

# Izražaj kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaze II i ponašanje povezano s boli u štakorskom modelu dijabetesa tip 1 i 2

---

**Ferhatović Hamzić, Lejla**

**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:171:185767>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-28**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu  
Medicinski fakultet**

**Lejla Ferhatović, dipl. ing.**

**Izražaj kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaze II i ponašanje povezano s boli u  
štakorskom modelu dijabetesa tip 1 i 2**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2013.**



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

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Livia Puljak

*Uči, čitaj u ime tvog Gospodara koji stvara.*

*Stvorio je čovjeka od ugruška.*

*Čitaj, plemenit je Gospodar tvoj.*

*Koji podučava peru.*

*Podučava čovjeka onome što ne zna.*

(Kur'an, 96:1-5)

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici na svemu što me naučila kroz protekle tri godine. Puno ti hvala na svemu lijepom što si mi pružila za vrijeme mog boravka na Zavodu. Uz tvoje vodstvo, ovaj posao mi je bio čisti užitek i nadam se da će moj sljedeći šef biti bar upola dobar kao ti.

Mnogo hvala svim ostalim kolegama na Zavodu za Anatomiju, histologiju i embriologiju na susretljivosti, podršci, kolegijalnosti i dobrom društvu.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Diabetes mellitus .....	1
1.1.1. Dijabetes tipa 1 .....	1
1.1.2. Dijabetes tipa 2 .....	2
1.1.3. Komplikacije dijabetesa .....	2
1.2. Dijabetička neuropatija .....	3
1.3. Spinalni ganglij .....	4
1.3.1. Anatomske karakteristike spinalnih ganglija .....	5
1.4. Bol i vrste boli .....	5
1.4.1. Nociceptivna bol .....	7
1.4.2. Upalna bol .....	7
1.4.3. Neuropatska bol .....	8
1.4.4. Funkcionalna bol .....	9
1.5. Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-ovisna protein kinaza II .....	9
1.5.1. Povijest otkrića spoznaja vezanih za ulogu kalcija, kalmodulina i CaMKII .....	10
1.5.2. Izoforme CaMKII .....	12
1.5.3. Regulacija enzimatske aktivnosti CaMKII .....	12
1.5.4. Uloga CaMKII u sinaptičkoj plastičnosti i pamćenju .....	14
1.5.5. Efektori CaMKII kaskade .....	18
1.5.6. Uloga CaMKII u nastanku neuropatske boli .....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	22
3. METODE I MATERIJALI .....	23
3.1. Etička pitanja .....	23
3.2. Pokusne životinje .....	23
3.3. Štakorski modeli dijabetesa .....	24
3.4. Testiranje ponašanja .....	25
3.5. Tjelesna masa i biokemijski parametri .....	26
3.6. Priprema tkiva za imunofluorescenciju .....	27
3.7. Analiza slika i kvantifikacija .....	30
3.8. Statistički postupci .....	31
4. REZULTATI .....	32
4.1. Validacija životinjskih modela za indukciju dijabetesa tipa 1 i tipa 2 .....	32
4.2. Eksperimentalna indukcija dijabetesa povećava ponašanje povezano s boli .....	33
4.3. Izražaj CaMKII u spinalnim ganglijima nakon injekcije STZ-a .....	36
4.4. Usporedba glikemije mužjaka i ženki dijabetičkih modela .....	42
4.5. Usporedba tjelesne mase mužjaka i ženki dijabetičkih modela .....	43

4.6. Usporedba ponašanja mužjaka i ženki dijabetičkih modela.....	44
4.7. Izražaj CaMKII u mužjaka i ženki dijabetičkih modela .....	47
5. RASPRAVA.....	50
6. ZAKLJUČAK .....	60
7. SAŽETAK.....	61
8. SUMMARY .....	62
9. LITERATURA.....	63
10. ŽIVOTOPIS .....	87

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionska kiselina (engl., <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> )
ANOVA	test jednosmjerne analize varijance (engl., <i>one-way analysis of variance</i> )
CaMKII	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II
CaMKII $\beta$	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II beta
CaMKII $\gamma$	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II gama
CaMKII $\delta$	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II delta
C-DM1	kontrolna skupina štakora za dijabetes tip 1
C-DM2	kontrolna skupina štakora za dijabetes tip 2
CDR	regulator ovisan o kalciju (engl., <i>calcium-dependent regulator</i> )
DM1	dijabetes mellitus tipa 1
DM2	dijabetes mellitus tipa 2
ERK2	kinaza 2 regulirana izvanstaničnim signaliziranjem (engl., <i>extracellular signal-regulated kinase 2</i> )
HFD	hrana s visokim udjelom masti (engl. <i>high fat diet</i> )
GluR1	glutamatni receptor 1
i.p.	intraperitonealno
i.v.	intravenski
IASP	Svjetsko udruženje za istraživanje boli (engl., <i>International Assotiation for the Study of Pain</i> )
MHC	genotip glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl., <i>major histocompatibility complex</i> )

NMDA	N-metil D-aspartat
NR2A	N-metil D-aspartat receptor 2A
NR2B	N-metil D-aspartat receptor 2B
PBS	zasoljeni fosfatni pufer
pCaMKII $\alpha$	fosforilirana kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II alfa
PKB	protein kinaza B
PKC	protein kinaza C
PP1	protein fosfataze 1 (engl., <i>phosphoprotein phosphatase 1</i> )
PSD-95	protein postsinaptičke gustoće (engl., <i>postsynaptic density protein 95</i> )
SPM	sinaptičke plazma membrane
STZ	streptozotocin
tCaMKII	ukupna kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II
VGCC	voltažni kalcijevi kanali (engl., <i>voltage-gated calcium channels</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus jedna je od najčešćih kroničnih bolesti, a karakterizira je visoka razina glukoze u plazmi (hiperglikemija). Hormon gušterače inzulin regulira razinu glikemije, a dijabetes nastaje kad se inzulin ne izlučuje u dovoljnim količinama, kad su tkiva neosjetljiva na inzulin, ili oboje. Dva su najčešća tipa dijabetesa – o inzulinu ovisan dijabetes (tip 1) i o inzulinu neovisan dijabetes (tip 2). Tip 1 (DM1) nastaje zbog manjka inzulina, a tip 2 (DM2) nastaje uslijed otpornosti perifernih tkiva na inzulin. Dijabetes je povezan s dugoročnim oštećenjem i zatajivanjem niza organa. Može se manifestirati karakterističnim simptomima kao što su pretjerano žedanje, pretjerana glad, pretjerano mokrenje, zamućenje vida i promjene tjelesne mase. Popratna pojava hiperglikemije uzrokuje niz komplikacija koje značajno umanjuju kvalitetu života oboljelih (1, 2).

U svijetu je 2011. bilo 366 milijuna oboljelih od dijabetesa. Procijenjeno je da će se broj oboljelih od dijabetesa u 2030. povećati za 141% u odnosu na 2000. godinu (4).

### 1.1.1. Dijabetes tipa 1

DM1 je multifaktorijalna autoimuna bolest, a osjetljivost na nju određena je okolišnim i genetskim čimbenicima. Nasljeđivanje DM1 je poligeno, a genotip glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl., *major histocompatibility complex* – MHC) najvažnija je genetska odrednica. Međutim, čak i u monozigotnih blizanaca, stopa podudarnosti obolijevanja od dijabetesa je svega 50% (5), što ukazuje na veliku važnost niza još uvijek neprepoznatih okolišnih čimbenika za razvoj DM1 (6).

Incidencija DM1 se povećava u djece širom svijeta, međutim globalni uzorak incidencije DM1 nije se značajno mijenjao od prvih analiza objavljenih tijekom 1970-ih i 1980-ih. Ranije opisani polarno-ekvatorijalni gradijent u incidenciji DM1 opisivao je najveću incidenciju u sjevernim zemljama te smanjenje incidencije od sjevera prema ekvatoru (7-10). Međutim, da



ovaj uzorak distribucije DM1 nije toliko uvjerljiv pokazano je novijim istraživanjem koje je obuhvatilo 5% svjetske populacije (11). Od 1990. do 1994. najveća incidencija DM1 zabilježena je u Sardiniji i Finskoj, zemljama udaljenima 3000 km, od kojih svaka ima drugačiji okoliš i genetsku podlogu (12, 13).

### **1.1.2. Dijabetes tipa 2**

DM2 je najčešći oblik dijabetesa, javlja se u 90% oboljelih, a odlikuje se multifaktorijalnom patogenezom (14). Životni stil i prejedanje smatraju se okidačima za razvoj DM2, međutim genetski elementi su također uključeni u patogenezu bolesti. Pozitivna obiteljska povijest bolesti povećava rizik od razvoja DM2 za 2 do 4 puta. 15-25% prvih rođaka ljudi oboljelih od dijabetesa razvit će poremećaj tolerancije glukoze ili dijabetes (15). Ako oba roditelja boluju od DM2, procjenjuje se da je prevalencija DM2 u djece 60% do 1960. godine (16).

DM2 nastaje zbog neosjetljivosti tkiva na inzulin, tzv. inzulinske rezistencije, i nedovoljne proizvodnje inzulina u beta stanicama gušterače. Razvoj inzulinske rezistencije povezan je s pretilošću i tjelesnom neaktivnošću, pri čemu je važna ne samo pretjerana pohrana masti u adipocitima nego i nakupljanje masti u drugim tjelesnim stanicama (14).

### **1.1.3. Komplikacije dijabetesa**

Stanice koje pokazuju pojačanu osjetljivost na ozljede uzrokovane hiperglikemijom su endotelne stanice kapilara u mrežnici, mezangijalne stanice u bubrežnom glomerulu, neuroni i Schwanove stanice u perifernom živčanom sustavu. Ove su stanice toliko osjetljive jer se ne mogu efikasno obraniti od pretjeranog ulaska glukoze u njihovu unutrašnjost, dok druge vrste stanica uspijevaju u tome. Ovo je važno imati na umu prilikom istraživanja patofizioloških promjena u dijabetesu jer, očito, uzroke ovih promjena treba tražiti u unutrašnjosti stanice, a ne u međustaničnom prostoru (17).

Svi oblici dijabetesa karakterizirani su kroničnom hiperglikemijom i razvojem specifičnih mikrovaskularnih komplikacija u mrežnici, glomerulu bubrega i perifernim živcima. Kao posljedica mikrovaskularne patologije, dijabetes je vodeći uzrok sljepoće, završne faze bolesti

bubrega (engl., *end-stage renal disease*) i različitih neuropatija. Dijabetes je također povezan s ubrzanim aterosklerotskim makrovaskularnim poremećajem, koji pogađa arterije što dovode krv u srce, mozak i donje ekstremitete. Posljedično, dijabetičari imaju povećan rizik od infarkta miokarda, moždanog udara i amputacije dijela noge. Velike prospektivne kliničke studije pokazale su značajnu povezanost između glikemije i dijabetičkih makrovaskularnih komplikacija u oba tipa dijabetesa (18, 19). Hiperglikemija i inzulinska rezistencija također su važan uzročni čimbenik i makrovaskularnih komplikacija (20-22).

## **1.2. Dijabetička neuropatija**

Jedna od najčešćih ranih komplikacija dijabetesa koja pogađa do 66% pacijenata je dijabetička neuropatija (23). Dijabetička neuropatija nije jedna bolest nego skupina različitih bolesti od kojih je najčešća senzomotorička polineuropatija koja započinje u stopalima i napreduje proksimalno (24, 25). Informacije s periferije koje prenose osjetni neuroni (afherentni unos) smanjene su u neuropatiji uzrokovanoj kroničnim dijabetesom (26).

Senzomotorička polineuropatija uzrokuje, među ostalim, ozljede srčanih autonomnih živaca, što je najveći uzrok smrtnosti u dijabetesu. Također, dijabetička polineuropatija uzrokuje gubitak osjeta mehaničkih podražaja u udovima, nastanak ulkusa i posljedične amputacije udova (27). Tipična dijabetička periferna neuropatija je patološki karakterizirana kao distalno predominantna aksonopatija u kojoj su najprije pogođeni najduži aksoni koji inerviraju stopala (28, 29). Smanjeni protok krvi zbog gubitka funkcija autonomnih živaca može pridonijeti razvoju dijabetičke neuropatije (30). U dijabetičkoj neuropatiji uočene su promjene u kapilarama perifernih živaca koje su nalik patogenoj neurovaskularizaciji opisanoj u dijabetičkoj retinopatiji i nefropatiji (3).

Živčana vlakna u ranim stadijima dijabetesa degeneriraju i mogu uzrokovati niz osjetnih simptoma koje dijelimo na pozitivne i negativne (31, 32). Pozitivni simptomi uključuju spontanu bol, parestezije, pretjeranu osjetljivost na normalno bezbolne ili umjereno bolne podražaje (hiperalgezija i alodinija). Negativni simptomi su gubitci osjeta u jednom ili više osjetnih modaliteta (na primjer potpuni gubitak osjeta boli i temperature) (33).

Oko 11% slučajeva dijabetičke polineuropatije povezano je sa simptomima kronične boli koji značajno narušavaju kvalitetu života oboljelih i često su povezani s depresijom (34), međutim

još uvijek nisu poznati točni stanični i molekularni mehanizmi odgovorni za abnormalnu percepciju boli u dijabetesu (35). Istraživanja na životinjama pokazala su da je patogeneza negativnih simptoma dijabetičke polineuropatije najvjerojatnije povezana s demijelinizacijom, atrofijom i degeneracijom živaca (36, 37). Mehanizmi nastanka neuropatske boli, parestezije i hiperalgezije slabije su istraženi (38, 39), a općenito je prihvaćen stav da je abnormalno povećani protok informacija iz periferije u leđnu moždinu primarni okidač ovih simptoma (27, 38, 40).

### **1.3. Spinalni ganglij**

Primarni osjetni neuroni prenose osjetne informacije s periferije u središnji živčani sustav, a protežu se od receptorskih područja na periferiji sve do dorzalnih rogova leđne moždine. Njihova duljina u nekim slučajevima doseže 1,5 m, što ih čini najvećim stanicama u tijelu. Njihova veličina pruža mnogostruke prilike za anesteziranje, no također ih izlaže i ozljedama. To su pseudounipolarni neuroni, što znači da imaju jedan akson koji izlazi iz tijela stanice i dijeli se tako da jedna grana vodi do periferije, a druga do leđne moždine. Na ovaj način, tijelo stanice je izmaknuto na stranu, te je omogućen brzi prijelaz akcijskog potencijala koji se ne usporava prolaskom kroz tijelo stanice (41).

Tijela neurona perifernih živaca smještena su u spinalnim ganglijima, koji se sastoje od oko 15000 neurona. Zbog velike dužine aksona ovih stanica, a relativno malih veličina njihovih tijela (promjer=20-50  $\mu\text{m}$ ), samo oko 0,2% citoplazme perifernih živaca otpada na somu. Proteini i mitohondriji proizvode se u somi, pa su metabolički zahtjevi koji se stavljaju pred somu enormni, a velika udaljenost koju aksoplazmatski transport treba prijeći prilikom opskrbe udaljenih dijelova aksona čini ova vlakna veoma podložnima ranim ozljedama tijekom metaboličkih bolesti, kao što je to dijabetes mellitus (41).

Spinalni gangliji su važno ciljno tkivo u patogenezi neuropatske boli jer u njima nastaju početne promjene u neuropatiji. Abnormalnosti u perifernom živcu i spinalnom gangliju uočene su u ranom stupnju eksperimentalno izazvane dijabetičke neuropatije. Istraživanja animalnih modela dijabetesa pokazala su kako se već jedan tjedan nakon kemijski izazvanog dijabetesa uočava globalna promjena izražaja gena u spinalnim ganglijima (42). Promjene izražaja pojedinih gena u početku bolesti su relativno skromne, što je u skladu s

degenerativnom neuropatijom koja direktno nastaje zbog dijabetesa. Nakon šest mjeseci trajanja pokusnog dijabetesa dolazi do vakuolarne degeneracije u spinalnim ganglijima (43). Ova istraživanja ukazuju na važnost spinalnog ganglija u nastanku dijabetičke neuropatije.

### **1.3.1. Anatomske karakteristike spinalnih ganglija**

Spinalni gangliji su smješteni izvan intravertebralnog foramena, posteriorno od vertebralne arterije. Ovi maleni organi nisu odijeljeni od okoline barijerom koja bi sprječavala ulazak tvari iz cirkulacije, kao što je to slučaj drugdje u centralnom i perifernom živčanom sustavu. Izloženost spinalnih ganglija tvarima iz krvotoka omogućava brzi ulazak steroida injiciranih u epiduralni prostor ili intrevertebralni foramen u ta tkiva prilikom tretiranja neuropatske boli nastale oslobađanjem upalnih posrednika iz aktiviranih glijia stanica. Nadalje, brzi ulazak lokalnih anestetika u spinalne ganglije vjerojatno olakšava i segmentalna priroda same epiduralne anestezije (41).

Permeabilnost membrane koja okružuje spinalne ganglije objašnjava zašto su oni tako otporni na intraneuronalne lokalne injekcije (44), jer toksične koncentracije lokalne anestezije neće biti zarobljene u samim ganglijima. Velika gustoća krvnih kapilara (45) dodatno objašnjava relativnu tvrdoću spinalnih ganglija u usporedbi s neuronima središnjeg živčanog sustava ili perifernim živcima, koji se lako oštećuju. Zbog svega navedenoga, spinalni gangliji su predloženi kao važno ciljno mjesto u liječenju neuropatske boli (41).

## **1.4. Bol i vrste boli**

Prema definiciji Svjetskog udruženja za istraživanje boli (engl., *International Association for the Study of Pain – IASP*) bol je neugodan osjetni i emocionalni doživljaj povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili opisan u okvirima takvog oštećenja (46).

Nadalje, u svojoj taksonomiji, IASP naglašava kako je bol uvijek subjektivna i da nemogućnost verbalne komunikacije ne znači da osoba ne doživljava bol. Svaka osoba nauči primjenjivati riječi bol tijekom iskustava povezanih s ozljedama u ranom životu. Biolozi

prepoznaju da su podražaji koji uzrokuju bol povezani s oštećenjem tkiva. Stoga je bol iskustvo koje se povezuje sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. To je osjet koji se javlja u dijelu ili dijelovima tijela, ali je uvijek neugodan i stoga je ujedno i emocionalno iskustvo. Mnoge osobe opisuju da trpe bol u odsutnosti ikakvog dokazivog oštećenja tkiva, ili bilo kojeg vjerojatnog patofiziološkog uzroka, i tada se obično radi o psihološkim razlozima. Obično nema načina da se razlikuje njihovo iskustvo od iskustva boli uzrokovanog oštećenjem tkiva, ako se uzima subjektivni opis. Ako osoba smatra da trpi bol, i ako bol opisuje na isti način kao i bol koja nastaje zbog oštećenja tkiva, onda se treba prihvatiti kao bol. Ovakva definicija izbjegava vezivanje boli za podražaj. Aktivnost inducirana u nociceptorima i nociceptivnim putovima štetnim podražajem nije bol, koja je uvijek psihološko stanje, čak i ako imamo na umu da bol najčešće ima proksimalni fizički uzrok (46).

Klasifikacija boli koja se temelji na mehanizmu odnosi se na klasifikaciji kliničkih prezentacija boli temeljem pretpostavki o neurofiziološkim mehanizmima odgovornima za nastanak i/ili održavanje boli (47). Klasifikacija boli temeljena na mehanizmu zagovara se u klinici s objašnjenjem da može pomoći objasniti različitost i kompleksnost kliničkih prezentacija boli te poboljšati kliničke ishode na način da se biraju lijekovi za koje se zna ili pretpostavlja da ciljaju dominantne neurobiološke mehanizme koji stoje iza pacijentove boli (48, 49).

Iako se bol obično smatra homogenim osjetnim entitetom, postoji nekoliko različitih vrsta boli: nociceptivna, upalna, neuropatska i funkcionalna. Neurobiološki mehanizmi odgovorni za različite vrste boli otkrivaju se u sve više detalja, pružajući uvid u način na koji različiti etiološki čimbenici stvaraju različite vrste boli i u kojih pacijenata. Osim toga, danas se realno može očekivati terapija ciljano usmjerena prema određenoj vrsti boli koju trpi individualni pacijent (50).

Bol može biti adaptivna i maladaptivna. Adaptivna bol doprinosi preživljavanju na način da štiti organizam od ozljede ili potiče cijeljenje nakon što se ozljeda dogodi. Naprotiv, maladaptivna bol je izraz patoloških zbivanja u živčanom sustavu. Adaptivna je bol nociceptivna i upalna, a maladaptivne vrste boli su neuropatska i funkcionalna (50).

### **1.4.1. Nociceptivna bol**

Prema IASP-ovoj taksonomiji, nociceptivna bol nastaje zbog stvarnog ili prijetećeg oštećenja neživčanog tkiva, a nastaje zbog aktivacije nociceptora. Ovaj je naziv osmišljen kao kontrast neuropatskoj boli, a koristi se za opisivanje boli koja nastaje ako somatosenzorni živčani sustav normalno funkcionira, za razliku od njegove abnormalne funkcije koja se viđa u neuropatskoj boli (46).

Osjetno iskustvo akutne boli uzrokovane štetnim podražajem posredovano je specijaliziranim senzornim sustavom visokoga praga. Ovaj se sustav proteže od periferije kroz kralježničku moždinu, moždano deblo i talamus do kore velikog mozga gdje se osjeti percipiraju. Kako bi se spriječilo oštećenje tkiva, ljudi nauče povezivati određene vrste podražaja s opasnošću koja se, ako je to moguće, mora izbjegavati. Ta asocijacija nastaje povezivanjem štetnih podražaja s osjetom koji je intenzivan i neugodan, odnosno osjetom boli. Stoga osjet boli mora biti dovoljno snažan da zahtijeva trenutno usmjeravanje pozornosti (50).

Nociceptivni sustav boli je uređaj za rano upozorenje, alarmni sustav koji objavljuje prisutnost potencijalno štetnog podražaja. Stoga se nociceptivna bol mora kontrolirati jedino u specifičnim kliničkim situacijama, kao što je bol nakon kliničkog zahvata ili medicinskih postupaka koji oštećuju tkivo te nakon traume. Važno je da nociceptivni sustav ne smije biti kronično onesposobljen, jer bi to značilo gubitak zaštitne funkcije koja bi vodila neminovnom oštećenju tkiva, uključujući destrukciju zglobova, gubitak vrhova prstiju i ulkuse koji nastaju zbog pritiska. Nociceptivna bol je, dakle, vitalni fiziološki osjet. Nedostatak mogućnosti osjećanja boli u pacijenata s kongenitalnom neosjetljivošću na bol uzrokuje gubitak senzornih neurona visokoga praga i smanjuje očekivano trajanje života (51).

### **1.4.2. Upalna bol**

Ako se oštećenje tkiva dogodi usprkos nociceptivnom zaštitnom sustavu, imperativ tijela mijenja se od zaštite protiv štetnog podražaja prema pospješivanju cijeljenja ozlijeđenog tkiva. Upalna bol služi za postizanje ovoga cilja. Tijekom upalne boli, osjetljivost je povećana na način da podražaji koji inače ne uzrokuju bol sada to čine. Rezultat je sprječavanje kontakta s ozlijeđenim dijelom tijela i sprječavanje pokretanja ozlijeđenog dijela tijela dok se

popravak tkiva ne dovrši – na ovaj način tijelo smanjuje daljnje oštećenje ozlijeđenog dijela tijela. Upalna bol tipično se smanjuje kako se oštećenje i upalni odgovor smanjuju. Iako je upalna bol adaptivna, evolucija nije imala u vidu da ljudi sami mogu uzrokovati oštećenje tkiva i da to može biti korisno, primjerice kirurški zahvat. Stoga je potrebno aktivno liječiti upalnu bol nakon kirurgije, kao i u pacijenata s upalnim bolestima, čime se otupljuje nociceptivni proces upozorenja. Na taj način se osjetljivost na bol ovih pacijenata normalizira, a ne uklanja (51).

### 1.4.3. Neuropatska bol

Prema IASP-ovoj taksonomiji, neuropatska bol nastaje zbog lezije ili bolesti somatosenzornog živčanog sustava. Neuropatska bol je klinički opis, a ne dijagnoza, koja zahtijeva postojanje lezije ili oštećenja koje se može dokazati, a koje zadovoljava postojeće neurološke dijagnostičke kriterije. Naziv *lezija* obično se koristi kad se tijekom dijagnostičkih postupaka utvrde abnormalnosti ili kada postoji očita trauma. Naziv *bolest* koristi se obično kad je uzrok lezije poznat, primjerice moždani udar, vaskulitis, dijabetes mellitus ili genetička abnormalnost. Naziv *somatosenzorni* odnosi se na informacije o tijelu koje uključuju visceralne organe, a ne informacije o vanjskom svijetu, kao što su vid, sluh ili njuh. Postojanje simptoma ili znakova, primjerice bol uzrokovana dodiranjem, samih za sebe ne opravdava uporabu naziva *neuropatska bol*. Neke bolesti, kao što je trigeminalna neuralgija trenutno se definiraju prema njihovoj kliničkoj prezentaciji, a ne temeljem objektivnog dijagnostičkog testiranja. Druge dijagnoze, kao što je postherpetička neuralgija, obično se definiraju temeljem povijesti bolesti. Često se tijekom dijagnostičke obrade neuropatske boli dobiju nekonzistentni podaci, a u takvim slučajevima nužna je klinička procjena kako bi se postavila dijagnoza (46).

Neuropatska bol može biti rezultat lezija perifernog živčanog sustava, kao primjerice u dijabetičara i pacijenata oboljelih od polineuropatije uzrokovane AIDS-om, post-herpetična neuralgija ili lumbalna radikulopatija. Nadalje, neuropatska bol može biti uzrok lezije središnjeg živčanog sustava, primjerice u pacijenata s ozljedom kralježničke moždine, multiplom sklerozom ili moždanim udarom (40).

Neuropatska bol je maladaptivni oblik boli. Maladaptivna bol odvojena je od štetnog podražaja ili tkiva koje cijeli. Izraz je abnormalne obrade osjetnih informacija i obično je perzistentna ili rekurentna. Maladaptivna bol je veliki klinički problem jer su mogućnosti liječenja maladaptivne boli vrlo ograničene, kao i naše razumijevanje ove vrste boli. Ukratko, maladaptivna bol bi se mogla opisati kao konstantno upaljen alarm, čak i u slučajevima kad nema opasnosti, ili kao ponavljano paljenje lažnog alarma (50).

#### **1.4.4. Funkcionalna bol**

Funkcionalna bol je novi koncept koji opisuje oblik osjetljivosti na bol u kojem se ne može uočiti neurološki deficit ili periferna abnormalnost. Kao i neuropatska bol, predstavlja maladaptivni oblik boli (50). Nastaje zbog abnormalnog odgovora ili funkcije živčanog sustava, u kojem se signali nepotrebno pojačavaju. Nekoliko čestih stanja koja se mogu svrstati u funkcionalnu bol su primjerice fibromijalgija, sindrom iritabilnog crijeva, neki oblici ne-srčane boli u prsima i tenzijska glavobolja (52-54). Nije poznato zašto središnji živčani sustav u pacijenata s funkcionalnom boli iskazuje abnormalnu osjetljivost, odnosno hiper-osjetljivost na bol (50).

#### **1.5. Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-ovisna protein kinaza II**

Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII) je enzim koji se nalazi u velikim količinama u svim stanicama živčanog sustava i ima važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, učenju i pamćenju (55). CaMKII je posrednik između oscilacija kalcija u međustaničnom prostoru i neuronskih odgovora kao što su transkripcijska i translacijska regulacija (56), funkcije receptora i membranskih kanala (57) i sinteza i oslobađanje neurotransmitera (58).



