran BIIE0246 u spinalni ganglij. Smanjenje praga u testovima s von Frey vlaknima u BIIE0246 skupini značajno se razlikuje od praga u SNL/NPY skupini (ANOVA, $P < 0,05$). Isti učinak zabilježen je u hiperalgezijskom tipu odgovora nakon testa uboda iglom. Učinak ozljede potpuno je nestao u BIIE0246 skupini (Slika 5H) (BIIE0246 skupina naspram SNL/NaCl skupine, ANOVA, $P < 0,05$). Blokada Y1 receptora s BIBO3304 ne utječe na broj hiperalgezijskih odgovora koji je ostao isti kao u SNL/NaCl skupini (Slika 5G).

Povećanje broja uzmicanja šape nakon testa s acetonom u NPY/NaCl skupini (Slika 6A) ili u SNL/NPY skupini (Slika 6B) smanjilo se u skupinama izloženim Y2R antagonistu BIIE0246 (Slika 6D).

Injekcija antagonista Y1 i Y2 receptora u spinalni ganglij nije utjecala na latenciju uzmicanja šape nakon podražaja toplinom (Slika 6G i H). Smanjenje latencije uzmicanja nakon podražaja toplinom zabilježeno je nakon primjene različitih doza Y2 antagonista, no taj učinak nije postigao statistički značajnu razliku u odnosu na SNL/NaCl skupinu.

U ipsilateralnom dijelu kralježnične moždine uočeno je značajno povećanje izražaja GFAP-a, u usporedbi s kontrolnim štakorima, dva tjedna nakon injekcije NPY-a, fiziološke otopine ili antagonista Y2 receptora (skupine SNL/NaCl, SNL/NPY ili SNL/BIIE) (Slike 7A i 8A; ANOVA, $P < 0,001$). U ipsilateralnim dorzalnim rogovima iz skupine SNL/NaCl očekivano je došlo do povećanja intenziteta fluorescencije, u odnosu na kontrolne skupine (Slika 7A i 8A, ANOVA, Bonferronijev post hoc test, $P < 0,001$). U neozlijeđenih štakora kojima je ubrizgan NPY ili fiziološka otopina nije bilo statistički značajnih promjena u izražaju GFAP-a.

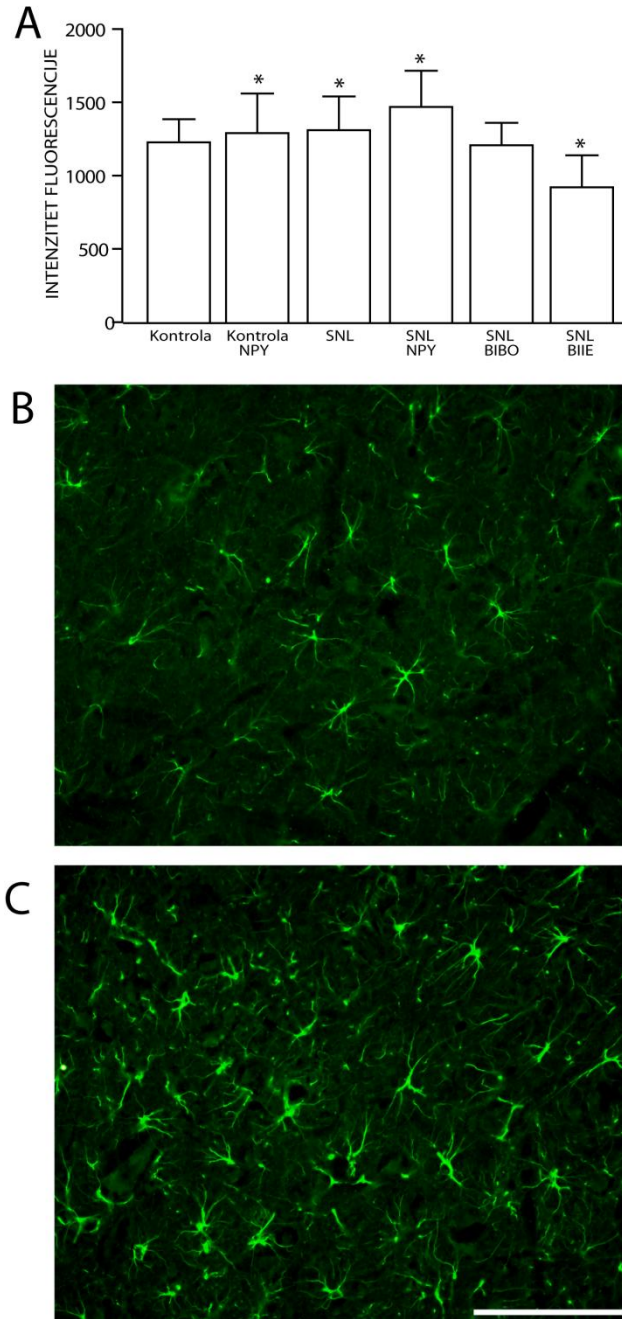
Pojačan izražaj bio je još uočljiviji u SNL/NPY skupini (Slika 7A i 8A). Najizraženija GFAP imunoreaktivnost u SNL/NPY skupini bila je u laminama I-III (Slika 7A). Zvezdoliki astrociti smješteni su oko živčanih stanica, te u perivaskularnim područjima unutar sive tvari.



Slika 7. Utjecaj injiciranja NPY-a, BIBO3304 i BIIE0246 u spinalni ganglij ozlijeđene životinje na aktivaciju astrocita u dorzalnom rogu. Kvantifikacija imunofluorescencije GFAP-a napravljena je duž linije položene od središnjeg kanala do zone ulaza stražnjeg korijena (DREZ). Najveći intenzitet fluorescencije bio je u SNL/NPY skupini, i to u laminama I, II, i III (0,2 mm od DREZ-a). Primjer imunoreaktivnosti GFAP-a u ipsilateralnom dorzalnom rogu štakora nakon SNL/NaCl (B) i SNL/BIIE 20 nM (C). Mjerilo: 0,5 mm.

Na kontralateralnoj strani kralježnične moždine nije bilo izražaja GFAP-a. Nije bilo statistički značajne razlike u intenzitetu fluorescencije između kontrolne i SNL/BIBO330 skupine (Slika 8A). No, antagonist Y2 značajno je smanjio aktivaciju

astrociti, u odnosu na SNL/NPY skupinu (922 ± 218 vs 1469 ± 273 , Bonferronijev post hoc test, $P < 0,001$).



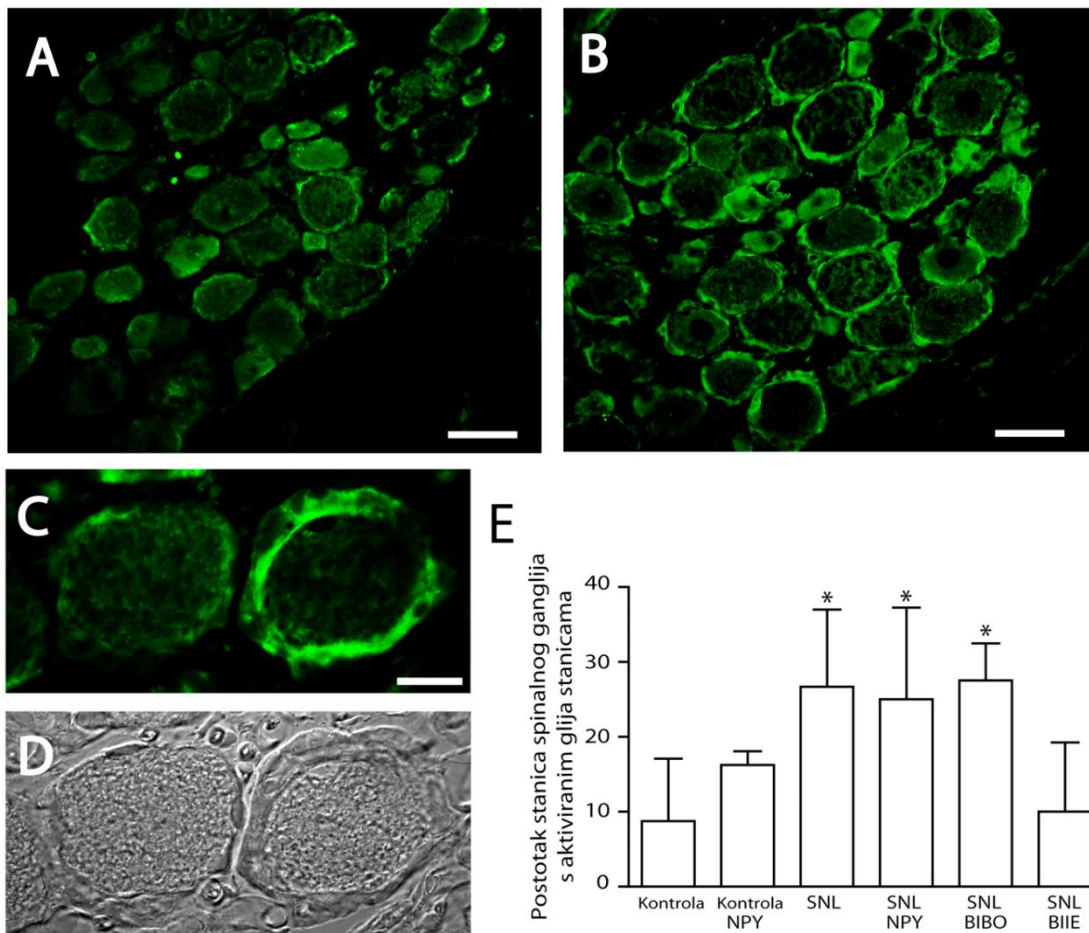
Slika 8. Intenzitet imunofluorescencije bio je više izražen u SNL/NaCl te SNL/NPY skupinama nego u kontrolnim skupinama (A). Primjer imunoreaktivnosti GFAP-a u ipsilateralnom dijelu dorzalnog roga SNL/NaCl skupine (B) i

SNL/NPY 0,01 nM skupine (C). Mjerilo za B i C: 100 μ m. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (n=6-15).

Također je uočena aktivacija satelitskih stanica nakon SNL-a u spinalnom gangliju (Slika 9). Zadebljanje satelitskih stanica oko neurona spinalnih ganglija i fluorescencija GFAP-a služi kao pokazatelj aktivacije satelitskih stanica. To zadebljanje objašnjava se kao rezultat proliferacije satelitskih stanica [34, 162]. U SNL/NaCl skupini, primijećene su aktivirane satelitske stanice koje kao prstenovi okružuju neurone spinalnog ganglija.

Povećana aktivacija satelitskih stanica bila je prisutna i u SNL/NPY i SNL/BIBO3304 skupinama.

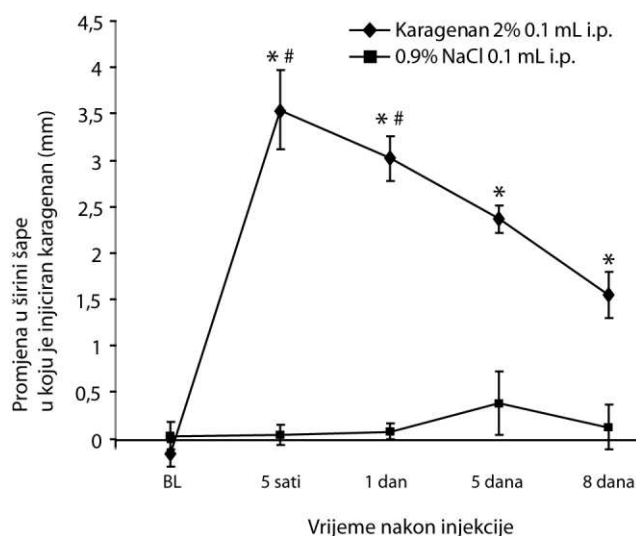
Injekcija antagonista Y2R, BIIE0246, spriječila je aktivaciju satelitskih stanica, bez obzira na ozljedu živca (SNL) (Slika 9E). NPY injekcija u neozlijeđenih životinja dovela je do statistički značajne aktivacije glija stanica u dorzalnom rogu, ali ne i u spinalnom gangliju (Slika 8 i 9). Injekcija fiziološke otopine u neozlijeđenih štakora nije izazvala nikakve promjene u izražaju GFAP-a (podaci nisu prikazani slikom).



Slika 9. Primjer imunoreaktivnosti GFAP-a u ipsilateralnom spinalnom gangliju kontrolne (A) i SNL/NPY 0.01 nM skupine. Većina ganglijskih stanica u SNL/NPY skupini okružena je aktiviranim satelitskim stanicama (A). Veće povećanje GFAP-pozitivnih satelitskih stanica koje okružuju neurone (C i D) otkriva da je aktivacija praćena zadebljanjem tih stanica. Isti neuron je prikazan i u tehnici diferencijalnog interfaznog kontrasta (DIC) (D). Postotak GFAP-pozitivnih satelitskih stanica u kontrolnim i pokusnim skupinama (E). U SNL/NaCl, SNL/NPY te SNL/BIBO skupinama postotak GFAP-pozitivnih prstenova bio je značajno veći u odnosu na kontrolu. Mjerilo: 50 μ m za A i B te 20 μ m za C i D. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Legenda: * označava statistički značajnu razliku od kontrole (n=3-5).

4.2. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu upalne boli

Injekcija karagenana u šapu izazvala je očekivani edem, mehaničku hiperalgeziju i eritem. Upalni odgovor kvantificiran je porastom veličine šape. Povećanje je bilo najizraženije 5 h nakon injekcije. U odnosu na početnu vrijednost (engl. baseline value), statistički značajno povećanje održalo se 5 dana nakon injekcije. Injekcija fiziološke otopine u šapu nije izazvala značajno povećanje veličine šape (Slika 10).



Slika 10. Promjene u širini šape nakon injiciranja karagenana. Injiciranje karagenana (0,1 mL, 2% w/v) u desnu stražnju šapu značajno je povećalo veličinu šape u usporedbi s životinjama kojima je injicirana 0,9%-tna fiziološka otopina (kontrola). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Legenda: * = značajna razlika u odnosu na početnu (baseline) vrijednost, $P < 0,05$; # = značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu životinja testiranu u istom vremenskom periodu, $P < 0,05$; i.p. = intraplantarna injekcija.

