

# Aktivirana kalcijsko-kalmodulinska protein-kinaza alfa, VEGF i NPY u trigeminalnom gangliju štakora u šećernoj bolesti tipa 1 i 2 : imunohistokemijska studija

---

Jerić, Milka

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:171:986821>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-16**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu**  
**Medicinski fakultet**

**Milka Jerić, dr. med.**

**AKTIVIRANA KALCIJSKO-KALMODULINSKA PROTEIN-KINAZA  
ALFA, VEGF I NPY U TRIGEMINALNOM GANGLIJU ŠTAKORA U  
ŠEĆERNOJ BOLESTI TIP 1 I 2 – IMUNOHISTOKEMIJSKA STUDIJA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2015.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: Natalija Filipović, doc. dr. sc.

## **ZAHVALE**

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

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	8
1.1	Šećerna bolest.....	8
1.1.1	Šećerna bolest tipa 1 .....	8
1.1.2	Šećerna bolest tipa 2 .....	9
1.2	Komplikacije šećerne bolesti .....	10
1.2.1	Dijabetička neuropatija.....	11
1.2.2	Dijabetična neuropatija malih i velikih neurona.....	13
1.3	Bol .....	15
1.3.1	Vrste i mehanizam nastanka boli .....	15
1.3.2	Dijabetička neuralgija.....	16
1.4	Anatomske karakteristike trigeminalnog ganglija i živaca .....	18
1.4.1	Trigeminalni spinalni put i prenošenje informacija.....	19
1.4.2	Trigeminalna neuropatija.....	20
1.5	Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza II (CaMKII) .....	22
1.5.1	Struktura i regulacija enzimske aktivnosti CaMKII .....	22
1.5.2	Uloga CaMKII u sinaptičkoj plastičnosti i pamćenju .....	23
1.5.3	CaMKII i neuropatije.....	25
1.5.4	CaMKII i dijabetička neuropatija .....	27
1.6	Dijabetes i upalni odgovor .....	29
1.6.1	Neuropeptid Y .....	30
1.6.2	Neuropeptid Y i dijabetes .....	33
1.6.3	Vaskularni endotelni čimbenik rasta .....	35
1.6.4	Vaskularni endotelni čimbenik rasta i dijabetes .....	38
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	40
3.	HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	41
4.	METODE I MATERIJALI .....	42
4.1	Etička pitanja.....	42
4.2	Pokusne životinje .....	42
4.3	Štakorski modeli dijabetesa.....	43
4.4	Priprema tkiva za imunofluorescenciju .....	44
4.5	Bojenje hemalaun eozinom .....	44
4.6	Imunofluorescencijska bojanja.....	45
4.7	Analiza slika i kvantifikacija.....	47
4.8	Statistički postupci .....	48
5.	REZULTATI.....	49

5.1	Validacija životinjskih modela za indukciju dijabetesa tipa 1 i tipa 2 .....	49
5.2	Morfološke promjene u neuronima trigeminalnih ganglija štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa .....	51
5.3	Distribucija neurona trigeminalnog ganglija štakora prema veličini u ranom stadiju šećerne bolesti tipa 1 i 2 .....	55
5.4	Intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$ u neuronima trigeminalnog ganglija štakora samostalno i u kolokalizaciji s IB4 tijekom ranog stadija šećerne bolesti tipa 1 i 2 .....	57
5.5	Udio NPY samostalno i u kolokalizaciji s IB4 u trigeminalnom gangliju ranog stadija šećerne bolesti tipa 1 i 2 .....	61
5.6	Udio VEGF imunoreaktivnih neurona samostalno i u kolokalizaciji s IB4 u trigeminalnom gangliju štakora tijekom ranog stadija šećerne bolesti tipa 1 i 2 .....	64
6.	RASPRAVA .....	68
7.	ZAKLJUČCI .....	78
8.	SAŽETAK .....	79
9.	SUMMARY .....	81
10.	LITERATURA .....	82
11.	ŽIVOTOPIS .....	102