### 1.5.1. Povijest otkrića spoznaja vezanih za ulogu kalcija, kalmodulina i CaMKII

Ioni kalcija služe kao gotovo univerzalni unutarstanični signalni uređaj tijekom aktivacije stanica ljudi i životinja. Kao jedan od „drugih glasnika“, kalcij prenosi električne i kemijske poruke koje stižu s površine stanične membrane u biokemijske mehanizme unutar stanice. Kako bi se stanični procesi učinkovito kontrolirali, sam kalcij mora biti reguliran. U stanici se to postiže kontrolom kretanja izvanstaničnih iona kalcija preko stanične membrane ili otpuštanjem kalcija iz unutarstaničnih spremnika kao što je sarkoplazmatski retikulum. U tipičnoj stanici, unutarstanična koncentracija ioniziranog kalcija je oko 100 nM, ali se povećava 10 do 100 puta tijekom obavljanja različitih staničnih funkcija. U usporedbi s izvanstaničnom tekućinom, u stanici ima 12000 puta manje kalcija. Ioni kalcija aktiviraju CaMKII posredno preko stvaranja kompleksa s proteinom kalmodulinom (59).

Prve bitne informacije o molekularnim mehanizmima signalizacije kalcija potječu iz istraživanja o kontroli mišićne kontrakcije. Ebashi i suradnici su 1966. opisali „protein prijemčiv za kalcij“, nazvan troponin, za kojeg se kasnije pokazalo da je kompleks građen od tri polipeptida koji djeluju zajedno kao okidač za mišićnu kontrakciju ovisan o kalciju (60).

Kalmodulin je prvi opisao Cheung 1970., dok je Kakiuchi iste godine pokazao da je kalmodulin protein odgovoran za osjetljivost enzima na kalcij (61, 62).

Nakon prepoznavanja uloge kalcija i kalmodulina u staničnoj fiziologiji, slijedilo je opisivanje CaMKII. Prije nego je opisana kao enzim, CaMKII je bila opisana kao „glavni protein post-sinaptičke gustoće“. Važnu ulogu u opisivanju CaMKII i načina na koji se aktivira imali su Howard Schulman i Paul Greengard koji su 1978. u časopisu Nature opisali svoja istraživanja iz područja uloge kalcija u fiziologiji živčanog sustava. Do tada biokemijski mehanizmi, poput sprege podražaja i sekrecije, kao i sinteza kateholamina, nisu bili posve razjašnjeni. Znalo se da je kalcij uključen u niz biokemijskih reakcija koje su važne za sinaptičku funkciju, a kao kalcijski receptor, koji posreduje između slobodnih iona kalcija i protein-kinaze ovisne o kalciju, opisan je tzv. regulator ovisan o kalciju (engl., *calcium-dependent regulator* – CDR) (63). Schulman i Greengard su pokazali da kalcij i CDR mogu djelovati na fosforilaciju proteina direktno, stimulacijom kalcija i sustava protein kinaze ovisne o CDR-u, kao i da bi ovaj sustav mogao biti posrednik presinaptičkih funkcija kalcija, a isto tako da kalcij i CDR mogu regulirati fosforilaciju proteina neizravno (63). U svojem sljedećem radu

Schulman i Greenberg pokazuju da membrane neurona sadrže sustav za fosforilaciju proteina ovisan o kalciju, a radi se o aktivatoru protein kinaze (64).

Takashi Yamauchi i Hitoshi Fujisawa 1980. obznanjuju da su izolirali tri različite forme kalmodulin-ovisnih protein kinaza iz mozga štakora, a između ostalog i CaMKII (65). Naknadno je uočeno da CaMKII ima četiri izoforme, koje kodiraju četiri srodna, ali različita gena te su Tobimatsu i suradnici opisali njihov različit izražaj u tijelu, pri čemu se alfa i beta izoforme nalaze primarno u živčanom tkivu, dok se gama i delta izoforme mogu naći u brojnim tjelesnim tkivima (66).

Prvi radovi o CaMKII u kontekstu boli objavljeni su 1995. godine. Nakon što su Munro i suradnici 1994. pokazali da je uloga PKC kritična u dugoročnom održavanju nocicepcije (67), 1995. je ista istraživačka skupina u svojem sljedećem radu postavila hipotezu da bi CaMKII mogla biti uključena u nocicepciju jer unutarstanični signali koji vode do aktivacije PKC vjerojatno uključuju i povećanje razine  $Ca^{2+}$  iona (68), a i već je dokazana uloga CaMKII u dugoročnoj potencijaciji (69). Young i suradnici potvrdili su svoju hipotezu, pokazavši 1995. da CaMKII može imati ulogu u trajnoj nocicepciji i senzitivaciji neurona dorzalnoga roda (68). Iste godine istraživačka skupina Howarda Schulmana dokazuje uključenost CaMKII u molekularne mehanizme kojima se signaliziranje mu opioidnih receptora desenzitivira i regulira na staničnoj razini, zaključujući da bi to mogao biti mehanizam kojim nastaje tolerancija na opioide u ljudi (70).

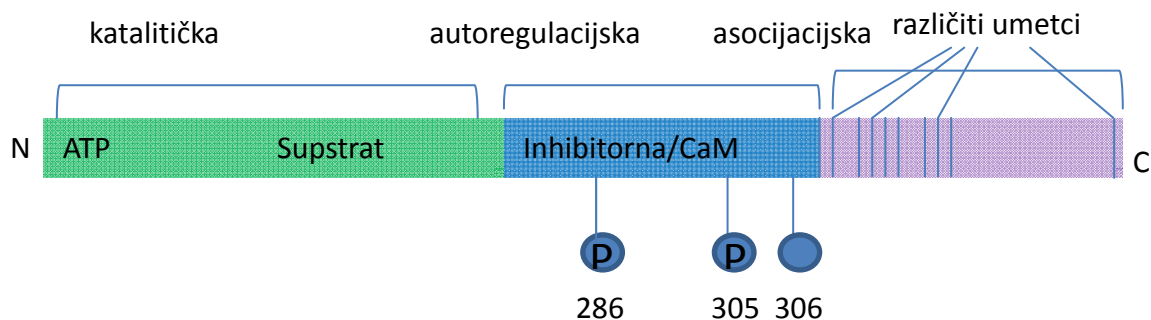
Osim u istraživanju boli, osobito su značajna istraživanja CaMKII u kontekstu memorije i dugoročne potencijacije, koja je provodio Eric R. Kandel, dobitnik Nobelove nagrade za fiziologiju/medicinu 2000. godine. Na istim principima temelje se teorije o ulozi CaMKII u razvoju kronične boli. Istražujući organizam *Aplysia californica* Kandel je sa suradnicima utvrdio da sinaptička plastičnost i učenje uključuju različite mehanizme, ovisno o stupnju plastičnosti i povijesti plastičnosti, ili meta-plastičnosti. Kandelov tim je ova pitanja istražio proučavanjem mehanizama sinaptičke plastičnosti u semi-intaktnim preparatima Aplysije, pri čemu je uočeno da ne samo mehanizmi nego i mjesto plastičnosti ovise i o stupnju plastičnosti i o meta-plastičnosti tijekom oblikovanja memorije (71). Prethodno je utvrdio da se komponente dugoročne potencijacije mogu ukinuti inhibitorima CaMKII (72), da CaMKII regulira frekvenciju odgovora sinapsi u hipokampusu (73), da je CaMKII uključena u prostornu, ali ne u kontekstualnu memoriju (74) i da se pomoću CaMKII može kontrolirati formiranje memorije (75).

### 1.5.2. Izoforme CaMKII

CaMKII je multifunkcionalna serin/treonin kinaza sa širokim spektrom supstrata. U neuronima viših kralježnjaka CaMKII se nalazi u četiri izoforme:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  (76) koje su proizvodi četiriju zasebnih gena (66). Izoforme  $\alpha$  i  $\beta$  primarno se nalaze u središnjem živčanom sustavu, dok se izoforme  $\gamma$  i  $\delta$  mogu naći u svim tkivima. Izoforma  $\alpha$  najčešće je istraživana, o ulozi CaMKII $\beta$  zna se malo, a o izoformama  $\gamma$  i  $\delta$  gotovo ništa (77). Izoforme  $\alpha$  i  $\beta$  mogu se izolirati kao podjedinice enzimatskog kompleksa koji se sastoji od 8 do 12  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica (450 do 650 kDa). Ove podjedinice su prisutne u omjeru 3:1, no važno je imati na umu da je ovaj omjer samo prosjek sastava koji može biti heterogeni raspored holoenzima formiranih od različitih kombinacija  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. Neki autori pretpostavljaju da se CaMKII koja se nalazi u prednjem dijelu mozga sastoji uglavnom od homomultimera ovih dviju podjedinica. Dokazano je da se u piramidalnim stanicama hipokampusa kodiranje glasničke RNA za CaMKII $\alpha$  događa u velikoj koncentraciji u dendritima, dok je za distribuciju  $\beta$  podjedinica kodiranje ograničeno na tijelo neurona, što ukazuje da je glasnička RNA za CaMKII $\alpha$  lokalno translatairana u polisome lokalizirane u dendritima i da su holoenzimi koji se tamo sintetiziraju primarno sastavljeni od  $\alpha$  podjedinica (78-80).

### 1.5.3. Regulacija enzimske aktivnosti CaMKII

Holoenzimatski sastav CaMKII važan je modulator za ponašanje ovog enzima. Regulacija enzimske aktivnosti ukazuje na autoinhibiciju pseudo-supstratima, što u osnovnom stanju okupira aktivno mjesto enzima i inhibira vezanje supstrata. Slika 1 prikazuje funkcionalne domene enzima CaMKII (59).



**Slika 1.** Shematski prikaz funkcionalnih domena CaMKII $\alpha$ . Štakorska CaMKII  $\alpha$  je polipeptid sastavljen od 478 aminokiselina. Na N terminalu (aminokiseline 1-128) nalazi se katalitička domena kinaze koja uključuje mjesto za vezanje Mg<sup>2+</sup>/ATP i mjesto raspoznavanja supstrata. Aminokiseline 281-314 definiraju takozvanu regulacijsku domenu koja se može rastaviti na dvije međusobno preklapljene regije: auto-inhibitorna domena i domena za vezivanje kalmodulina. C terminal (aminokiseline 315-478) sudjeluje u sastavljanju holoenzima. Legenda: ATP=adenozin-3-fosfat, CaM=kalcij-kalmodulin kompleks.

Vezivanje kalcija i kalmodulina aktivira CaMKII preko interakcije sa sekvencom koja se preklapa s katalitičkom domenom, pri čemu se mijenja konformacija i oslobađa se aktivno mjesto. Aktivirana kinaza fosforilira vanjske supstrate, a može se i autofosforilirati. Ovaj fenomen se događa na 286. aminokiselini treonin i zahtijeva vezivanje kalcija i kalmodulina za dvije podjedinice od kojih se prva ponaša kao kinaza, a druga služi kao supstrat (81, 82).

Autofosforilacija smanjuje disocijaciju kalmodulina za više od tri reda veličine, nakon čega autofosforilirani enzim zadržava svoju aktivnost čak i nakon što se kalmodulin odvoji od njega. Zarobljavanje kalmodulina ga održava vezanim za CaMKII na duže vrijeme i povećava vjerojatnost da će više podjedinica ući u zarobljeno stanje, što povećava broj aktiviranih molekula kinaze (81, 82).

U određenim regijama mozga (83) i neuronskim organelama kao što su hipokampalni postsinaptički prostori CaMKII predstavlja znatan postotak ukupnog proteinskog sastava (84). Ovako velike koncentracije CaMKII vrlo vjerojatno prelaze molarni omjer CaMKII naprema kalmodulinu, što potiče reakciju među njima i konverziju CaMKII u aktivnu formu koja ima veliki afinitet za vezivanje kalcija i kalmodulina. Ovo može pridonijeti substancičnoj

redistribuciji kalmodulina za vrijeme jakih promjena oscilacija kalcija, što utječe na dostupnost kalmodulina i regulaciju kalmodulin-ovisnih živčanih impulsa čija aktivacija može imati veliki utjecaj na autofosforilaciju na 286. kiselini treonin. Dakle, brza autofosforilacija rezultira autonomnom i konstitucijski aktivnom formom CaMKII koja katalizira dodatne autofosforilacije na različitim mjestima i sposobna je pretvoriti prolazna povećanja koncentracije kalcija u stanici u promjenu aktivnosti i fosforilaciju ciljnih proteina (85).

#### **1.5.4. Uloga CaMKII u sinaptičkoj plastičnosti i pamćenju**

U zadnjim desetljećima napravljeno je mnogo interdisciplinarnih istraživanja s ciljem objašnjavanja molekularnih i staničnih mehanizama odgovornih za učenje i pamćenje. Većina istraživanja pokušala je dokazati postulat koji je 1949. postavio Donald Haub, a koji pretpostavlja da će se sinapsa ojačati ako se presinaptički i postsinaptički neuroni istodobno aktiviraju. Danas je općenito prihvaćena hipoteza da pohrana novih informacija u formu dugoročnog pamćenja zahtijeva aktivno-ovisne plastične mehanizme, kao što su oni koji uključuju dugoročnu potencijaciju (86-90).

U CA1 regiji hipokampusa dugoročna potencijacija izaziva se promjenama u frekvenciji intradendritskih oscilacija kalcija kojom upravljaju N-metil D-aspartat (NMDA) glutaminski receptori. Ova činjenica ukazuje na potrebu za molekulama koje su sposobne osjetiti i na odgovarajući način protumačiti postsinaptička povećanja kalcija prouzrokovana aktivacijom NMDA receptora. Dokaz da je CaMKII *in vitro* sposobna dekodirati poruku koju izražava amplituda i vremensko trajanje individualnog povećanja kalcija i prevodi je u jedinstvene količine autonomne aktivnosti upućuje na to da CaMKII može biti ta tražena molekula (91).

Niz dokaza pokazuje da CaMKII ima istaknutu ulogu u ranoj fazi dugoročne potencijacije i tijekom oblikovanja različitih tipova memorije. U CA1 regiji hipokampusa, indukcija dugoročne potencijacije ovisne o NMDA receptorima uzrokuje brzo povećanje autonomne aktivnosti CaMKII i njenu autofosforilaciju (92). Postsinaptičko vezivanje kalcija i kalmodulina inducira aktivaciju CaMKII i sinaptičku potencijaciju (93), a inhibicija postsinaptičke CaMKII prekida indukciju dugoročne potencijacije (94). Tetanusna stimulacija povećava dendritsku sintezu i akumulaciju CaMKII u hipokampusnim neuronima, a injekcija konstitucijski aktivne forme kinaze u CA1 piramidalne neurone uzrokuje jačanje ekscitatornih

postsinaptičkih struja, te posljedično prekida dugoročnu potencijaciju (95). Nadalje, ciljana inhibicija CaMKII $\alpha$  uzrokuje slabljenje dugoročne potencijacije (96).

Dugoročna memorija se, ovisno o mehanizmu kojim nastaje, može podijeliti u asocijativnu i neasocijativnu. Asocijativna memorija temelji se na stvaranju prediktivnih veza između specifičnog događaja i stimulansa. Neasocijativna memorija nastaje kada ponavljano ili kontinuirano izlaganje novom podražaju mijenja bihevioralni odgovor na taj podražaj. Kod sisavaca, neke forme asocijativne i neasocijativne memorije uključuju sudjelovanje *gyrusa dentatusa* (97).

Korištenje transgenične tehnologije zajedno s farmakološkim i biokemijskim pristupima nedvojbeno je pokazalo da je aktivacija CaMKII potrebna za formiranje asocijativne memorije u raznim životinjskim modelima. Genetski modificirane muhe koje izražavaju specifični peptidni inhibitor CaMKII imaju ozbiljne poteškoće u pamćenju (98). U miša, izražaj konstitucijski aktivne CaMKII neovisne o kalciju rezultira poteškoćama u prostornom pamćenju i kondicioniranju straha (75). Homozigotni CaMKII $\alpha$  miševi pokazuju slabljenje prostorne memorije (99). CaMKII heterozigotni miševi pokazuju visoki nivo retencije, odnosno zapamćene materije u memoriji, u testovima ponašanja jedan do tri dana nakon testiranja, no zaborave zapamćeno deset do pedeset dana poslije testiranja (100).

Testovi ponašanja u štakora su pokazali da im je učenje povezano s brzim i specifičnim porastom hipokampusne CaMKII aktivnosti (101), a farmakološki dokazi pokazuju da je sudjelovanje CaMKII ograničeno na kratko vrijeme poslije testiranja i to uglavnom u događanjima vezanim za stvaranje dugoročne memorije. Za dugoročnu retenciju naučenog ponašanja mjenog 24 h poslije testiranja, intrahipokampalna infuzija blokatora CaMKII prouzrokuje samo djelomičnu amneziju. Ukoliko se blokator doda 2 ili 3 h poslije, ne dolazi do nikakvih posljedica na formiranje dugoročnog pamćenja testiranja (102). Tan i Liang su uočili povećanje aktivnosti CaMKII u amigdaloidnoj jezgri nakon testiranja štakora testom prilagodbe na novi okoliš (103). Oni su također dokazali da testiranje štakora u Morrisonovom bazenu inducira aktivaciju CaMKII u hipokampusu štakora, te da je retencija memorije ovisna o stupnju hipokampusne CaMKII autonomne aktivnosti (104).

Mnogo manje je poznata uloga hipokampusne CaMKII u formiranju nesocijativne memorije. Pomoću jednog od osnovnih neasocijativnih testiranja učenja – testa prilagodba ponašanja na novi okoliš, dokazano je da blokiranje CaMKII u dva vremenska perioda, jednom za vrijeme testiranja i drugi put 3 h nakon testiranja, smanjuje sposobnost prilagodbe na novi okoliš.

Inhibicija drugih hipokampusnih signalnih putova koji su uključeni u mnoge asocijativne zadatke nema nikakav utjecaj na dugoročno pamćenje habituacije (105, 106).

Nasuprot informacijama o prikupljanju i jačanju memorije, informacije o molekularnim mehanizmima mnogih memorijskih pristupa, a posebice uloge CaMKII u ovom procesu, štute su i fragmentirane. Koristeći bihevioralni test naučenog izbjegavanja prepreka pronađeno je da inhibicija CaMKII u CA1 prije testiranja s dozama CaMKII inhibitora KN-62 dovoljno jakim da blokiraju formiranje memorije kada se unesu u organizam odmah nakon testiranja (102), ne mijenja rezultate retencijskog testa (107).

Hipokampusna CaMKII vrlo vjerojatno je uključena u najvažnije mehanizme obrade memorije. Nekoliko farmakoloških intervencija je omogućilo razlikovanje između najvažnijih i modularnih mehanizama u formiranju memorije. Primjerice, izazvano smanjenje memorije koje ide preko modularnih mehanizama, kao što je elektro-konvulzivni šok ili sistematski  $\beta$  endorfin, može se smanjiti različitim lijekovima i hormonima. Nasuprot tome, memorija izgubljena inhibicijom hipokampusne CaMKII ne može se povratiti aktivacijom drugih signalnih putova u CA1 regiji hipokampusa niti s vazopresinom danim za vrijeme prisjećanja, a to su dvije dobro poznate terapije za poticanje memorije (108, 109).

CaMKII se može translocirati u postsinaptički prostor i pretpostavlja se da ona tu igra svoju najvažniju ulogu u plastičnosti memorije. CaMKII fosforilira nekoliko supstrata u postsinaptičkom prostoru. Među njima je i PSD-95 (engl., postsynaptic density protein 95) koji pripada gvanilat kinazama, skupini proteina vezanih za membranu, i čini glavnu komponentu postsinaptičkog prostora (110). CaMKII fosforilira i GluR1 (glutamatni receptor 1) podjedinicu AMPA (engl.,  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) receptora (111), te NR2A (NMDA receptor 2A) i NR2B (NMDA receptor 2B) podjedinice NMDA receptora (112), mijenjajući njihova svojstva na način koji ukazuje na to da to pridonosi stvaranju dugoročne potencijacije. U dugoročnoj potencijaciji CaMKII može vezati više supstrata uključujući i transmembranski glikoprotein densin-180, koji je uključen u organizaciju substaničnog razvrstavanja multimolekularnih kompleksa (113), F-aktin (114) i NMDA receptor. Za vezivanje CaMKII $\alpha$  za NR2B podjedinicu potrebna je prethodna autofosforilacija na 286. aminokiselini treonin (115), a defosforilacija CaMKII potiče njeno oslobađanje od postsinaptičkog prostora pomoću proteina fosfataze 1 (engl., *phosphoprotein phosphatase 1 – PPI*) (116).

NR2B sadrži dvije regije na koje se veže CaMKII: mjesto za vezanje ovisno o autofosforilaciji (NR2B-P) i mjesto za vezanje ovisno o vezivanju kalcija i kalmodulina (NR2B-C). Vezivanje CaMKII za NR2B-C povećava afinitet za kalmodulin, slično kao kod autofosforilacije. Sekvenca NR2B-C je homologna segmentu CaMKII koji okružuje 286. aminokiselinu treonin u autoinhibitornoj domeni CaMKII $\alpha$ . Interakcija CaMKII s ovom regijom NR2B-C potiče fosforilaciju peptida i ireverzibilnu autofosforilaciju kinaze bez spajanja kalcija i kalmodulina. Ova interakcija također blokira inhibiciju sekundarne autofosforilacije CaMKII koje se događa na 305. aminokiselini treonin i koju obično inicira disocijacija kalmodulina s autonomnog enzima. Na ovaj način, vezivanje CaMKII i NMDA receptora može slijediti nakon malog povećanja koncentracije kalcija u dendritu koje nije dovoljno da inicira autofosforilaciju na 286. aminokiselini treonin. Vezivanje CaMKII za mjesto na NR2B na kojem se ne događa fosforilacija može olakšati autofosforilaciju na 286. aminokiselini drugih podjedinica na translociranom holoenzimu, što povećava snagu interakcije potičući vezivanje autofosforiliranih podjedinica na mjesta ovisna o fosforilaciji na NR2B (117).

Vezivanje CaMKII s NMDA receptorom može se također dogoditi kroz interakciju s NR2A podjedinicom. Di Luca i suradnici identificirali su sekvencu na C terminalu NR2A (aminokiseline 1412. do 1419.) koje imaju sposobnost specifičnog vezanja za CaMKII (118). Autofosforilacija NR2A smanjuje vezivanje CaMKII $\alpha$  za NMDA receptor bez utjecaja na ukupnu količinu CaMKII prisutnu u substancijskoj frakciji hipokampusa štakora. Nadalje, PSD-95 koji inducira nagomilavanje kanalnih proteina u postsinaptički prostor direktno se natječe s CaMKII za vezivanje na NMDA receptor (119). Aktivacija CaMKII koja se događa na lateralnoj i bazolateralnoj amigdali nakon prisjećanja uključuje NR2A podjedinicu, pa možemo pretpostaviti da postoji funkcionalna veza između ove podjedinice i regulacije CaMKII kaskade koja slijedi nakon izražaja mnemoničkog traga (120).

Opisani rezultati, zajedno s onim rezultatima koji govore da je sinaptičko grupiranje CaMKII $\alpha$  u potpunosti ovisno o neaktivnom aktinskom citoskeletu (114), navode nas na zaključak da je lokalizacija CaMKII blizu postsinaptičkih receptora složen proces koji zahtijeva nekoliko kinaza, fosfataza i građevnih proteina. Činjenica da je CaMKII sposobna fosforilirati nekoliko supstrata odjednom ukazuje da je ovaj enzim sposoban modulirati svoju brzinu vezivanja mijenjanjem svojstava proteina s kojima je u interakciji. Ovu je hipotezu potvrdilo otkriće da CaMKII fosforilacija proteina u postsinaptičkom prostoru inhibira njenu translokaciju (121).



### 1.5.5. Efektori CaMKII kaskade

Translokacija i aktivacija CaMKII pridonosi nastanku dugoročne potencijacije, što je povezano s formiranjem nove memorije. CaMKII fosforilira nekoliko proteina vezanih u postsinaptičkom prostoru uključujući PSD-95,  $\alpha$  i  $\beta$  tubulin, GTPazu dinamin, tip IV intermedijarnog filamentnog proteina  $\alpha$ -interneksin i cAMP fosfodiesterazu (121), iako funkcionalne posljedice većine ovih fosforilacija još uvijek nisu poznate. Unatoč tome, postoje dokazi koji daju zaključiti da je jedan od najvažnijih događaja posredovanih s CaMKII u ranoj fazi dugoročne potencijacije povezan s povećanjem razine izražaja AMPA receptora (122).

CaMKII autofosforilira GluR1 podjedinicu AMPA receptora na 831. aminokiselini serin, a dokazano je da ova fosforilacija omogućuje struje posredovane AMPA receptorima (123), najvjerojatnije putem mehanizma koji uključuje stabilizaciju receptora u stanje visoke provodljivosti (124). Stimulacija NMDA receptora potiče fosforilaciju AMPA receptora ovisnu o kalciju i CaMKII (125), te indukciju dugoročne potencijacije uz odgađanje poticanja odgovora posredovanih s AMPA receptorima nakon kojih slijedi fosforilacija GluR1 ovisna o CaMKII na 831. aminokiselini (122). Testovi prilagodbe na novi okoliš kod štakora su pokazali da je učenje povezano s fosforilacijom GluR1 u hipokampusu, i to najvjerojatnije putem mehanizama koji uključuju aktivaciju CaMKII (126).

Uz direktni učinak fosforilacije GluR1 podjedinice na elektrofiziološke karakteristike AMPA receptora, moguće je da CaMKII sudjeluje u nekim drugim procesima koji su uključeni u plastične promjene ovih receptora. Veliki postotak sinapsi u CA1 području hipokampusa prenosi signale preko NMDA receptora, umjesto AMPA receptora, što upućuje na to da AMPA receptori nisu funkcionalni pri normalnim potencijalima u stanju mirovanja. Te iste sinapse zahtijevaju AMPA tip odgovora za dugoročnu potencijaciju (127).

Ova otkrića, zajedno s ranijim rezultatima koja su pokazala da i dugoročna potencijacija inducirana glicinom u hipokampusnim rezovima (128) i *in vivo* inducirana dugoročna potencijacija u hipokampusu štakora (129) povećavaju broj  $^3\text{H}$ -AMPA spojnih mjesta (ligandi koji se specifično vežu za AMPA receptore), nametnula su hipotezu „tihe sinapse“. Ova hipoteza pretpostavlja da dugoročna potencijacija konvertira sinapse u kojima nema AMPA

receptorskih odgovora u potpuno funkcionalne AMPA terminale, moguće pomoću unosa AMPA receptora u sinapsu (130).

Hipotezu „tihe sinapse“ je potvrdio dokaz da indukcija dugoročne potencijacije uzrokuje redistribuciju GluR1 podjedinice obilježene zelenim fluorescentnim proteinom iz međustaničnih bazena u dendrične spine. Ova redistribucija ovisna je o NMDA receptorima. Iako je ovaj proces neovisan o fosforilaciji GluR1 na 831. aminokiselini serin, može biti doslovno kopiran preko aktivacije CaMKII (131). Spontana aktivacija NMDA receptora u kulturi neurona hipokampusa izaziva brzu regrutaciju NMDA receptora u morfološki tihe sinapse, primjerice sinapse koje sadrže NMDA receptore, a ne sadrže AMPA receptore, a zatim dolazi do translokacije CaMKII u te sinapse i do fosforilacije GluR1 na 831. aminokiselini serin (132).