Proalgezijski učinak ciljane primjene NPY u spinalni ganglij nakon injekcije karagenana u desnu stražnju šapu ispitan je testovima ponašanja. Von Frey vlakna upotrijebljena su za ispitivanje mehaničke alodinije. Slika 11A pokazuje da

intraplantarna injekcija karagenana, s ili bez i.g. injekcije fiziološke otopine u spinalni ganglij, rezultira očekivanim smanjenjem praga uzmicanja šape (ANOVA, $P < 0,05$). Post-hoc analiza pokazala je značajne razlike između početne vrijednosti i vrijednosti izmjerene 5 h, 1., 5. i 8. dana nakon injekcije karagenana.

Rezultati kontrolne skupine kojoj je napravljen samo rez kože na leđima i kontrolne skupine s fiziološkom otopinom injiciranom u spinalni ganglij objedinjeni su jer nije bilo razlike u bolnom ponašanju životinja između tih skupina.

Štakori kojima je injiciran 0,01 nM NPY u spinalni ganglij (karagenan i.p./NPY i.g. skupina) pokazuju značajno niži prag uzmicanja šape nakon stimulacije von Frey vlaknima, od kontrolne skupine (Slika 11B, ANOVA, $P < 0,001$). Osmi dan nakon injekcije prag uzmicanja u karagenan i.p./NPY i.g. skupini bio je niži nego u karagenan i.p./NaCl i.g. skupini, ali ta razlika nije dosegla statističku značajnost (Slika 11A i 11B).

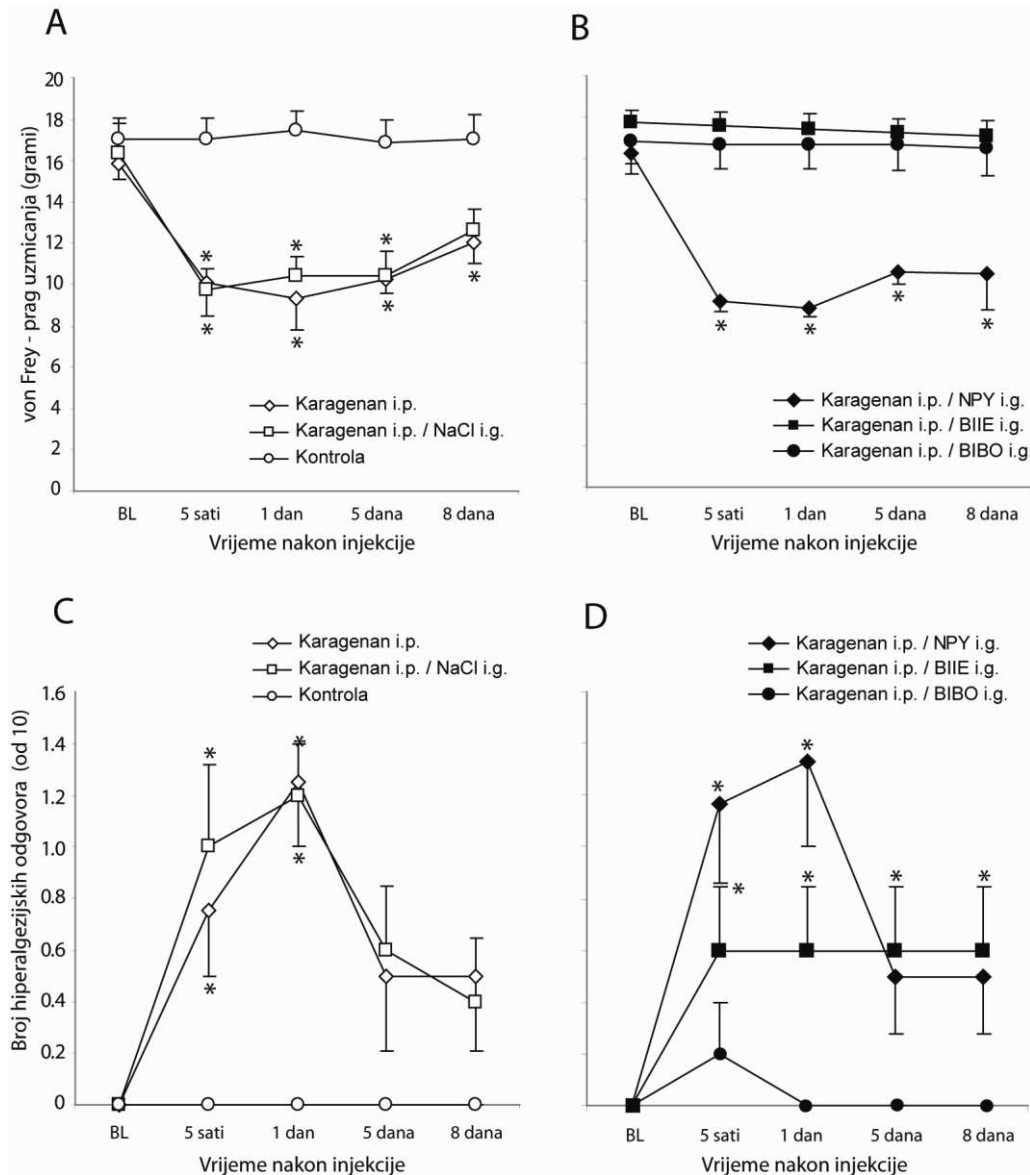
Za istražiti koji su receptori odgovorni za pro-algezijski učinak NPY-a, nakon intraplantarne injekcije karagenana, NPY Y1R (BIBO3304) i Y2R (BIIE0246) antagonisti injicirani su izravno u spinalni ganglij. Kad su BIBO3304, antagonist receptora Y1 ili BIIE0246, antagonist receptora Y2 injicirani u spinalni ganglij, potpuno su poništili smanjenje praga koje je nastalo nakon intraplantarne injekcije karagenana (s ili bez injekcije fiziološke otopine) u testu s von Frey vlaknima (Slika 11B).

Broj hiperalgezijskih odgovora na stimulaciju iglom u pin-prick testu bio je veći u karagenan i.p./NaCl i.g. skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11C, ANOVA, $P < 0,05$). Post-hoc analiza pokazala je značajan porast u broju hiperalgezijskih odgovora 5 h i 1 dan nakon injekcije u karagenan i.p./NaCl i.g. skupini u odnosu na kontrolne vrijednosti. Peti i osmi dan nakon injekcije broj hiperalgezijskih odgovora u karagenan i.p./NaCl i.g. skupini bio je veći nego u kontrolnoj skupini, no ta razlika nije dosegla statističku značajnost.

Značajan porast hiperalgezijskog tipa odgovora zabilježen je u karagenan i.p./NPY i.g. skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11D, ANOVA, $P < 0,001$). Broj hiperalgezijskih odgovora u karagenan i.p./NPY i.g. skupini bio sličan kao u karagenan i.p./NaCl i.g. skupini.

Kada je BIBO3304, antagonist receptora Y1, injiciran u spinalni ganglij, došlo je do potpunog nestanka učinka ozljede (Slika 11D) (BIBO3304 skupina naspram karagenan i.p./NaCl i.g. skupina; analiza varijance s ponovljenim mjerenjima, $P < 0,05$).

Blokiranjem Y2 receptora s BIIE0246 smanjen je broj hiperalgezijskih odgovora, ali ne dovoljno da bi to bilo statistički značajno (Slika 11D).



Slika 11. Intraplantarna (i.p.) injekcija karagenana s i bez intraganglijske (i.g.) injekcije fiziološke otopine dovela je do značajnih promjena u (A) pragu uzmicanja šape u von Frey testovima i (C) hiperalgezijskim odgovorima. Ciljani unos neuropeptida Y u spinalni ganglij neposredno nakon injekcije karagenana smanjio je prag uzmicanja u von Frey testu (B) i povećao broj hiperalgezijskih odgovora (D), u odnosu na skupine karagenan i.p. i

karagenan i.p./NaCl i.g. Injiciranje BIBO3304, antagonista Y1 receptora, ili BIIE0246, antagonista Y2 receptora, u spinalni ganglij poništilo je smanjenje von Frey praga uzmicanja koje je izazvala intraplantarna injekcija karagenana, ili injekcija karagenan i.p./NaCl i.g. (B). Aplikacija BIBO3304 potpuno je poništila veći broj hiperalgezijskih odgovora koji je izazvala injekcija karagenana (D). BIIE0246 smanjio je broj hiperalgezijskih odgovora, ali ne dovoljno da se dosegne statistička značajnost. Kontrolna skupina objedinjuje podatke kontrolne skupine kojoj je napravljen samo rez na leđima te podatke kontrolne skupine kojoj je injicirana fiziološka otopina u spinalni ganglij. Vrijednosti dobivene testiranjem lijeve, neozlijeđene šape nisu prikazane jer nije došlo do kontralateralnog učinka. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Svaki podatak prikazuje prosječni 50%-tni prag uzmicanja šape, izražen u gramima (C i D) ili prosječni broj odgovora (A i B) za desnu šapu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od početne vrijednosti ($P < 0,05$; $n = 5-7$ štakora po skupini).

Preosjetljivost na termalne podražaje uočena je samo u testovima s podražajima hladnoćom. Injiciranje karagenana u šapu ili u kombinaciji s intraganglijskim injiciranjem fiziološke otopine povećalo je broj uzmicanja šape kao odgovor na podražaje hladnoćom (Slika 12A, ANOVA, $P < 0,001$). Učinak karagenana prestaje 8 dana nakon injekcije (Slika 12A).

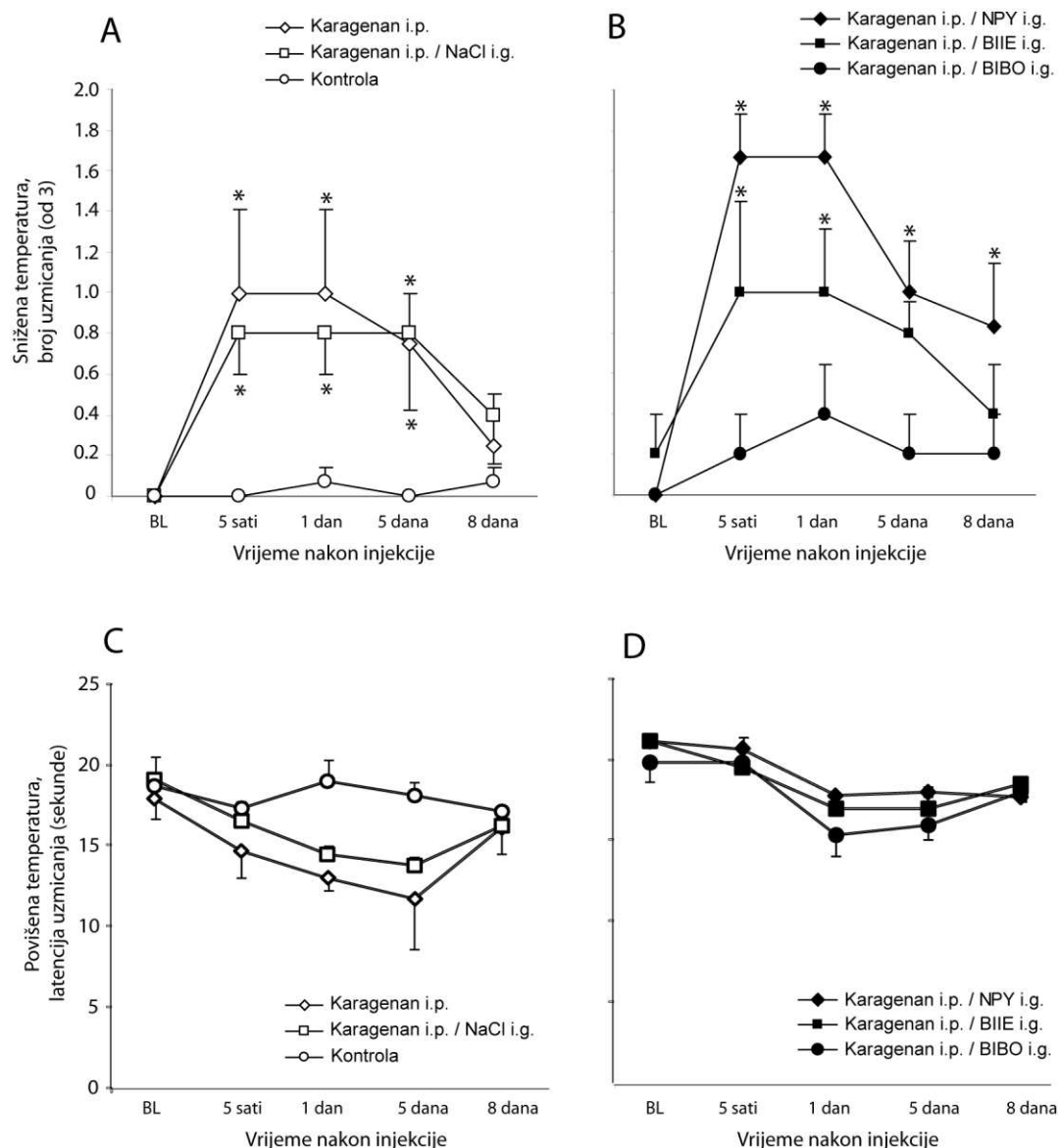
Injiciranjem NPY-a u spinalni ganglij značajno se povećao broj uzmicanja nakon podražaja hladnoćom, u odnosu na kontrolne skupine (Slika 12B, ANOVA, $P < 0,05$). Uočene su značajne razlike u reakciji na podražaj hladnoćom nakon injiciranja karagenan i.p./NPY i.g. (5 sati i 1 dan poslije injiciranja), u odnosu na karagenan i.p./NaCl i.g. skupinu (Slika 12A i 12B, ANOVA, $P < 0,01$).

Veći broj uzmicanja nakon podražaja hladnoćom očit je u skupinama injiciranih karagenanom (Slika 12A) ili u karagenan i.p./NPY i.g. skupini (Slika 12B). Broj uzmicanja smanjen je u skupini koja je bila izložena Y1 antagonistu, BIBO3304 (Slika 12B).