## 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> )
ATF3	čimbenik aktivacije transkripcije vezan uz stres (engl. <i>stress-related gene-activating transcription factor 3</i> )
ATP	adenozin-tri-fosfat
CaMKII	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II
CaMKII $\alpha$	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II alfa
CAP	kapsaicin (engl. <i>capsaicin</i> )
C-DM1	kontrolna skupina štakora za dijabetes tip 1
C-DM2	kontrolna skupina štakora za dijabetes tip 2
CGRP	peptid vezan za gen kalcitonina (engl. <i>calcitonin gene-related peptide</i> )
DM	šećerna bolest (lat. <i>diabetes mellitus</i> )
DM1	šećerna bolest tipa 1
DM2	šećerna bolest tipa 2
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DPN	dijabetička periferna neuropatija (engl. <i>diabetic peripheral neuropathy</i> )
DSPN	senzomotorna dijabetička periferna neuropatija (engl. <i>diabetic sensomotor peripheral neuropathy</i> )
GABA	$\gamma$ -aminomaslačna kiselina (engl. <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> )

GDNF	glijalni čimbenik rasta neurona (engl. <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i> )
HbA1c	glikozilirani hemoglobin A1c
IB4	izolektin B4
IENF	intraepidermalna živčana vlakna (engl. <i>intraepidermal nerve fibers</i> )
i.p.	intraperitonealna injekcija
IASP	Međunarodno udruženje za istraživanje boli (engl. <i>International Association for the Study of Pain</i> )
LADA	latentni autoimuni dijabetes u odrasloj dobi (engl. <i>latent autoimmune diabetes in adults</i> )
LTP	dugodjelujuća potencijacija signala (engl. <i>long term potentiation</i> )
LTD	dugodjelujuća depresija signala (engl. <i>long term depression</i> )
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
Na/K ATP	natrij/kalij adenzin-tri-fosfat (engl. <i>sodium-potassium adenosine triphosphat</i> )
NC	test živčane provodljivosti (engl. <i>nerve conduction test</i> )
NMDA	N-metil D-aspartat glutaminski receptori (engl. <i>N-Methyl-D-aspartate</i> )
NGF	čimbenik rasta neurona (engl. <i>nerve growth factor</i> )
NPY	neuropeptid y
O-GlcNAc	O-povezana N-acetilglukozamin transferaza (engl. <i>O-linked N-acetylglucosamine transferase</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
pCaMKII $\alpha$	fosforilirana kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II alfa

PGP	protein gen produkt (engl. <i>protein gene product 9.5</i> )
SG	spinalni ganglij
STZ	streptozotocin
SŽS	središnji živčani sustav
TG	trigeminalni ganglij
TRPV1	receptor kapsaicina (engl. <i>transient receptor potential vanilloid 1</i> )
VGCC	kalcijevi kanali ovisni o naponu (engl. <i>voltage-gated calcium channels</i> )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )



## 1. UVOD

### 1.1 Šećerna bolest

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*; DM) je najčešća metabolička bolest, obilježena kroničnom hiperglikemijom. Uzrokuje poremećaj u metabolizmu ugljikohidrata, bjelančevina i masti, a nastaje zbog promjena u sekreciji i/ili djelovanju inzulina (1). Broj oboljelih od DM i njegovih komplikacija eksponencijalno se povećava i vodeći je uzročnik morbiditeta i mortaliteta. Trenutačno broj oboljelih od dijabetesa širom svijeta iznosi 382 milijuna, a do 2035. godine predviđa se eksponencijalni rast i do 572 milijuna (2).