KN-62 je specifični inhibitor CaMKII koji blokira NMDA-inducirano povećanje GluR1, GluR2 i GluR3 povezanih s hipokampusnim sinaptičkim plazma membranama (SPM) (133), a inkubacija hipokampusnih SPM pod uvjetima pogodnima za aktivaciju i autofosforilaciju CaMKII, potiče CaMKII-ovisno povećanje <sup>3</sup>H-AMPA spojnih mjesta (126) što ukazuje da CaMKII sudjeluje u ovom mehanizmu umetanja i objašnjava opaženi porast hipokampusnih <sup>3</sup>H-AMPA spojnih mjesta nakon testiranja štakora testom prilagodbe na novi okoliš (134).

### 1.5.6. Uloga CaMKII u nastanku neuropatske boli

CaMKII igra važnu ulogu u reguliranju prolaska kalcija kroz membranu dendrita (135). CaMKII pretvara prolazna povećanja kalcija u stanici u promjene aktivnosti i fosforilaciju ciljnih proteina (136). Ovaj enzim se nalazi u velikim količinama u neuronima, uključujući primarne osjetne neurone u spinalnom gangliju. Autofosforilirana CaMKII zadržava aktivnost neovisno o daljnjoj stimulaciji kalcijem tako da zadržava autonomnu aktivnost dugo nakon prolaznog povećanja kalcija i na taj način obavlja funkciju molekularne memorije stanične aktivnosti (137). Obično je oko 30% CaMKII u fosforiliranom stanju, ali ponavljani ulazak kalcija u stanicu povećava aktivnost enzima (82). Istraživanjima na osjetnim neuronima potvrđeno je da CaMKII djeluje kao detektor učestalosti podražaja neurona i da pamti podražaj i nakon što je on završio (138). Stoga je CaMKII atraktivan kandidat za istraživanje neuropatske boli u neuronima.

Smanjenje razine CaMKII dovodi do pada razine kalcijevih struja (139). Voltažni kalcijevi kanali (engl., *voltage-gated calcium channels – VGCC*) supstrati su za CaMKII (140). CaMKII potiče strujanje iona kroz ove kanale, a selektivnom blokadom aktivnosti CaMKII mogu se smanjiti različite vrste ovih kalcijevih struja (141). Kalijeve struje ovisne o kalciju važne su jer sudjeluju u smanjenju naknadne hiperpolarizacije. Što je kraća naknadna hiperpolarizacija, to je podražljivost neurona veća (142).

Smanjenjem ili blokiranjem aktivnosti CaMKII smanjuju se struje važne za naknadnu hiperpolarizaciju, što dovodi do pojačanog okidanja osjetnih neurona i temelj je za pojavu osjeta neuropatske boli. Smanjenje kalcijevih struja pojačava podražljivost osjetnih neurona spinalnog ganglija (143). Dokazano je da se u neuropatskoj boli uzrokovanoj ozljedom smanjuje ulazak kalcija u osjetne neurone, što povećava njihovu podražljivost i pridonosi nastanku ponašanja karakterističnog za neuropatsku bol u štakora (144-146). Sve navedeno dokazuje kako je enzim CaMKII vrlo važan u održanju uredne ravnoteže ionskih struja i za normalnu podražljivost neurona.

CaMKII $\alpha$ , glavna CaMKII izoforma izražena u središnjem živčanom sustavu, nalazi se zajedno sa  $\mu$  opioidnim receptorima u različitim regijama mozga u kojima se obrađuje osjet boli, uključujući i površinske slojeve leđne moždine i spinalne ganglije (147). U spinalnim ganglijima, CaMKII $\alpha$  se nalazi u neuronima malog promjera koji su povezani s prijenosom osjeta boli (148-150). Promjene u izražaju CaMKII u spinalnim ganglijima povezane su s

različitim simptomima neuropatske boli kao što su hiperalgezija – pretjerani odgovor na bolni podražaj) ili alodinija – pojava osjeta boli nakon podražaja koji obično ne prouzrokuje bol u modelima neuropatske boli izazvane ozljedama perifernog živca (151-153), kao i s visceralnom preosjetljivošću u modelu visceralne boli (152).

U Laboratoriju za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu izražaj CaMKII u spinalnim ganglijima već je istraživani i dosadašnji su pokusi na modelu neuropatske boli pokazali da presjecanje perifernih neurona smanjuje izražaj pCaMKII $\alpha$  u osjetnim neuronima spinalnog ganglija (154) Taj rezultat ukazuje na to da bi CaMKII mogla biti uključena u prijenos nociceptivnih informacija nakon ozljede perifernog živca, i pridonijeti nastanku neuropatske boli. Naime, neuroni spinalnih ganglija u štakora značajno se mijenjaju nakon indukcije dijabetesa i posljedično nastaju promjene živčanog tkiva (155), promjene u kalcijskim strujama i povećana stanična podražljivost (24).

Inhibicija CaMKII pomoću specifičnog inhibitora KN-93 sprječava nastanak termalne hiperalgezije i mehaničke alodinije u modelu upalne boli (156) i u modelu kronične konstriktivne ozljede (157). Inhibicija CaMKII nakon presjecanja donjeg alveolarnog živca smanjuje mehaničku alodiniju u ovom modelu neuropatske boli (157).

CaMKII bi stoga mogla biti potencijalna nova farmakološka meta za liječenje neuropatske boli. Na tragu ovih istraživanja, predlaže se istraživanje povezanosti izražaja CaMKII i ponašanja povezanoga s boli u štakorskom modelu dijabetesa tip 1 i 2.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza istraživanja je da se izražaj CaMKII u spinalnom gangliju smanjuje, a ponašanje povezano s boli povećava u spinalnim ganglijima dijabetičkih štakora dva tjedna i dva mjeseca nakon uspješne indukcije dijabetesa, te da će već dva tjedna nakon indukcije dijabetesa biti vidljive spolne razlike u ponašanju povezanom s boli i izražaju CaMKII u spinalnim ganglijima.

Pretpostavka je da sniženje razine CaMKII nije jednako u svim neuronima i da do gubitka CaMKII dolazi u neuronima maloga promjera. Također će se utvrditi koja izofoma CaMKII ima najveću ulogu u osjetnim neuronima spinalnih ganglija u dijabetičkoj neuropatiji. Pretpostavlja se da je od četiri izoforme CaMKII koje se mogu naći u neuronima spinalnih ganglija alfa izoforma najvažnija u patogenezi neuropatske boli.

Značajne promjene ponašanja povezanog s boli očekuju se na testovima kompleksnog hiperalgezijskog odgovora, kao i na testovima termalnih i mehaničkih podražaja.

Ne očekuje se postojanje spolnih razlika u izražaju CaMKII i ponašanju povezanom s boli.

### 3. METODE I MATERIJALI

#### 3.1. Etička pitanja

Svi eksperimentalni postupci i protokoli učinjeni su prema IASP-ovim uputama za etičko istraživanje eksperimentalne boli u životinja pri svijesti. Također, sve postupke je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu. Istraživanja su provedena na način da se izbjegne nepotrebna bol i neugoda životinja, prema preporuci američke Nacionalne akademije znanstvenih instituta za istraživanja na životinjama u sljedećim dokumentima: Politika javnog zdravstva o humanoj brizi i korištenju laboratorijskih životinja (engl., *Public Health Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*) i Vodič za brigu o laboratorijskim životinjama i njihovo korištenje (engl., *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996*).

#### 3.2. Pokusne životinje

Sprague-Dawley štakori (mase 160-180 g) za potrebe istraživanja pribavljeni su iz Nastambe za male pokusne životinje Sveučilišta u Splitu. Štakori su smješteni pojedinačno u zasebne plastične kaveze s podlogom od piljevine i kukuruzne stelje u omjeru 3:1 da bi se izbjegao razvoj kompresijske neuropatije (158). U prostoriji u kojoj su štakori bili smješteni za vrijeme istraživanja održavana je konstantna temperatura od ~22°C, a automatska izmjena dnevno-noćnih ciklusa odvijala se svakih 12 h.

Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine prema vrsti hrane koju su dobivali. Štakori korišteni za model DM1 i njihova kontrolna skupina hranjeni su *ad libitum* standardnom hranom za pokusne štakore koja se u ukupnom postotku kalorijskog unosa sastoji od 9% masti, 27% proteina i 64% ugljikohidrata (4RF24 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija). Štakori koji su se koristili za model DM2 i njihova kontrolna skupina hranjeni su *ad libitum* masnom hranom koja se sastojala od 58% masti, 25% proteina i 17% ugljikohidrata u ukupnom kalorijskom unosu. Štakori su na početku pokusa dva tjedna hranjeni jednom od dvije vrste hrane, nakon čega su raspoređeni u dijabetičke ili kontrolne pokusne skupine (159). Da bi se uklonio mogući utjecaj uzgoja u skupinama na ponašajne odgovore životinja, svaki je štakor bio smješten zasebno u svojem kavezu. U prostoriji u kojoj su štakori bili smješteni za

vrijeme eksperimenta održavana je konstantna temperatura od ~22°C, a automatska izmjena dnevno-noćnih ciklusa se odvijala svakih 12 h.

U prvoj studiji, u kojoj su ispitivane dvotjedne i dvomjesečne promjene kod STZ-dijabetičkih modela DM1 i DM2 korišteno je ukupno 63 štakora koji su podijeljeni u sljedeće skupine:

- 1) 28 štakora kojima je induciran model DM1
- 2) 12 štakora u kontrolnoj skupini za DM1
- 3) 12 štakora kojima je induciran model DM2
- 4) 11 štakora u kontrolnoj skupini za DM2.

U dugoj studiji, u kojoj su ispitivane spolne razlike u ranom stadiju STZ-dijabetičkih modela DM1 i DM2 korišteno je 49 mužjaka i ženki Sprague-Dawley štakora koji su podijeljeni u sljedeće skupine:

- 1) 16 štakora kojima je induciran model DM1 (7 ženki i 9 mužjaka)
- 2) 10 štakora u kontrolnoj skupini za DM1 (5 mužjaka i 5 ženki)
- 3) 10 štakora kojima je induciran model DM2 (5 mužjaka i 5 ženki)
- 4) 12 štakora u kontrolnoj skupini za DM2 (6 mužjaka i 6 ženki).

### **3.3. Štakorski modeli dijabetesa**

Predložene hipoteze testirane su na štakorskom modelu dijabetesa tipa 1 i tipa 2. Za kreiranje modela dijabetesa tipa 1 (skupina DM1) štakorima je intraperitonealno injiciran Streptozotocin (STZ) svježe otopljen u citratnom puferu (pH=4,5) u dozi od 55 mg/kg i čuvan na tamnom mjestu na ledu kako bi se izbjegla degradacija pod utjecajem svjetlosti i topline. STZ je toksičan za beta stanice Langerhansovih otočića u gušterači, koje proizvode inzulin. Štakori nakon primanja injekcije STZ-a unutar 2-4 dana razvijaju hiperglikemiju koja je osnovna karakteristika dijabetesa (160). DM1 štakori tijekom cijelog trajanja pokusa hranjeni su standardnom hranom za pokusne štakore.

Za model dijabetesa tipa 2 (skupina DM2) korišten je model koji su opisali Srinivasan i suradnici (159). Štakori su 2 tjedna hranjeni masnom hranom, nakon čega su injicirani

intraperitonealno niskom dozom STZ-a od 35 mg/kg. Do žrtvovanja su se štakori nastavili hraniti hranom s visokim udjelom masti. Na ovaj način dobije se štakorski model koji se odlikuje metaboličkim abnormalnostima i sliči prirodnom razvoju dijabetesa tipa 2 u ljudskoj populaciji (159).

Dvije kontrolne skupine korištene su u studiji. Životinje iz kontrolnih skupina odgovarale su dijabetičkim životinjama po spolu i dobi. Kontrolna skupina za DM1 štakore (C-DM1) tijekom cijelog pokusa je hranjena istom hranom kao i DM1 skupina, a intraperitonealno je injicirana samo citratnim puferom. Kontrolna skupina za DM2 štakore (C-DM2) tijekom cijeloga pokusa je hranjena hranom s visokim udjelom masti, a 2 tjedna nakon početka ovakve ishrane štakori su dobili intraperitonealnu injekciju citratnog pufera.

Kako bi se utvrdila vremenska komponenta promjena u izražaju CaMKII štakori su žrtvovani 2 tjedna i 2 mjeseca nakon injekcije STZ-a ili citratnog pufera. Štakori iz DM1 skupine koji su testirani tijekom 2 mjeseca primali su jednom tjedno jednu jedinicu dugodjelujućeg inzulina (Lantus Solostar, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Njemačka) kako se ne bi razvila ketoacidoza i smanjenje tjelesne mase koji bi mogli dovesti do lošeg općeg stanja pokusne životinje. To je minimalna doza inzulina, koja se obično upotrebljava u istraživanjima dijabetičke neuropatije na STZ-modelu štakora, koja je dovoljna za održavanje dobrog stanja štakora, a nedovoljna za utjecaj na istraživane varijable.

### **3.4. Testiranje ponašanja**

Ponašanje štakora karakteristično za bol u dvotjednom je pokusu testirano prije početka pokusa, jedan dan prije injekcije i nakon toga 4., 8. i 14. dan nakon injekcije. Životinje u dvomjesečnom pokusu testirane su jednom prije injekcije, a zatim 15., 30., 45. i 60. dan nakon injekcije. Strategija bihevioralnih testiranja uključivala je mjerenje osjetnih odgovora tijekom vremena u različitim pokusnim skupinama. Odabrani su testovi primjereni promjenama koje se mogu vidjeti u kliničkoj neuropatskoj boli u ljudi (161).

Svi testovi izvedeni su na štakorima smještenim na mrežastu površinu (otvori mreže veličine 3 x 3 mm). Testirane su četiri životinje odjednom, a svaki štakor bio je u odvojenoj plastičnoj kutiji (10 x 25 x 30 cm). Testiranje uključuje podražaj plantarne kože obje stražnje šape u štakora koji se po plastičnoj kutiji mogu slobodno kretati. Pretpostavka je bila da će složeni hiperalgezijski odgovor (kompleksni odgovor životinje na bolni podražaj uz trešnju i lizanje



šape i/ili timarenje) najbolje razlikovati štakore koji razviju neuropatsku bol kao posljedicu dijabetesa. Korišteni su sljedeći testovi:

- 1) Testiranje hladnoćom – kapljica acetona se prinese srednjoj plantarnoj površini šape testirane životinje i mjeri se broj pozitivnih odgovora (broj uzmicanja šape) prilikom tri uzastopne aplikacije vremenski odvojene minimalno 30 s.
- 2) Testiranje toplinom – šapi se prinese izvor topline opremljen potenciometrom za održavanje konstantne temperature i 3 x 3 mm velikom kontaktnom površinom, a maksimalna temperatura koja se može postići je 42°C. Mjeri se vrijeme potrebno da životinja povuče šapu prilikom tri uzastopne aplikacije odvojene minimalno 1 min.
- 3) Testiranje tupom iglom – mjeri složeni hiperalgezijski odgovor na način da se vrhom tupe debele anestezijske igle (22 G) testira plantarna strana šape dovoljnom snagom da udubi kožu, a da je ne ozlijedi. U ovom testu mjeri se broj hiperalgezijskih odgovora prilikom deset uzastopnih aplikacija vremenski odvojenih najmanje 2 s. Promatra se reakcija uzmicanja, kao i složeni hiperalgezijski odgovor, koji uključuje dugotrajno držanje šape u zraku, lizanje šape, čuvanje šape i vokalizacija.
- 4) Von Freyeva vlakna (North Coast Medical Inc., Gilroy, CA, SAD) korištena su za testiranje plantarnih površina stražnjih šapa životinje na način da se vlakno dovede u kontakt sa šapom. Kontakt kože s vlaknom održavao se 2 s pritiskom dovoljno velikim da se vlakno savije. Vlakna su se koristila od najslabijeg do najjačeg kako bi se odredio prag kod kojeg životinja uzmiče šapu u 50% pokušaja (162).

### **3.5. Tjelesna masa i biokemijski parametri**

Štakorima je redovito mjerena tjelesna masa i koncentracija glukoze u plazmi na sljedeće dane: prije injiciranja na dan injekcije STZ-a ili citratnog pufera (dan 0) te nakon injiciranja 15. dan štakorima koji su živjeli 2 tjedna nakon injekcije, a svakih sljedećih 15 dana do kraja eksperimenta štakorima koji su živjeli 2 mjeseca nakon injekcije. Glukoza je mjerena iz kapljice krvi uzete iz repne vene štakora pomoću One Touch Vita glukometra (LifeScan, High Wycombe, Velika Britanija). DM1 štakori koji su nakon injekcije STZ-a natašte imali koncentraciju glukoze u plazmi manju od 300 mg/dl i DM2 štakori čija je razina glukoze u plazmi bila ispod 200 mg/dl (5 mužjaka u studiji o vremenskim promjenama i 5 mužjaka i 6 ženki u studiji spolnih razlika) smatrani su nedijabetičkim i isključeni su iz studije. Broj

preostalih štakora u svakoj pokusnoj skupini bio je 5 do 7 i sve dijabetičke životinje koje su zadržane u studiji su bile hiperglikemične za vrijeme testiranja ponašanja. Tijekom eksperimenta je uočeno pojačano konzumiranje hrane i vode (polifagija i polidipsija) u dijabetičkih u odnosu na kontrolne štakore, što je karakteristično za dijabetes.

### **3.6. Priprema tkiva za imunofluorescenciju**

Dva tjedna i dva mjeseca nakon početka eksperimenta štakori su anestetizirani 5%-tnim izofluranom u struji zraka (Forane, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Velika Britanija). Anestezija je zatim održavana intramuskularnom injekcijom ketamina (Ketaminol, Intervet, Unterschleibheim, Njemačka, 60 mg/ml) i xylazina (Xylapan, Vetoquinol, Bern, Švicarska, 50 mg/ml) u omjeru 7:1. Štakori su perfundirani kroz uzlaznu aortu preko lijeve klijetke s onoliko mililitara fiziološke otopine koji odgovaraju njihovoj masi u gramima (200 ml za životinju od 200 g) i podjednakim volumenom Zambonijevog fiksativa (4% paraformaldehida i 15% pikrinske kiseline u 0.1 M zasoljenom fosfatnom puferu (PBS) pH=7,4).

Lijevi i desni lumbalni gangliji vađeni su s dorzalne strane leđa perfundiranog štakora strogo pazeći da se stanice ganglija ne dodirnu s instrumentima i da se izbjegnu oštećenja tkiva. Nakon vađenja tkiva su fiksirana 2 h u Zambonijevom fiksativu, a zatim su prebačena u 30%-tnu otopinu saharoze u 0,01M PBS i ostavljeni preko noći. Ova hipertonična otopina izvlači svu vodu iz tkiva; na ovaj način se sprječava stvaranje kristalića leda koji bi u smrznutom tkivu mogli oštetiti stanice. Sljedeći dan su tkiva uklapana u inertni medij za uklapanje (Optimal Cutting Temperature OCT freezing medium, Tissue Tek, Tokyo, Japan) Lijevi i desni L4 i L5 gangliji su uklopljeni zajedno i rezana na kriotomu pri -22°C (Thermo Shandon Cryotome, Pittsburgh, PA, SAD). Rezovi tanki 7  $\mu$ m rezani su uzduž duge osi ganglija i stavljeni na predmetna stakalca. Na svakom predmetnom stakalcu stavljeni su paralelno gangliji dijabetičkih životinja i njima odgovarajućih kontrola. Prije imunofluorescencijskog bojanja preparati su inkubirani 1 h u 4%-tnoj blokirajućoj otopini kozjeg seruma (x0907, lot 00069899, Dako, Glostrup, Danska).

Za analizu izražaja ukupne CaMKII (tCaMKII) i njenih  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  isoformi korištena je metoda imunofluorescencije. Za analizu tCaMKII, fosforilirane CaMKII $\alpha$  izoforme

(pCaMKII $\alpha$ ) i CaMKII $\beta$  korištena su kunićja primarna poliklonalna protutijela, a za analizu CaMKII $\gamma$  i CaMKII $\delta$  korištena su kozja protutijela (Tablica 1).

**Tablica 1.** Specifikacija primarnih protutijela korištenih u istraživanju

<b>Antigen</b>	<b>Imunogen</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Razrjeđenje</b>
<b>CaMKII</b>	Aa 303-478 koji odgovara C terminalu CaMKII mišjeg podrijetla #P11798	sc-9035, lot no. F0304, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD	1:100
<b>pCaMKII<math>\alpha</math></b>	Aa 282 HRQET(-fosfo)VDCLK 291 koji sadrži fosforilirani treonin 286 od CaMKII ljudskog podrijetla #Q9UQM7	sc-12886-R, lot. no. K2305, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD)	1:100
<b>CaMKII<math>\beta</math></b>	Sintetski peptid konjugiran sa KLH koji je izveden iz ostataka 350 do 450 mišje CaMKII $\beta$	ab 34703, Abcam, Cambridge, Velika Britanija	1:100
<b>CaMKII<math>\gamma</math></b>	Peptid koji odgovara C terminalu CaMKII $\gamma$ ljudskog podrijetla	sc-1541, lot no. G2208, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD	1:100
<b>CaMKII<math>\delta</math></b>	Peptid koji odgovara internoj regiji CaMKII $\delta$ štakorskog podrijetla	sc-5392, lot. no. H1408, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD	1:100

Poliklonalno protutijelo tCaMKII (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD) prepoznaje sve CaMKII podjedinice mišjeg, štakorskog i ljudskog porijekla (prema tehničkoj podatkovnoj tablici proizvođača) i prethodno je opisano. Prepoznaje jednu traku proteina od 50 kDa tijekom Western Blot analize izražaja CaMKII u ekstraktu štakorskog mozga (prema tehničkoj podatkovnoj tablici proizvođača) koji odgovara očekivanoj molekularnoj težini CaMKII. Idenična traka je identificirana u mišjim kolagenocitima (163), ljudskim astrocitima i neuronima (164), i u ekstraktu štakorskog mozga (165).

Protutijelo pCaMKII $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD) je poliklonalno pročišćeno protutijelo uzgojeno u kuniću protiv aminokiselinskog slijeda [Aa 282 HRQET(-phospho)VDCLK 291] koji sadrži fosforilirani treonin 286 iz CaMKII $\alpha$  ljudskog porijekla. Sekvenca imunizirajućeg peptida određena je u prethodnoj publikaciji Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu (154). U ekstraktu mišjeg mozga analiziranom Western Blot metodom, ovo protutijelo prepoznaje jedinstveni bend od ~50 kDa proteina koji odgovara očekivanoj molekularnoj masi CaMKII (prema tehničkoj podatkovnoj tablici proizvođača). Slične proteinske trake identificirane su u ekstraktu ljudskih astrocita (164) i neuronima hipokampusa štakora (166). Također, specifičnost pCaMKII $\alpha$  protutijela je potvrđena preadsorpcijskom kontrolom s odgovarajućim blokirajućim peptidom (sc-12886-P, lot D2607, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD).

Pročišćeno CaMKII $\beta$  protutijelo (Abcam, Cambridge, Velika Britanija) je poliklonalno protutijelo uzgojeno u zecu protiv sintetskog peptida konjugiranog hemocijaninom, izvedeno iz ostataka od 350. do 450. aminokiseline mišje CaMKII $\beta$ . Ovo protutijelo prepoznaje jedinstvenu proteinsku traku tijekom Western Blota od 60 kDa u mišjim i štakorskim liziranim tkivima (prema tehničkoj podatkovnoj tablici proizvođača). Slične proteinske trake su nađene u ekstraktu tkiva štakorskih nukleusa akumbensa i stražnjeg striatuma (167).

Protutijelo CaMKII $\gamma$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD) je kozje poliklonalno protutijelo uzgojeno protiv peptida koji odgovara C terminalu CaMKII $\gamma$  ljudskog porijekla. Prepoznaje dvije Western Blot proteinske trake od ~43 i ~52 kDa u ekstraktu mišjeg mozga (prema tehničkoj podatkovnoj tablici proizvođača).

Protutijelo CaMKII $\delta$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD) je kozje poliklonalno protutijelo uzgojeno protiv peptida koji odgovara internoj regiji CaMKII $\delta$  štakorskog porijekla. Prepoznaje dvije Western Blot proteinske trake od ~70 kDa u ekstraktu

mišjeg mozga. Slične proteinske trake su pronađene na mišjim tkivima drugih istraživačkih skupina (169-171).

Za razrjeđivanje svih protutijela i za ispiranje preparata korištena je 0,3%-tna otopina Tritona X-100 (kat. br. 648466, lot B65241, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) u 0,1 M PBS-u. Preparati su inkubirani u otopini primarnih protutijela preko noći.

Za sekundarnu detekciju tCaMKII, pCaMKII $\alpha$  i CaMKII $\beta$  korišteno je biotinizirano kozje sekundarno protutijelo (1:100, sc-2040, lot no. L0309, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD), a za vizualizaciju je upotrijebljen konjugat Streptavidin Alexa Fluor 488 (1:500; S-32354, lot 508205, Molecular Probes, Eugene, OR, SAD). Primarna protutijela za CaMKII $\gamma$  i CaMKII $\delta$  detektirana su magarećim sekundarnim protutijelom (1:100, sc-2476, lot no. K1408, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD).

Nakon 1,5 h inkubacije preparata u otopinama sekundarnog protutijela i 0,5 h inkubacije u otopini konjugata Streptavidin Alexa Fluora, preparati su ispirani u otopini tritona x-100 u PBS-u i preklopljeni pokrovnica s ljepljivom tekućinom za pokrivanje histoloških rezova (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Za kontrolu sekundarnih protutijela, dijelu preparata je u proceduri bojanja izostavljena inkubacija u primarnim protutijelima. Ovim bojanjima nije dobiven fluorescentni signal i potvrđena je specifičnost korištenih sekundarnih protutijela.

### **3.7. Analiza slika i kvantifikacija**

Svaki četvrti rez spinalnih ganglija snimljen je mikroskopom (BX61, Olympus, Tokio, Japan), korištenjem hladene digitalne kamere (DP71, Olympus, Tokio, Japan). Sve slike su snimljene pri povećanju 40x i pri istoj vremenskoj ekspoziciji za svako pojedino bojanje. Za analizu su izabrane samo slike u kojima neuroni pokrivaju više od 80% površine. Zelena fluorescentna boja je sa slika uklonjena pretvorbom u nijanse sive boje pomoću računalnog programa Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, SAD). Nakon toga, slike su prebačene u računalni program Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, SAD) u kojem su obrađene kao monokromne mikrofotografije (2040x1536 piksela, 12 bitova, 0-4096 razina sive boje). Na vidnim poljima veličine 100x100  $\mu$ m mjereno je intenzitet fluorescencije i površina svakog pojedinog neurona s vidljivom jezgrom. Dobiveni podatke o intenzitetu fluorescencije podijeljeni su na tri skupine ovisno o veličini neurona: mali neuroni (promjer

manji od 30  $\mu\text{m}$ ), srednje veliki neuroni (promjer od 30 do 40  $\mu\text{m}$ ) i veliki neuroni (promjer veći od 40  $\mu\text{m}$ ). Analiza mikrofotografija Metamorphom je rađena izuzetno pažljivo i vodilo se računa o tome da se mjerenja vrše samo na stanicama s jasno vidljivim jezgrama. Za svaki korišteni protokol, izabrano je pet slika za analiziranje po životinji. Analizirano je oko 150 stanica po svakoj životinji kod svake imunofluorescencijske metode koja je korištena u radu, s ciljem da analiza bude što objektivnija. Rezultati intenziteta imunoflorescencije su u studiji spolnih razlika normalizirani prema vrijednostima za kontrolne životinje.