U testovima za termalnu alodiniju s povišenom temperaturom kao podražajem nije bilo promjene u latenciji uzmicanja šape nakon karagenan i.p./NaCl i.g. i karagenan

i.p./NPY i.g. injekcije, u odnosu na kontrolnu skupinu (Slike 12C i 12D). Također, injiciranje antagonista Y1 i Y2 receptora u spinalni ganglij nije utjecalo na prosječnu latenciju uzmicanja šape nakon podražaja povišenom temperaturom (Slike 12C i 12D).

Rotarod test nije pokazao nikakav poremećaj u motoričkoj koordinaciji ili ravnoteži životinja dva sata nakon injekcije testiranih supstanci (podaci nisu prikazani slikom).

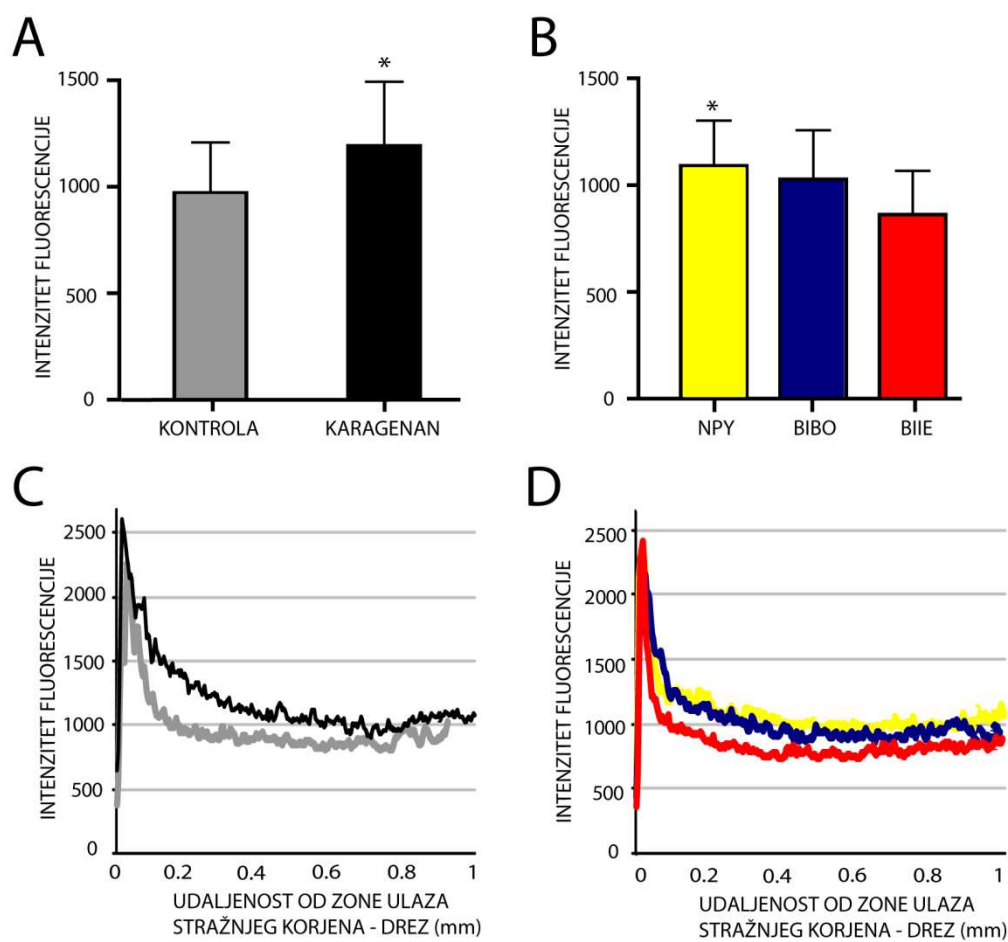


Slika 12. Intraplantarna (i.p.) injekcija karagenana s i bez i.g. injekcije fiziološke otopine izazvala je značajne promjene u (A) testovima termalne alodinije s hladnim podražajem ali nije izazvala promjene u osjetljivosti na podražaj

povišenom temperaturom (C). Izravni unos NPY u spinalni ganglij (i.g.) dodatno je pojačao osjetljivost na podražaj hladnoćom (B) ali nije promijenio vrijeme latencije uzmicanja nakon podražaja povišenom temperaturom (D). Injiciranje BIBO3304 u spinalni ganglij poništilo je povećani broj odgovora na podražaj hladnoćom koji je izazvala injekcija karagenana (B). Blokiranje Y2 receptora za NPY nije utjecalo na odgovore na podražaj hladnoćom (B). Prag uzmicanja nakon podražaja povišenom temperaturom nije se promijenio nakon blokiranja Y1 ili Y2 receptora (D). Kontrolna skupina objedinjuje podatke kontrolne skupine kojoj je napravljen samo rez na leđima i podatke kontrolne skupine kojoj je injicirana fiziološka otopina u spinalni ganglij. Vrijednosti dobivene testiranjem lijeve, neozlijeđene šape nisu prikazane jer nije došlo do kontralateralnog učinka. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Svaki podatak prikazuje prosječni broj odgovora (A i B) ili prosječnu latenciju uzmicanja u sekundama (C i D) za desnu šapu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od početne vrijednosti ($P < 0,05$; $n = 5-7$ štakora po grupi).

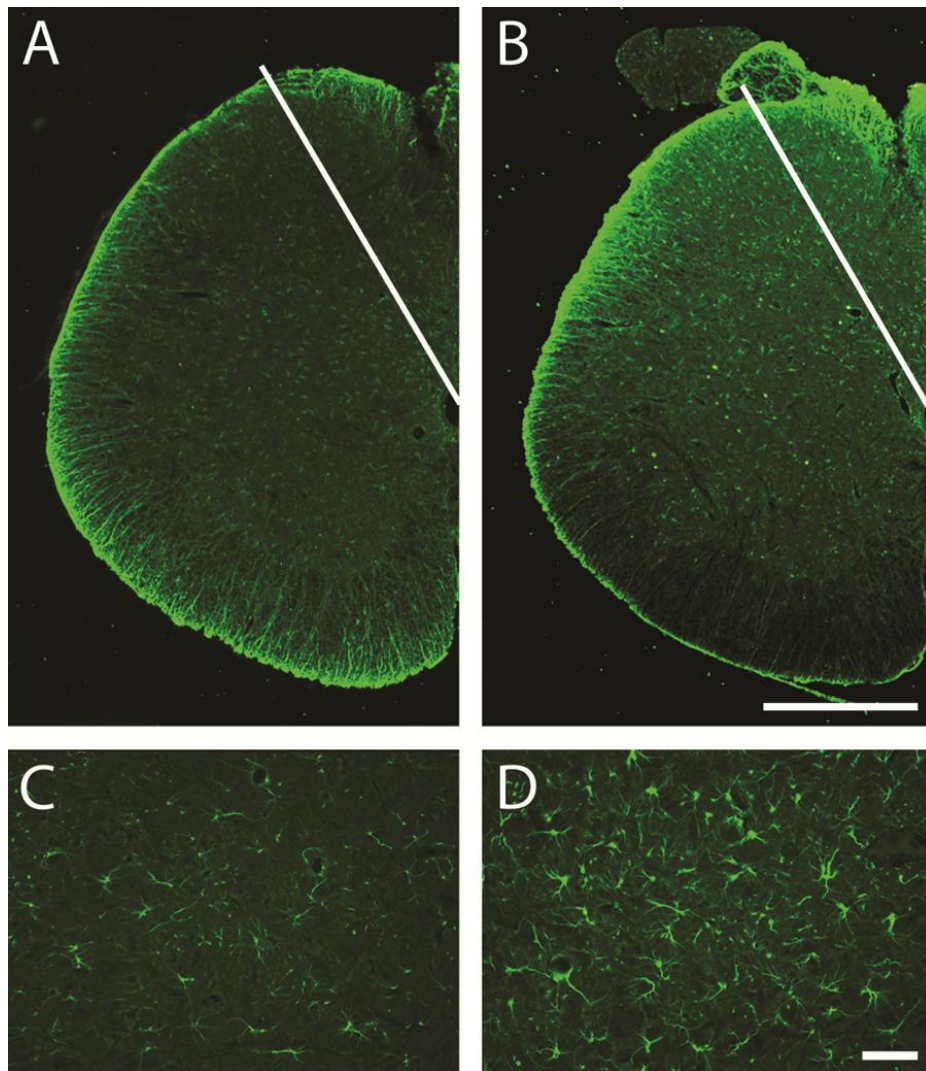
Značajan porast u ekspresiji GFAP-a zabilježen je na ipsilateralnoj strani dorzalnog roga 8 dana nakon intraplantarne injekcije karagenana, u usporedbi s kontrolnim štakorima (Slika 13A i 13C, t-test, $P < 0,001$). Slično povećanje uočeno je u karagenan i.p./NPY i.g. skupini (Slika 13B i 13D). Nije bilo razlike između karagenan i.p. i karagenan i.p./NPY i.g. skupine. Na kontralateralnoj strani nije došlo do promjene u ekspresiji GFAP-a .

U dorzalnom rogu nije bilo značajne razlike u razini fluorescencije između kontrole i karagenan i.p./BIBO3304 ili BIIE9246 i.g. skupina (Slika 13B).



Slika 13. Prosječni intenzitet fluorescencije GFAP-a u dorzalnim rogovima kontrolnih štakora i štakora s injiciranim karagenanom (A i C) te štakora kojima je injiciran NPY, BIBO3304 i BIIE0246 (B i D) pokazuje utjecaj i.g. injekcije NPY, BIBO3304 i BIIE0246 na aktivaciju astrocita u dorzalnom rogu. Kontrolna skupina objedinjuje podatke kontrolne skupine kojoj je napravljen rez na leđima te podatke kontrolne skupine kojoj je injicirana fiziološka otopina u spinalni ganglij. Kvantifikacija imunofluorescencije GFAP-a napravljena je niz liniju položenu od središnjeg kanala do zone ulaza dorzalnog korijena (DREZ). Najjači intenzitet fluorescencije uočen je u karagenan i.p./NPY i.g. te karagenan i.p. skupinama u lamini I, II i III (0,2 mm od DREZ-a), u odnosu na fluorescenciju ostatka dorzalnog roga. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od kontrole ($P < 0,05$). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM).

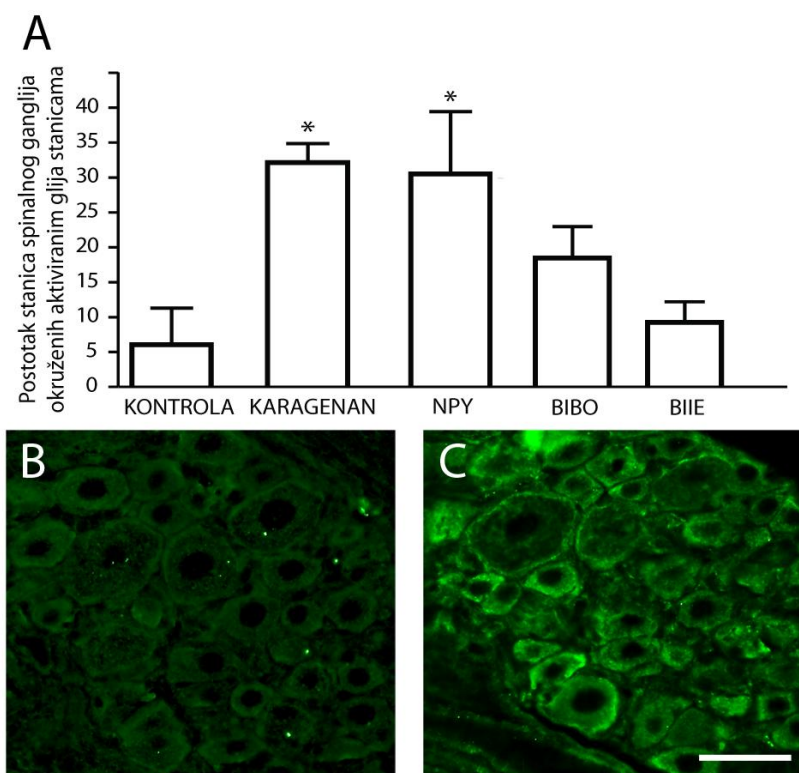
Najizraženija GFAP imunoreaktivnost u skupni s injiciranim NPY-om bila je u laminama I-III dorzalnog roga. Zvezdoliki astrociti nalazili su se oko živčanih stanica, kao i u perivaskularnim područjima unutar sive tvari (Slika 14).



Slika 14. Odgovor astrocita dorzalnog roga kontrolnih (A i C) te karagenan i.p./NPY i.g. skupina (B i D). Osam dana nakon injiciranja, imunoreaktivnost GFAP-a se povećala u ipsilateralnom dijelu dorzalnog roga karagenan i.p./NPY i.g. skupine životinja. Primjer linije koja se koristila pri kvantifikaciji imunofluorescencije GFAP-a prikazan je na slikama (A i B). Mjerilo za A i B je 0,5 mm, a za C i D je 50 μ m.

Injekcija karagenana izazvala je također aktivaciju satelitskih stanica u spinalnom gangliju (ANOVA, $P < 0,001$, Slika 15). U skupinama kojima je injiciran karagenan, aktivirane satelitske stanice bile su vidljive kao "prsten" oko neurona spinalnih ganglija. Povećana aktivacija satelitskih stanica bila je vidljiva u karagenan i.p. i karagenan i.p./NPY i.g. skupinama.

Injekcije BIBO03304 i BIIE0246 smanjile su aktivaciju satelitskih stanica u skupinama s injiciranim karagenanom (Slika 15A). Te injekcije značajno su smanjile postotak GFAP-pozitivnih prstenova u odnosu na skupinu s injiciranim karagenanom. Nisu uočene razlike između karagenan i.p. i karagenan i.p./NPY i.g. skupina, kao i između karagenan i.p./BIBO3304 ili BIIE9246 i.g. skupina.



Slika 15. Postotak neurona okruženih GFAP-pozitivnim satelitskim stanicama u spinalnim ganglijima kontrolnih i pokusnih skupina osam dana nakon injekcija. Postotak GFAP-pozitivnih prstenova bio je značajno veći u skupinama s i.p. karagenan injekcijom, s i bez i.g. NPY injekcije, nego u kontrolnoj skupini. Antagonisti BIBO3304 i BIIE0246 smanjili su

aktivaciju satelitskih stanica nastalu nakon injekcije karagenana. Primjeri imunoreaktivnosti GFAP-a u ipsilateralnom spinalnom gangliju kontrolnih (B) te karagenan i.p./NPY i.g. (C) skupina. Većina ganglijskih stanica u karagenan i.p./NPY i.g. skupini okruženi su aktiviranim satelitskim stanicama. Mjerilo: 50 μ m. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od kontrole ($P < 0,05$), # označava statistički značajnu razliku od karagenan i.p skupine ($P < 0,05$).