Dva su najčešća tipa šećerne bolesti – o inzulinu ovisna šećerna bolest (tip 1) i o inzulinu neovisna šećerna bolest (tip 2). Tip 1 (DM1) nastaje zbog zastoja u proizvodnji inzulina, a tip 2 (DM2) nastaje uslijed rezistencije perifernih tkiva na inzulin (3). U etiološkoj klasifikaciji bolesti opisuju se gestacijski DM i drugi specifični tipovi DM, kao što su: DM uzrokovan različitim hormonalnim poremećajima (najčešće zbog izloženosti visokim koncentracijama kortizola), genetskim poremećajima ili dugogodišnjim korištenjem lijekova (4).

Kronična hiperglikemija uzrokuje niz metaboličkih, kardiovaskularnih i neuroloških oštećenja i komplikacija (5). Patogenetski procesi u podlozi nastanka šećerne bolesti uključuju autoimuno razaranje beta stanica gušterače s posljedičnom inzulinskom rezistencijom, neadekvatno lučenje inzulina ili smanjeni odgovor tkiva na inzulin (6). Dijabetes se očituje s karakterističnim trijasom simptoma kao što su prekomjerno mokrenje (poliurija), prekomjerno jedenje (polifagija) i pojačani osjećaj žeđi (polidipsija) (4). Simptomi su često odsutni ili neprepoznatljivi, a posljedice dugotrajne hiperglikemije uzrokuju komplikacije i prije nego se postavi dijagnoza.

#### 1.1.1 Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1, kronični autoimuni ili juvenilni dijabetes javlja se u 5-10% bolesnika (4). Kao multifaktorijalna autoimuna bolest nastaje djelovanjem okolišnih i genetskih čimbenika. Tip 1 šećerne bolesti podrazumijeva nedostatak proizvodnje vlastitog inzulina, uzrokovan oštećenjem beta stanica gušterače i gubitkom njihove funkcije (1). Uzrok DM1 leži u autoimunom inzulinitisu, kroničnom upalnom zbivanju u Langerhansovima otočićima  $\beta$  stanica gušterače, pri čemu specifična autoantitijela i vlastite imunološke stanice napadaju i

uništavaju stanice koje izlučuju inzulin. Incidencija DM1 u značajnom je porastu, naročito unutar dječije dobi i do 70% (7). U mlađih ljudi često počinje naglo, sa simptomima dijabetičke ketoacidoze, dok se u starijih hiperglikemijski poremećaj može manifestirati ketoacidozom izričito u vrijeme stresa ili akutnih infekcija. U starijih bolesnika početak bolesti obično je sporiji i oponaša tip 2 šećerne bolesti. Posljednjih godina za ovaj tip bolesti predlaže se korištenje naziva latentni autoimuni dijabetes odraslih (engl. *latent autoimmune diabetes in adults*; LADA). Jedina terapijska opcija je inzulinsko liječenje kojim se započinje odmah po postavljanju dijagnoze, a zlatni standard za liječenje DM1 je intenzivirana inzulinska terapija, odnosno bazal-bolus liječenje. Uz pomno planiranu prehranu, tjelesnu aktivnost, individualiziranu inzulinsku terapiju i redovitu samokontrolu, terapijski cilj je postići dobru glukoregulaciju, što potvrđuje razina glikoziliranog hemoglobina u krvi – HbA1c manja od 6,5% (4).

### **1.1.2 Šećerna bolest tipa 2**

DM2 je najčešći oblik dijabetesa s pojavnošću od 90-95%, a odlikuje se multifaktorijskom patogenezi. Uz životni stil, prejedanje i pretilost kao glavne okidače razvitka DM2, genetski elementi su također uključeni u patogenezu bolesti. Pozitivna obiteljska povijest bolesti povećava rizik od razvoja DM2 za 2 do 4 puta (5).