### **3.8. Statistički postupci**

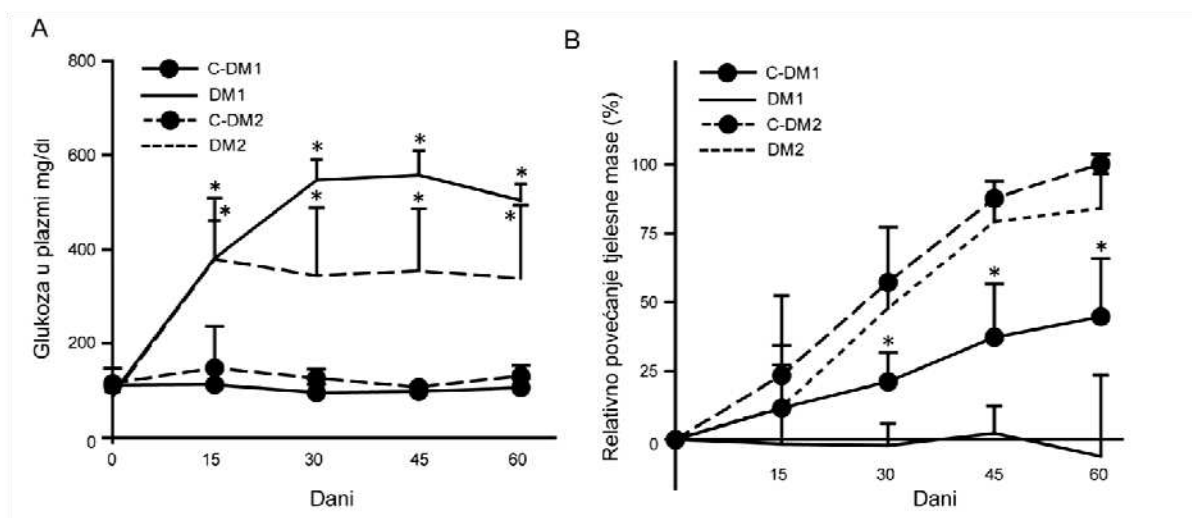
Za usporedbu između kontrolnih i dijabetičkih neuronalnih skupina korišten je t-test ili analiza varijance (ANOVA) za procjenu glavnog učinka, a razlike među skupinama utvrđivane su Fisherovim post hoc testom. Testovi ponašanja su analizirani ANOVA testom za ponovljena mjerenja. Za statističke postupke korišten je računalni program Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD). Razina značajnosti bila je postavljena na  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Validacija životinjskih modela za indukciju dijabetesa tipa 1 i tipa 2

Koncentracija glukoze u plazmi značajno se povećala u DM1 i DM2 skupinama štakora nakon injekcije STZ-a. Glukoza u plazmi DM1 i DM2 životinja na 15., 30., 45., i 60. dan eksperimenta bila je statistički značajno veća u usporedbi s vrijednostima prije indukcije dijabetesa (ANOVA  $F(4,76)=117,2$ ,  $p<0,001$ ) i u usporedbi s vrijednostima u kontrolnim životinjama (ANOVA  $F(4,20)=3,65$ ,  $p<0,05$ ). Nakon 15. post-injekcijskog dana, kada je plazma u glukozi DM1 životinja bila  $380\pm 16,2$  mg/dl, a u DM2 životinja  $378\pm 37,6$  mg/dl, DM2 životinje su zadržale konstantne vrijednosti glukoze u plazmi sve do kraja eksperimenta, a u DM1 životinja su se vrijednosti glukoze u plazmi kontinuirano povećavale sve dok nisu dosegle maksimum na 30. dan pri  $546\pm 11,7$  mg/dl. C-DM1 i C-DM2 životinje su tijekom cijelog eksperimenta zadržale normalne vrijednosti glukoze u plazmi, koje se nisu razlikovale od početnih vrijednosti ( $111\pm 4,2$  mg/dl kod C-DM1 životinja i  $115\pm 9,54$  mg/dl kod C-DM2 životinja) (Slika 2A).

Tjelesna masa DM1 životinja nije se povećala nakon indukcije dijabetesa, naprotiv, nakon dva mjeseca je DM1 skupina izgubila  $6\pm 7,9\%$  svoje početne tjelesne mase. Istovremeno, C-DM1 životinje su udvostručile svoju početnu tjelesnu masu (povećanje od  $45\pm 9,0\%$ ) (ANOVA  $F(1,19)=21,62$ ,  $p=0,002$ ). Na kraju eksperimenta je DM2 skupina dobila  $84\pm 6,2\%$ , a C-DM2 grupa je dobila  $100\pm 2,2\%$  dodatne tjelesne mase (Slika 2B), i ove vrijednosti se nisu statistički razlikovale.



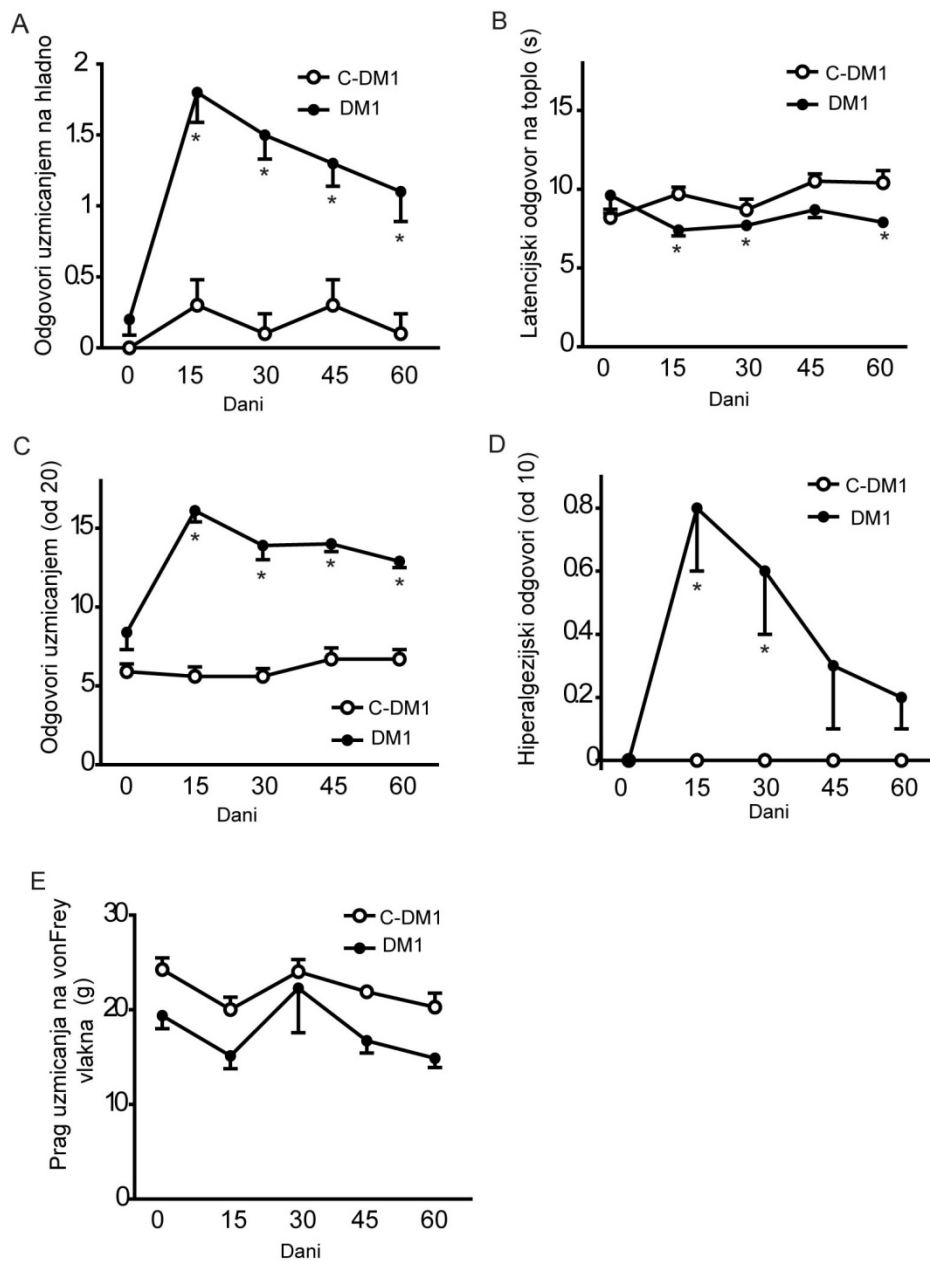
**Slika 2.** A) Razine glukoze u plazmi i B) relativni porast tjelesne mase (izražen kao postotak tjelesne mase na početku eksperimenta) u svim eksperimentalnim skupinama tijekom pokusa. Legenda: C-DM1 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 1, DM1 = skupina s dijabetesom tipa 1, C-DM2 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 2, DM2 = skupina s dijabetesom tipa 2.

#### 4.2. Eksperimentalna indukcija dijabetesa povećava ponašanje povezano s boli

DM1 životinje su razvile povećanu osjetljivost na hladne i tople podražaje. Broj uzmicanja šapa na hladni podražaj (Slika 3A) bio je najveći 15. eksperimentalnog dana, kada se polako počeo smanjivati uz zadržavanje statistički značajne razlike u usporedbi s C-DM1 skupinom (ANOVA  $F(4,76)=3,6$ ,  $p=0,001$ ). Kod DM1 životinja se također značajno smanjilo vrijeme latencije na topli podražaj (ANOVA  $F(4,76)=3,58$ ,  $p=0,01$ ) (Slika 3B).

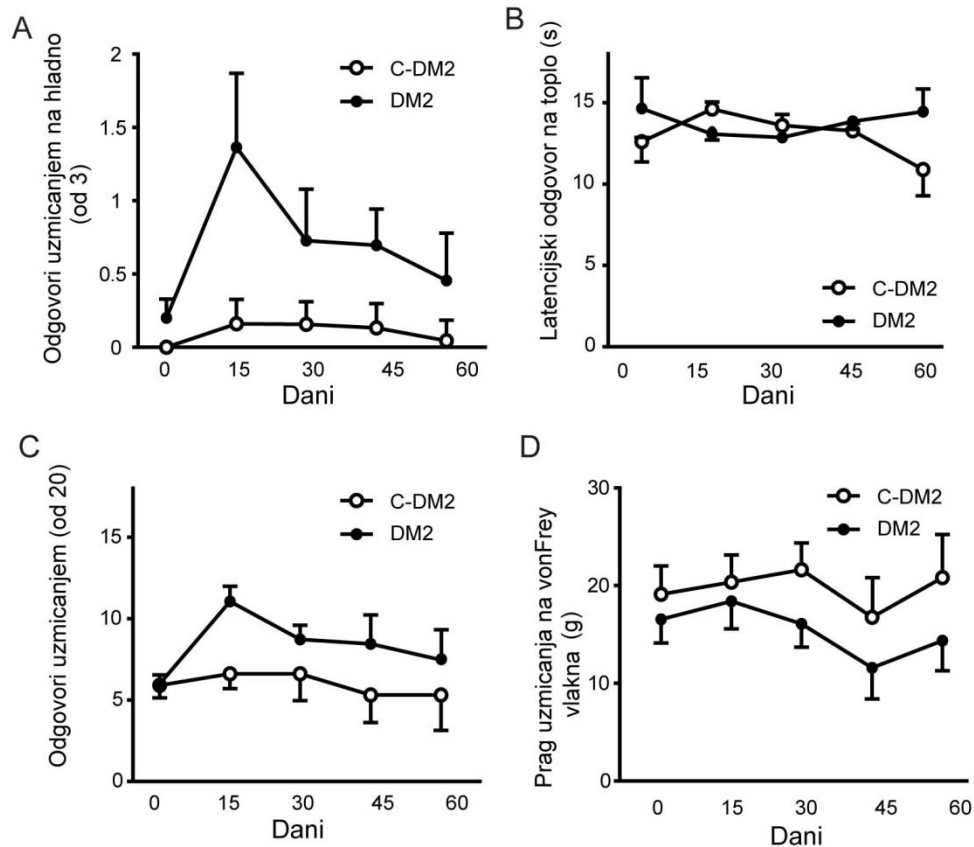
Stopa uzmicanja šapa na mehanički podražaj značajno se povećala u DM1 životinja tijekom eksperimenta u usporedbi s C-DM1 skupinom (ANOVA  $F(4,76)=7,34$ ,  $p<0,001$ ) (Slika 3C). Broj hiperalgezijskih odgovora na podraživanje iglom je povećan kod DM1 životinja; ove životinje su pokazale najveću osjetljivost 15. dana (Slika 3D) (ANOVA,  $F(4,76)=2,4$ ,  $p=0,05$ ). Mehanička alodinija je testirana von Freyevim vlaknima. Indukciju dijabetesa pratilo je smanjenje praga uzmicanja u DM1 životinja tijekom cijeloga eksperimenta, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno u usporedbi s vrijednostima za C-DM1 skupinu (ANOVA,  $F(4,76)=0,71$ ,  $p=0,59$ ) (Slika 3E).





**Slika 3.** A) Broj uzmicanja na hladni podražaj, B) latencijski odgovori na topli podražaj, C) broj uzmicanja na mehanički podražaj, D) hiperalgezijski odgovori na mehanički podražaj i E) prag uzmicanja na von Frey vlakna u životinjskom modelu DM1. Podatci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od početne vrijednosti. Legenda: C-DM1 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 1, DM1 = skupina s dijabetesom tipa 1.

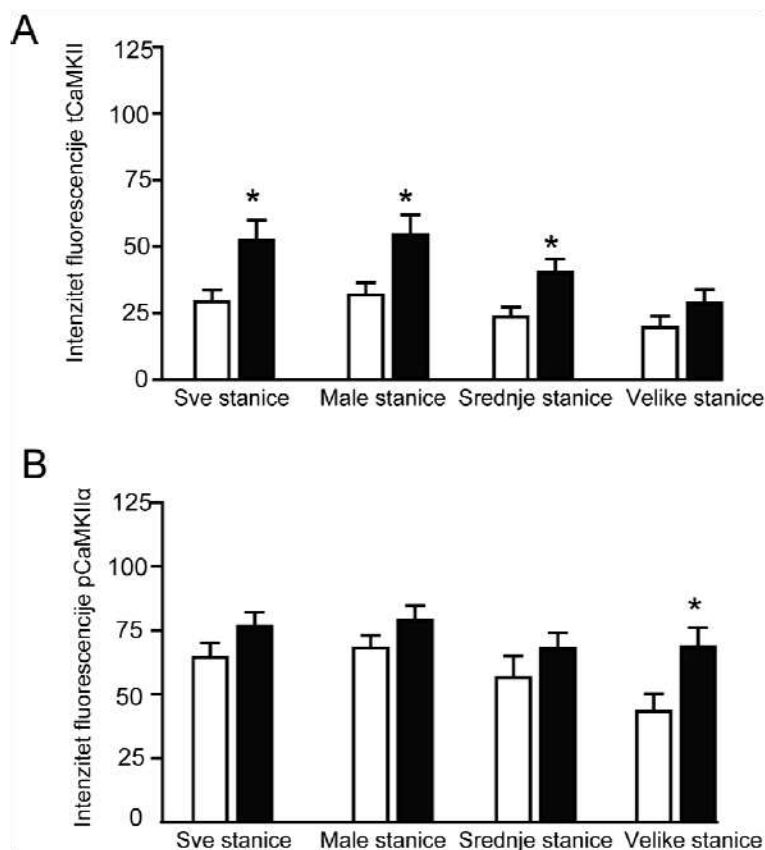
Analiza ponašanja je pokazala da DM2 životinje nisu razvile pojačanu osjetljivost na mehaničke i termalne podražaje tijekom cijelog eksperimenta (Slika 4). Ni kod DM2 niti kod C-DM2 skupine nije uočen niti jedan hiperalgezijski odgovor tijekom čitavog eksperimenta (podatci nisu prikazani).



**Slika 4.** A) Broj uzmicanja na hladni podražaj, B) latencijski odgovori na topli podražaj, C) broj uzmicanja na mehanički podražaj, D) prag uzmicanja na von Frey vlakna u DM2 životinjskom modelu. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Nije uočena razlika među eksperimentalnim skupinama DM2 i C-DM2 ni u jednom testu ponašanja korištenom u istraživanju. Legenda: C-DM2 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 2, DM2 = skupina s dijabetesom tipa 2.

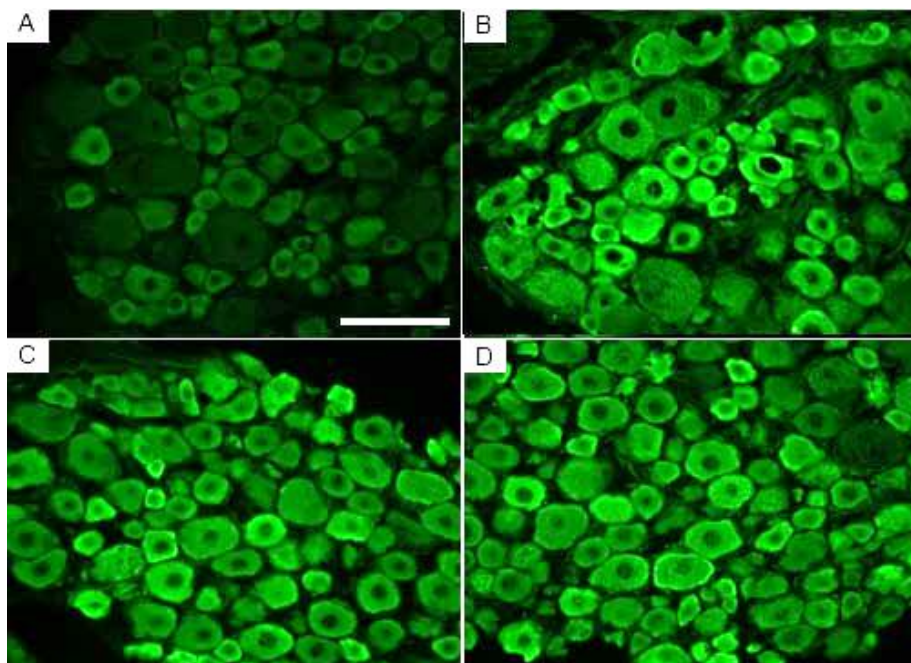
### 4.3. Izražaj CaMKII u spinalnim ganglijima nakon injekcije STZ-a

Za analizu promjena koje indukcija dijabetesa uzrokuje u spinalnim ganglijima, tkiva su bojana protutijelima za tCaMKII i CaMKII izoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ . Dva tjedna nakon indukcije dijabetesa je izražaj tCaMKII bio značajno veći u DM1 životinja ( $52 \pm 7,5$ ) u usporedbi s njihovim kontrolama ( $29 \pm 3,75$ ) (Slika 5A, 6A i 6B) (t test,  $p=0,03$ ). Daljnja analiza je otkrila da se izražaj tCaMKII u DM1 životinja povećao u odnosu na C-DM1 skupinu zbog povećanja njenoga izražaja u srednje velikim neuronima i u malim neuronima koji sudjeluju u procesu prijenosa osjeta boli iz periferije u središnji živčani sustav (t-test,  $p=0,03$ ). Također je primijećeno povećanje izražaja pCaMKII $\alpha$  u DM1 životinja, ali samo u velikim stanicama (Slika 5B, 6C i 6D) (t-test,  $p=0,03$ ). Indukcija DM1 nije uzrokovala promjene u izražaju  $\beta$ ,  $\gamma$  ni  $\delta$  izoformi u spinalnim ganglijima, neovisno o veličini analiziranih neurona (podatci nisu prikazani).



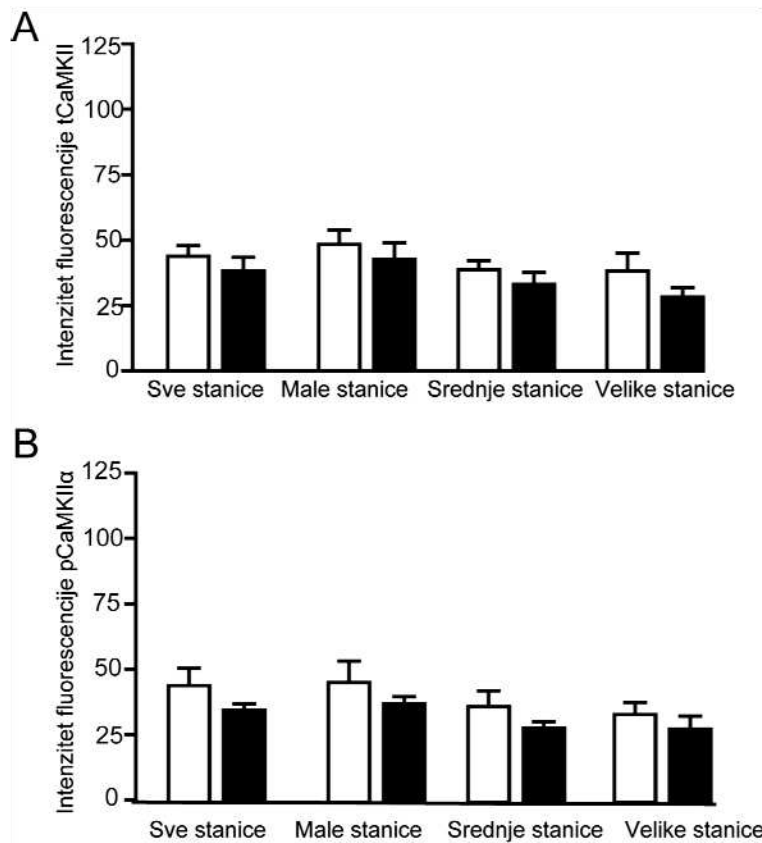
**Slika 5.** Izražaj tCaMKII (A) i pCaMKII $\alpha$  (B) u neuronima različitog promjera spinalnih ganglija L4 i L5 u C-DM1 (bijeli stupci) i DM1 štakora (crni stupci) 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa. Eksperimentalna indukcija dijabetesa uzrokuje značajni porast izražaja tCaMKII i

pCaMKII $\alpha$  u L4 i L5 spinalnim ganglijima (t-test). Podatci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku između eksperimentalnih skupina.



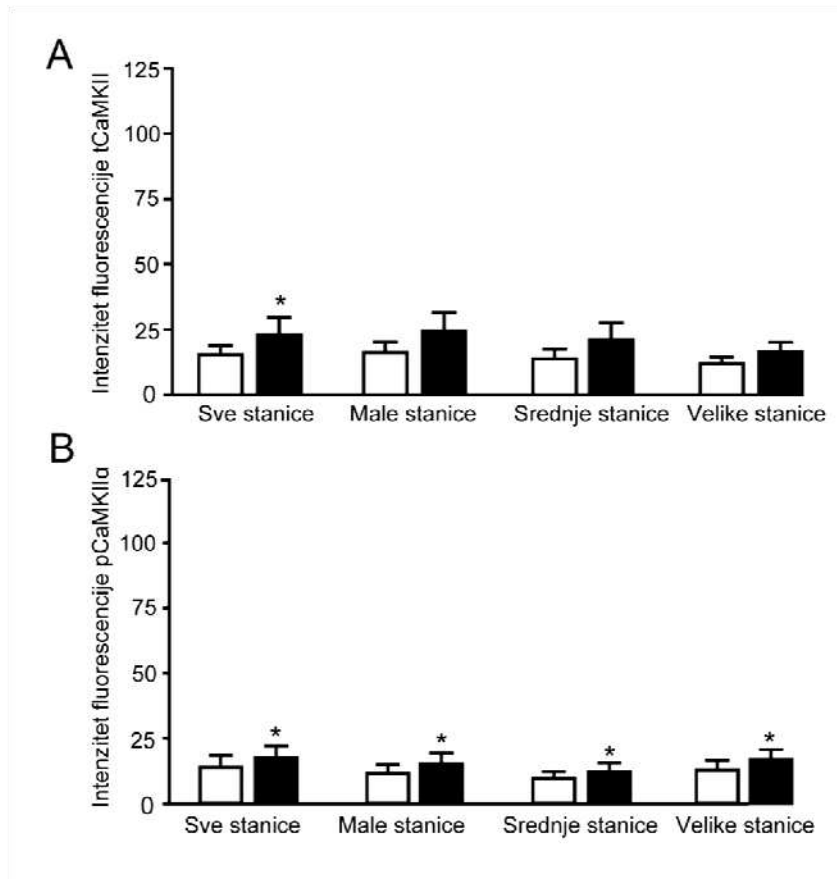
**Slika 6.** Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojanja tCaMKII u spinalnim ganglijima C-DM1 (A), DM1 (B) i pCaMKII $\alpha$  u C-DM1 (C) i DM1 (D) štakora. Indukcija dijabetesa uzrokuje značajan porast intenziteta fluorescencije tCaMKII (sve stanice, male stanice promjera manjeg od 30  $\mu\text{m}$ , i srednje stanice promjera između 30  $\mu\text{m}$  i 40  $\mu\text{m}$ ) i pCaMKII $\alpha$  (velike stanice promjera većeg od 40  $\mu\text{m}$ ) u štakorskim L4 i L5 spinalnim ganglijima dva tjedna nakon STZ injekcije. Povećanje: 40x. Mjerilo je dugo 100  $\mu\text{m}$  i odnosi se na sve slike.

U dvotjednom eksperimentu nije primijećena razlika u izražaju tCaMKII niti njenih izoformi  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  u spinalnim ganglijima između DM2 i C-DM2 štakora (Slika 7). Izražaj pCaMKII $\alpha$  se povećao, ali ne značajno, u svim neuronima spinalnih ganglija DM2 štakora ( $94 \pm 15,3$ ) u usporedbi s C-DM2 štakorima ( $70 \pm 9,1$ ) (Slika 7B).

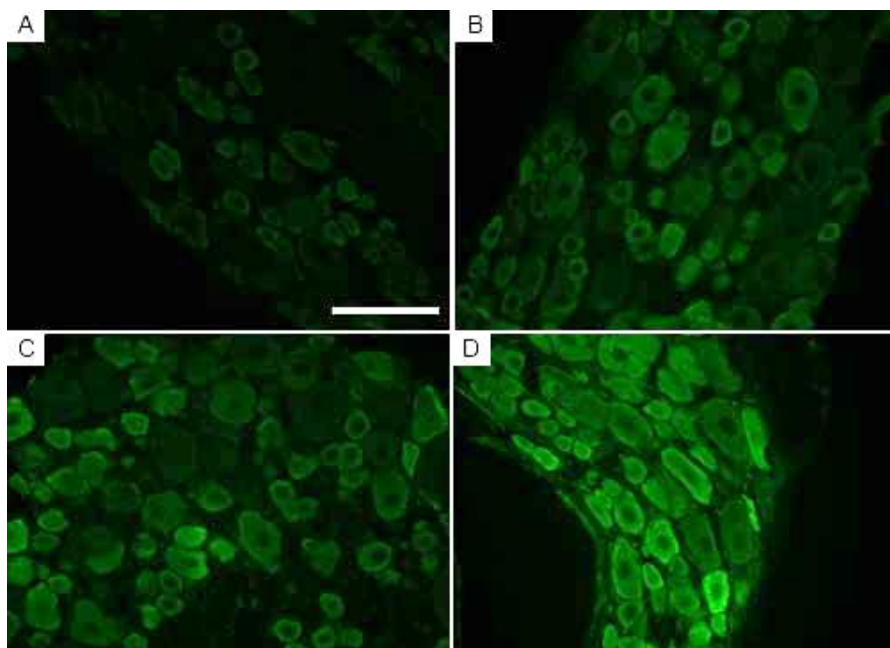


**Slika 7.** Izražaj tCaMKII (A) i pCaMKII $\alpha$  (B) u neuronima različitog promjera spinalnih ganglija L4 i L5 u C-DM2 (bijeli stupci) i DM2 štakora (crni stupci) 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa. Nije bilo značajne razlike u izražaju tCaMKII niti pCaMKII $\alpha$  između eksperimentalnih skupina (t-test). Podatci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine.