5. RASPRAVA

Iako je poznato da NPY sudjeluje u modulaciji boli, njegova funkcija još nije potpuno objašnjena. Cilj je stoga bio istražiti utjecaj izravnog unosa NPY-a i antagonista njegovih Y1 i Y2 receptora u spinalni ganglij na bolno ponašanje štakora koristeći dva eksperimentalna životinjska modela boli: model neuropatske boli izazvan podvezivanjem spinalnog živca (SNL) i model upalne boli uzrokovan injiciranjem karagenana u šapu štakora.

5.1. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu neuropatske boli

Blokiranje receptora za NPY u modelu neuropatske boli pokazalo je da NPY, kada se injicira izravno u akutno ozlijeđen spinalni ganglij, pojačava bolno ponašanje štakora i to u određenim osjetnim modalitetima. To pogoršanje u ponašanju povezanom s boli popraćeno je značajnom aktivacijom glija i satelitskih stanica na ipsilateralnoj strani dorzalnog roga i injiciranom spinalnom gangliju. Našim istraživanjem dokazano je da se obje posljedice aplikacije NPY-a mogu poništiti lokalnom primjenom antagonista za Y2 receptor, BIIE0246. Navedeni rezultati pridonose razjašnjavanju složene uloge koju NPY ima u neuropatskoj boli.

Iako su analgezijska svojstva NPY već dobro opisana, postoje brojne studije koje tvrde suprotno. U nizu studija pokazano je da farmakološka primjena NPY-a uzrokuje analgeziju u zdravih i ozlijeđenih štakora [59, 60, 136, 137, 163, 164]. Ovaj antinociceptivni učinak može se polučiti samo malim dozama NPY-a [139]. Također, dokazano je da miševi kojima nedostaje gen za NPY pokazuju znakove pretjerane autotomije, što ukazuje na analgezijski učinak NPY-a [140]. To djelovanje NPY najvjerojatnije ostvaruje putem Y1 receptora jer je u miševima kojima nedostaje Y1 receptor dokazana smanjena antinocicepcija [88]. Također, NPY i Y1 receptor imaju antinociceptivnu ulogu u n. accumbens u zdravih štakora [157], u periakvaduktalnoj sivoj tvari štakora u kojih je eksperimentalno izazvana upala [137] i u jezgrama hipotalamusa zdravih štakora i štakora s eksperimentalno izazvanom upalom [165].

Nasuprot tome, druge studije pokazale su da intratekalna aplikacija NPY-a pogoršava hiperalgezijsko ponašanje nakon ozljede živca pomoću aktivacije Y1

receptora smještenih na mijeliniziranim živčanim vlaknima [141] i da NPY apliciran subkutano u stražnju šapu životinje s kroničnom ozljedom živca pogoršava hiperalgezijske odgovore na nociceptivne podražaje [141, 142].

Različiti rezultati ponašanja nakon primjene NPY-a mogu biti ishod sudjelovanja različitih podtipova NPY receptora, primjene NPY-a na različita mjesta i korištenja različitih eksperimentalnih modela boli. Najvjerojatniji razlog zbog kojeg postoje takve razlike je to što se u svim navedenim istraživanjima NPY nije izravno i selektivno unosio u spinalni ganglij. Na taj način bi se izbjegao mogući utjecaj na središnji živčani sustav i ograničilo bi se djelovanje NPY-a na periferiju, izvan krvno-moždane barijere.

U ovom istraživanju injiciran je NPY istodobno s podvezivanjem spinalnog živca (SNL). Vrijeme aplikacije NPY-a je još jedan dodatni razlog koji može pridonijeti uočenim razlikama jer modulacija rane faze ozljede živca može biti od kritične važnosti u prevenciji razvoja neuropatskih patoloških stanja. Dokazano je da se razvoj mehaničke alodinije i hiperalgezije može modulirati samo ako je terapija započela u vrijeme ozljede živca, ali ne i ako se primjenjuje nakon ozljede [166]. Ovo djelomično objašnjava i produljeni utjecaj jedne doze NPY-a i njegovih antagonista. Trajanje djelovanja NPY nakon primjene samo jedne doze nije istraživano, ali prema prijašnjim studijama vrijeme njegovog djelovanja je oko 3 sata [60]. Stoga se učinak samo jedne doze u ovom istraživanju može objasniti dugotrajnim promjenama koje NPY inducira u ranoj fazi nastanka neuropatskih promjena. Također, produljeno djelovanje može biti rezultat smanjenog djelovanja peptidaza ili razgradnjom na manje fragmente koji mogu polučiti značajan fiziološki učinak.

Specifično djelovanje NPY-a može se povezati i s promjenama u njegovom izražaju koje nastaju nakon ozljede u spinalnim ganglijima. Izvor povećane koncentracije NPY-a nakon ozljede najvjerojatnije su srednji i veliki neuroni spinalnih ganglija koji nisu uključeni u nocicepciju i koji najvjerojatnije odgovaraju $A\beta$ mijeliniziranim primarnim eferentnim vlaknima [63, 64, 67, 68]. Promjene koje nastaju nakon ozljede uključuju i promjene u izražaju receptora za NPY, pomoću kojih NPY i ostvaruje svoj fiziološki učinak. Poznato je da NPY Y1 i Y2 receptori kontroliraju aktivnost neurona u spinalnim ganglijima, međutim rezultati našeg istraživanja pokazali su da je Y2 receptor odgovoran za promjene u ponašanju nakon injiciranja NPY-a. Mnoge studije pokazale su da osjetni neuroni izražavaju Y1 i Y2 podtipove receptora, koji su funkcionalno povezani, ali i da razina njihova izražaja ovisi o vrsti stanica [108-

111]. U neuronima spinalnog ganglija mRNA Y2 receptora prisutna je u CGRP-pozitivnim, velikim i srednjim neuronima, dok se Y1 receptor izražava u malim CGRP i IB4 pozitivnim neuronima [88, 109]. Periferna aksotomija pojačava izražaj Y2 receptora u malim i velikim neuronima spinalnih ganglija, dok se izražaj Y1 receptora povećava samo u velikim neuronima [109, 112, 113]. Značajna razlika između ta dva receptora je to što Y1 receptori ostaju u tijelu stanice u spinalnom gangliju, posebno nakon aksotomije, dok se Y2 receptori transportiraju centralno u dorzalni rog unutar krvno-moždane barijere [112, 114, 115]. Otvara se mogućnost da je egzogeni NPY koji je korišten u ovoj studiji djelovao na NPY receptore smještene na drugim stanicama, primjerice na stanicama imunološkog sustava smještenim izvan krvno-moždane barijere. Poznato je da NPY pojačava adheziju T limfocita *in vitro*, a dokazi pokazuju da je ovaj učinak posredovan Y2 receptorom [167]. Također, NPY može započeti cijelu kaskadu događaja važnih za lokalni urođeni imunološki odgovor. U nekim istraživanjima predloženo je da može proizvesti analgezijski učinak inhibicijom imunoreaktivne tvari P [60, 61].

NPY modulira različite imunološke funkcije, uključujući specifičnu sekreciju citokina [167-169], kemotaksiju [170] ili otpuštanje kisikovih radikala [171]. Također, ovisno o dozi, može povećati težinu lokalnog imunološkog odgovora *in vivo* [172]. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na to da bi neurogena upala mogla biti važan okidač za nastanak boli i da spriječavanje razvoja upalnog odgovora umanjuje ponašanje povezano s boli. Lokalna primjena NPY-a stvara značajnu neurogenu upalu koja može biti odgovorna za pojačano bolno ponašanje u odnosu na bolno ponašanje koje nastaje kao rezultat oštećenje živca. Pokazano je da injiciranje NPY-a pogoršava neurogenu upalu u spinalnom gangliju i u dorzalnom rogu. Kako spriječavanje razvoja upale umanjuje razvoj, ali ne i već postojeću preosjetljivost u štakorskom modelu neuropatije [166], odlučili smo injicirati NPY ili antagoniste NPY receptora neposredno nakon podvezivanja spinalnog živca. Pojačana aktivacija astrocita bila je najviše izražena u laminama I-III, koje sadrže gama-amino-maslačnu kiselinu (GABA), inhibicijski neurotransmiter [173]. Kako Y2 antagonist BIIE0246 značajno smanjuje neurogenu upalu, to ukazuje na zanimljivu mogućnost da je to možda mehanizam koji je u pozadini smanjenja bolnog ponašanja uočenim u upotrijebljenim testovima ponašanja.

5.2. Blokiranje NPY Y1 i Y2 receptora u modelu upalne boli

U našem istraživanju, u testovima s podražajem hladnoćom, NPY pogoršao je proalgezijski učinak koji je inducirao karagenan. Drugi testovi ponašanja nisu pokazali da je injiciranje NPY-a, uz intraplantarnu injekciju karagenana, pogoršalo učinak koji je sam karagenan imao na ponašanje štakora [174]. Druga istraživanja pokazala su, kako proalgezijsko, tako i analgezijsko djelovanje NPY-a [175-177]. U neuronima spinalnih ganglija NPY je prisutan u vrlo niskoj koncentraciji ili ga se uopće ne može detektirati [63, 178]. Nakon različitih vrsta ozljeda perifernog živca, događa se dramatično povećanje koncentracije NPY-a, uglavnom u velikim i srednjim neuronima spinalnih ganglija koji nisu uključeni u nocicepciju [63, 64]. Izvor endogenog NPY-a su, osim ozlijeđenih neurona spinalnog ganglija, i stanična tijela interneurona u laminama I-III [179, 180]. NPY koji otpuštaju neuroni dorzalnog roga inhibira otpuštanje CGRP-a [181] i inducira gubitak inhibicije u upalnoj i neuropatskoj boli [182].

NPY djeluje putem receptora koji pripadaju jednoj od najraznovrsnijih porodica unutar superporodice receptora vezanih za G-protein [77]. Djeluje na mobilizaciju iona Ca^{2+} te na inhibiciju adenilat ciklaze. NPY inducira povećanje ($[Ca^{2+}]_i$) nakon stimulacije Y1 receptora [130, 133]. U drugim putovima, NPY stimulira sintezu $InsP_3$ i DAG-a u neuronima spinalnih ganglija, što dovodi do povećane koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ kroz PTX-osjetljive G-proteine [116, 123]. Stoga, različiti putovi potaknuti aktivacijom NPY receptora mogu imati suprotne učinke na signalizaciju Ca^{2+} u osjetnim neuronima. Utjecaj određenog puta ovisi o vrsti stanice i o modelu ozljede. Također, NPY i antagonisti njegovih receptora mogu utjecati na sinaptički prijenos na način da receptori Y1 selektivno suprimiraju prijenos inhibicijskih podražaja pre- i postsinaptičkih mehanizama, dok Y2 receptori suprimiraju ekscitirajući prijenos presinaptičkih mehanizama [183].

Te tvrdnje su u suprotnosti s istraživanjem Lia i sur. [184], u kojem Y2 receptor nije nađen ni u peptidergičkim ni nepeptidergičkim nociceptorima. Dokazano je da Y1 receptor knockout miševi ne pokazuju znakove neurogene upale, što pokazuje da bi upravo Y1 receptor mogao imati ključnu ulogu u upalnim stanjima [88]. Jak izražaj mRNA i proteina Y1R u neuronima lamine II dokazuje prisutnost Y1 receptora u području kralježnične moždine povezane s nocicepcijskim prijenosom [111]. Temeljem

tih studija čini se da bi Y1 receptor mogao biti receptor putem kojeg NPY utječe na bolno ponašanje [176, 185].

Također je pokazano da je antinocicepcijski učinak intratekalno primijenjenog NPY-a rezultat aktivacije Y2 receptora [138, 186]. Stoga je i u ovom slučaju moguće da su analgezijski i proalgezijski učinci NPY-a rezultat metodoloških razlika, primjerice aplikacije NPY-a na različita mjesta i/ili korištenja različitih modela boli. U ovom dijelu istraživanja korišten je ciljani unos NPY-a i antagonista njegovih receptora u spinalni ganglij kako bi se istražio njihov utjecaj na bolno ponašanje štakora izazvano injekcijom karagenana u stražnju šapu. Dokazano je da blokiranje Y1 i Y2 receptora ne mijenja prag odgovora dobiven u kontrolnoj skupini životinja pomoću von Frey testova, dok u testu uboda iglom i testu termalne alodinije potaknute hladnim podražajem blokiranje Y1 receptora dovodi do smanjenog broja hiperalgezijskih odgovora.

U većini prijašnjih studija Y1 receptor povezan je s pojačanom osjetljivošću na termalni podražaj. U našem istraživanju veći učinak dobiven je u testovima s mehaničkim podražajima, što ukazuje da je Y2 receptor važniji u modulaciji mehaničke osjetljivosti [174]. Injiciranje karagenana uzrokovalo je promjene u ponašanju koje su već prije opisane [187], osim promjene u testovima s povišenom temperaturom kao podražajem. U našem istraživanju karagenan je smanjio latenciju uzmicanja šape nakon podražaja povišenom temperaturom ali ne dovoljno da dosegne statistički značajnu razliku. Jedan od mogućih razloga za izostanak ovog učinka je korištenje niže temperature na kojoj se prekida izlaganje povišenoj temperaturi (engl. cut-off temperature) od temperatura upotrijebljenih u drugim studijama [188]. Kako utjecaj NPY-a ovisi o dozi, dodatni razlog može biti i korištenje niže doze karagenana [189].

Analiziran je i utjecaj samog NPY-a na bolno ponašanje, injiciranjem 0,1 nM NPY-a u spinalni ganglij neozlijeđenih štakora. Ta injekcija dovela je do statistički značajnog porasta u broju hiperalgezijskih odgovora, ali ne i do odgovora u testovima termalne alodinije [161]. Također je dokazan pronociceptivni utjecaj NPY-a u ozlijeđenim neuronima u modelu podvezivanja spinalnog živca (SNL) [161].