DM2 nastaje zbog neosjetljivosti tkiva na inzulin, tzv. inzulinske rezistencije i nedovoljne proizvodnje inzulina u  $\beta$  stanicama gušterače. Rizik razvoja DM2 raste s povećanjem dobi, tjelesne težine, unosom hrane i tjelesne neaktivnosti. Iako abdominalna pretilost inicijalno povećava inzulinsku rezistenciju i predisponira za razvitak DM, visceralna distribucija masnog tkiva je puno važniji prateći čimbenik. Isto tako, DM2 se češće pojavljuje u žena s prethodnim gestacijskim dijabetesom i u pacijenata s metaboličkom bolešću (7). DM2 se dijagnosticira znatno kasnije u odnosu na tip 1 zbog postepenog razvoja hiperglikemije i zaštitnog lučenja inzulina, iako privremeno i u nedovoljnoj koncentraciji istoga. Liječenje započinje dijetom i tjelovježbom, a u kasnijim stadijima uvodi se oralna terapija i inzulin. Nakon dva do tri mjeseca promjene stila života očekuje se poboljšanje lipidograma i HbA1c (4).

## 1.2 Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije uzrokovane DM dijele se na akutne (hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, dijabetička hipoosmolarna neketotička koma, lakto-acidotična koma) i kronične, koje nastaju kao rezultat vaskularnih oštećenja (mikrovaskularna i makrovaskularna oštećenja) (8).

Hipoglikemija je najčešća akutna komplikacija DM, a definira se razinom glukoze u plazmi nižom od 3,88 mmol/L. Adrenergički (znojenje, tremor, tahikardija, anksioznost) i neuroglikopenijski (glavobolja, omaglica, stupor, koma i smrt) simptomi pojavljuju se kada je razina glukoze u plazmi niža od 2,5 mmol/L (6).

Dijabetička ketoacidoza nastaje zbog nedostatka inzulina i smatra se hitnim stanjem zbog izazivanja smrti u 5% slučajeva. Najčešće je prva manifestacija razvitka DM1 u ne dijagnosticiranim slučajevima ili može nastati kao posljedica djelovanja stresa u DM1 bolesnika. Klinički znakovi su: Kussmaulovo disanje uzrokovano acidozom, miris po acetonu i bolovi u truhu praćeni mučninom i povraćanjem (4).

Dijabetička hiperosmolarna neketotička koma najčešće nastaje nakon akutnog stresa (infekcije, kirurškog zahvata), primjene kortikosteroida ili zatajenja organa. Praćena je smrtnošću i do 15% zbog starije dobi pacijenata i pratećeg komorbiditeta. U kliničkoj slici dominira poliurija s posljedičnom jakom dehidracijom, polidipsija, hiperglikemija, visoka osmolalnost plazme i promijenjeni mentalni status (6).

Lakto-acidotična koma javlja se u DM bolesnika s pratećim komorbiditetom, smanjenom perfuzijom tkiva i posljedičnom tkivnom hipoksijom. Kliničkom slikom uz simptome osnovne bolesti dominiraju opća slabost, mučnina i povraćanje (9).

Kronične komplikacije DM objedinjuju makrovaskularne i mikrovaskularne komplikacije. Makrovaskularne komplikacije (ishemijska bolest srca, cerebrovaskularne i periferne vaskularne bolesti) su najčešći uzročnici mortaliteta, dok mikrovaskularne komplikacije (retinopatija, nefropatija i neuropatija) rezultiraju smanjenom kvalitetom života (10).

Rizik od nastanka infarkta miokarda u oboljelih od DM odgovara riziku bolesnika već preboljelog infarkta. Isto tako, relativni rizik za moždani udar u oboljelih od DM2 doseže i do 150-400% (11). Oboljeli od DM imaju 71 puta veći rizik nastanka periferne vaskularne bolesti i gangrene nakon 40 godina trajanja DM. Uz hiperglikemiju, dislipidemija, hipertenzija i hiperkoagulopatija, kao sastavnice metaboličkog sindroma dodatno pridonose nastanku spomenutih komplikacija (12).

Retinopatija je ozbiljna mikrovaskularna komplikacija DM i vodeći je uzrok sljepoće u osoba između 20 i 74 godina. Može se javiti već 7 godina nakon dijagnosticiranja DM2, a rizik od razvoja retinopateije ovisi o duljini trajanja bolesti i visini glikemije (13).