Dva mjeseca nakon indukcije dijabetesa je izražaj tCaMKII u svim neuronima spinalnih ganglija ostao značajno povećan u DM1 životinja ( $16 \pm 0,9$ ) u usporedbi s C-DM1 skupinom ( $14 \pm 2,0$ ) (t-test,  $p=0,05$ ) (Slika 8A, 9A i 9B). Izražaj pCaMKII $\alpha$  povećao se značajno u svim neuronima spinalnih ganglija DM1 životinja i u svim skupinama neurona analiziranim posebno (t-test,  $p=0,01$ ) (Slika 8B, 9C i 9D).

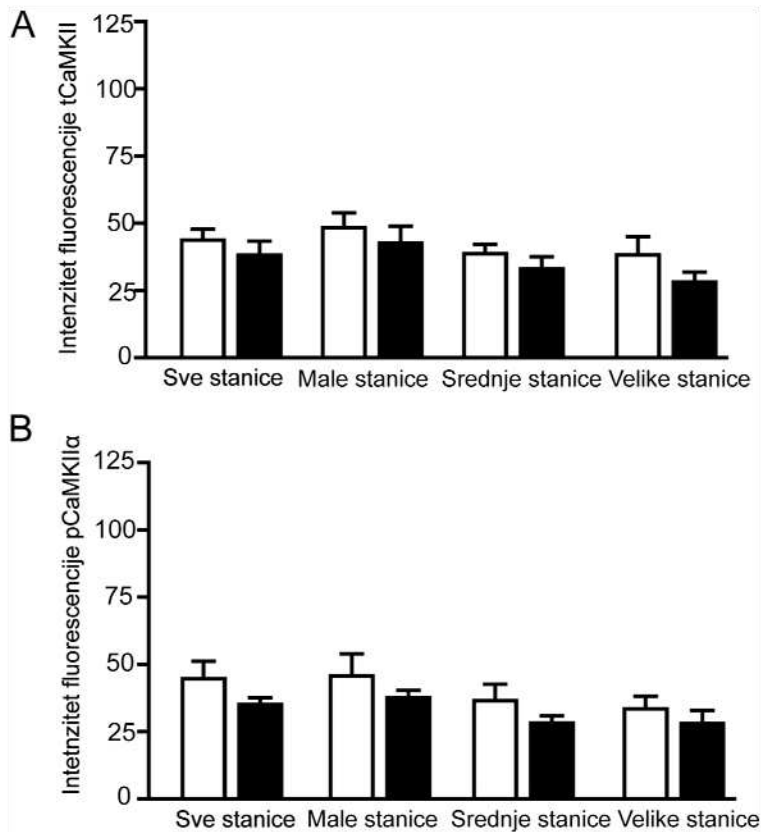


**Slika 8.** Izražaj tCaMKII (A) i pCaMKII $\alpha$  (B) u neuronima različitog promjera spinalnih ganglija L4 i L5 u C-DM1 (bijeli stupci) i DM1 štakora (crni stupci) 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa. Dijabetes uzrokuje značajno povećanje izražaja tCaMKII i pCaMKII $\alpha$  u L4 i L5 spinalnim ganglijima (t-test). Podatci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku između eksperimentalnih skupina.



**Slika 9.** Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojanja tCaMKII u spinalnim ganglijima C-DM1 (A), DM1 (B) i pCaMKII $\alpha$  u C-DM1 (C) i DM1 (D) štakorima. Indukcija dijabetesa uzrokuje značajan porast intenziteta fluorescencije tCaMKII (sve stanice) i pCaMKII $\alpha$  (sve stanice i svaka neuronalna skupina analizirana posebno) u štakorskim L4 i L5 spinalnim ganglijima dva mjeseca nakon STZ injekcije. Povećanje: 40x. Mjerilo je dugo 100  $\mu\text{m}$  i odnosi se na sve slike.

Izražaj  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  izoformi nije se razlikovao između DM1 i C-DM1 životinja (podatci nisu prikazani). Također, nije bilo ni razlike u izražaju tCaMKII i njenih  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  izoformi između DM2 i C-DM2 štakora dva mjeseca nakon indukcije dijabetesa (Slika 10).



**Slika 10.** Izražaj tCaMKII (A) i pCaMKII $\alpha$  (B) u neuronima različitog promjera spinalnih ganglija L4 i L5 u C-DM2 (bijeli stupci) i DM2 štakora (crni stupci) 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa. Nije bilo značajne razlike u izražaju tCaMKII niti pCaMKII $\alpha$  između eksperimentalnih skupina (t-test). Podatci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine.

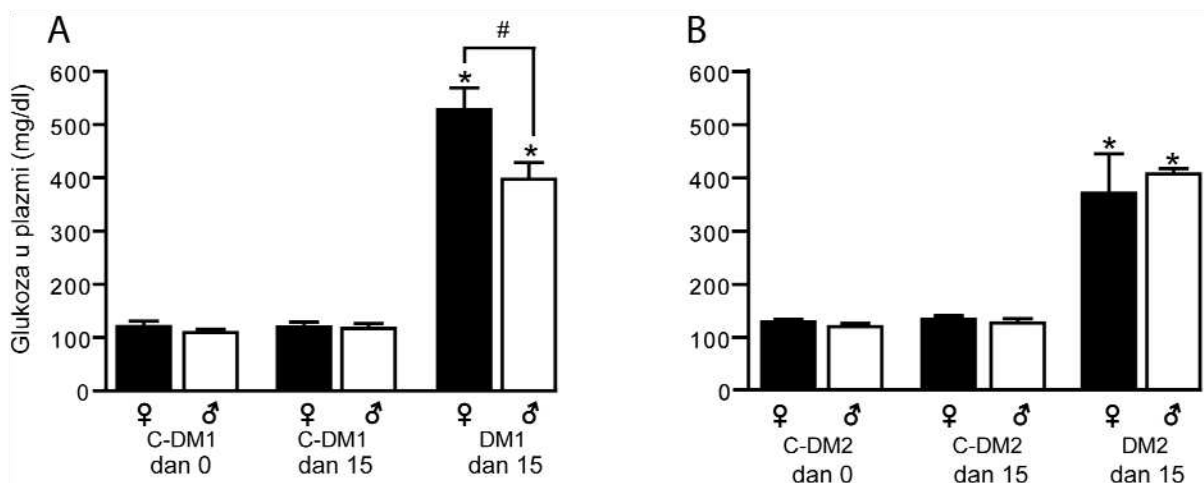


#### 4.4. Usporedba glikemije mužjaka i ženki dijabetičkih modela

Dva tjedna nakon indukcije dijabetesa, koncentracija glukoze u plazmi značajno se povećala u dijabetičkih životinja oba spola u usporedbi s vrijednostima za kontrolne životinje (t-test,  $p < 0,05$ ) (slika 11A i B). U ženki DM1 štakora, glukoza u plazmi povisila se više nego četverostruko u usporedbi s početnom vrijednošću ( $118,2 \pm 10$  mg/dl) i vrijednošću kontrolnih životinja (C-DM1) 15. dan ( $119,52 \pm 6$  mg/dl) i dosegla je  $527,67 \pm 36$  mg/dl 15. dan nakon STZ injekcije. U DM1 mužjaka, glukoza u plazmi se značajno povećala nakon dva tjedna dijabetesa u usporedbi s početnom vrijednosti ( $109,38 \pm 5,4$  mg/dl) i vrijednosti kontrolnih životinja na 15. dan ( $117,12 \pm 7$  mg/dl), te je dosegla  $397,48 \pm 28,2$  mg/dl.

U DM2 mužjaka, glukoza u plazmi se nakon dva tjedna povisila do  $405 \pm 11$  mg/dl, za razliku od početne vrijednosti koja je iznosila  $118,9 \pm 6$  mg/dl i vrijednosti kod njihovih kontrola na 15. dan ( $125,5 \pm 8$  mg/dl). U ženki DM2 štakora glukoza u plazmi se također povisila ( $369,1 \pm 74$  mg/dl), u usporedbi s početnom vrijednosti ( $127,3 \pm 5$  mg/dl), i vrijednosti kontrolnih životinja na 15. dan ( $132,7 \pm 7$  mg/dl) (Slika 11B).

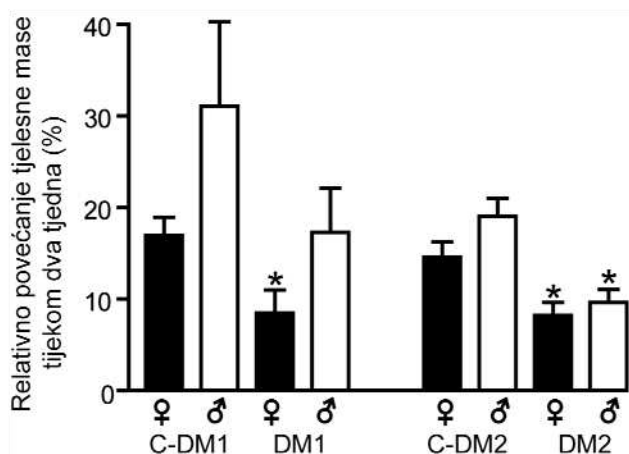
Glukoza u plazmi u ženki DM štakora bila je značajno veća nego u mužjaka 15. dan poslije STZ injekcije (t-test,  $p < 0,05$ ), dok nije uočena razlika između DM2 mužjaka i ženki (t-test,  $p = 0,51$ ). Usporedba između ženki DM1 i DM2 štakora i između mužjaka DM1 i DM2 štakora nije pokazala značajnu razliku između skupina (t-test,  $p = 0,079$  i  $p = 0,87$ ).



**Slika 11.** Razina glukoze u plazmi mužjaka i ženki u modelu dijabetesa tipa 1 (A) i dijabetesa tipa 2 (B). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku između eksperimentalnih životinja i kontrola (t-test,  $p < 0,05$ ). Simbol (#) označava statistički značajnu razliku među spolovima. Legenda: C-DM1 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 1, DM1 = skupina s dijabetesom tipa 1, C-DM2 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 2, DM2 = skupina s dijabetesom tipa 2.

#### 4.5. Usporedba tjelesne mase mužjaka i ženki dijabetičkih modela

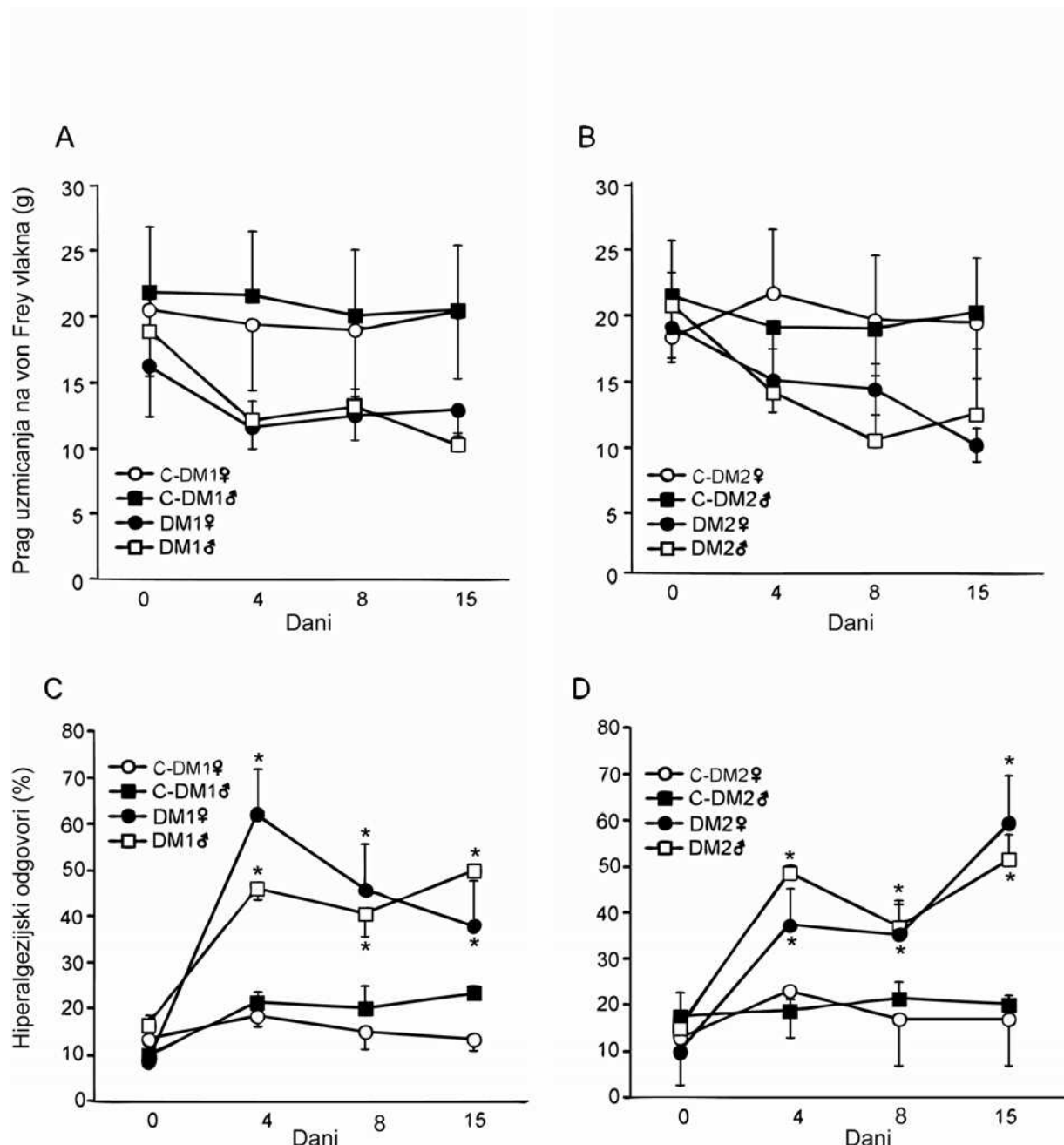
Povećanje tjelesne mase u ženki DM1 štakora, te mužjaka i ženki DM2 štakora značajno je usporeno nakon indukcije dijabetesa u usporedbi s kontrolnim skupinama (t-test,  $p = 0,034$ ,  $p = 0,017$  i  $p = 0,003$ ). Relativni porast tjelesne mase u DM1 ženki 15. dan nakon STZ injekcije bio je samo  $8,4 \pm 1\%$ , dok je masa njihovih kontrola porasla za  $16,9 \pm 2\%$ . Relativno povećanje tjelesne mase u ženki i mužjaka DM2 štakora 15. post-injekcijski dan bilo je  $8,15 \pm 1\%$  i  $8,16 \pm 1\%$ . Mužjaci DM1 štakora su također pokazali sporije relativno povećanje tjelesne mase u usporedbi s vrijednostima kontrolne skupine ( $30,9 \pm 9\%$ ), no ova razlika nije bila statistički značajna (t-test,  $p = 0,19$ ). Nije uočena razlika u relativnom povećanju tjelesne mase između mužjaka i ženki kontrolnih štakora niti DM1 i DM2 dijabetičkih štakora (slika 12).



**Slika 12.** Relativno povećanje tjelesne mase u mužjaka i ženki modela dijabetesa tipa 1 (DM1) i tipa 2 (DM2) (izraženo kao postotak tjelesne mase na početku eksperimenta). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku između eksperimentalnih životinja i kontrola (t-test,  $p < 0,05$ ). Legenda: C-DM1 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 1, DM1 = skupina s dijabetesom tipa 1, C-DM2 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 2, DM2 = skupina s dijabetesom tipa 2.

#### 4.6. Usporedba ponašanja mužjaka i ženki dijabetičkih modela

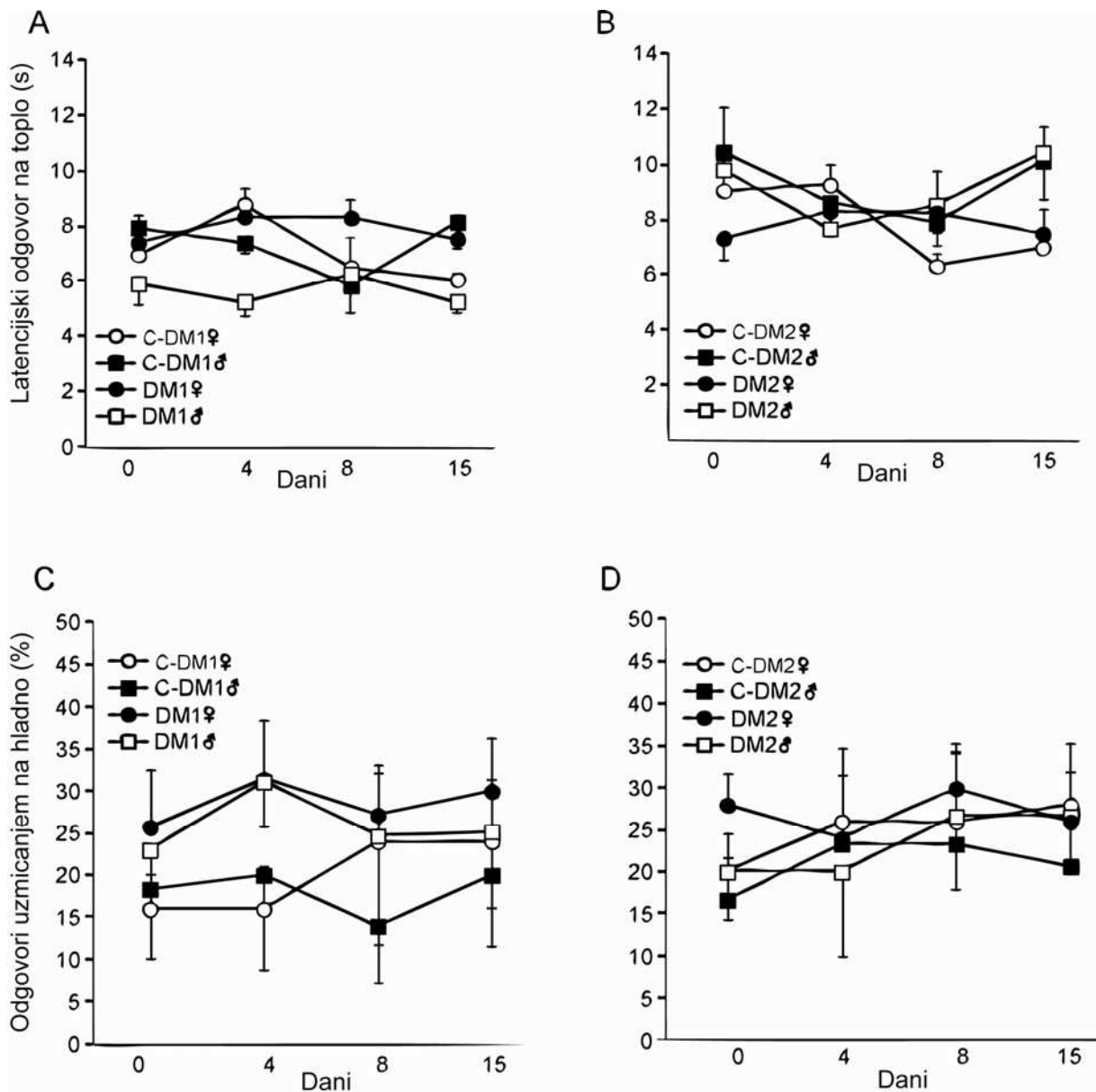
Nakon indukcije dijabetesa, DM1 i DM2 mužjaci i ženke nisu pokazali značajne razlike u pragu podražaja von Frey vlaknima (slika 13A i B). Mehanička hiperalgezija, koja je testirana pomoću tupe igle, pokazala je značajnu razliku među skupinama kad se uzme u obzir vrijeme mjerenja (ANOVA,  $F(9,87)=5,36$ ,  $p=0,0001$ ). Fisherov *post hoc* test ( $p < 0,05$ ) je pokazao da su i mužjaci i ženke DM1 i DM2 štakora pokazali značajno povećanje postotka hiperalgezijskih odgovora pri svakom post-injekcijskom testiranju u usporedbi s početnom kontrolnom vrijednosti (slika 13C i D).



**Slika 13.** Usporedba ponašanja povezanoga s boli u mužjaka i ženki dijabetičkih modela nakon mehaničkog podražaja. Prag uzmicanja na podražaj von Frey vlaknima u modelu dijabetesa tipa 1 (A) i modelu dijabetesa tipa 2 (B); postotak hiperalgezijskih odgovora na mehanički podražaj u modelu dijabetesa tipa 1 (C) i modelu dijabetesa tipa 2 (D). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od početnih vrijednosti odgovarajućih kontrola (Fisherov *post hoc*). Legenda: C-DM1 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 1, DM1 = skupina s dijabetesom tipa 1, C-DM2 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 2, DM2 = skupina s dijabetesom tipa 2.

Nisu uočene razlike u latencijskom odgovoru na toplinski podražaj između mužjaka i ženki, iako su vidljivi različiti trendovi. Mužjaci DM1 štakora imali su skraćeno latencijsko vrijeme 4. i 15. dan u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nasuprot tome, ženke DM1 štakora su pokazale povećanje latencijskog vremena 8. i 15. dan u usporedbi s kontrolnim vrijednostima (slika 14A). Nisu uočene razlike u latencijskom odgovoru na toplinski podražaj između mužjaka i ženki DM2 štakora i njihovih kontrola (slika 14B).

Broj uzmicanja na hladni podražaj acetonom nije se razlikovao između dijabetičkih i kontrolnih skupina u oba modela koja su korištena u studiji (Slika 14C i D).



**Slika 14.** Usporedba ponašanja povezanoga s boli u mužjaka i ženki dijabetičkih modela nakon termičkog podražaja. Latencijski odgovori na topli podražaj u modelu dijabetesa tipa 1

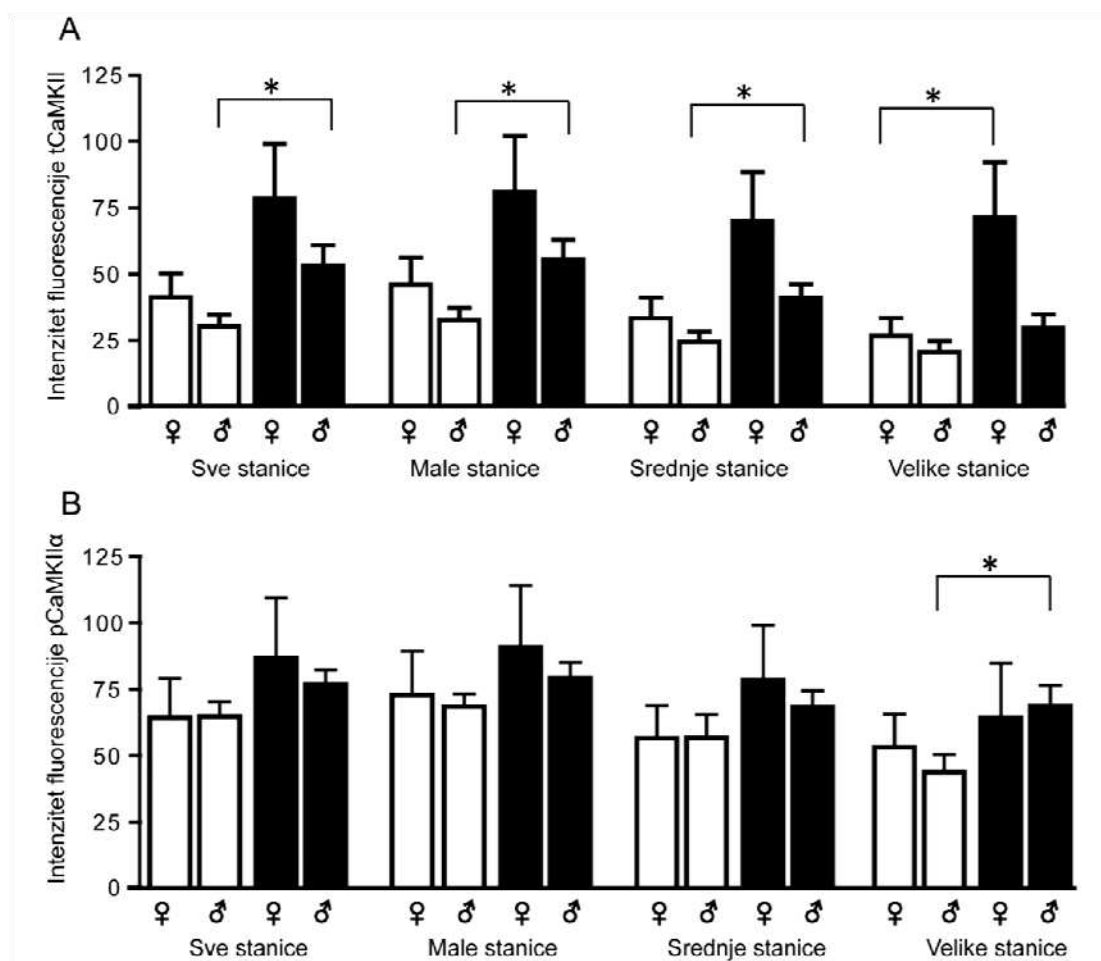
(A) i modelu dijabetesa tipa 2 (B); postotak uzmicanja na hladni podražaj u modelu dijabetesa tipa 1 (C) i modelu dijabetesa tipa 2 (D). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od početnih vrijednosti odgovarajućih kontrola (Fisherov *post hoc*). Legenda: C-DM1 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 1, DM1 = skupina s dijabetesom tipa 1, C-DM2 = kontrolna skupina za dijabetes tipa 2, DM2 = skupina s dijabetesom tipa 2.

Analiza ponašanja povezanog s boli je u konačnici pokazala da ne postoje spolne razlike u odgovorima na mehaničke i toplinske podražaje u obama modelima korištenima u studiji (Slika 13 i 14).