Uzimajući u obzir podatke iz ta dva pokusa s različitim modelima boli, može se zaključiti da korištenje različitih modela i apliciranje NPY izravno u spinalni ganglij uzrokuje različite rezultate u testovima ponašanja. Izražaj GFAP-a induciran upalom u spinalnom gangliju i u dorzalnom rogu kraljeznične moždine možda i doprinosi održavanju, ali ne i u inicijaciji boli inducirane ozljedom. Moguće je da se blokiranjem

pojačanog izražaja GFAP-a nakon ozljede može skratiti vrijeme trajanja kroničnih bolnih stanja [35]. U našem istraživanju NPY nije dodatno pogoršao aktivaciju satelitskih stanica u spinalnom gangliju, a ni astrocita u dorzalnom rogu u štakora s intraplantarno injiciranim karagenanom. Međutim, antagonisti Y1 i Y2 receptora, aplicirani izravno u spinalni ganglij, poništili su proalgezijski učinak karagenana u određenim testovima ponašanja i smanjili gliozu u dorzalnom rogu i spinalnom gangliju [174]. Povećanje u debljini i intenzitetu fluorescencije prstenova satelitskih stanica oko neurona spinalnog ganglija smatra se mjerom aktivacije satelitskih stanica i objašnjava se kao rezultat fenotipskih promjena u satelitskoj stanici [31, 162]. Istraživačka skupina Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu pokazala je ranije da ne postoji statistički značajna promjena u ekspresiji GFAP-a u neozlijeđenim štakorima kojima je injiciran NPY i fiziološka otopina [161].

U našem istraživanju, najznačajnija je imunoreaktivnost GFAP-a u skupini s injiciranim karagenan i.p. / NPY i.g. u laminama I-III u dorzalnom rogu. Navedeni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjem koje ukazuje na vezu između bolnog ponašanja i neuroimune aktivacije putem NPY-a i njegovih Y1 i Y2 receptora [161]. Iako kritične promjene koje dovode do kronične boli nastaju u spinalnom gangliju, još nisu osmišljene terapije koje izravno ciljaju spinalni ganglij. U prethodnim studijama pokazano je da apliciranje NPY-a i antagonista njegovih receptora izravno u ganglij dovodi do potpuno različitih rezultata, kada se uspoređuje s drugim mjestima apliciranja [161]. Također, već prije je pokazano da ciljani unos lijekova izravnim injiciranjem u spinalni ganglij sam po sebi ne uzrokuje bolno ponašanje u štakora [148]. Stoga, ciljana primjena lijekova u spinalni ganglij pruža izvrsne mogućnosti liječenje lokaliziranih bolnih stanja.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja pokazuju da egzogeni NPY ima proalgezijski učinak kad se injicira akutno u ozlijeđeni spinalni ganglij, te se taj učinak može poništiti primjenom antagonista Y2 receptora za NPY.

Selektivnost inhibicije Y2 receptora u specifičnoj populaciji stanica spinalnog ganglija otvara mogućnost za stvaranje selektivnijih terapija za bol, s manje nuspojava.

Antagonisti NPY predstavljaju novi i obećavajući način za liječenje boli. S kliničkog aspekta, otvaraju mogućnost za potencijalno liječenje izravnim i selektivnim unosom lijekova u spinalni ganglij, kako bi se smanjile nuspojave i izbjegao utjecaj na ostale neuronske populacije.

7. SAŽETAK

Uloga neuropeptida Y (NPY) u modulaciji boli nije potpuno objašnjena. Cilj je bio istražiti utjecaj izravnog unosa NPY-a i antagonista njegovih Y1 i Y2 receptora u spinalni ganglij na bolno ponašanje štakora koristeći dva eksperimentalna životinjska modela boli; model neuropatske boli izazvan podvezivanjem spinalnog živca (SNL) i model upalne boli uzrokovan injiciranjem karagenana u šapu štakora.

Odmah nakon injekcije karagenana ili nakon SNL-a, NPY ili njegovi antagonisti injicirani su izravno u spinalni ganglij. Testiranje ponašanja provedeno je dan prije injiciranja karagenana ili SNL-a, i četiri puta nakon injekcije tj. tri puta nakon SNL-a. Imunohistokemijska analiza pomoću biljega aktivacije satelitskih stanica u spinalnom gangliju i astrocita u kralježničnoj moždini (glijalni fibrilarni kiseli protein – GFAP) provedena je osam dana nakon operacije u upalnom modelu i 16 dana nakon operacije u SNL modelu.

U modelu neuropatske boli, ustanovljeno je da injiciranje NPY-a pogoršava bolno ponašanje potaknuto SNL-om. Nakon injiciranja Y1 i Y2 antagonista u spinalni ganglij utvrđeno je da antagonist Y2 receptora poništava djelovanje NPY-a. Pogoršanje bolnog ponašanja nakon NPY injekcije bilo je popraćeno aktivacijom astrocita i satelitskim stanicama ipsilateralno od ozljede. Ova aktivacija smanjena je nakon primjene antagonista Y2 receptora.

U modelu upalne boli NPY je pogoršao proalgezijski učinak koji je inducirao karagenan samo u testovima s podražajem hladnoćom. NPY u tom modelu nije dodatno pogoršao aktivaciju satelitskih stanica i astrocita uzrokovanu intraplantarnom injekcijom karagenana. Injiciranje antagonista Y1 i Y2 receptora izravno u spinalni ganglij poništilo je proalgezijski učinak injekcije karagenana i smanjilo gliozu u spinalnom gangliju i kralježničnoj moždini.

Zaključno, ovi rezultati ukazuju na važnu vezu između bolnog ponašanja i neuroimunološkog djelovanja NPY Y1 i Y2 receptora.

8. SUMMARY

It is well known that neuropeptide Y (NPY) participates in the modulation of chronic pain, but its exact role has not yet been fully explained. We explored whether targeted delivery of NPY and its antagonists into dorsal root ganglion (DRG) modulates pain-related behavior in rats with experimentally induced inflammatory and neuropathic pain.

Inflammatory nociception was induced by intraplantar carrageenan injection. Neuropathic pain was induced by spinal nerve ligation (SNL). Immediately after carrageenan injection, or after SNL in neuropathic pain model, NPY or its antagonists were injected directly into DRG. Behavioral testing was performed on the day preceding the carrageenan injection or SNL, and four times following the injection or 3 times after SNL, respectively. Immunohistochemical analysis with glial fibrillary acidic protein (GFAP) was performed 8 days following the surgery in inflammation model and 16 day after surgery in SNL model.

In neuropathic pain model, NPY application exacerbated pain-related behavior induced by SNL in a modality-specific fashion. When saline was injected after SNL, the expected increase in hyperalgesia responses to needle stimulation was present on the 8th postoperative day. When NPY was injected, hyperalgesic responses increased in a manner similar to the SNL/saline group. To characterize NPY action, specific Y1 and Y2 antagonists were also delivered directly to DRG, which revealed that behavioral actions of NPY were abolished by Y2 receptor antagonist. Exacerbation of pain-related behavior following NPY injection was accompanied by astrocyte activation in ipsilateral dorsal horn and with satellite cells activation in the DRG proximal to injury. This activation was reduced following Y2 receptor antagonist application.

In the model of inflammatory pain, NPY applied directly to DRG induced cold allodynia in carrageenan inflammatory pain model. NPY in carrageenan-injected rats did not additionally exacerbate activation of satellite cells in DRG and astrocytes in dorsal horn caused by intraplantar carrageenan injection. However, application of NPY Y1 and Y2 antagonists directly into DRG reversed carrageenan proalgesic effects and reduced gliosis in DRG and dorsal horn.

In conclusion, these findings indicate an important link between pain-related behavior and neuroimmune actions of NPY Y1 and Y2 receptors.

9. LITERATURA

1. Merskey, H. i Bogduk, N. *Classification of chronic pain*, in *Part III: pain terms, a current list with definitions and notes on usage*. IASP task force on taxonomy, H. Merskey and N. Bogduk, Editors. 1994, IASP Press: Seattle. 209–214.
2. Sapunar, D., Puljak, L. *Neurobiologija boli*, in *Bol-uzroci i liječenje*, M. Jukić, Majerić Kogler V., Fingler M., Editor. 2011, Medicinska naklada: Zagreb. 6.
3. Bouhassira, D. i Attal, N. *Diagnosis and assessment of neuropathic pain: the saga of clinical tools*. *Pain*. 152(3 Suppl): S74-83.
4. Zimmermann, M. *Pathobiology of neuropathic pain*. *Eur J Pharmacol*, 2001. 429(1-3): 23-37.
5. Woolf, C.J. *What is this thing called pain?* *J Clin Invest*. 120(11): 3742-4.
6. Levine, J., Taiwo, Y. *Inflammatory pain*, in *Textbook of pain*, P.D. Wall, Melzack, R., Editor. 1994, Churchill Livingstone: Edinburgh. 45-46.
7. Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G. i Julius, D. *Cellular and molecular mechanisms of pain*. *Cell*, 2009. 139(2): 267-84.
8. Klusakova, I. i Dubovy, P. *Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective*. *Ann Anat*, 2009. 191(3): 248-59.
9. Asato, F., Butler, M., Blomberg, H. i Gordh, T. *Variation in rat sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain*. *J Peripher Nerv Syst*, 2000. 5(1): 19-21.
10. Takahashi, Y. i Nakajima, Y. *Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves*. *Pain*, 1996. 67(1): 197-202.
11. Swett, J.E., Torigoe, Y., Elie, V.R., Bourassa, C.M. i Miller, P.G. *Sensory neurons of the rat sciatic nerve*. *Exp Neurol*, 1991. 114(1): 82-103.
12. Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z. i Tomkiewicz, M.M. *Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa*. *Pain*, 1979. 7(2): 103-11.
13. Bennett, G.J. i Xie, Y.K. *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*. *Pain*, 1988. 33(1): 87-107.

14. Seltzer, Z., Dubner, R. i Shir, Y. *A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury.* Pain, 1990. 43(2): 205-18.
15. Decosterd, I. i Woolf, C.J. *Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain.* Pain, 2000. 87(2): 149-58.
16. Kim, S.H. i Chung, J.M. *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.* Pain, 1992. 50(3): 355-63.
17. Tabo, E., Jinks, S.L., Eisele, J.H., Jr. i Carstens, E. *Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats.* Pain, 1999. 80(3): 503-20.
18. Lombard, M.C., Nashold, B.S., Jr., Albe-Fessard, D., Salman, N. i Sakr, C. *Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain.* Pain, 1979. 6(2): 163-74.
19. Li, L., Xian, C.J., Zhong, J.H. i Zhou, X.F. *Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons.[erratum appears in Exp Neurol 2002 Aug;176(2):407].* Experimental Neurology, 2002. 175(1): 23-34.
20. Iadarola, M.J., Berman, K.F., Zeffiro, T.A., Byas-Smith, M.G., Gracely, R.H., Max, M.B. i Bennett, G.J. *Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET.* Brain, 1998. 121 (Pt 5): 931-47.
21. Sapunar, D., Kostic, S., Banozic, A. i Puljak, L. *Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain.* J Pain Res, 2012. 5: 31-8.
22. Hogan, Q., Sapunar, D., Modric-Jednacak, K. i McCallum, J.B. *Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury.* Anesthesiology, 2004. 101(2): 476-87.
23. Pfirrmann, C.W., Oberholzer, P.A., Zanetti, M., Boos, N., Trudell, D.J., Resnick, D. i Hodler, J. *Selective nerve root blocks for the treatment of sciatica: evaluation of injection site and effectiveness--a study with patients and cadavers.* Radiology, 2001. 221(3): 704-11.
24. Sapunar, D., Ljubkovic, M., Lirk, P., McCallum, J.B. i Hogan, Q.H. *Distinct Membrane Effects of Spinal Nerve Ligation on Injured and Adjacent Dorsal Root Ganglion Neurons in Rats.* Anesthesiology, 2005. 103(2): 360-76.

25. Xie, W.R., Deng, H., Li, H., Bowen, T.L., Strong, J.A. i Zhang, J.M. *Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia.* Neuroscience, 2006. 142(3): 809-22.
26. Whitworth, L.A. i Feler, C.A. *Application of spinal ablative techniques for the treatment of benign chronic painful conditions: history, methods, and outcomes.* Spine, 2002. 27(22): 2607-12.
27. Abram, S.E., Yi, J., Fuchs, A. i Hogan, Q.H. *Permeability of injured and intact peripheral nerves and dorsal root ganglia.* Anesthesiology, 2006. 105(1): 146-53.
28. Jimenez-Andrade, J.M., Herrera, M.B., Ghilardi, J.R., Vardanyan, M., Melemedjian, O.K. i Mantyh, P.W. *Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies.* Mol Pain, 2008. 4: 10.
29. Hu, S.J. i Xing, J.L. *An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat.* Pain, 1998. 77(1): 15-23.
30. DeLeo, J.A. i Winkelstein, B.A. *Physiology of chronic spinal pain syndromes: from animal models to biomechanics.* Spine, 2002. 27(22): 2526-37.
31. Znaor, L., Lovric, S., Hogan, Q. i Sapunar, D. *Association of neural inflammation with hyperalgesia following spinal nerve ligation.* Croat Med J, 2007. 48(1): 35-42.
32. LaCroix-Fralish, M.L., Austin, J.S., Zheng, F.Y., Levitin, D.J. i Mogil, J.S. *Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain.* Pain. 152(8): 1888-98.
33. Scholz, J. i Woolf, C.J. *The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia.* Nat Neurosci, 2007. 10(11): 1361-8.
34. Hanani, M. *Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function.* Brain Res Brain Res Rev, 2005. 48(3): 457-76.
35. Kim, D.S., Figueroa, K.W., Li, K.W., Boroujerdi, A., Yolo, T. i Luo, Z.D. *Profiling of dynamically changed gene expression in dorsal root ganglia post peripheral nerve injury and a critical role of injury-induced glial fibrillary acidic protein in maintenance of pain behaviors [corrected].* Pain, 2009. 143(1-2): 114-22.