Dijabetička nefropatija je vodeći uzrok zatajenja bubrega i do 40%. Očituje se progresivnim smanjenjem glomerularne filtracije, udruženom proteinurijom, mikroalbuminurijom i posljedičnim zatajenjem bubrežne funkcije. Uz hiperglikemiju, hipertenzija kao rezultat DM dodatno opterećuje normalnu bubrežnu funkciju (14). Već pri postavljanju dijagnoze dijabetesa 7% pacijenata ima prisutnu mikroalbuminuriju (15).

Dijabetička neuropatija je ozbiljna i kronična komplikacija DM koja oštećuje autonomni i periferni živčani sustav (16). Neuropatija varira od asimptomatskog stadija do perzistentnih neugodnih bolnih senzacija. Dijabetička neuropatija također uzrokuje inkontinenciju mokraćne, proljev, opstipaciju, erektilnu disfunkciju, te tako ozbiljno pogoršava kvalitetu života oboljelih od DM (17).

### **1.2.1 Dijabetička neuropatija**

Oštećenje perifernog živca uzrokuje remodeliranje periferne inervacije i razvitak posljedične periferne neuropatije (18). Periferna neuropatija jedna je od čestih komplikacija dijabetesa s povećanjem incidencije do 60% (19). Obuhvaća skupinu različitih bolesti od kojih je najčešća senzomotorna periferna neuropatija (engl. *distal sensorimotor peripheral neuropathy*; DSPN) (3).

Patofiziologija dijabetičke periferne neuropatije je veoma složena. Glukoza djeluje na različite receptore na osjetnim neuronima i endotelnim stanicama. Hiperglikemijom modificirani proteini (glikozilirani ili oksidirani) se vežu za receptore koji preko svojih transportnih mehanizama propuštaju glukozu u stanicu i potiču oštećenje mitohondrija. Aktivirani receptori potiču kaskadnu reakciju upalog odgovora, koja dovodi do oksidativnog stresa stanice te povećanja izražaja i aktivnosti oksidativnih enzima. Aktivirani enzimi oštećuju mitohondrije i druge stanične strukture uzrokujući ozljedu neurona (3).

Unutarstanična glukoza se procesom glikolize u mitohondrijima razlaže do piruvata, pri čemu se sintetizira adenzin-tri-fosfat (ATP). Pretjerana razgradnja akumulirane glukoze u dijabetesu opterećuje mitohondrije i oštećuje njihovu funkciju. Isto tako u anaerobnim

uvjetima dio piruvata prelazi u laktat, čime se dodatno troši energija stanice pri ponovnom prevođenju u piruvat i potiče gubitak funkcije neurona (3). Pretvorba glukoze u sorbitol, preko puta poliola kroz niz reakcija koje katalizira enzim aldoza reduktaza uzrokuje smanjenje aktivnosti Na/K ATP-aze (engl. *sodium-potassium adenosine triphosphatase*), enzima neophodnog za održavanje membranskog potencijala stanica svih živih organizama. Povećanje koncentracije sorbitola u stanici povećava osmolarnost stanice i vodi oksidativnom stresu. Aktivacija enzima aldoza reduktaze oštećuje i svoje ko-čimbenike nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NADPH), što rezultira smanjenjem razine dušikovog oksida i glutationa, koji štite stanicu od oksidacijskih ozljeda (20). Kronična unutarstanična hiperglikemija vodi povećanom stvaranju krajnjih produkata glikozilacije, koji se odlažu unutar i oko perifernih živaca. Krajnji produkti glikozilacije mogu ometati aksonalni transport, usporavati vodljivost živca, te uzrokovati crpljenje zaliha NADPH aktivacijom NADPH oksidaze, što doprinosi formiranju vodikova peroksida i održavanju daljnjeg oksidativnog stresa (20). Povećani izražaj receptora za koje se vežu krajnji produkti glikozilacije pronađen je u različitim stanicama živčanog sustava i bio je praćen morfološkim i funkcionalnim promjenama neurona u dijabetičkoj neuropatiji (3). Mitohondriji su posebno osjetljivi jer hiperglikemija potiče proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva, koji mogu oštetiti DNA i membrane stanica. Modulacija proteina koji reguliraju oblik i broj mitohondrija može narušiti stanične funkcije i dovesti do degeneracije neurona (21).