#### **4.7. Izražaj CaMKII u mužjaka i ženki dijabetičkih modela**

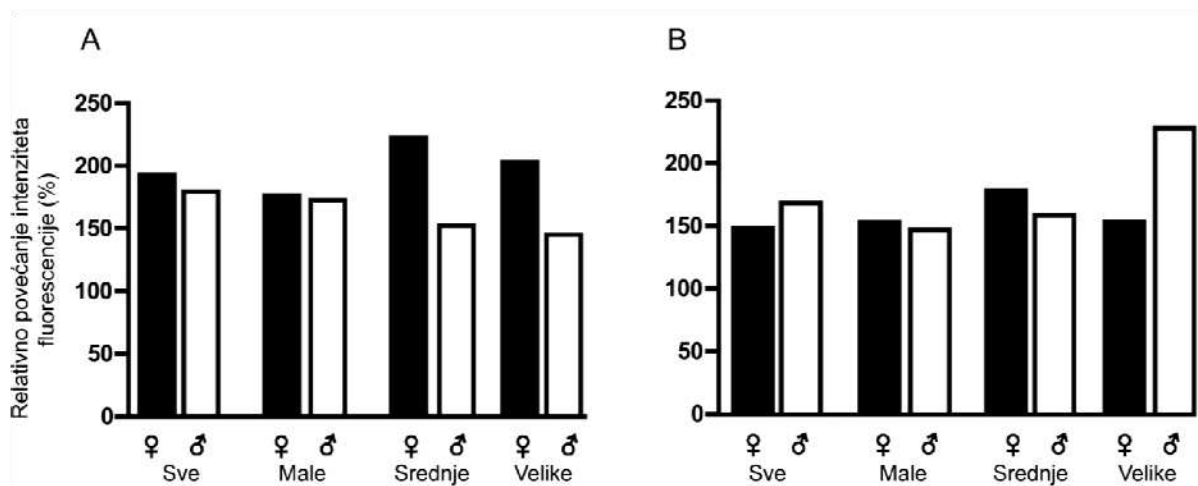
Analiza imunofluorescencije totalne CaMKII i njenih  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  izoformi korištena je za ispitivanje promjena u spinalnim ganglijima nastalih nakon indukcije dijabetesa, i za usporedbu tih promjena među spolovima. Na 15. post-injekcijski dan, izražaj tCaMKII u neuronima mužjaka DM1 štakora značajno se povećao u usporedbi s kontrolom (t-test,  $p < 0,05$ ). Detaljnija analiza urađena je na tri odvojene skupine neurona: mali ( $d \leq 30 \mu\text{m}$ ), srednji ( $30 \mu\text{m} \leq d \leq 40 \mu\text{m}$ ) i veliki ( $d \geq 40 \mu\text{m}$ ). Ova analiza je pokazala da povećanje izražaja tCaMKII u mužjacima DM1 štakora prvenstveno nastaje u neuronima male i srednje veličine; ove vrijednosti su bile  $52,4 \pm 7$  i  $36,6 \pm 5$  petnaesti dan (slika 15 A, 16A i 17A i 17B). Nasuprot tome, u ženki DM1 štakora se izražaj tCaMKII značajno povećao samo u velikim neuronima ( $70,4 \pm 2$ ), dok je vrijednost u kontrolnoj skupini bila  $29,6 \pm 8$  (slika 15A i 16A).

Značajno povećanje izražaja pCaMKII $\alpha$  je također uočeno u mužjacima DM1 štakora u velikim stanicama (t-test,  $p < 0,05$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $43,4 \pm 7$ ) i dosegao je vrijednost  $42 \pm 5$  (slika 15B, 16B, 17C i 17D). Nije uočena promjena u izražaju pCaMKII $\alpha$  u ženkama DM1 štakora (slika 15B i 16B).

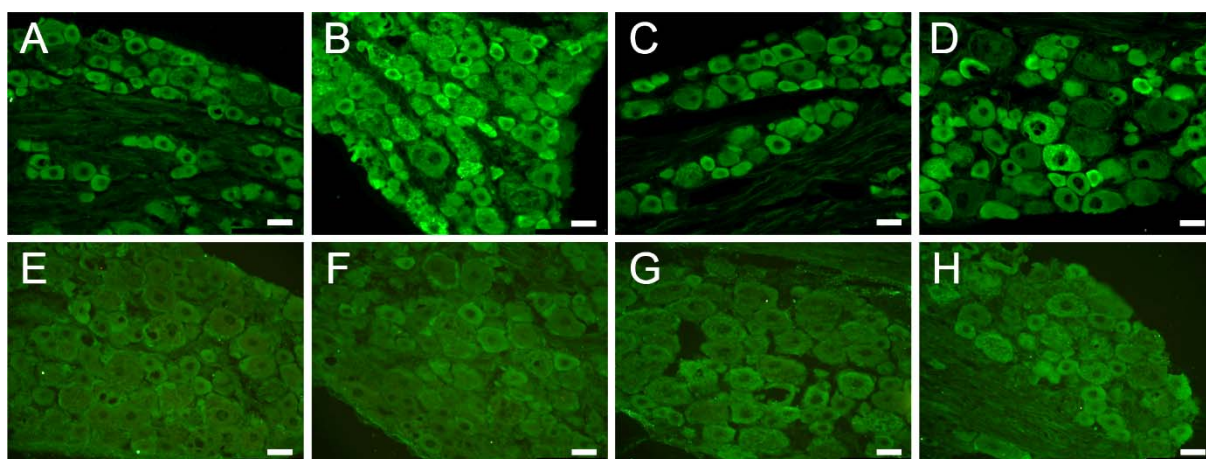


**Slika 15.** Izražaj ukupne CaMKII (tCaMKII) u kontrolnim (bijeli stupci) i dijabetičkim (crni stupci) neuronima spinalnih ganglija mužjaka i ženki dijabetičkih modela dva tjedna nakon indukcije dijabetesa. Dijabetes uzrokuje značajni porast izražaja u svim dijabetičkim L4 i L5 spinalnim ganglijima, i također u malim i srednje velikim neuronima analiziranim posebno. U dijabetičnih ženki, izražaj tCaMKII je narastao samo u velikim neuronima (A). Izražaj fosforilirane CaMKII alfa izoforme (pCaMKII $\alpha$ ) u kontrolnim (bijeli stupci) i dijabetičkim (crni stupci) neuronima spinalnih L4 i L5 ganglija. Zvezdica označava statistički značajnu razliku između eksperimentalnih životinja i kontrola (t-test,  $p < 0,05$ ). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine.

Kako bi se ustanovili razmjeri povećanja intenziteta izražaja tCaMKII i pCaMKII $\alpha$  vrijednosti intenziteta fluorescencije mužjaka i ženki DM1 štakora su normalizirane prema vrijednostima u odgovarajućih kontrola. U svim grupama neurona su uočena povećanja intenziteta fluorescencije veća od 100% (Slika 16 A i B).



**Slika 16.** Relativno povećanje izražaja tCaMKII (A) i pCaMKII $\alpha$  (B) u neuronima spinalnih ganglija mužjaka i ženki kojima je induciran dijabetes tipa 1. Vrijednosti su normalizirane prema vrijednostima kontrolnih životinja.



**Slika 17.** Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojanja tCaMKII u kontrolnih (A) i dijabetičnih (B) mužjaka, pCaMKII u kontrolnih (C) i dijabetičnih (D) mužjaka, CaMKII $\delta$  u kontrolnih (E) i dijabetičnih (F) mužjaka i CaMKII $\gamma$  u dijabetičnih (G) i kontrolnih (H) mužjaka u modelu dijabetesa tipa 1. Intenzitet fluorescencije povećao se kod tCaMKII i kod fosforilirane  $\alpha$  izoforme ovog enzima, no ne i kod  $\gamma$  i  $\delta$  izoformi. Mjerilo=50  $\mu$ m.

Indukcija DM1 nije uzrokovala promjenu u izražaju  $\gamma$  i  $\delta$  izoformi, u mužjaka (slika 17E, 17F, 17G i 17H) i ženki, neovisno o veličini neurona. Također, nisu uočene značajne razlike u izražaju tCaMKII i njenih izoformi između DM2 i C-DM2 štakora neovisno o spolu analiziranih štakora (rezultati nisu prikazani).



## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju pokazano je da se izražaj tCaMKII i pCaMKII $\alpha$  povećava u spinalnim ganglijima eksperimentalnog modela dijabetesa tipa 1 izazvanog u štakora intraperitonealnom injekcijom STZ-a. Povećanje CaMKII uočeno je već dva tjedna nakon indukcije dijabetesa i zadržano je tijekom dva mjeseca. Paralelno s promjenama u izražaju CaMKII, u spinalnom gangliju uočene su odgovarajuće promjene u ponašanju povezanom s boli, vidljive kroz razvoj mehaničke i termalne hiperalgezije u DM1 štakora. Životinje kojima je induciran model dijabetesa tipa 2 kombinacijom prehrane s visokim udjelom masti i niske doze STZ-a nisu pokazale promjene u ponašanju povezanom s boli, niti je došlo do promjene izražaja CaMKII u njihovim spinalnim ganglijima tijekom cijelog eksperimenta. Nije dokazano postojanje spolnih razlika u ponašanju povezanom s boli i izražaju CaMKII u mužjaka i ženki analiziranih dijabetičkih modela.

Mnoga prethodna istraživanja su pokazala kako se patološke promjene u izazvanoj bolnoj dijabetičkoj neuropatiji javljaju iznimno brzo nakon indukcije, pa je tako uočeno spontano izbijanje živčanih impulsa u neuronima spinalnih ganglija neuropatičnih štakora (172). Dijabetes snižava aktivnost voltažnih kalijevih kanala u srednje velikim i velikim spinalnim ganglijima. Smanjena aktivnost neurotrofnih čimbenika iz mozga u neuronima spinalnih ganglija vrlo vjerojatno utječe na smanjenje funkcionalnosti voltažnih kalijevih kanala u bolnoj dijabetičkoj neuropatiji (173). Smanjeni izražaj gena za natrijeve kanale, neravnomjerna fosforilacija ovih kanala i povećana proizvodnja voltažnog natrijevog alfa kanala pridonosi pojačanoj osjetljivosti spinalnih ganglija (174-176). Inhibicijom voltažnog natrijevog kanala 1.7., GABA pruža analgetsko djelovanje u bolnoj dijabetičkoj neuropatiji. Moguće je da kontinuirana aktivacija endogenih neurotransmitera regulira stabilno stanje voltažnih ionskih kanala (G-vezanih receptora) u spinalnim ganglijima (177).

Eksperimentalni dijabetes mijenja izražaj voltažnih kalijevih i natrijevih kanala u neuronima spinalnih ganglija, što je povezano s patofiziologijom dijabetičke neuropatije (173). Biessels i Gispen pretpostavljaju da je poremećena homeostaza kalcija uključena u patogenezu dijabetičke neuropatije (178). Enzim CaMKII prevodi citoplazmatske kalcijeve signale u različite odgovore fosforiliranjem raznih supstrata koji su uključeni u egzocitozu, transkripcijske i translacijske procese (179). Izražaj voltažnih kalijevih kanala povećan je u primarnim osjetnim neuronima dijabetičkih štakora (180). Unutarstanična razina kalcija je

povećana u većini dijabetičkih tkiva, a promijenjeni metabolizam kalcija vjerojatno predstavlja zajedničku abnormalnost koja povezuje metaboličke, kardiovaskularne, vidne i neuralne manifestacije dijabetesa (181, 182). Također, dokazano je da su mehanizmi centralne senzitivizacije ovisni o kalciju (183). Postoje brojni dokazi koji povezuju kontinuirano povećanje kalcijevih struja, proizvodnju reaktivnih oksidirajućih kemijskih vrsta i stanične smrti neurona (182). Promjena u izražaju selektivnih blokatora voltažnih kalcijevih kanala tipa P/Q, osobito u malim i srednje velikim primarnim aferentnim živčanim vlaknima prilikom prijenosa osjeta boli u leđnu moždinu je vrlo vjerojatno povezana s preosjetljivošću u STZ modelu dijabetesa (184).

Brojne kliničke i bazične studije sugeriraju da oksidativni stres nastao djelovanjem glukoze igra središnju ulogu u dijabetičkoj neuropatiji, povezujući brojne patološke mehanizme kao što su putovi aldozne reduktaze i glikacije, vaskularna disfunkcija i snižena neurotrofna opskrba (185). Višak glukoze inducira apoptotske promjene u neuronima spinalnih ganglija jedan mjesec nakon indukcije dijabetesom u štakora i u akutno hiperglikemičnih štakora koji su 6 do 10 h primali infuziju s otopinom glukoze (186). Također, štakori s dugotrajnim STZ dijabetesom, trajanja 12 do 15 mjeseci, pokazuju slične apoptotske strukturalne promjene u neuronima spinalnih ganglija (43). Oksidativni stres vrlo vjerojatno pridonosi mitohondrijskim promjenama i inducira programiranu staničnu smrt (38).

Morfometrija spinalnih ganglija u eksperimentalnoj dijabetičkoj neuropatiji pokazuje da je indukcija dijabetesa povezana sa smanjenjem broja neurona velikog promjera i povećanjem broja malih neurona (155). Nadalje, indukcija dijabetesa je povezana s ozljedama citoskeleta velikih neurona spinalnih ganglija, što navodi na zaključak da strukturne promjene u neuronima velikog promjera i njihovih perifernih mijeliniziranih aksona mogu doprinijeti bolnim parestezijama i disestezijama u ljudi (187). Bolna dijabetička neuropatija je povezana s drugim promjenama u stanično-specifičnim patofiziološkim mehanizmima (176, 188). Ova otkrića impliciraju da stanično-specifične studije primarnih osjetnih neurona, uključujući i raspodjelu CaMKII, mogu biti važne u istraživanju dijabetesa.

Uloga CaMKII u procesu nocicepcije je istraživana u brojnim studijama. CaMKII je prisutna u površinskim slojevima spinalnih leđnih rogova (189) i nalazi se u polovici spinalnih neurona od kojih je većina uključena u procesiranje nocicepcijskih informacija (147, 149). Izražaj CaMKII se mijenja u spinalnim ganglijima nakon ozljede perifernog živca (150) i indukcije upalne boli (148).

Enzim CaMKII je povezan s mnogim patofiziološkim promjenama u štakorima kojima je dijabetes izazvan STZ-om. Izražaj reaktivnih oksidirajućih kemijskih vrsta i CaMKII se povećava u srcima STZ-om induciranih dijabetičkih štakora, a ovo povećanje se može inhibirati antagonistom CaMKII (190). Nadalje, prijenos signala u koji je uključena CaMKII pridonosi razvoju abnormalne vaskularne reaktivnosti i bubrežne disfunkcije kod istovremene pojave hipertenzije i dijabetesa (191).

CaMKII $\alpha$  je kritična uzvodna komponenta koja započinje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranu signalnu fosforilaciju receptora za čimbenik rasta sličan inzulinu (engl., insulin-like growth factor-1 receptor), zatim fosforilaciju kinaze 2 regulirane izvanstaničnim signaliziranjem (engl., extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2) i fosforilaciju protein kinaze B (PKB) u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila; što može dovesti do abnormalne stanične proliferacije (192).

STZ-om inducirani dijabetes rezultira naglašenim povećanjem CaMKII aktivnosti u štakorskom mozgu. Ukupna količina enzima također pokazuje povećanje. Intenzivna terapija inzulinom rezultira oporavkom normalnih vrijednosti aktivnosti enzima u većini regija mozga koje su analizirane. Izražaj CaMKII $\alpha$  je povezan s aktivnošću ovog enzima u mozgu dijabetičkih štakora (193).

U ovoj studiji ukupno povećanje izražaja tCaMKII rezultat je povećanja izražaja svake pojedine izoforme. Iako se izražaj pCaMKII $\alpha$  značajno povećao u neuronima velikog promjera u DM1 životinja dva tjedna nakon indukcije dijabetesa, izražaj ostalih izoformi nije se promijenio u dovoljnoj količini da ova razlika ostane vidljiva i kod izražaja tCaMKII. Također, značajni porast izražaja tCaMKII u malim neuronima vjerojatno je rezultat malih, statistički neznačajnih porasta izražaja pojedinih izoformi.

Izražaj CaMKII također se povećava u drugim modelima neuropatske boli, kao i u modelu korištenom u ovom istraživanju. CaMKII je ključna za održavanje abnormalne pretjerane osjetljivosti neurona u dorzalnim rogovima leđne moždine u modelu neuropatske boli izazvane ozljedom leđne moždine. U ovom modelu, količina pCaMKII raste u neuronima dorzalnih rogova i terapija CaMKII antagonistom značajno smanjuje mehaničku alodiniju (194). U prethodnoj studiji Laboratorija za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu, utvrđeno je da podvezivanje spinalnog živca uzrokuje smanjenje izražaja CaMKII u neuronima spinalnih ganglija (150). Patofiziologija boli u dijabetesu razlikuje se od modela neuropatske boli koja se inducira podvezivanjem spinalnog živca, zato što se razina kalcija

povećava u mnogim dijabetičkim tkivima (181), izražaj voltažnih kalcijevih kanala je povećan u neuronima dijabetičkih spinalnih ganglija (184) i jakost kalcijevih struja ovisnih o naponu povećava se u neuronima spinalnih ganglija (180), što rezultira povećanjem unutarstaničnih razina kalcija. Preopterećenje stanica kalcijem vrlo vjerojatno uzrokuje povećanje izražaja CaMKII u neuronima spinalnih ganglija i rezultira abnormalnim okidanjem neurona. CaMKII signaliziranje u neuronima može potaknuti staničnu smrt i rezultirati degradacijom živčanog tkiva (195).

Enzim CaMKII je nizvodni efektor mnogobrojnih putova signalizacije koji prevode kalcijeve signale u različite stanične odgovore (179) i povećana razina kalcija u stanici je povezana s brojnim abnormalnostima u dijabetesu (182, 196). Abnormalno kalcijevo signaliziranje je najvjerojatnije uzrokovalo povećanje izražaja CaMKII, te uzrokovalo oštećenje nocicepcije u DM1 štakora u ovoj studiji. Drugi istraživački timovi su također primijetili razlike u jačini neuropatskih poremećaja između dvaju tipova dijabetesa (197-199). Moguće je da DM2 životinje u ovoj studiji nisu razvile abnormalnu nocicepciju jer je izražaj CaMKII u njihovim spinalnim ganglijima ostao nepromijenjen tijekom dvomjesečnog praćenja. Nadalje, razina glukoze u plazmi DM2 životinja je bila manja tijekom cijelog eksperimenta u usporedbi s DM1 životinjama.

Od svih CaMKII izoformi koje su korištene u ovom istraživanju, CaMKII $\alpha$  je najobilnija u neuronima središnjeg živčanog sustava (77) i prethodno je implicirano da baš ova izoforma ima važnu ulogu u modulaciji aktivnosti nociceptora i plastičnosti primarnih osjetnih neurona (149). Od svih izoformi CaMKII analiziranih u ovom istraživanju, jedino je izražaj pCaMKII $\alpha$  značajno porastao nakon indukcije DM1, što navodi na zaključak da je samo ova izoforma uključena u patofiziologiju abnormalne percepcije boli u dijabetesu.

Kod životinjskih modela, promjene perifernog živčanog sustava nastaju unutar nekoliko tjedana nakon STZ-om izazvanog dijabetesa, dok promjene u središnjem živčanom sustavu nastaju nakon nekoliko mjeseci. Inzulin može smanjiti i periferne i središnje neurofiziološke promjene (20). Kod životinjskih modela dijabetesa je uočeno da su sve abnormalnosti reverzibilne s normalizacijom glukoze u krvnoj plazmi, a neke abnormalnosti, primjerice smanjenje praga osjeta boli, mogu se inducirati u štakora kroničnom *in vivo* perfuzijom spinalnih ganglija hipertoničnom otopinom (21).

Smanjenje tjelesne mase kod eksperimentalnih životinja s STZ-induciranim dijabetesom i posljedično loše tjelesno stanje ovih životinja mogu utjecati na rezultate testova ponašanja, što

je također važno naglasiti. Kod dijabetičnih životinja lošega općeg stanja i s veoma sniženom tjelesnom masom, aktivnost životinja se smanji do te mjere da one postaju letargične i njihovo eksploratorno ponašanje, odnosno istraživanje okoline, se smanjuje. Ove promjene mogu utjecati na reakcije životinja tijekom testiranja. Životinje dobroga fizičkoga stanja mogu bolje podnositi postupke testiranja nego kronično bolesne životinje, pa zaključci o hiperalgeziji i alodiniji poslije mogu biti netočni (9, 10). Neuropatične životinje kod kojih dolazi do porasta tjelesne mase preferiraju se u odnosu na životinje koje su kronično bolesne. Hoybergs i sur. stoga preporučuju koristiti životinje manje tjelesne mase (<300 g) ako se visoke doze STZ koriste u pokusu (>60 mg/kg), odnosno životinje s većom tjelesnom masom (>300 g) kod nižih doza STZ-a (<60 mg/kg). Ako se želi povećati dijabetički odgovor na STZ, može se ili povećati doza kemikalije ili se mogu koristiti starije životinje koje imaju veću masu (9). Da bi se izbjegle moguće loše posljedice teškog općeg stanja eksperimentalnih životinja u ovoj studiji korištena je manja doza STZ-a (50 mg/kg), kod manjih životinja (160-200 g).

STZ DM1 štakori pokazuju ranu neurološku disfunkciju (200), uključujući promijenjenu osjetljivost na bol (201), što sugerira ranu uključenost malih nocicepcijskih neurona (174, 188). Rezultati bihevioralnih testiranja u STZ DM1 štakora razlikuju se u različitim eksperimentima, ovisno o vrsti štakora, početnoj tjelesnoj masi štakora, trajanju eksperimenta i korištenoj dozi STZ-a. Rezultati testova ponašanja u ovom istraživanju sukladni su rezultatima koje su prethodno dobili drugi istraživači u eksperimentima koji su trajali dva tjedna (202) i dva mjeseca (203), gdje su mehanička i termalna pretjerana osjetljivost također uočene u STZ DM1 štakora.

Mehanička i termalna hiperalgezija uočena je i u drugim studijama u kojima su korišteni STZ-dijabetički Sprague-Dawley štakori mase 150 do 300 g (201, 202, 204). Druge studije s trajanjem od jednog do tri mjeseca pokazale su mehaničku hiperalgeziju i termalnu hipoalgeziju koja se razvije nakon termalne hiperalgezije (205, 206). Neke su studije rađene na Sprague-Dawley, Wistar ili Lewis štakorima mase manje od 200 g i u ovim studijama je primijećena samo mehanička alodinija (174, 207, 208) ili mehanička alodinija s termalnom i/ili mehaničkom hiperalgezijom (176, 177, 209-212).

Razlog zašto životinje u ovoj studiji nisu razvile termalnu hipoalgeziju ili taktilnu alodiniju mogao bi biti u kombinaciji tjelesne mase životinja koje su korištene (< 200 g) s nižom dozom STZ-a (< 60 mg/kg). Taktilna alodinija je uglavnom uočena u eksperimentima gdje su korištene veće životinje (> 200 g) ili više doze STZ-a (> 60 mg/kg) (174, 207, 209, 210, 212).

Međutim, termalna hipoalgezija je uočena u eksperimentima s dozom STZ-a koja je bila niža od 55 mg/kg (206, 213).

Izrazite razlike u funkcionalnim, strukturnim (197, 198) i metaboličkim (199) značajkama neuropatija između dva tipa dijabetesa prethodno su opisali mnogi istraživači. U usporedbi s DM1 modelima, dijabetička neuropatija je u DM2 modelima obično slabije izražena (197). Iako većina dijabetesa u ljudi otpada na DM2, i to 90 do 95% (20), STZ-inducirani dijabetički štakorski modeli DM2 koriste se mnogo rjeđe od modela DM1. Naime, modeli DM2 su skuplji i veoma rijetko se izvode kroz duže vremensko razdoblje (159, 198, 199). U usporedbi s drugim modelima DM2 koji se trenutno koriste, model korišten u ovom eksperimentu nudi značajne prednosti u repliciranju prirodnog tijeka promjena i metaboličkih karakteristika dijabetesa čovjeka (159, 214).

DM2 životinje u ovoj studiji su razvile hiperglikemiju manjeg intenziteta u usporedbi s DM1 štakorima, što je vjerojatno utjecalo na to da DM2 životinje nisu pokazale promjene u izražaju CaMKII i ponašanju povezanom s boli tijekom dvomjesečnog praćenja. Yang i suradnici su koristili hranu s visokim udjelom masti i saharoze, kao i STZ injekciju (30 mg/kg) da bi inducirali DM2. Uočili su povećanje ponašanja povezanog s boli deset tjedana nakon indukcije dijabetesa. Mogući uzrok povećane osjetljivosti ovih životinja su visoke doze saharoze koje su dodane u njihovu prehranu (215). Naime, dokazano je da dugotrajno jedenje saharoze uzrokuje intenzivnu hiperalgeziju u odraslih štakora (216).

Dugo vremena je u znanosti spol ispitanika koji se koriste rijetko uziman u obzir, kako u bazičnim tako i u kliničkim studijama. U području istraživanja dijabetesa također postoji potreba za istraživanjima razlika baziranih na spolu. Preporuke za prevenciju i liječenje dijabetesa ne uzimaju u obzir spol, što ne iznenađuje, jer preporuke se temelje gotovo u potpunosti na istraživanjima koje ili ne uključuju ženske ispitanike ili nemaju dovoljno ispitanika obaju spolova kako bi se ispitale spolne razlike (217). Nekoliko studija je pokazalo spolne razlike u dijabetičkoj neuropatiji. Muškarci razvijaju dijabetičku neuropatiju ranije od žena (218) i češće su pogođeni dijabetičkom neuropatijom (219). No, neuropatska bol je češća u žena nego u muškaraca (220, 221).

Dok saznanja dobivena kliničkim istraživanjima sugeriraju spolni dimorfizam u pojavnosti i simptomatologiji dijabetičke neuropatije, mogući utjecaj spolova nije nikad bio detaljno istraživan u dobro opisanom eksperimentalnom modelu dijabetesa, kao što je dijabetes induciran STZ-om (222). Rijetka istraživanja u ovom području navode da različiti mehanizmi

boli mogu imati važnu ulogu u dijabetičkoj neuropatiji izazvanoj STZ-om. Spolni dimorfizam je uočen u dijabetičkoj hiperalgeziji i hiperglikemiji, a posreduju ga razlike u dvjema izoformama protein kinaze C (PKC). Ove razlike su ovisne o spolnim hormonima (223). Ispitivanje razina neuroaktivnih hormona pokazalo je spolne i regionalne razlike u perifernom i središnjem živčanom sustavu (224) Ako postoje različiti patofiziološki mehanizmi dijabetičke neuropatije među spolovima, ta spoznaja može imati važne učinke na razvoj spolno-usmjerenih terapija (224).

U ovoj studiji su spolno-specifične razlike u glikemiji i izražaju CaMKII uočene u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1, ali ne i u modelu dijabetesa tipa 2. Eksperimentalni modeli dijabetesa induciranoj STZ-om često se koriste u istraživanjima dijabetičke neuropatije. STZ model dijabetesa tipa 1 uzrokuje ranu neuronalnu disfunkciju (200) i promijenjenu osjetljivost na bol (201). STZ model dijabetesa tipa 2 nudi značajne prednosti u replikaciji prirodnog toka i metaboličkih karakteristika bolesti kod čovjeka u usporedbi s drugim modelima dijabetesa tipa 2 koji se trenutno koriste (159, 214). Iako žene imaju za 50% pojačani rizik od bolnih simptoma u dijabetesu (225), i također pokazuju veću osjetljivost na bol u usporedbi s muškarcima za većinu modaliteta boli (220), velika većina studija koristi samo muške životinje u istraživanjima patofiziologije dijabetičke neuropatije.

Uključivanje čimbenika spola u studijama je veoma važno zbog manjka istraživanja spolnih razlika u boli i analgeziji (226). Tri glavna cilja istraživanja spolnog dimorfizma u boli i analgeziji uključuju određivanje mehanizama koji doprinose generalno većoj prevalenciji boli u žena nego u muškaraca, otkrivanje spolno-specifičnih mehanizama u boli i analgeziji koji bi bili korisni u poboljšanju liječenja boli u oba spola i određivanje razlika u uspješnosti liječenja pri sličnim tretmanima (226). Iako žene pate od većine bolesti u većem postotku nego muškarci, u istraživanjima u kojima se koriste životinje istraživači koriste neproporcionalno veći broj muških u odnosu na ženske životinje. Samo u neuroznanosti, istraživanja u kojima je korišten samo muški spol su 5,5 puta češća od onih u kojima je korišten ženski spol (227). U kliničkim i pretkliničkim istraživanjima vjerojatno se uglavnom uključuju muškarci, odnosno mužjaci zbog veće biološke kompleksnosti ženskog spola (228).