36. Zhou, X.F., Deng, Y.S., Xian, C.J. i Zhong, J.H. *Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats*. European Journal of Neuroscience, 2000. 12(1): 100-5.
37. Ramer, M.S., Thompson, S.W. i McMahon, S.B. *Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia*. Pain, 1999. Suppl 6: S111-20.
38. Li, J.Y., Xie, W., Strong, J.A., Guo, Q.L. i Zhang, J.M. *Mechanical hypersensitivity, sympathetic sprouting, and glial activation are attenuated by local injection of corticosteroid near the lumbar ganglion in a rat model of neuropathic pain*. Reg Anesth Pain Med, 2011. 36(1): 56-62.
39. Basbaum, A.I., Jessel, T. *The perception of pain*, in *Principles of Neuroscience*, E.R. Kendel, Schwartz, J., Jessel, T., Urednici. 2000, Appleton and Lange: New York. 472-91.
40. Meyer, R.A., Ringkamp, M., Campbell, J.N., Raja, S.N. *Peripheral mechanisms of cutaneous nociception*, u *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, S.B. McMahon, Koltzenburg, M., Urednici. 2008, Elsevier: Philadelphia. 3-34.
41. Light, A.R., Trevino, D.L. i Perl, E.R. *Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn*. J Comp Neurol, 1979. 186(2): 151-71.
42. Djouhri, L. i Lawson, S.N. *Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. 46(2): 131-45.
43. Neumann, S., Doubell, T.P., Leslie, T. i Woolf, C.J. *Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons*. Nature, 1996. 384(6607): 360-4.
44. Byers, M.R. i Bonica, J.J. *Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity*, u *Bonica's Management of Pain*, S.M. Fishmann, Ballantyne, J.C., Rathmell, J.P., Editor. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore. 46-47.
45. Perl, E.R. *Ideas about pain, a historical view*. Nat Rev Neurosci, 2007. 8(1): 71-80.
46. Schmidt, R., Schmelz, M., Forster, C., Ringkamp, M., Torebjork, E. i Handwerker, H. *Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin*. J Neurosci, 1995. 15(1 Pt 1): 333-41.

47. Olausson, H., Cole, J., Rylander, K., McGlone, F., Lamarre, Y., Wallin, B.G., Kramer, H., Wessberg, J., Elam, M., Bushnell, M.C. i Vallbo, A. *Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: sympathetic response and perceptual localization*. Exp Brain Res, 2008. 184(1): 135-40.
48. Snider, W.D. i McMahon, S.B. *Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. [Review] [15 refs]*. Neuron, 1998. 20(4): 629-32.
49. Dong, X., Han, S., Zylka, M.J., Simon, M.I. i Anderson, D.J. *A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons*. Cell, 2001. 106(5): 619-32.
50. Katzung, B.G., White, P.F. *Lokalni anestetici*, in *Temeljna i klinička farmakologija*, B.G. Katzung, Masters, S.B., Trevor, A.J., Editor. 2011, Medicinska naklada: Zagreb. 439-450.
51. Melzack, R. *Recent concepts of pain*. J Med, 1982. 13(3): 147-60.
52. Todd, A.J., Koerber, H.R. *Neuroanatomical substrates of spinal nociception*, in *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, S.B. McMahon, Koltzenburg, M., Urednici. 2006, Elsevier Churchill Livingstone: London, UK. 73-90.
53. Tan, A.M. i Waxman, S.G. *Spinal cord injury, dendritic spine remodeling, and spinal memory mechanisms*. Exp Neurol, 2012. 235(1): 142-51.
54. Campbell, J.N., Raja, S.N., Meyer, R.A. i Mackinnon, S.E. *Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury*. Pain, 1988. 32(1): 89-94.
55. Woolf, C.J. *Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity*. Nature, 1983. 306(5944): 686-8.
56. Devor, M. *Neuropathic pain: what do we do with all these theories?* Acta Anaesthesiol Scand, 2001. 45(9): 1121-7.
57. Gray, T.S. i Morley, J.E. *Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system*. Life Sci, 1986. 38(5): 389-401.
58. Cerda-Reverter, J.M. i Larhammar, D. *Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution*. Biochem Cell Biol, 2000. 78(3): 371-92.
59. Colmers, W.F. i Bleakman, D. *Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons*. Trends Neurosci, 1994. 17(9): 373-9.

60. Hua, X.Y., Boublik, J.H., Spicer, M.A., Rivier, J.E., Brown, M.R. i Yaksh, T.L. *The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structure-activity relationship.* J Pharmacol Exp Ther, 1991. 258(1): 243-8.
61. Duggan, A.W., Hope, P.J. i Lang, C.W. *Microinjection of neuropeptide Y into the superficial dorsal horn reduces stimulus-evoked release of immunoreactive substance P in the anaesthetized cat.* Neuroscience, 1991. 44(3): 733-40.
62. Munglani, R., Hudspith, M.J. i Hunt, S.P. *The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, anxiolytic and antihypertensive.* Drugs, 1996. 52(3): 371-89.
63. Wakisaka, S., Kajander, K.C. i Bennett, G.J. *Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy.* Neurosci Lett, 1991. 124(2): 200-3.
64. Zhang, X., Meister, B., Elde, R., Verge, V.M. i Hokfelt, T. *Large calibre primary afferent neurons projecting to the gracile nucleus express neuropeptide Y after sciatic nerve lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study in rats.* Eur J Neurosci, 1993. 5(11): 1510-9.
65. Fried, G., Terenius, L., Brodin, E., Efendic, S., Dockray, G., Fahrenkrug, J., Goldstein, M. i Hokfelt, T. *Neuropeptide Y, enkephalin and noradrenaline coexist in sympathetic neurons innervating the bovine spleen. Biochemical and immunohistochemical evidence.* Cell Tissue Res, 1986. 243(3): 495-508.
66. Jessell, T., Tsunoo, A., Kanazawa, I. i Otsuka, M. *Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons.* Brain Research, 1979. 168(2): 247-59.
67. Frisen, J., Risling, M., Theodorsson, E. i Fried, K. *NPY-like immunoreactivity in sensory nerve fibers in rat sciatic neuroma.* Brain Res, 1992. 577(1): 142-6.
68. Nahin, R.L., Ren, K., De Leon, M. i Ruda, M. *Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain.* Pain, 1994. 58(1): 95-108.
69. Ma, W. i Bisby, M.A. *Partial and complete sciatic nerve injuries induce similar increases of neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide immunoreactivities in primary sensory neurons and their central projections.* Neuroscience, 1998. 86(4): 1217-34.

70. Marchand, J.E., Cepeda, M.S., Carr, D.B., Wurm, W.H. i Kream, R.M. *Alterations in neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase, and Y-receptor subtype distribution following spinal nerve injury to rats.* Pain, 1999. 79(2-3): 187-200.
71. Shi, T.J., Tandrup, T., Bergman, E., Xu, Z.Q., Ulfhake, B. i Hokfelt, T. *Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression.* Neuroscience, 2001. 105(1): 249-63.
72. Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T. i Noguchi, K. *Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model.* Pain, 1998. 78(1): 13-26.
73. Wakisaka, S., Kajander, K.C. i Bennett, G.J. *Effects of peripheral nerve injuries and tissue inflammation on the levels of neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat primary afferent neurons.* Brain Res, 1992. 598(1-2): 349-52.
74. Hokfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, r., Nilsson, G. i Arimura, A. *Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat.* Neuroscience, 1976. 1(2): 131-6.
75. Rittenhouse, P.A., Marchand, J.E., Chen, J., Kream, R.M. i Leeman, S.E. *Streptozotocin-induced diabetes is associated with altered expression of peptide-encoding mRNAs in rat sensory neurons.* Peptides, 1996. 17(6): 1017-22.
76. Fried, K. i Frisen, J. *End structure and neuropeptide immunoreactivity of axons in sciatic neuromas following nerve section in neonatal rats.* Exp Neurol, 1990. 109(3): 286-93.
77. Blomqvist, A.G. i Herzog, H. *Y-receptor subtypes--how many more?* Trends Neurosci, 1997. 20(7): 294-8.
78. Michel, M.C., Beck-Sickinger, A., Cox, H., Doods, H.N., Herzog, H., Larhammar, D., Quirion, R., Schwartz, T. i Westfall, T. XVI. *International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors.* Pharmacol Rev, 1998. 50(1): 143-50.
79. Larhammar, D., Wraith, A., Berglund, M.M., Holmberg, S.K. i Lundell, I. *Origins of the many NPY-family receptors in mammals.* Peptides, 2001. 22(3): 295-307.

80. Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., Stidsen, C.E., Madsen, K., Smith, M.S. i Cameron, J.L. *Activation of central neuropeptide Y Y1 receptors potently stimulates food intake in male rhesus monkeys.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(10): 3781-91.
81. Kask, A., Rago, L. i Harro, J. *Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y1-selective antagonist BIBP3226.* Br J Pharmacol, 1998. 124(7): 1507-15.
82. Wieland, H.A., Engel, W., Eberlein, W., Rudolf, K. i Doods, H.N. *Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents.* Br J Pharmacol, 1998. 125(3): 549-55.
83. Kanatani, A., Ito, J., Ishihara, A., Iwaasa, H., Fukuroda, T., Fukami, T., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H. i Ihara, M. *NPY-induced feeding involves the action of a Y1-like receptor in rodents.* Regul Pept, 1998. 75-76: 409-15.
84. Morton, K.D., McCloskey, M.J. i Potter, E.K. *Cardiorespiratory responses to intracerebroventricular injection of neuropeptide Y in anaesthetised dogs.* Regul Pept, 1999. 81(1-3): 81-8.
85. Nakajima, M., Inui, A., Asakawa, A., Momose, K., Ueno, N., Teranishi, A., Baba, S. i Kasuga, M. *Neuropeptide Y produces anxiety via Y2-type receptors.* Peptides, 1998. 19(2): 359-63.
86. Sajdyk, T.J., Vandergriff, M.G. i Gehlert, D.R. *Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test.* Eur J Pharmacol, 1999. 368(2-3): 143-7.
87. Kask, A., Nguyen, H.P., Pabst, R. i Von Horsten, S. *Neuropeptide Y Y1 receptor-mediated anxiolysis in the dorsocaudal lateral septum: functional antagonism of corticotropin-releasing hormone-induced anxiety.* Neuroscience, 2001. 104(3): 799-806.
88. Naveilhan, P., Hassani, H., Lucas, G., Blakeman, K.H., Hao, J.X., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Thoren, P. i Ernfors, P. *Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor.* Nature, 2001. 409(6819): 513-7.
89. Wahlestedt, C., Yanaihara, N. i Hakanson, R. *Evidence for different pre-and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides.* Regul Pept, 1986. 13(3-4): 307-18.

90. King, P.J., Williams, G., Doods, H. i Widdowson, P.S. *Effect of a selective neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist, BIIE0246 on neuropeptide Y release.* Eur J Pharmacol, 2000. 396(1): R1-3.
91. Smith-White, M.A., Hardy, T.A., Brock, J.A. i Potter, E.K. *Effects of a selective neuropeptide Y Y2 receptor antagonist, BIIE0246, on Y2 receptors at peripheral neuroeffector junctions.* Br J Pharmacol, 2001. 132(4): 861-8.
92. Sajdyk, T.J., Schober, D.A., Smiley, D.L. i Gehlert, D.R. *Neuropeptide Y-Y2 receptors mediate anxiety in the amygdala.* Pharmacol Biochem Behav, 2002. 71(3): 419-23.
93. Smith-White, M.A., Herzog, H. i Potter, E.K. *Role of neuropeptide Y Y(2) receptors in modulation of cardiac parasympathetic neurotransmission.* Regul Pept, 2002. 103(2-3): 105-11.
94. Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska-Prokopczuk, E., Rose, W., Rone, J., Movafagh, S., Ji, H., Yeh, Y., Chen, W.T., Kleinman, H.K., Grouzmann, E. i Grant, D.S. *Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium.* Circ Res, 1998. 83(2): 187-95.
95. Ekstrand, A.J., Cao, R., Bjorndahl, M., Nystrom, S., Jonsson-Rylander, A.C., Hassani, H., Hallberg, B., Nordlander, M. i Cao, Y. *Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(10): 6033-8.
96. Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D. i Bloom, S.R. *Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake.* Nature, 2002. 418(6898): 650-4.
97. Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatei, M.A. i Bloom, S.R. *Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36.* N Engl J Med, 2003. 349(10): 941-8.
98. Halatchev, I.G., Ellacott, K.L., Fan, W. i Cone, R.D. *Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism.* Endocrinology, 2004. 145(6): 2585-90.

99. Moran, T.H., Smedh, U., Kinzig, K.P., Scott, K.A., Knipp, S. i Ladenheim, E.E. *Peptide YY(3-36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. 288(2): R384-8.
100. Lundell, I., Blomqvist, A.G., Berglund, M.M., Schober, D.A., Johnson, D., Statnick, M.A., Gadski, R.A., Gehlert, D.R. i Larhammar, D. *Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY.* J Biol Chem, 1995. 270(49): 29123-8.
101. Lundell, I., Statnick, M.A., Johnson, D., Schober, D.A., Starback, P., Gehlert, D.R. i Larhammar, D. *The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(10): 5111-5.
102. Eriksson, H., Berglund, M.M., Holmberg, S.K., Kahl, U., Gehlert, D.R. i Larhammar, D. *The cloned guinea pig pancreatic polypeptide receptor Y4 resembles more the human Y4 than does the rat Y4.* Regul Pept, 1998. 75-76: 29-37.
103. Batterham, R.L., Le Roux, C.W., Cohen, M.A., Park, A.J., Ellis, S.M., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A. i Bloom, S.R. *Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(8): 3989-92.
104. Stanley, B.G., Magdalin, W., Seirafi, A., Nguyen, M.M. i Leibowitz, S.F. *Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y1 receptor mediating this peptide's effect.* Peptides, 1992. 13(3): 581-7.
105. Raposinho, P.D., Pierroz, D.D., Broqua, P., White, R.B., Pedrazzini, T. i Aubert, M.L. *Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism.* Mol Cell Endocrinol, 2001. 185(1-2): 195-204.
106. Marsh, D.J., Baraban, S.C., Hollopeter, G. i Palmiter, R.D. *Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in limbic seizures.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(23): 13518-23.