Hiperglikemija inducira monocite i endotelne stanice na povećanu proizvodnju citokina i adhezijskih molekula, te aktivira matriks-metaloproteinaze, koje mogu oštetiti aksone (3). Razni oblici dijabetičkih neuropatija mogu biti uzrokovani upalnim vaskulopatijama ili vaskulitisima (3).

Neurotropni čimbenici rasta neophodni su za održavanje strukture i funkcije živčanog tkiva, kao i popravak nakon ozljede. Niske razine čimbenika rasta neurona (engl. *nerve growth factor*; NGF) i inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 povezane su sa težinom dijabetičke neuropatije u životinjskim modelima. Nadalje, inzulin posjeduje neurotrofni učinak, a njegov nedostatak može doprinijeti razvoju neuropatije (22).

Poremećena aktivnost kalcijevih kanala igra ključnu ulogu u staničnoj smrti i ozljedi tijekom različitih poremećaja. Na modelu dijabetičke neuropatije je prikazano da pojačana aktivnost

kalcijskih kanala ovisnih o naponu (engl. *voltage-gated calcium channels*; VGCC) može dovesti do ozljede tkiva (23).

Dijabetička neuropatija klasificirana je u tri osnovne podskupine:

- a) dijabetička polineuropatija,
- b) fokalne i multifokalne neuropatije i
- c) autonomne neuropatije (18).

Dijabetička polineuropatija je najčešći oblik i odgovorna je za 80% slučajeva dijabetičke neuropatije (16). Tipična dijabetička polineuropatija je kronična, simetrična, senzomotorna polineuropatija, ovisna o dužini živca i primarno zahvaća donje udove (24). Dijabetička periferna neuropatija (engl. *diabetic peripheral neuropathy*; DPN) je obilježena progresivnim gubitkom, degeneracijom i odgođenom regeneracijom neurona, uz pojavu niza abnormalnih osjetnih simptoma poput: alodinije (bol koja nastaje kao rezultat podražaja koji u normalnim uvjetima ne izaziva bol), hiperalgezije (pojačani odgovor na bolni podražaj), poremećaja osjeta dodira, vibracije, pritiska, slabljenja mišićne snage i gubitka osjeta (25). Kliničkom slikom dominiraju osjetni simptomi žarenja, trnjenja, bockanja, bolni svrbež, oštra bol kao udar električne struje (26). Dijabetička periferna neuropatija može biti i subklinička (postojanost abnormalnog testa živčane provodljivosti, ali bez simptoma DPN) ili se može očitovati tipičnom kliničkom slikom koja može napredovati do nastanka ulkusa na stopalima, razvoja dijabetičkog stopala i potrebe za amputacijom udova (18).

U najtežim slučajevima može biti zahvaćeno i područje lica, što bi upućivalo na poremećaj duž trigeminalnog živca, kao najdužeg živca na području glave i razvitak simptoma trigeminalne neuropatije (27). Takvi poremećaji kranijalnih živaca ubrajaju se u fokalne neuropatije, koje se češće javljaju u starijih dijabetičkih bolesnika sa slabije reguliranom glikemijom.

## **1.2.2 Dijabetička neuropatija malih i velikih neurona**

Dijabetička periferna neuropatija uzrokuje ireverzibilno oštećenje neurona, pa je rana intervencija od presudnog značaja u prevenciji pogoršanja neuropatije u ranom stadiju dijabetesa (24). Ozbiljnost komplikacija raste s dužinom trajanja bolesti i izloženosti hiperglikemiji (26). Uznapredovala DPN dovodi do gubitka osjeta i oštećenja neurona svih

tipova vlakana; velikih mijeliniziranih ( $A\alpha$ ,  $A\beta$ ), malih mijeliniziranih ( $A\delta$ ) i malih nemijeliniziranih (C) (28).