U ovoj studiji, glikemija je bila značajno veća u ženki DM1 štakora u usporedbi s mužjacima, dok u DM2 modelu ovakva razlika nije uočena. No, razina glikemije nije bila povezana s ponašanjem povezanim s boli jer nisu uočene razlike u bolnim pragovima niti hiperalgezijskim odgovorima između spolova. Spolni dimorfizam u utjecaju hiperglikemije

na nocicepciju STZ-dijabetičnih štakora je prethodno uočen u jednoj ranijoj studiji u kojoj su hiperglikemija i hiperalgezija bile povezane s razinom PKC, posebno sa njenim epsilon i delta izorofmama. PKC je serin/treonin protein kinaza, kao i CaMKII (223).

Spolni dimorfizam izražaja CaMKII u štakorskim modelima neuropatske boli nije bio prethodno istraživani. Potencijalni efekt utjecaja estradiola na izražaj CaMKII je prethodno istraživani u trigeminalnom nukelus kaudalisu. Pardutz i suradnici su pokušali rasvijetliti na koji način estradiol utječe na ozbiljnost simptoma migrene i njenih rezultat i pokazali su da administracija estradiola nije imala mjerljivi efekt na početni izražaj CaMKII i nitroglicerina nije imao utjecaja na izražaj CaMKII u ovarijektomiranih životinja (229).

U našoj studiji je veći porast izražaja CaMKII uočeni u DM1 modelu nego u DM2 modelu. Među mužjacima i ženka DM1 štakora uočene su spolno-specifične razlike u izražaju tCaMKII. Značajno povećanje izražaja tCaMKII u mužjaka DM1 štakora uočeno je u neuronima malog promjera, a u ženki u neuronima velikog promjera. Moguće je da su razlike u izražaju CaMKII povezane s razlikama u glikemiji, jer su DM1 štakori imali značajno veću glikemiju nego DM2 štakori, i ženke DM1 štakora su imale značajno veću glikemiju u usporedbi s mužjacima. Razlog zašto su istraživane stanično-specifične promjene u spinalnim ganglijima leži u prethodnim istraživanjima funkcionalnih razlika među različitim skupinama primarnih osjetnih neurona i njihovih uloga u patofiziologiji boli i dijabetičke neuropatije. Mali neuroni spinalnih ganglija vjerojatno su uključeni u obradu nociceptivnih informacija (149, 150).

Dijabetička neuropatija nastaje u oba tipa dijabetesa, a hiperglikemija je najočitiji simptom koji karakterizira obje bolesti, što navodi na zaključak da je hiperglikemija univerzalni okidač za dijabetičku neuropatiju. Različiti putevi aktivirani hiperglikemijom dovode do stvaranja reaktivnih oksidirajućih kemijskih spojeva koji uzrokuju oksidativni stres i upalu tkiva (230). Kronična lokalna *in vivo* perfuzija štakorskih lumbalnih spinalnih ganglija s hiperglikemičnom otopinom uzrokuje hiperalgeziju u stražnjem ekstremitetu koji inervira perfundirani ganglij, ali ne i u kontralateralnom ekstremitetu (231).

Iako se uloga hiperglikemije kao uzročnog faktora za sekundarne komplikacije dijabetesa često propituje, Cochrane sustavni pregled zaključuje da poboljšana kontrola glukoze u pacijenata s dijabetesom tipa 1 značajno smanjuje godišnju stopu razvoja kliničke dijabetičke neuropatije. U oba tipa dijabetesa je poboljšana kontrola glukoze bila povezana s poboljšanjem živčane provodljivosti i praga detekcije vibracije. Ovi rezultati pokazuju jasno



kliničko poboljšanje u prevenciji neuropatije u pacijenata s dijabetesom tipa 1 i moguće poboljšanje u pacijenata s dijabetesom tipa 2 (232). U potvrdi hipoteze da jačina hiperalgezije doprinosi pojačanoj nocicepciji u eksperimentalno izazvanom dijabetesu, u STZ-induciranim životinjskim modelima dijabetesa je otkriveno da je hiperalgezija pozitivno korelirana s razinom hiperglikemije (223). Infuzija zdravih pacijenata glukozom podiže koncentraciju glukoze u njihovoj plazmi i posljedično akutno snižava prag osjeta boli (233). Simptomi dijabetičke neuropatije su povezani s direktnim neuropatskim efektom hiperglikemije na živčani sustav (204, 231).

Liječenje hiperglikemije inzulinom smanjuje određene simptome dijabetičke neuropatije i odgađa napredak bolesti. Stroga kontrola hiperglikemije u pacijenata s dijabetesom tipa 1 bez kliničke neuropatije smanjuje razvitak neuropatije za oko 60% (18). Nemogućnost potpune prevencije dijabetičke neuropatije kontrolom hiperglikemije vjerojatno leži u činjenici da kontrola hiperglikemije nikada ne može biti savršena. Smanjenje brzine prijenosa živčanih impulsa i bolni simptomi javljaju se najranije u dijabetičkoj neuropatiji. Kratki životni vijek glodavaca koji se koriste u istraživanjima znatno ograničava istraživanja kroničnih ljudskih bolesti na ovim životinjama. Drugo ograničenje su testovi ponašanja, jer se kod životinja može izmjeriti samo ponašanje izazvano bolnim podražajem, koje se može manifestirati, primjerice, povlačenjem šape, ali ni spontana boli, niti pragovi drugih osjeta koji nisu bolni ne mogu se pouzdano izmjeriti u životinja (19).

Dijabetes se manifestira kroz razne znakove i simptome i povezan je sa složenim biokemijskim, funkcionalnim i strukturnim abnormalnostima perifernog živčanog sustava, pa uz hiperglikemiju i drugi čimbenici mogu biti okidači za nastanak dijabetičke neuropatije. Inzulinopenija u dijabetesu tipa 1, a inzulinska rezistencija u dijabetesu tipa 2 su također mogući okidači dijabetesa. Oba poremećaja uzrokuju smanjeno inzulinsko signaliziranje. Da smanjeno inzulinsko signaliziranje ima određenu ulogu u nastanku dijabetičke neuropatije, pokazuje činjenica da u pred-dijabetičkim i ranim dijabetičkim stanjima također može doći do promjena u brzini prijenosa živčanih impulsa u životinjskim modelima i u ljudi. Ovo ne isključuje hiperglikemiju kao važan čimbenik u dijabetičkoj neuropatiji, ali omogućuje da se stvori jasnija slika o dijabetesu (19).

U ovoj studiji, razina glikemije nije bila linearno povezana s razinom ponašanja povezanog s boli. DM1 štakori, koji su imali više razine glikemije, imali su i više izražene nociceptivne disfunkcije od DM2 štakora, ali ova razlika nije dosegla statističku značajnost. Moguće je da

su više doze korištenog STZ-a i više razine glikemije koje su uočene u ovoj studiji u usporedbi s prethodnim istraživanjem, uzrok ovoj razlici (223).

U ovoj studiji i mužjaci i ženke DM1 i DM2 štakora pokazali su značajno povećanje u postotku hiperalgezijskih odgovora svakog post-injekcijskog dana u usporedbi s početnom vrijednošću njihovih kontrola. Rezultati navode na zaključak da su dijabetičke životinje u oba korištena modela razvili pojačanu osjetljivost na mehaničke podražaje vrlo brzo nakon indukcije dijabetesa, no nisu razvile pojačanu osjetljivost na termalne podražaje. Isti rezultati uočeni su u prethodnoj studiji s DM1 i DM2 štakorima, koji su razvili mehaničku alodiniju, ali ne i termalnu hiperalgeziju (234). Životinjski modeli DM1 koriste se u istraživanjima mnogo češće nego DM2 modeli, stoga ova studija doprinosi boljem razumijevanju DM2 štakorskog modela i nociceptivne disfunkcije koja je uočena vrlo brzo nakon povećanja glikemije.

Nedavni pregledni članak je pokazao kako muškarci i žene različito doživljavaju dijabetes, no nijedan zaključak ne odnosi se na spolni dimorfizam u boli i analgeziji dijabetičnih pacijenata (217). Razlike u ponašanju povezanom s boli bazirane na spolu rijetko su ispitivane u štakorskim modelima dijabetesa. Ova studija nije pronašla spolni dimorfizam u nociceptivnim disfunkcijama štakorskih modela dijabetesa tipa 1 i tipa 2, no dodatne studije su potrebne za pojašnjavanje posljedica spolnih razlika u izražaju tCaMKII u DM1 životinja.

Različiti obrasci glikemije i izražaja tCaMKII u mužjaka i ženki DM1 životinja nisu bili povezani sa spolnim dimorfizmom u ponašanju povezanom s boli. Ovi rezultati ukazuju da ne postoje spolne razlike u bolnoj dijabetičkoj neuropatiji STZ-dijabetičnih štakora.

## 6. ZAKLJUČAK

Indukcija dijabetesa tipa 1 uzrokovala je povećanje izražaja CaMKII koji odgovara karakterističnim disfunkcijama u percepciji boli, što navodi na zaključak da je CaMKII uključena u prijenos nociceptivnih signala u modelu dijabetičke neuropatije. Ovaj novi mehanizam bi se mogao istražiti kao ciljna terapija za dijabetičku neuropatiju. U daljnjim istraživanjima bi valjalo provjeriti može li inhibicija CaMKII smanjiti nociceptivne odgovore u DM1 štakora.

Ne postoje spolne razlike u ranoj STZ-izazvanoj bolnoj dijabetičkoj neuropatiji. Izražaj CaMKII je porastao u oba spola nakon indukcije dijabetesa tipa 1, ali u različitim tipovima stanica. Ove razlike su vjerojatno posljedica značajne razlike u razini hiperglikemije između spolova.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Abnormalnosti u perifernom živcu i spinalnim ganglijima uočene su vrlo rano u eksperimentalno izazvanom dijabetesu. Enzim kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII) vjerojatno sudjeluje u moduliranju dijabetičke neuropatije zbog svoje važne uloge u homeostazi kalcija. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ponašanje povezano s boli i izražaj ukupne CaMKII i njenih izoformi  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  u neuronima spinalnih ganglija Sprague-Dawley štakora s eksperimentalno izazvanim dijabetesom tipa 1 (DM1) i tipa 2 (DM2), kao i istražiti postoje li spolne razlike u ovim varijablama.

**Metode:** Model DM1 induciran je intraperitonealnom injekcijom streptozotocina (STZ) u dozi od 55 mg/kg, a model DM2 je induciran kombinacijom manje doze STZ-a (35 mg/kg) i masne hrane (udio masti 58%). Za analizu ponašanja povezanog s boli korišteni su toplinski i mehanički podražaji. Štakori su žrtvovani dva tjedna i dva mjeseca nakon induciranja dijabetesa, a zatim je analiziran izražaj ukupne CaMKII i njenih izoformi u neuronima spinalnih ganglija koristeći imunofluorescenciju.

**Rezultati:** Dva tjedna nakon indukcije dijabetesa uočene su promjene u ponašanju povezanom s boli u DM1, ali ne i DM2 štakora. Izražaj totalne CaMKII i fosforilirane  $\alpha$  izoforme je značajno porastao u neuronima DM1 štakora istovremeno s promjenama u ponašanju. Izražaj  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  izoformi nije se promijenio tijekom eksperimenta u oba modela, kao ni izražaj ukupne CaMKII i njene  $\alpha$  izoforme u DM2 modelu. Spolni dimorfizam u glikemiji i izražaju CaMKII je uočen u štakorskom modelu DM1 ali ne u DM2. Povećani izražaj tCaMKII u spinalnim neuronima malog promjera, koji su povezani s nocicepcijom je uočen samo u muškim DM1 štakorima. Različiti obrasci glikemije i tCaMKII izražaja u mužjaka i ženki kod DM1 modela nisu bili povezani sa spolnim dimorfizmom u ponašanju povezanom s boli.

**Zaključci:** Ovi rezultati upućuju na moguću ulogu CaMKII u prijenosu osjeta boli u ranoj fazi dijabetesa tipa 1, ali ne i dijabetesa tipa 2. Također, naši rezultati ne sugeriraju spolne razlike u bolnoj dijabetičkoj neuropatiji kod štakora. Enzim CaMKII bi trebalo biti testiran kao farmakološko sredstvo za liječenje boli u dijabetičkoj neuropatiji.

## 8. SUMMARY

**Background:** Abnormalities in peripheral nerves and dorsal root ganglia (DRG) are noticed in the early stage of experimentally provoked diabetic neuropathy. Enzyme calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) may have a modulating role in diabetic neuropathy because of its role in calcium homeostasis. The aim of this study was to investigate pain-related behavior and expression of total CaMKII (tCaMKII) and its alpha, gamma and delta isoforms in the DRGs of rats with experimentally induced diabetes mellitus type 1 (DM1) and type 2 (DM2), as well as to test possible sex-related differences in these variables.

**Methods:** Model of DM1 was induced with 55 mg/kg of the streptozotocin (STZ) and for DM2 induction a combination of high fat diet and low-dose STZ (35 mg/kg) was used. Pain-related behavior was analyzed using thermal and mechanical stimuli. Two weeks and two months following induction of diabetes rats were sacrificed and the expression of CaMKII and its isoforms in the DRGs was analyzed using immunofluorescence.

**Results:** Increased pain-related behavior became evident in DM1 rats already two weeks after diabetes induction, but not in DM2 rats. The expression of tCaMKII and phosphorylated alpha isoform of CaMKII increased in DM1 animals concurrently with pain-related behavior. Expression of beta, gamma and delta isoforms in DM1 animals and expression of tCaMKII and all of its analyzed isoforms in DM2 animals remained unchanged. Sexual dimorphism in glycemia, and expression of CaMKII was observed in the rat model of DM1, but not in DM2 animals. Increased expression of total CaMKII (tCaMKII) in small-diameter dorsal root ganglia neurons, which are associated with nociception, was found only in male DM1 rats. Different patterns of glycemia and tCaMKII expression in male and female DM1 rats were not associated with the sexual dimorphism in pain-related behavior.

**Conclusions:** The present findings indicate involvement of CaMKII in transmission of nociceptive input early in DM1, but not in DM2. In addition, our results do not suggest sex-related differences in diabetic painful peripheral neuropathy of rats. Enzyme CaMKII should be tested as pharmacological target for treating the diabetic neuropathy.

## 9. LITERATURA

1. Spruce MC, Potter J, Coppini DV. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. *Diabet Med.* 2003;20(2):88-98.
2. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 2009;32 Suppl 1:S62-7.
3. Zent R, Pozzi A. Angiogenesis in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007;27(2):161-71.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care.* 2004;27(5):1047-53. Epub 2004/04/28.
5. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. *Diabetologia.* 1981;20(2):87-93.
6. Castano L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:647-79.
7. Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Epidemiology Research International Group. Diabetes.* 1988;37(8):1113-9.
8. Rewers M, LaPorte RE, King H, Tuomilehto J. Trends in the prevalence and incidence of diabetes: insulin-dependent diabetes mellitus in childhood. *World Health Stat Q.* 1988;41(3-4):179-89.
9. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *World Health Organization DIAMOND Project Group. Diabetologia.* 1993;36(10):883-92.
10. Karvonen M, Pitkaniemi M, Pitkaniemi J, Kohtamaki K, Tajima N, Tuomilehto J. Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. *World Health Organization DIAMOND Project Group. Diabetes Metab Rev.* 1997;13(4):275-91.

11. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes care*. 2000;23(10):1516-26.
12. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *Europe: The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press. 1994:268–80.
13. Shaltout AA, Qabazard MA, Abdella NA, LaPorte RE, al Arouj M, Ben Nekhi A, et al. High incidence of childhood-onset IDDM in Kuwait. Kuwait Study Group of Diabetes in Childhood. *Diabetes care*. 1995;18(7):923-7.
14. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*. 365(9467):1333-46.
15. Pierce M, Keen H, Bradley C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med*. 1995;12(1):6-13.
16. Tattersal RB, Fajans SS. Prevalence of diabetes and glucose intolerance in 199 offspring of thirty-seven conjugal diabetic parents. *Diabetes*. 1975;24(5):452-62.
17. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
18. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977-86.
19. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet*. 1998;352(9131):837-53.
20. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes care*. 1998;21(7):1167-72.
21. Ebara T, Conde K, Kako Y, Liu Y, Xu Y, Ramakrishnan R, et al. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(12):1807-18.

22. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(4):453-8.
23. Gooch C, Podwall D. The diabetic neuropathies. *Neurologist*. 2004;10(6):311-22.
24. Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, Mancuso S, Joksovic PM, Rosenberg ER, et al. Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(12):3305-16.
25. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(10):573-83.
26. Johnson MS, Ryals JM, Wright DE. Diabetes-induced chemogenic hypoalgesia is paralleled by attenuated stimulus-induced fos expression in the spinal cord of diabetic mice. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(8):637-49.
27. Vinik AI, Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):947-99.
28. Pop-Busui R, Herman WH, Feldman EL, Low PA, Martin CL, Cleary PA, et al. DCCT and EDIC studies in type 1 diabetes: lessons for diabetic neuropathy regarding metabolic memory and natural history. *Curr Diab Rep*. 2010;10(4):276-82.
29. Lo YL, Leoh TH, Lim LL, Fook-Chong S, Ng YL, Ratnagopal P. The laterality index in the evaluation of distal sensorimotor neuropathy. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2008;10(1):18-21.
30. Cameron NE, Cotter MA. Diabetes causes an early reduction in autonomic ganglion blood flow in rats. *Journal of diabetes and its complications*. 2001;15(4):198-202.
31. Horowitz SH. Diabetic neuropathy. *Clinical orthopaedics and related research*. 1993;296:78-85.
32. Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle & nerve*. 1988;11(1):21-32.
33. Dobretsov M, Romanovsky D, Stimers JR. Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(2):175-91.



34. Argoff CE, Cole BE, Fishbain DA, Irving GA. Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(4 Suppl):S3-11.
35. Berti-Mattera LN, Garipey CE, Burke RM, Hall AK. Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes. *Experimental neurology.* 2006;201(2):399-406.
36. Thomas PK. Diabetic neuropathy: mechanisms and future treatment options: *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999 Sep;67(3):277-9.
37. Dyck PJ, Giannini C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(12):1181-93.
38. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AAF. Diabetic neuropathy – a continuing enigma. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2000;16(6):408-33.
39. Benbow SJ, MacFarlane IA. Painful diabetic neuropathy. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1999;13(2):295-308.
40. Koltzenburg M, Scadding J. Neuropathic pain. *Current opinion in neurology.* 2001;14(5):641-7. Epub 2001/09/20.
41. Hogan Q. Labat Lecture: The Primary Sensory Neuron. *Regional Anesthesia & Pain Medicine.* 2010;3(35):306-11.
42. Price SA, Zeef LA, Wardleworth L, Hayes A, Tomlinson DR. Identification of changes in gene expression in dorsal root ganglia in diabetic neuropathy: correlation with functional deficits. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(7):722-32.
43. Sasaki H, Schmelzer JD, Zollman PJ, Low PA. Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats. *Acta Neuropathol.* 1997;93(2):118-28.
44. Pfirmann CW, Oberholzer PA, Zanetti M, Boos N, Trudell DJ, Resnick D, et al. 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.
45. Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR, Vardanyan M, Melemedjian OK, Mantyh PW. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse:

implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol Pain*. 2008;4(10):1744-8069.

46. International Association for the Study of Pain Taxonomy. Dostupno na: <http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/default.htm>. 2013.
47. Woolf CJ, Bennett GJ, Doherty M, Dubner R, Kidd B, Koltzenburg M, et al. Towards a mechanism-based classification of pain? *Pain*. 1998;77(3):227-9. Epub 1998/11/10.
48. Smart K, O'Connell NE, Doody C. Towards a mechanisms-based classification of pain in musculoskeletal physiotherapy? *Physical Therapy Reviews*. 2008;13:1-10.
49. Scholz J, Mannion RJ, Hord DE, Griffin RS, Rawal B, Zheng H, et al. A novel tool for the assessment of pain: validation in low back pain. *PLoS medicine*. 2009;6(4):e1000047. Epub 2009/04/11.
50. Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of internal medicine*. 2004;140(6):441-51. Epub 2004/03/17.
51. Miranda C, Di Virgilio M, Selleri S, Zanotti G, Pagliardini S, Pierotti MA, et al. Novel pathogenic mechanisms of congenital insensitivity to pain with anhidrosis genetic disorder unveiled by functional analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase type 1/nerve growth factor receptor mutations. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(8):6455-62. Epub 2001/11/24.
52. Bennett RM. The rational management of fibromyalgia patients. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2002;28(2):181-99, v. Epub 2002/07/19.
53. Sarkar S, Aziz Q, Woolf CJ, Hobson AR, Thompson DG. Contribution of central sensitisation to the development of non-cardiac chest pain. *Lancet*. 2000;356(9236):1154-9. Epub 2000/10/13.
54. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nature medicine*. 2002;8(2):136-42. Epub 2002/02/01.

55. Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends in neurosciences*. 1994;17(10):406-12. Epub 1994/10/01.
56. Wang Y, Mishra R, Simonson MS. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II stimulates c-fos transcription and DNA synthesis by a Src-based mechanism in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003;1:28-36.
57. Cheriyan J, Kumar P, Mayadevi M, Surolia A, Omkumar RV. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II bound to NMDA receptor 2B subunit exhibits increased ATP affinity and attenuated dephosphorylation. *PloS one*. 2011;6(3):e16495. Epub 2011/03/23.
58. Zhang J, Suneja SK, Potashner SJ. Protein kinase A and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulate glycine and GABA release in auditory brain stem nuclei. *J Neurosci Res*. 2004;3:361-70.
59. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Biochemical journal*. 2002;364(Pt 3):593-611. Epub 2002/04/05.
60. Ebashi S, Kodama A. Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *Journal of biochemistry*. 1966;59(4):425-6. Epub 1966/04/01.
61. Cheung WY. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochemical and biophysical research communications*. 1970;38(3):533-8. Epub 1970/02/06.
62. Kakiuchi S, Yamazaki R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochemical and biophysical research communications*. 1970;41(5):1104-10. Epub 1970/12/09.
63. Schulman H, Greengard P. Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein. *Nature*. 1978;271(5644):478-9. Epub 1978/02/02.
64. Schulman H, Greengard P. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978;75(11):5432-6. Epub 1978/11/01.

65. Yamauchi T, Fujisawa H. Evidence for three distinct forms of calmodulin-dependent protein kinases from rat brain. *FEBS letters*. 1980;116(2):141-4. Epub 1980/07/28.
66. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(30):17907-12.
67. Munro FE, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R. Evidence for a role of protein kinase C in the sustained activation of rat dorsal horn neurons evoked by cutaneous mustard oil application. *Neurosci Lett*. 1994;170(2):199-202. Epub 1994/04/11.
68. Young MR, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R, Dickinson T. The involvement of metabotropic glutamate receptors and their intracellular signalling pathways in sustained nociceptive transmission in rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacology*. 1995;34(8):1033-41. Epub 1995/08/01.
69. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992;257(5067):201-6. Epub 1992/07/10.
70. Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, et al. The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(3 Pt 2):2396-406. Epub 1995/03/01.
71. Antonov I, Kandel ER, Hawkins RD. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity and metaplasticity during intermediate-term memory formation in *Aplysia*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(16):5781-91. Epub 2010/04/23.
72. Huang YY, Kandel ER. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learning and Memory*. 1994;1(1):74-82. Epub 1994/05/01.
73. Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell*. 1995;81(6):891-904. Epub 1995/06/16.

74. Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*. 1995;81(6):905-15. Epub 1995/06/16.
75. Mayford M, Bach M, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*. 1996;273(274):1678-83.
76. Tombes RM, Faison MO, Turbeville JM. Organization and evolution of multifunctional Ca(2+)/CaM-dependent protein kinase genes. *Gene*. 2003;322:17-31.
77. Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain research bulletin*. 2011;85(1-2):2-8. Epub 2010/11/13.
78. Kanaseki T, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T. Structural features of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 1991;115(4):1049-60. Epub 1991/11/01.
79. Martone ME, Pollock JA, Jones YZ, Ellisman MH. Ultrastructural localization of dendritic messenger RNA in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(23):7437-46. Epub 1996/12/01.
80. Steward O. mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron*. 1997;18(1):9-12. Epub 1997/01/01.
81. Hanson PI, Schulman H. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. *Annual review of biochemistry*. 1992;61:559-601. Epub 1992/01/01.
82. Hanson PI, Meyer T, Stryer L, Schulman H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron*. 1994;12(5):943-56.
83. Erondy NE, Kennedy MB. Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1985;5(12):3270-7. Epub 1985/12/01.
84. Kennedy M. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *J Neurosci Res*. 1997 6:264-8.

85. Hook SS, Means AR. Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:471-505.
86. Brun VH, Ytterbo K, Morris RG, Moser MB, Moser EI. Retrograde amnesia for spatial memory induced by NMDA receptor-mediated long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2001;21(1):356-62. Epub 2001/01/11.
87. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience.* 2000;23:649-711. Epub 2000/06/09.
88. Richter-Levin G, Yaniv, D. Is LTP in the hippocampus a useful model for learning-related alterations in gene expression? *Rev Neurosci.* 2001;3:289-96.
89. Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Roberto M, Tassoni G, et al. Long-lasting hippocampal potentiation and contextual memory consolidation. *The European journal of neuroscience.* 2001;13(12):2291-8. Epub 2001/07/17.
90. Shors TJ, Matzel LD. Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav Brain Sci.* 1997 4:597-614.
91. De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science.* 1998;279(5348):227-30. Epub 1998/01/31.
92. Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E. Increased phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(11):6119-24. Epub 1995/03/17.
93. Wang JH, Kelly PT. Postsynaptic injection of CA<sup>2+</sup>/CaM induces synaptic potentiation requiring CaMKII and PKC activity. *Neuron.* 1995;15(2):443-52. Epub 1995/08/01.
94. Otmakhov N, Griffith LC. Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1997;14(17):5357-65.
95. Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic

transmission by the same mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(24):11175-9. Epub 1995/11/21.

96. Hinds HL, Tonegawa S, Malinow R. CA1 long-term potentiation is diminished but present in hippocampal slices from alpha-CaMKII mutant mice. *Learn Mem*. 1998 4-5:344-54.

97. Thiel CM, Huston JP, Schwarting RK. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*. 1998;85(4):1253-62. Epub 1998/07/29.

98. Griffith LC, Verselis LM, Aitken KM, Kyriacou CP, Danho W, Greenspan RJ. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* disrupts behavioral plasticity. *Neuron*. 1993;10(3):501-9. Epub 1993/03/01.

99. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992;257(5067):206-11. Epub 1992/07/10.

100. Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ. Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature*. 2001;411(6835):309-13. Epub 2001/05/18.

101. Cammarota M, Izquierdo I, Wolfman C, Levi de Stein M, Bernabeu R, Jerusalinsky D, et al. Inhibitory avoidance training induces rapid and selective changes in 3[H]RAMPA binding in the rat hippocampal formation. *Neurobiol Learn Mem*. 1995;3:257-64.

102. Wolfman C, Fin C, Dias M, Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, et al. Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behavioral and neural biology*. 1994;61(3):203-5. Epub 1994/05/01.

103. Tan SE, Liang KC. Inhibitory avoidance learning alters the amygdala calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain research*. 1997;748(1-2):227-33. Epub 1997/02/14.

104. Tan SE, Liang KC. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain research*. 1996;711(1-2):234-40. Epub 1996/03/04.

105. Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and neural biology*. 1992;58(1):16-26. Epub 1992/07/01.
106. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*. 2000;7(5):333-40. Epub 2000/10/21.
107. Szapiro G, Izquierdo LA, Alonso M, Barros D, Paratcha G, Ardenghi P, et al. Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*. 2000;99(1):1-5. Epub 2000/08/05.
108. Barros DM, Izquierdo LA, Sant'Anna MK, Quevedo J, Medina JH, McGaugh JL, et al. Stimulators of the cAMP cascade reverse amnesia induced by intra-amygdala but not intrahippocampal KN-62 administration. *Neurobiol Learn Mem*. 1999;1(71):94-103.
109. Izquierdo LA, Schröder N, Ardenghi P, Quevedo J, Netto CA, Medina JH, et al. Systemic administration of ACTH or vasopressin reverses the amnestic effect of posttraining beta-endorphin or electroconvulsive shock but not that of intrahippocampal infusion of protein kinase inhibitors. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;2(68):197-202.
110. Yoshimura Y, Aoi C, Yamauchi T. Investigation of protein substrates of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II translocated to the postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;1-2(81):118-28.
111. Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Huganir RL. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(51):32528-33. Epub 1998/01/24.
112. Caputi A, Gardoni F, Cimino M, Pastorino L, Cattabeni F, Di Luca M. CaMKII-dependent phosphorylation of NR2A and NR2B is decreased in animals characterized by hippocampal damage and impaired LTP. *The European journal of neuroscience*. 1999;1(11):141-8.



113. Strack S, Robison AJ, Bass MA, Colbran RJ. Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25061-4. Epub 2000/05/29.
114. Allison DW, Chervin AS, Gelfand VI, Craig AM. Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(12):4545-54. Epub 2000/06/14.
115. Strack S, Colbran RJ. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1998;33(273):20689-92.
116. Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *Journal of neurochemistry*. 1997;68(5):2119-28. Epub 1997/05/01.
117. Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature*. 2001;411(6839):801-5. Epub 2001/07/19.
118. Gardoni F, Bellone C, Cattabeni F, Di Luca M. Protein kinase C activation modulates alpha-calmodulin kinase II binding to NR2A subunit of N-methyl-D-aspartate receptor complex. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(10):7609-13. Epub 2000/12/06.
119. Gardoni F, Schrama LH, Kamal A, Gispén WH, Cattabeni F, Di Luca M. Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. 2001;5(21):1501-9.
120. Moriya T, Kouzu Y, Shibata S, Kadotani H, K. F, Miyamoto E, et al. Close linkage between calcium/calmodulin kinase II alpha/beta and NMDA-2A receptors in the lateral amygdala and significance for retrieval of auditory fear conditioning. *The European journal of neuroscience*. 2000;9(12):3307-14.

121. Yoshimura Y, Sogawa Y, Yamauchi T. Protein phosphatase 1 is involved in the dissociation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II from postsynaptic densities. *FEBS Lett.* 1999;2-3(446):239-42.
122. Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science.* 1997;276(5321):2042-5. Epub 1997/06/27.
123. Barria A, Derkach V, Soderling T. Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(52):32727-30. Epub 1998/01/31.
124. Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(6):3269-74. Epub 1999/03/17.
125. Tan SE, Wenthold RJ, Soderling TR. Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1994;14(3 Pt 1):1123-9. Epub 1994/03/01.
126. Cammarota M, Bernabeu R, Levi De Stein M, Izquierdo I, Medina JH. Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *The European journal of neuroscience.* 1998;10(8):2669-76. Epub 1998/10/10.
127. Liao D, Hessler NA, Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature.* 1995;375(6530):400-4. Epub 1995/06/01.
128. Musleh W, Bi X, Tocco G, Yaghoubi S, Baudry M. Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(17):9451-6. Epub 1997/08/19.

129. Maren S, Tocco G, Standley S, Baudry M, Thompson RF. Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP): increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(20):9654-8. Epub 1993/10/15.
130. Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(3):352-7.
131. Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*. 2000;287(5461):2262-7. Epub 2000/03/24.
132. Liao D, Scannevin RH, Huganir R. Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(16):6008-17. Epub 2001/08/07.
133. Broutman G, Baudry M. Involvement of the secretory pathway for AMPA receptors in NMDA-induced potentiation in hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(1):27-34. Epub 2001/01/11.
134. Cammarota M, Izquierdo I, Wolfman C, Levi de Stein M, Bernabeu R, Jerusalinsky D, et al. Inhibitory avoidance training induces rapid and selective changes in 3[H]AMPA receptor binding in the rat hippocampal formation. *Neurobiol Learn Mem*. 1995;64(3):257-64. Epub 1995/11/01.
135. Maletic-Savatic M, Koothan T, Malinow R. Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(17):6814-21. Epub 1998/08/26.
136. Morris EP, Torok K. Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Biol*. 2001;308(1):1-8.
137. Molloy SS, Kennedy MB. Autophosphorylation of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in cultures of postnatal rat hippocampal slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(11):4756-60.

138. Eshete F, Fields RD. Spike frequency decoding and autonomous activation of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(17):6694-705.
139. Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, Colbran RJ, Johnson ML, Barrett PQ. A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(31):10116-21.
140. Yokoyama CT, Westenbroek RE, Hell JW, Soong TW, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(10):6419-32.
141. Dzhura I, Wu Y, Zhang R, Colbran RJ, Hamilton SL, Anderson ME. C terminus L-type Ca<sup>2+</sup> channel calmodulin-binding domains are 'auto-agonist' ligands in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol*. 2003;550(Pt 3):731-8.
142. Wilson CJ, Goldberg JA. Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons. *Journal of neurophysiology*. 2006;95(1):196-204.
143. Blair NT, Bean BP. Role of tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current slow inactivation in adaptation of action potential firing in small-diameter dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(32):10338-50.
144. Hogan QH, McCallum JB, Sarantopoulos C, Aason M, Mynlieff M, Kwok WM, et al. Painful neuropathy decreases membrane calcium current in mammalian primary afferent neurons. *Pain*. 2000;86(1-2):43-53.
145. McCallum JB, Kwok WM, Sapunar D, Fuchs A, Hogan QH. Painful peripheral nerve injury decreases calcium current in axotomized sensory neurons. *Anesthesiology*. 2006;105(1):160-8.
146. Sarantopoulos CD, McCallum JB, Rigaud M, Fuchs A, Kwok WM, Hogan QH. Opposing effects of spinal nerve ligation on calcium-activated potassium currents in axotomized and adjacent mammalian primary afferent neurons. *Brain research*. 2007;1132(1):84-99.

147. Bruggemann I, Schulz S, Wiborny D, Holtt V. Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;85(1-2):239-50.
148. Carlton SM. Localization of CaMKIIalpha in rat primary sensory neurons: increase in inflammation. *Brain research*. 2002;947(2):252-9.
149. Carlton SM, Hargett GL. Stereological analysis of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II alpha -containing dorsal root ganglion neurons in the rat: colocalization with isolectin Griffonia simplicifolia, calcitonin gene-related peptide, or vanilloid receptor 1. *J Comp Neurol*. 2002;448(1):102-10.
150. Lovric-Kojundzic S, Puljak L, Hogan QH, Sapunar D. Depression of calcium/calmodulin dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons after spinal nerve ligation. *J Comp Neurol*. 2010;518(1):64-74.
151. Hasegawa S, Kohro Y, Tsuda M, Inoue K. Activation of cytosolic phospholipase A2 in dorsal root ganglion neurons by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II after peripheral nerve injury. *Mol Pain*. 2009;5:22.
152. Qin HY, Luo JL, Qi SD, Xu HX, Sung JJ, Bian ZX. Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon. *Eur J Pharmacol*. 2010;647(1-3):75-83.
153. Kawano T, Zoga V, Gemes G, McCallum JB, Wu HE, Pravdic D, et al. Suppressed Ca<sup>2+</sup>/CaM/CaMKII-dependent K(ATP) channel activity in primary afferent neurons mediates hyperalgesia after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(21):8725-30.
154. Kojundzic S, Puljak L, Hogan Q, Sapunar D. Depression of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons after spinal nerve ligation. *J Comp Neurol*. 2010 518(1):64-74.
155. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2002;51(3):819-24.

156. Luo F, Yang C, Chen Y, Shukla P, Tang L, Wang LX, et al. Reversal of Chronic Inflammatory Pain by Acute Inhibition of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;325(1):267-75.
157. Dai Y, Wang H, Ogawa A, Yamanaka H, Obata K, Tokunaga A, et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the spinal cord contributes to neuropathic pain in a rat model of mononeuropathy. *The European journal of neuroscience*. 2005;21(9):2467-74.
158. Zochodne DW, Murray MM, van der Sloot P, Riopelle RJ. Distal tibial mononeuropathy in diabetic and nondiabetic rats reared on wire cages: an experimental entrapment neuropathy. *Brain research*. 1995;698(1-2):130-6.
159. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4):313-20.
160. Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The metabolic fate and elimination of streptozotocin. *Biochem Soc Trans*. 1975;3(3):410-4.
161. Lindblom U, Verrillo RT. Sensory functions in chronic neuralgia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1979;42(5):422-35.
162. Sapunar D, Vukojevic K, Kostic S, Puljak L. Attenuation of pain-related behavior evoked by injury through blockade of neuropeptide Y Y2 receptor. *Pain*. 2011;152(5):1173-81. Epub 2011/03/08.
163. B MP, J MD, M PG. Mimotopes and proteome analyses using human genomic and cDNA epitope phage display. *Comparative and functional genomics*. 2002;3(3):254-63. Epub 2008/07/17.
164. Song JH, Bellail A, Tse MC, Yong VW, Hao C. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(12):3299-308.
165. Rose AJ, Hargreaves M. Exercise increases Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2003;553(Pt 1):303-9.

166. Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, et al. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 14):2301-7.
167. Reissner KJ, Uys JD, Schwacke JH, Comte-Walters S, Rutherford-Bethard JL, Dunn TE, et al. AKAP signaling in reinstated cocaine seeking revealed by iTRAQ proteomic analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2011;31(15):5648-58.
168. Croatian National Bank. Available from: [http://www.hnb.hr/statistika/e-ekonomski\\_indikatori.htm](http://www.hnb.hr/statistika/e-ekonomski_indikatori.htm). Accessed: April 3, 2008.
169. Yamagata Y, Kobayashi S, Umeda T, Inoue A, Sakagami H, Fukaya M, et al. Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(23):7607-18.
170. Akimoto T, Ribar TJ, Williams RS, Yan Z. Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2004;287(5):C1311-C9.
171. Peng W, Zhang Y, Zheng M, Cheng H, Zhu W, Cao CM, et al. Cardioprotection by CaMKII-deltaB is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70. *Circulation research.* 2010;106(1):102-10.
172. Kajander KC, Wakisaka S, Bennett GJ. Spontaneous discharge originates in the dorsal root ganglion at the onset of a painful peripheral neuropathy in the rat. *Neurosci Lett.* 1992;138(2):225-8.
173. Cao XH, Byun HS, Chen SR, Cai YQ, Pan HL. Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of neurochemistry.* 2010;114(5):1460-75.
174. Craner MJ, Klein JP, Renganathan M, Black JA, Waxman SG. Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Annals of neurology.* 2002;52(6):786-92.

175. Chattopadhyay M, Zhou Z, Hao S, Mata M, Fink DJ. Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy. *Mol Pain*. 2012;8(1):17.
176. Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(28):29341-50.
177. Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ. Vector-mediated release of GABA attenuates pain-related behaviors and reduces NaV1.7 in DRG neurons. *European Journal of Pain*. 2011;15(9):913-20.
178. Biessels G, Gispen WH. The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: significance in diabetic neuropathy. *Life Sci*. 1996;59(5-6):379-87.
179. Fink CC, Meyer T. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(3):293-9.
180. Hall KE, Sima AA, Wiley JW. Voltage-dependent calcium currents are enhanced in dorsal root ganglion neurones from the Bio Bred/Worcester diabetic rat. *J Physiol*. 1995;486(Pt 2):313-22.
181. Levy J, Gavin JR, 3rd, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am J Med*. 1994;96(3):260-73.
182. Shutov L, Kruglikov I, Gryshchenko O, Khomula E, Viatchenko-Karpinski V, Belan P, et al. The Effect of Nimodipine on Calcium Homeostasis and Pain Sensitivity in Diabetic Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2006;26(7):1539-55.
183. Stanfa LC, Dickenson AH. The role of non-N-methyl-D-aspartate ionotropic glutamate receptors in the spinal transmission of nociception in normal animals and animals with carrageenan inflammation. *Neuroscience*. 1999;93(4):1391-8.
184. Umeda M, Ohkubo T, Ono J, Fukuizumi T, Kitamura K. Molecular and immunohistochemical studies in expression of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*. 2006;79(21):1995-2000.



185. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *European Journal of Pharmacology*. 1999;375(1-3):217-23.
186. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis*. 1999;6(5):347-63.
187. Topp KS, Tanner KD, Levine JD. Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol*. 2000;424(4):563-76.
188. Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(1):618-27.
189. Fang F, Wang HL, Ye P, Deng HL, Dong GL, Ma LL, et al. Detection of autoantibodies in the serum of primary hepatocarcinoma patients. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2002;1(1):94-5. Epub 2003/11/11.
190. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, et al. Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012;52(5):1103-11.
191. Yousif MH, Akhtar S, Walther T, Benter IF. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in development of vascular dysfunction in diabetic rats with hypertension. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(2):256-63.
192. Bouallegue A, Pandey NR, Srivastava AK. CaMKII knockdown attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced phosphorylation of ERK1/2, PKB/Akt, and IGF-1R in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(6):858-66.
193. Bhardwaj SK, Kaur G. Effect of diabetes on calcium/calmodulin dependent protein kinase-II from rat brain. *Neurochem Int*. 1999;35(4):329-35.
194. Crown ED, Gwak YS, Ye Z, Yu Tan H, Johnson KM, Xu GY, et al. Calcium/calmodulin dependent kinase II contributes to persistent central neuropathic pain following spinal cord injury. *Pain*. 2012;153(3):710-21.

195. Coultrap SJ, Vest RS, Ashpole NM, Hudmon A, Bayer KU. CaMKII in cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(7):861-72.
196. Levy J, Gavin Iii JR, Sowers JR. Diabetes mellitus: A disease of abnormal cellular calcium metabolism? *The American Journal of Medicine.* 1994;96(3):260-73.
197. Sima AAF, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia.* 1999;42(7):773-88.
198. Sima AAF, Zhang W, Xu G, Sugimoto K, Guberski D, Yorek MA. A comparison of diabetic polyneuropathy in Type II diabetic BBZDR/Wor rats and in Type I diabetic BB/Wor rats. *Diabetologia.* 2000;43(6):786-93.
199. Li F, Abatan OI, Kim H, Burnett D, Larkin D, Obrosova IG, et al. Taurine reverses neurological and neurovascular deficits in Zucker diabetic fatty rats. *Neurobiology of Disease.* 2006;22(3):669-76.
200. Coppey LJ, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Slowing of Motor Nerve Conduction Velocity in Streptozotocin-induced Diabetic Rats is Preceded by Impaired Vasodilation in Arterioles that Overlie the Sciatic Nerve. *International Journal of Experimental Diabetes Research.* 2000;1(2):131-43.
201. Romanovsky D, Hastings SL, Stimers JR, Dobretsov M. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetes. *Journal of the Peripheral Nervous System.* 2004;9(2):62-9.
202. Romanovsky D, Cruz NF, Dienel GA, Dobretsov M. Mechanical hyperalgesia correlates with insulin deficiency in normoglycemic streptozotocin-treated rats. *Neurobiology of Disease.* 2006;24(2):384-94.
203. Malcangio M, Tomlinson DR. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain.* 1998;76(1-2):151-7.
204. Dobretsov M, Hastings SL, Romanovsky D, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. *Brain research.* 2003;960(1-2):174-83.
205. Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain.* 1999;81(3):307-16.

206. Sugimoto K, Rashid IB, Shoji M, Suda T, Yasujima M. Early Changes in Insulin Receptor Signaling and Pain Sensation in Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathy in Rats. *The Journal of Pain*. 2008;9(3):237-45.
207. Berti-Mattera LN, Kern TS, Siegel RE, Nemet I, Mitchell R. Sulfasalazine blocks the development of tactile allodynia in diabetic rats. *Diabetes*. 2008;57(10):2801-8.
208. Kato N, Nemoto K, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y, Uenoyama M, et al. Nonviral gene transfer of human hepatocyte growth factor improves streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Diabetes care*. 2005;3(54):846-54. Epub Mar.
209. Hoybergs YMJJ, Biermans RLV, Meert TF. The impact of bodyweight and body condition on behavioral testing for painful diabetic neuropathy in the streptozotocin rat model. *Neuroscience Letters*. 2008;436(1):13-8.
210. Taliyan R, Sharma PL. Possible mechanism of protective effect of thalidomide in STZ-induced-neuropathic pain behavior in rats. *Inflammopharmacology*. 2012;20(2):89-97.
211. Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ. Continuous delta-opioid receptor activation reduces neuronal voltage-gated sodium channel (NaV1.7) levels through activation of protein kinase C in painful diabetic neuropathy. *J Neurosci Res*. 2008 26(28):6652-8. Epub Jun 25.
212. Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*. 1993;53(1):81-8.
213. Calcutt N, Freshwater J, Mizisin A. Prevention of sensory disorders in diabetic Sprague-Dawley rats by aldose reductase inhibition or treatment with ciliary neurotrophic factor. *Diabetologia*. 2004;47(4):718-24.
214. Chen D, Wang M-W. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2005;7(4):307-17.
215. Yang X-y, Sun L, Xu P, Gong L-l, Qiang G-f, Zhang L, et al. Effects of salvianolic acid A on plantar microcirculation and peripheral nerve function in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 2011;665(1-3):40-6.
216. Mukherjee K, Mathur R, Nayar U. Nociceptive responses to chronic stress of restraint and noxious stimuli in sucrose fed rats. *Stress and Health*. 2001;17(5):297-305.

217. Legato MJ, Gelzer A, Goland R, Ebner SA, Rajan S, Villagra V, et al. Gender-specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. *Gend Med*. 2006;3(2):131-58.
218. Aaberg ML, Burch DM, Hud ZR, Zacharias MP. Gender differences in the onset of diabetic neuropathy. *Journal of diabetes and its complications*. 2008;22(2):83-7. Epub 2008/02/19.
219. Booya F, Bandarian F, Larijani B, Pajouhi M, Nooraei M, Lotfi J. Potential risk factors for diabetic neuropathy: a case control study. *BMC Neurology*. 2005;5(1):24.
220. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley Iii JL. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *The Journal of Pain*. 2009;10(5):447-85.
221. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008;136(3):380-7.
222. Pesaresi M, Giatti S, Cavaletti G, Abbiati F, Calabrese D, Bianchi R, et al. Sex differences in the manifestation of peripheral diabetic neuropathy in gonadectomized rats: a correlation with the levels of neuroactive steroids in the sciatic nerve. *Experimental neurology*. 2011;228(2):215-21.
223. Joseph EK, Levine JD. Sexual dimorphism in the contribution of protein kinase C isoforms to nociception in the streptozotocin diabetic rat. *Neuroscience*. 2003;120(4):907-13. Epub 2003/08/21.
224. Pesaresi M, Maschi O, Giatti S, Garcia-Segura LM, Caruso D, Melcangi RC. Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. *Horm Behav*. 2010;57(1):46-55.
225. Abbott CA, Malik RA, van Ross ERE, Kulkarni J, Boulton AJM. Prevalence and Characteristics of Painful Diabetic Neuropathy in a Large Community-Based Diabetic Population in the U.K. *Diabetes care*. 34(10):2220-4.
226. Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, et al. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain*. 2007;132 Suppl 1:S26-45. Epub 2007/10/30.

227. Zucker I, Beery AK. Males still dominate animal studies. *Nature* 2010 Jun 10;465(7299):690.
228. Racine M, Tousignant-Laflamme Y, Kloda LA, Dion D, Dupuis G, Choiniere M. A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and experimental pain perception - part 1: are there really differences between women and men? *Pain*. 2012;153(3):602-18.
229. Pardutz A, Hoyk Z, Varga H, Vecsei L, Schoenen J. Oestrogen-modulated increase of calmodulin-dependent protein kinase II (CamKII) in rat spinal trigeminal nucleus after systemic nitroglycerin. *Cephalalgia*. 2007;27(1):46-53.
230. Dobretsov M, Romanovsky D, Stimers JR. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;2(13):175-91. Epub January 14.
231. Dobretsov M, Hastings SL, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rats with chronic perfusion of lumbar dorsal root ganglion with hyperglycemic solution. *J Neurosci Methods*. 2001;110(1-2):9-15.
232. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;6:CD007543. Epub 2012/06/15.
233. Morley GK, Mooradian AD, Levine AS, Morley JE. Mechanism of pain in diabetic peripheral neuropathy: Effect of glucose on pain perception in humans. *The American Journal of Medicine*. 1984;77(1):79-82.
234. Vera G, Lopez-Miranda V, Herradon E, Martin MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(2):335-43.

## 10. ŽIVOTOPIS

**LEJLA FERHATOVIĆ**



**Adresa:**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Laboratorij za istraživanje boli

Šoltanska 2, 21000 Split, Hrvatska

**Telefon:** +385 21 557 810

**e-pošta:** lejla.ferhatovic@mefst.hr

**Datum rođenja:** 1. veljače 1983.

**Mjesto rođenja:** Split, Hrvatska

### **Radno iskustvo**

Ožujak 2013- danas Postoktorandica na EU FP7 projektu GlowBrain na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Rujan 2010. – veljača 2013. Stručna suradnica na znanstvenom projektu Molekularna memorija u dijabetičkoj neuropatiji (MEMODIN) u Laboratoriju za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu

### **Obrazovanje**

2011. – danas: Poslijediplomski studij Translacijska istraživanja u Biomedicini (TRIBE) Medicinskog fakulteta u Splitu

2009. Diplomirani inženjer kemijske tehnologije, smijer: zaštita okoliša, diploma dobivena na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu, Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Politeo

## **Usavršavanje**

1. FENS-IBRO djelomično financirana škola 2012 “Evolucija koncepata boli”, lipanj 2012. Siena, Italija
2. EBSCOhost: Trening pretaživanja istraživačkih baza podataka, svibanj 2012. Split, Hrvatska
3. Metodološki tečajevi u biologiji i medicini: “DNA i RNA”, ožujak 2012. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska
4. Opći tečaj o intelektualnom vlasništvu, Svjetska organizacija za intelektualno vlasništvo (WIPO), travanj 2011.

## **Posebno iskustvo u području istraživanja boli**

Bazična istraživanja (životinjski modeli boli i dijabetesa, imunohistokemija, spektrofotometrija, Western Blot), klinička istraživanja (analiza podataka o pacijenatima), pretraživanje literature, čitanje priručnika i znanstvenih članaka

## **Nastavne aktivnosti**

2011. – 2012.

Katedra Istraživanje u biomedicini i zdravstvu pri Medicinskom fakultetu u Splitu.

## **Znanstveni interesi**

Neuropatska bol, dijabetička neuropatija, biomaterijali, moždani udar, matične stanice

## Članstva u stručnim udruženjima

Hrvatski liječnički zbor, HLZ

Hrvatsko društvo za liječenje boli, *HDLB*

International Association for the Study of Pain (IASP)

Hrvatsko društvo za neuroznanost

## Publikacije

1. Hongwei Y, Fischer G, **Ferhatovic L**, Fan F, Light R.A, Weihrauch D, Sapunar D, Hiroyuki N, Park F, Hogan Q. Intraganglionic AAV6 Results in Efficient and Long-term Gene Transfer to Peripheral Sensory Nervous System in Adult Rats, PLOS ONE, *Prihvaćen u ožujku 2013.*
2. Novak A, Režić Mužinić N, Čikeš-Čulić V, Božić J, Tičinović Kurir T, **Ferhatović L**, Puljak L, Markotić A, Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of type 1 and type 2 diabetes. Journal of Physiology and Biochemistry, *Prihvaćen u veljači 2013.*
3. **Ferhatović L**, Banožić A, Kostić S, Tičinović Kurir T, 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. 2013 Mar;116(3):712-21.
4. Ćosić A, **Ferhatović L**, Banožić A, Kraljević S, Marić A, Sapunar D, Puljak L. Pain catastrophizing changes during menstrual cycle. *Prihvaćen u Psychology, Health & Medicine*, 26. 02. 2013.
5. **Ferhatovic L**, Banožić 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 Histochemica. 2012 Dec 22. pii: S0065-1281(12)00170-5.
6. Klinar I, **Ferhatović L**, Banožić A, Raguž M, Kostić S, Sapunar D, Puljak L. Physicians' attitudes about interprofessional treatment of chronic pain: family physicians are considered the most important collaborators. Scandinavian Journal of Caring Sciences. 2012 July 15. doi: 10.1111/j.1471-6712.2012.01039.x.



7. 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.
8. Mužinić Režić N, Čikeš-Čulić V, **Ferhatović L**, Puljak L, Tičinović-Kurir T, Markotić A. Renal CD77 expression in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Poslan u Biochemia Medica*.

### Sažetci i prezentacije na znanstvenim skupovima

1. Ćosić A, **Ferhatović L**, Banožić A, Kraljević S, Marić A, Sapunar D, Puljak L. Pain catastrophizing changes during menstrual cycle, 14. svjetski kongres boli. Kolovoz, 2012., Milano, Italija.
2. **Ferhatović L**, Banožić A, Kostić S, Tičinović Kurir T, Novak A, Vrdoljak L, Sapunar D, Puljak L. 14. svjetski kongres boli. Kolovoz, 2012., Milano, Italija.
3. Režić Mužinić N, Čikeš Čulić V, Radan M, Mastelić A, Delić H, **Ferhatović L**, Puljak L, Markotić A. Renal globotetraosylceramide expression in rat model of diabetes type 1. Skup FEBS3+ „Od molekula do života i nazad“. Lipanj, 2012. Opatija.
4. **Ferhatović L**, Kostić S, Banožić A, Vrdoljak L, Sapunar D, Puljak L. A role of calcium/calmodulin-depedent protein kinase II in diabetic neuropathy. Pozvano predavanje, 7. godišnja konferencija „Mostovi u znanosti: Znanost i umjetnost za napredak medicine“. Ožujak, 2012. Budimpešta, Mađarska
5. **Ferhatović L**, Kostić S, Banožić A, Sapunar D, Puljak L, A role of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in diabetic neuropathy,7. kongres Europske federacije udruženja za bol (engl., *European Federation of IASP Chapters – EFIC*). Rujan, 2011. Hamburg, Njemačka.
6. **Ferhatović L**, Banožić A, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in the diabetic neuropathy. Skup mladih neuroznanstvenika. Lipanj, 2011. Trst, Italija.
7. Carev I, **Ferhatović L**, Politeo O, Burčul F, Jukić M, Miloš M. Biological activitiy of non-volatile compounds of plants in Asteraceae family. Međunarodni skup XIII. Ruzičkini dani. „Danas znanost-sutra industrija“. Rujan, 2010. Vukovar.

### **Predavanja na znanstvenim skupovima**

1. Europska škola boli, IASP/FENS/IBRO/Sveučilište u Sieni. 4. lipnja 2012. Siena, Italija
2. Skup mladih neuroznanstvenika, 23. lipnja 2011. Trst, Italija

### **Druge znanstvene djelatnosti**

- Studen 2012. Instruktor na EMBO tečaju Anatomija i embriologija miša, Medicinski fakultet u Splitu
- 2011.-2012. Član organizacijskog odbora Festivala znanosti u Splitu
2011. -2012. Član organizacijskog odbora 1. skupa mladih znanstvenika Medicinskog fakulteta u Splitu

## **RADOVI NA KOJIMA SE TEMELJI DOKTORSKA DISERTACIJA**

Ova je doktorska disertacija napisana temeljem dva znanstvena rada, objavljena u međunarodnim časopisima:

1. **Ferhatovic L**, Banožić 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 Histochemica*. 2012 Dec 22. pii: S0065-1281(12)00170-5.
2. **Ferhatović L**, Banožić A, Kostić S, Tičinović Kurir T, 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*. 2013 Mar;116(3):712-21.