107. Guo, H., Castro, P.A., Palmiter, R.D. i Baraban, S.C. *Y5 receptors mediate neuropeptide Y actions at excitatory synapses in area CA3 of the mouse hippocampus.* J Neurophysiol, 2002. 87(1): 558-66.
108. Mantyh, P.W., Allen, C.J., Rogers, S., DeMaster, E., Ghilardi, J.R., Mosconi, T., Kruger, L., Mannon, P.J., Taylor, I.L. i Vigna, S.R. *Some sensory neurons express neuropeptide Y receptors: potential paracrine inhibition of primary afferent nociceptors following peripheral nerve injury.* J Neurosci, 1994. 14(6): 3958-68.
109. Zhang, X., Shi, T., Holmberg, K., Landry, M., Huang, W., Xiao, H., Ju, G. i Hokfelt, T. *Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(2): 729-34.
110. Naveilhan, P., Neveu, I., Arenas, E. i Ernfors, P. *Complementary and overlapping expression of Y1, Y2 and Y5 receptors in the developing and adult mouse nervous system.* Neuroscience, 1998. 87(1): 289-302.
111. Zhang, X., Bao, L., Xu, Z.Q., Kopp, J., Arvidsson, U., Elde, R. i Hokfelt, T. *Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat nervous system with special reference to somatic receptors on small dorsal root ganglion neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(24): 11738-42.
112. Zhang, X., Wiesenfeld-Hallin, Z. i Hokfelt, T. *Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia.* Eur J Neurosci, 1994. 6(1): 43-57.
113. Xu, H., Tong, Y., Zhang, X., Jiao, X. i Hu, S. *Neuropeptide Y inhibits the hyperexcitability of type A neurons in chronically compressed dorsal root ganglion of the rat.* Neurosci Lett, 2002. 323(1): 70-4.
114. Wahlestedt, C. i Hakanson, R. *Effects of neuropeptide Y (NPY) at the sympathetic neuroeffector junction. Can pre- and postjunctional receptors be distinguished?* Med Biol, 1986. 64(2-3): 85-8.
115. Zhang, X., Ji, R.R., Nilsson, S., Villar, M., Ubink, R., Ju, G., Wiesenfeld-Hallin, Z. i Hokfelt, T. *Neuropeptide Y and galanin binding sites in rat and monkey lumbar dorsal root ganglia and spinal cord and effect of peripheral axotomy.* Eur J Neurosci, 1995. 7(3): 367-80.
116. Walker, M.W., Ewald, D.A., Perney, T.M. i Miller, R.J. *Neuropeptide Y modulates neurotransmitter release and Ca²⁺ currents in rat sensory neurons.* J Neurosci, 1988. 8(7): 2438-46.

117. Salter, M.W. i Henry, J.L. *Responses of functionally identified neurones in the dorsal horn of the cat spinal cord to substance P, neurokinin A and physalaemin.* Neuroscience, 1991. 43(2-3): 601-10.
118. Lam, F.Y. i Ferrell, W.R. *Specific neurokinin receptors mediate plasma extravasation in the rat knee joint.* Br J Pharmacol, 1991. 103(1): 1263-7.
119. Santicioli, P., Giuliani, S. i Maggi, C.A. *Failure of L-nitroarginine, a nitric oxide synthase inhibitor, to affect hypotension and plasma protein extravasation produced by tachykinin NK-1 receptor activation in rats.* J Auton Pharmacol, 1993. 13(3): 193-9.
120. Besson, J.M. *The neurobiology of pain.* Lancet, 1999. 353(9164): 1610-5.
121. Ewald, D.A., Matthies, H.J., Perney, T.M., Walker, M.W. i Miller, R.J. *The effect of down regulation of protein kinase C on the inhibitory modulation of dorsal root ganglion neuron Ca²⁺ currents by neuropeptide Y.* J Neurosci, 1988. 8(7): 2447-51.
122. Thayer, S.A. i Miller, R.J. *Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro.* J Physiol, 1990. 425: 85-115.
123. Ewald, D.A., Pang, I.H., Sternweis, P.C. i Miller, R.J. *Differential G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro.* Neuron, 1989. 2(2): 1185-93.
124. Bleakman, D., Colmers, W.F., Fournier, A. i Miller, R.J. *Neuropeptide Y inhibits Ca²⁺ influx into cultured dorsal root ganglion neurones of the rat via a Y2 receptor.* Br J Pharmacol, 1991. 103(3): 1781-9.
125. Hille, B. *Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors.* Trends Neurosci, 1994. 17(12): 531-6.
126. Rane, S.G. i Dunlap, K. *Kinase C activator 1,2-oleoylacylglycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(1): 184-8.
127. McCullough, L.A. i Westfall, T.C. *Mechanism of catecholamine synthesis inhibition by neuropeptide Y: role of Ca²⁺ channels and protein kinases.* J Neurochem, 1996. 67(3): 1090-9.

128. Motulsky, H.J. i Michel, M.C. *Neuropeptide Y mobilizes Ca²⁺ and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells.* Am J Physiol, 1988. 255(6 Pt 1): E880-5.
129. Mihara, S., Shigeri, Y. i Fujimoto, M. *Neuropeptide Y-induced intracellular Ca²⁺ increases in vascular smooth muscle cells.* FEBS Lett, 1989. 259(1): 79-82.
130. Wahlestedt, C., Reis, D.J., Yoo, H., Adamsson, M., Andersson, D. i Edvinsson, L. *A novel inositol phosphate selectively inhibits vasoconstriction evoked by the sympathetic co-transmitters neuropeptide Y (NPY) and adenosine triphosphate (ATP).* Neurosci Lett, 1992. 143(1-2): 123-6.
131. Perney, T.M. i Miller, R.J. *Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons.* J Biol Chem, 1989. 264(13): 7317-27.
132. Fuhlendorff, J., Gether, U., Aakerlund, L., Langeland-Johansen, N., Thogersen, H., Melberg, S.G., Olsen, U.B., Thastrup, O. i Schwartz, T.W. *[Leu³¹, Pro³⁴]neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(1): 182-6.
133. Wiley, J.W., Gross, R.A. i MacDonald, R.L. *Agonists for neuropeptide Y receptor subtypes NPY-1 and NPY-2 have opposite actions on rat nodose neuron calcium currents.* J Neurophysiol, 1993. 70(1): 324-30.
134. Wahlestedt, C., Grundemar, L., Hakanson, R., Heilig, M., Shen, G.H., Zukowska-Grojec, Z. i Reis, D.J. *Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2.* Ann N Y Acad Sci, 1990. 611: 7-26.
135. Hudspith, M.J. i Munglani, R. *Neuropeptide Y: friend of foe.* Eur J Pain, 1999. 3: 3-6.
136. Broqua, P., Wettstein, J.G., Rocher, M.N., Gauthier-Martin, B., Riviere, P.J., Junien, J.L. i Dahl, S.G. *Antinociceptive effects of neuropeptide Y and related peptides in mice.* Brain Research, 1996. 724(1): 25-32.
137. Wang, J.Z., Lundeberg, T. i Yu, L.C. *Anti-nociceptive effect of neuropeptide Y in periaqueductal grey in rats with inflammation.* Brain Res, 2001. 893(1-2): 264-7.
138. Taiwo, O.B. i Taylor, B.K. *Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors.* Pain, 2002. 96(3): 353-63.

139. Mellado, M.L., Gibert-Rahola, J., Chover, A.J. i Mico, J.A. *Effect on nociception of intracerebroventricular administration of low doses of neuropeptide Y in mice.* Life Sci, 1996. 58(26): 2409-14.
140. Shi, T.J., Zhang, X., Berge, O.G., Erickson, J.C., Palmiter, R.D. i Hokfelt, T. *Effect of peripheral axotomy on dorsal root ganglion neuron phenotype and autonomy behaviour in neuropeptide Y-deficient mice.* Regul Pept, 1998. 75-76: 161-73.
141. White, D.M. *Intrathecal neuropeptide Y exacerbates nerve injury-induced mechanical hyperalgesia.* Brain Res, 1997. 750(1-2): 141-6.
142. Tracey, D.J., Romm, M.A. i Yao, N.N. *Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: exacerbation by neuropeptide Y.* Brain Res, 1995. 669(2): 245-54.
143. Morris, C.J. *Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse.* Methods Mol Biol, 2003. 225: 115-21.
144. Kosta, V., Kojundzic, S.L., Sapunar, L.C. i Sapunar, D. *The extent of laminectomy affects pain-related behavior in a rat model of neuropathic pain.* Eur J Pain, 2009. 13(3): 243-248.
145. Basic, Z., Kostic, S., Kosta, V., Carija, R., Puljak, L. i Sapunar, D. *Postlaminectomy Stabilization of the Spine in a Rat Model of Neuropathic Pain Reduces Pain-Related Behavior.* Spine (Phila Pa 1976), 2012. 37(22): 1874-82.
146. Di Rosa, M. *Biological properties of carrageenan.* J Pharm Pharmacol, 1972. 24(2): 89-102.
147. Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J. i Willoughby, D.A. *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.* Nat Med, 1999. 5(6): 698-701.
148. Puljak, L., Kojundzic, S.L., Hogan, Q.H. i Sapunar, D. *Targeted delivery of pharmacological agents into rat dorsal root ganglion.* J Neurosci Methods, 2009. 177(2): 397-402.
149. Puljak, L., Kojundzic, S.L., Hogan, Q.H. i Sapunar, D. *Lidocaine injection into the rat dorsal root ganglion causes neuroinflammation.* Anesth Analg, 2009. 108(3): 1021-6.
150. Fischer, G., Kostic, S., Nakai, H., Park, F., Sapunar, D., Yu, H. i Hogan, Q. *Direct injection into the dorsal root ganglion: technical, behavioral, and histological observations.* J Neurosci Methods, 2011. 199(1): 43-55.

151. Dixon, W.J. *Efficient analysis of experimental observations*. Annual Review of Pharmacology & Toxicology, 1980. 20: 441-62.
152. Wu, H.E., Gemes, G., Zoga, V., Kawano, T. i Hogan, Q.H. *Learned avoidance from noxious mechanical simulation but not threshold semmes weinstein filament stimulation after nerve injury in rats*. J Pain, 2010. 11(3): 280-6.
153. Choi, Y., Yoon, Y.W., Na, H.S., Kim, S.H. i Chung, J.M. *Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain*. Pain, 1994. 59(3): 369-76.
154. Stefanini, M., De Martino, C. i Zamboni, L. *Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy*. Nature, 1967. 216(5111): 173-4.
155. Doods, H., Gaida, W., Wieland, H.A., Dollinger, H., Schnorrenberg, G., Esser, F., Engel, W., Eberlein, W. i Rudolf, K. *BIIE0246: a selective and high affinity neuropeptide YY(2) receptor antagonist*. Eur J Pharmacol, 1999. 384(2-3): R3-5.
156. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J. i Saldanha, C. *Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects*. Biochem Pharmacol, 2003. 65(7): 1035-41.
157. Li, Y., Li, J.J. i Yu, L.C. *Anti-nociceptive effect of neuropeptide Y in the nucleus accumbens of rats: an involvement of opioid receptors in the effect*. Brain Res, 2002. 940(1-2): 69-78.
158. Adewale, A.S., Macarthur, H. i Westfall, T.C. *Neuropeptide Y-induced enhancement of the evoked release of newly synthesized dopamine in rat striatum: mediation by Y2 receptors*. Neuropharmacology, 2007. 52(6): 1396-402.
159. Wieronska, J., Stachowicz, K., Klodzinska, A., Smialowska, M. i Pilc, A. *Intraamygdaloid administration of BIBO 3304 increases water intake and extends anxiolytic effects*. Polish Journal of Pharmacology, 2004. 56(6): 867-70.
160. Smialowska, M., Wieronska, J.M., Domin, H. i Zieba, B. *The effect of intrahippocampal injection of group II and III metabotropic glutamate receptor agonists on anxiety; the role of neuropeptide Y*. Neuropsychopharmacology, 2007. 32(6): 1242-50.
161. Sapunar, D., Vukojevic, K., Kostic, S. i Puljak, L. *Attenuation of pain-related behavior evoked by injury through blockade of neuropeptide Y Y2 receptor*. Pain, 2011. 152(5): 1173-1181.

162. Arkhipova, S.S., Raginov, I.S., Mukhitov, A.R. i Chelyshev, Y.A. *Satellite cells of sensory neurons after various types of sciatic nerve trauma in the rat*. Neurosci Behav Physiol. 40(6): 609-14.
163. Intondi, A.B., Dahlgren, M.N., Eilers, M.A. i Taylor, B.K. *Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain*. Pain, 2008. 137(2): 352-65.
164. Shi, T.J., Li, J., Dahlstrom, A., Theodorsson, E., Ceccatelli, S., Decosterd, I., Pedrazzini, T. i Hokfelt, T. *Deletion of the neuropeptide Y Y1 receptor affects pain sensitivity, neuropeptide transport and expression, and dorsal root ganglion neuron numbers*. Neuroscience, 2006. 140(1): 293-304.
165. Li, J.J., Zhou, X. i Yu, L.C. *Involvement of neuropeptide Y and Y1 receptor in antinociception in the arcuate nucleus of hypothalamus, an immunohistochemical and pharmacological study in intact rats and rats with inflammation*. Pain, 2005. 118(1-2): 232-42.
166. Raghavendra, V., Tanga, F. i DeLeo, J.A. *Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 306(2): 624-30.
167. Levite, M. *Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(21): 12544-9.
168. Hernanz, A., Medina, S., de Miguel, E. i Martin-Mola, E. *Effect of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by peripheral whole blood cells from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients*. Regul Pept, 2003. 115(1): 19-24.
169. Kawamura, N., Tamura, H., Obana, S., Wenner, M., Ishikawa, T., Nakata, A. i Yamamoto, H. *Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper T cell subsets*. Neuroimmunomodulation, 1998. 5(1-2): 9-15.
170. Straub, R.H., Mayer, M., Kreutz, M., Leeb, S., Scholmerich, J. i Falk, W. *Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes*. J Leukoc Biol, 2000. 67(4): 553-8.