Osjetni gangliji su sastavljeni od subpopulacije mehanosenzitivnih i nocicepcijskih neurona. Prema promjeru i brzini provođenja aksone neurona dijelimo na A, B i C vlakna. Skupina A vlakana obuhvaća mijelinizirana somatska aferentna i eferentna vlakna, a čine ih najdeblja i najbrža  $A\alpha$  vlakna, nešto tanja i sporija  $A\beta$  vlakna, te najtanja i najsporija  $A\delta$  vlakna. B vlakna su mijelinizirana eferentna vlakna autonomnog živčanog sustava, a C vlakna su nemijelinizirana spora vlakna. Većina  $A\beta$  vlakana ne prenose osjetne informacije, dok 90% C vlakana i 70%  $A\delta$  vlakana ubrajamo u nociceptiva vlakna (29).

Heterogenost C vlakana vidljiva je kroz različite podjele, među kojima je i podjela na peptidergička i nepeptidergička vlakna. Peptidergički C nociceptori otpuštaju neuropeptide, tvar P i peptid vezan za gen kalcitonina (engl. *calcitonin-gene related peptide*; CGRP). Oni izražavaju TrkA neurotrofni receptor, za koji se veže NGF. Nepeptidergički C nociceptori izražavaju c-Ret neurotrofinski receptor koji je ciljno mjesto vezanja neurotrofnog faktora rasta glija stanica (engl. *glial-derived neurotrophic factor*; GDNF). Veliki broj c-Ret-pozitivnih neurona također veže izolektin B4 (engl. *isolectin B4*; IB4) (30). Budući da ne postoje vlakna i živčani putovi koji prenose osjet boli, anatomski i funkcionalno specijalizirani periferni osjetni neuroni, nociceptori odgovaraju na vanjske štetne podražaje. Ti podražaji putuju prema kralježničnoj moždini kao niz električkih signala duž C i  $A\delta$  vlakana smještenih u spinalnim ili kranijalnim neuronima (25).

Senzorni poremećaji su puno češće zastupljeni nego motorički (31). Neuropatija malih neurona predstavlja 70-90% svih perifernih neuropatija i smatra se jednom od prvih pojava u dijabetičnih bolesnika (32). Degeneracija osjetnih nemijeliniziranih neurona ima najvažniju ulogu u nastanku neuropatske boli (33, 34).

Prezentacija kliničke slike dijabetičke neuropatije ovisi o tipu zahvaćenih vlakana i oštećenih neurona. Neuropatija malih neurona rezultira nastankom boli i poremećajima osjeta temperature (35), dok neuropatija velikih neurona uzrokuje poremećaje dodira, vibracije, pritiska, slabljenje miškulature i poremećaje refleksa (24).

U dijagnostici je najvažnije razlučiti pripadnost negativnim simptomima (gubitka osjeta) ili pozitivnim simptomima (hiperalgezija) (36). Do sada su u istraživanjima opisane termalno, mehanički i kemijski izazvane hiperalgezije na animalnim modelima DM kao odgovor na

podražajne testove bolnog ponašanja. Na štakorskom dijabetičkom modelu je testovima hladnog i toplog podražaja u orofacijalnom području uočena dugodjelujuća toplinska hiperalgezija, dok su ostali senzorni testovi bili pozitivni samo kod podraživanja šape dijabetičnih štakora (19). S druge strane, studije provedene na pacijentima variraju u rezultatima, od onih bez vidljivih simptoma (37), preko izraženih promjena karaktera boli u orofacijalnom području uz somatosenzorne ispade duž maksilarne grane trigeminalnog živca, kod lošije glikemijske kontrole (20), do značajnih pogoršanja simptoma orofacijalne boli u oboljelih od DM (38).