171. De la Fuente, M., Bernaez, I., Del Rio, M. i Hernanz, A. *Stimulation of murine peritoneal macrophage functions by neuropeptide Y and peptide YY. Involvement of protein kinase C.* Immunology, 1993. 80(2): 259-65.
172. Dimitrijevic, M., Stanojevic, S., Vujic, V., Kovacevic-Jovanovic, V., Beck-Sickinger, A., Demuth, H. i von Horsten, S. *Effect of neuropeptide Y on inflammatory paw edema in the rat: involvement of peripheral NPY Y1 and Y5 receptors and interaction with dipeptidyl-peptidase IV (CD26).* J Neuroimmunol, 2002. 129(1-2): 35-42.
173. Castro-Lopes, J.M., Tavares, I., Tolle, T.R. i Coimbra, A. *Carrageenan-induced inflammation of the hind foot provokes a rise of GABA-immunoreactive cells in the rat spinal cord that is prevented by peripheral neurectomy or neonatal capsaicin treatment.* Pain, 1994. 56(2): 193-201.
174. Kostic, S., Puljak, L. i Sapunar, D. *Attenuation of pain-related behaviour evoked by carrageenan injection through blockade of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors.* Eur J Pain, 2012. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00218.x.
175. Brumovsky, P., Shi, T.S., Landry, M., Villar, M.J. i Hokfelt, T. *Neuropeptide tyrosine and pain.* Trends Pharmacol Sci, 2007. 28(2): 93-102.
176. Gibbs, J.L., Diogenes, A. i Hargreaves, K.M. *Neuropeptide Y modulates effects of bradykinin and prostaglandin E2 on trigeminal nociceptors via activation of the Y1 and Y2 receptors.* Br J Pharmacol, 2007. 150(1): 72-9.
177. Smith, P.A., Moran, T.D., Abdulla, F., Tumber, K.K. i Taylor, B.K. *Spinal mechanisms of NPY analgesia.* Peptides, 2007. 28(2): 464-74.
178. Zhang, X., Nicholas, A.P. i Hokfelt, T. *Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the spinal cord--I. Co-existence of galanin with other peptides in primary afferents in normal rats.* Neuroscience, 1993. 57(2): 365-84.
179. Gibson, S.J., Polak, J.M., Allen, J.M., Adrian, T.E., Kelly, J.S. i Bloom, S.R. *The distribution and origin of a novel brain peptide, neuropeptide Y, in the spinal cord of several mammals.* J Comp Neurol, 1984. 227(1): 78-91.
180. Sasek, C.A. i Elde, R.P. *Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity and its relationship to FMRF-amide-like immunoreactivity in the sixth lumbar and first sacral spinal cord segments of the rat.* J Neurosci, 1985. 5(7): 1729-39.

181. Gibbs, J., Flores, C.M. i Hargreaves, K.M. *Neuropeptide Y inhibits capsaicin-sensitive nociceptors via a Y1-receptor-mediated mechanism*. Neuroscience, 2004. 125(3): 703-9.
182. Solway, B., Bose, S.C., Corder, G., Donahue, R.R. i Taylor, B.K. *Tonic inhibition of chronic pain by neuropeptide Y*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(17): 7224-9.
183. Moran, T.D., Colmers, W.F. i Smith, P.A. *Opioid-like actions of neuropeptide Y in rat substantia gelatinosa: Y1 suppression of inhibition and Y2 suppression of excitation*. J Neurophysiol, 2004. 92(6): 3266-75.
184. Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., Woodbury, C.J. i Ginty, D.D. *The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons*. Cell, 2011. 147(7): 1615-27.
185. Xu, I.S., Hao, J.X., Xu, X.J., Hokfelt, T. i Wiesenfeld-Hallin, Z. *The effect of intrathecal selective agonists of Y1 and Y2 neuropeptide Y receptors on the flexor reflex in normal and axotomized rats*. Brain Res, 1999. 833(2): 251-7.
186. Mahinda, T.B. i Taylor, B.K. *Intrathecal neuropeptide Y inhibits behavioral and cardiovascular responses to noxious inflammatory stimuli in awake rats*. Physiol Behav, 2004. 80(5): 703-11.
187. Barrot, M. *Tests and models of nociception and pain in rodents*. Neuroscience, 2012. 211: 39-50.
188. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. i Joris, J. *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia*. Pain, 1988. 32(1): 77-88.
189. Radhakrishnan, R., Moore, S.A. i Sluka, K.A. *Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats*. Pain, 2003. 104(3): 567-77.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Sandra Kostić

Adresa: Šoltanska 2, 21 000 Split

Telefon: +385 21 557 810

Fax: +385 21 557 811

e-pošta: sandra.kostic@mefst.hr

Datum rođenja: 22. veljače 1983.

Matični broj iz Upisnika znanstvenika: 314431

RADNO ISKUSTVO

2009 -

Znanstveni novak, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Područje rada: - sudjelovanje u nastavnom procesu, Katedra za histologiju i embriologiju

- istraživanje neuropatske boli

ŠKOLOVANJE

2011 -

Poslijediplomski studij Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE) Medicinskog fakulteta u Splitu

2008

Studij biotehnologije; Prehrambeno - biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zvanje: Magistar inženjer molekularne biotehnologije

USAVRŠAVANJE

ožujak 2011– lipanj 2012

Medical College of Wisconsin, Department of Anesthesiology, SAD, istraživanje boli

2010

EMBO – Anatomy and Embryology of the Mouse, Medicinski fakultet Split

2010

Sveučilišni tečaj edukacije edukatora, Medicinski fakultet Split

2009

Trilj, Ljetna škola znanstvene komunikacije, Medicinski fakultet Split

ČLANSTVA I AKTIVNOSTI U STRUČNIM UDRUGAMA

- Član Hrvatskog društva za liječenje boli
- Pridruženi član Hrvatskog liječničkog zbora
- Član Međunarodne udruge za proučavanje boli (engl. International Association for the Study of Pain – IASP)

NASTAVNE AKTIVNOSTI

- Dodiplomska nastava:
- predmet: Histologija i embriologija
 - Studij medicine
 - Studij dentalne medicine
 - Studij farmacije
 - Studij medicine na engleskom jeziku (Medical Studies in English)
 - Odjel zdravstvenih studija
- izborni predmet:
 - Zagonetka boli
 - Empatija i bol

DRUGE ZNANSTVENE DJELATNOSTI

2011 – Glavni urednik elektronskog izdanja časopisa Croatian Medical Journal

2010-2011 – Član uredničkog odbora časopisa Croatian Medical Journal

2010, 2012 – Instruktor – EMBO Practical Course

ZNANSTVENO-ISTRAŽIVAČKO ISKUSTVO

Istraživanje perifernih mehanizama neuropatske boli.

Iskustvo u histološkim tehnikama imunofluorescencije. Poznavanje i korištenje modela neuropatske boli (podvezivanje spinalnog živca) i testova ponašanja.

Poznavanje elektrofizioloških tehnika (patch clamp).

ISTRAŽIVAČKI PROJEKTI

2011- voditelj projekta „Genska terapija neuropatske boli“, Unity Through Knowledge Fund (UKF2A)

2010- - Sudjelovanje na projektu „Molekularna memorija u dijabetičkoj neuropatiji (MEMODIN)“, Nacionalna zaklada za znanost (NZZ)

2009- - sudjelovanje na projektu „Ozljeda živčanih stanica i neuropatska bol“, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa, br. 216-2160522

2009- - Znanstveni novak na projektu „Funkcionalna analiza ozlijeđenih primarnih aferentnih neurona“, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa, br. 216-2160528.

ZNANSTVENI RADOVI

1. **Kostić S**, Puljak L, Sapunar D. Attenuation of pain-related behaviour evoked by carrageenan injection through blockade of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors. *Europ J Pain*. 2012 Oct 12. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00218.x. [Epub ahead of print]
2. Ferhatović L, Banožić A, **Kostić S**, Tičinović TK, Novak A, Vrdoljak L, Heffer M, Sapunar D, Puljak L. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesthesia & Analgesia*. [In press]
3. Ferhatovic L, Banozic A, **Kostić S**, Sapunar D, Puljak L. Sex differences in pain-related behavior and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglia of rats with diabetes type 1 and type 2. *Acta Histochem*. 2012 Dec 22. doi:pii: S0065-1281(12)00170-5. 10.1016/j.acthis.2012.11.006. [Epub ahead of print]

4. Tang Q, Bangaru ML, **Kostic S**, Pan B, Wu HE, Koopmeiners AS, Yu H, Fischer GJ, McCallum JB, Kwok WM, Hudmon A, Hogan QH. Ca²⁺-Dependent Regulation of Ca²⁺ Currents in Rat Primary Afferent Neurons: Role of CaMKII and the Effect of Injury. *J Neurosci*. 2012;32(34):11737-49.
5. Klinar I, Ferhatovic L, Banozic A, Raguz M, **Kostic S**, Sapunar D, Puljak L. Physicians' attitudes about interprofessional treatment of chronic pain: family physicians are considered the most important collaborators. *Scand J Caring Sci*. 2012 Jul 15. doi: 10.1111/j.1471-6712.2012.01039.x. [Epub ahead of print]
6. Basic Z, **Kostic S**, Kosta V, Carija R, Puljak L, Sapunar D. Posthemilaminectomy stabilization of the spine in a rat model of neuropathic pain reduces pain-related behavior. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Apr 23. [Epub ahead of print] DOI:10.1097/BRS.0b013e31825a2c2b
7. Sapunar D, **Kostic S**, Banozic A, Puljak L. Dorsal root ganglion – a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *J Pain Res*. 2012;5:31-8.
8. Durgo K, **Kostić S**, Gradiški K, Komes D, Osmak M, Franekić J. Genotoxic Effects of Green Tea Extract on Human Laryngeal Carcinoma Cells In Vitro. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2011; 62(2):139-146.
9. Sapunar D, **Kostić S**, Banožić A, Ferhatović L, Puljak L. Pain research in Croatia: Analysis of bibliometric trends. *Periodicum Biologorum*. 2011; 113(2):137-140.
10. Fisher GJ, **Kostic S**, Nakai H, Park F, Sapunar D, Yu H, Hogan Q. Direct injection into the dorsal root ganglion: Technical, Behavioral and Histological observations. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011; 199(1):43-55.
11. Sapunar D, Vukojevic K, **Kostic S**, Puljak L. Attenuation of injury-evoked pain-related behavior by blockade of neuropeptide Y Y2 receptor. *Pain* 2011;152: 1173-1181.
12. Novak K, Aljinović J, **Kostić S**, Čapkun V, Novak Ribičić K, Batinić T, Štula I, Puljak L. Pain to hospital times after myocardial infarction in patients from mainland and islands of Dalmatia, Southern Croatia. *Croat Med J*. 2010; 51:423-31.

SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA

1. **Kostic S**, Puljak L, Sapunar D. Acute blood flow alterations within sciatic nerve following its transection. Presentation number: PT231. 14th World Congress on Pain. Milan, Italy, August 27-31, 2012.
2. Ferhatovic L, Banozic A, **Kostic S**, Ticinovic TK, Novak A, Vrdoljak L, Sapunar D, Puljak L. Sensory changes and oncrease of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II expression in animal models of diabetes type I and type II. Presentation number: PF246. 14th World Congress on Pain. Milan, Italy, August 27-31, 2012.
3. Ferhatovic L, Banozic A, **Kostic S**, Sapunar D, Puljak L. Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in the diabetic neuropathy. Young Neuroscientists Meeting (YNM). June, 2011. Trieste, Italy.
4. Ferhatovic L, **Kostic S**, Banozic A, Vrdoljak L, Sapunar D, Puljak L. A role of calcium/calmodulin-depedent protein kinase II in diabetic neuropathy. Invited oral presentation. Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference: Science and Art for the Advancement in Medicine. March 30 – April 1, 21012. Budapest, Hungary.
5. Bangaru MLY, **Kostic S**, Tang Q, Wu HE, Ashpole N, Mueller S, Hudetz AG, Kwok WM, Hudmon A, Hogan QH. Ca²⁺-dependent facilitation of Ca²⁺ current in sensory neurons: Loss of excitability regulation after nerve injury. Neuroscience Meeting, Washington DC, November 12-16, 2011.
6. Ferhatovic L, **Kostic S**, Banozic A, Sapunar D, Puljak L. A role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in diabetic neuropathy. 7th Congress of the European Federation of IASP Chapters. Hamburg 21-24 September, 2011.
7. Novak K, **Kostić S**, Čapkun V, Novak Ribičić K, Batinić T, Štula I, Puljak L. Pain to hospital times after myocardial infarction in patients from mainland and islands of Dalmatia, Southern Croatia. 8th Congress of the Croatian Cardiac Society with international participation, Opatija, October, 21st-24th, 2010.
8. **Kostic S**, Puljak L, Sapunar D. Targeted delivery of NPY into dorsal root ganglion reduces pain-related behavior following intraplantar carrageenan injection. 2.hrvatski kongres iz liječenja boli, Osijek, 7.-9. listopada 2010.

9. Sapunar D, Vukojevic K, **Kostic S**, Puljak L. Attenuation of injury evoked pain-related behavior by blockade of neuropeptide Y Y2 receptor. 2.hrvatski kongres iz liječenja boli, Osijek, 7.-9. listopada 2010.
10. **Kostic S**, Puljak L, Sapunar D, Targeted delivery of NPY into dorsal root ganglion reduces pain-related behavior following intraplantar carrageenan injection. Presentation number: PW255. 13th World Congress on Pain. Montreal, Canada, August 29-September 2, 2010.
11. Sapunar D, Vukojevic K, **Kostic S**, Puljak L. Attenuation of injury evoked pain-related behavior by blockade of neuropeptide Y Y2 receptor. Presentation number: PH180. 13th World Congress on Pain. Montreal, Canada, August 29-September 2, 2010.
12. Durgo K, **Kostić,S**, Kopjar N, Osmak M, Franekić Čolić J. Investigation of genotoxic properties of green tea extract // Toxicology Letters, Volume 180, Supplement 1, Abstracts of the 45th Congress of the European Societies of Toxicology.

ZNANSTVENI MATERIJALI

Sapunar, D, Puljak, L, **Kostic S**, Banozic, A. Are mice small rats? Rodent models of neuropathic pain, in Anatomy and Embryology of the Mouse, A. Marusic, Editor. 2010, University of Split School of Medicine: Split.

NAGRADE I PRIZNANJA:

- 2011 - 3. mjesto, Simpozij mladih znanstvenika, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

2011 - Sudjelovanje u organizaciji Festivala Znanosti u Splitu

2010 - Sudjelovanje u organizaciji Festivala Znanosti u Splitu

RAČUNALNI PROGRAMI

- Software baziran na Windowsima, MS Office, Statistica, GraphPad, EndNote, Adobe Photoshop, Adobe Illustrator