Neuropatija malih neurona, neovisno o zahvaćenosti tipa vlakana, teže se dijagnosticira od neuropatije velikih neurona, jer ne utječe na promjene prenošenja akcijskog potencijala prilikom testiranja živčane provodljivosti (39). U dijagnostici dijabetičke neuropatije malih neurona primjenjuju se različiti testovi, kao što su: biopsija kože s mjerenjem smanjenja gustoće intraepidermalnih živčanih završetaka i kvantitativni senzorni testovi (40).

### **1.3 Bol**

Prema definiciji Međunarodnog udruženja za istraživanje boli (engl. *International Association for the Study of Pain; IASP*) bol se definira kao neugodan osjetni i emocionalni doživljaj, povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili opisan u okvirima takvog oštećenja (2).

Prema duljini trajanja simptoma razlikuju se akutna i kronična bol. Akutna bol počinje nakon ozljede tkiva, često s burno izraženim simptomima, brzo se razvija i kratko traje. Prema tome, akutna se bol definira kao simptom koji upućuje na oštećenje tkiva ili bolest (41). Kronična bol se razvija sporije, traje mnogo duže (više od 3 mjeseca) od vremena potrebnog za izlječenje početnih simptoma bolesti i ne mora nužno biti posljedica bolesti ili ozljede tkiva (41). Kronična bol se očituje simptomima bolne preosjetljivosti i boli nakon podražaja koji u uobičajenim okolnostima ne uzrokuje bol (25).

#### **1.3.1 Vrste i mehanizam nastanka boli**

Prema mehanizmu nastanka bol se može podijeliti u četiri kategorije: nociceptivna, upalna, neuropatska i funkcionalna bol. Takva klasifikacija se odnosi na klasifikaciju kliničkih



prezentacija boli i temelji se na pretpostavkama o neurofiziološkim mehanizmima odgovornima za nastanak i/ili održavanje boli (42). Klasifikacija omogućava precizniju razlučivost među različitim kliničkim prezentacijama boli, te poboljšanje kliničkih ishoda biranjem lijekova koji ciljaju izravne neurofiziološke mehanizme nastanka određene vrste boli (42).

Nociceptivna bol nastaje zbog stvarnog ili prijetjećeg oštećenja tkiva aktivacijom nociceptora. Opisuje se kao bol koja nastaje uz normalnu aktivnost somatosenzornog živčanog sustava, za razliku od neuropatske boli gdje postoji patološka promjena aktivnosti tog sustava (2).

Neuropatska bol nastaje kao rezultat oštećenja ili disfunkcije perifernog ili središnjeg živčanog sustava, a ne receptora za bol. Neuropatska bol kao klinički opis zahtijeva postojanje oštećenja koje se može dokazati, uz ispunjenje neuroloških dijagnostičkih kriterija (2). Najčešći uzroci su lezije perifernog živčanog sustava, kao posljedica dijabetesa, post-herpetične neuralgije, lumbalne radikulopatije, pretjerane konzumacije alkohola, kemoterapije ili zlouporabe lijekova. Isto tako, neuropatska bol kao rezultat lezije središnjeg živčanog sustava, nastaje u pacijenata s ozljedom kralježnične moždine, multiplom sklerozom ili moždanim udarom (24). Neuropatska bol obuhvaća abnormalnu obradu osjetnih informacija i obično je perzistentna ili rekurentna maladaptivna bol. Zbog ograničenja u razumijevanju patofiziologije boli i terapijskog protokola maladaptivna bol postaje značajan klinički problem (3).

### **1.3.2 Dijabetička neuralgija**

Prevalenciju neuropatske boli u dijabetesu je veoma teško procijeniti zbog velikih razlika u rezultatima dosadašnjih istraživanja, a njena prosječna pojavnost procjenjuje se na 25% dijabetičnih bolesnika (43). Dokazano je da dijabetični bolesnici s prezentacijskom slikom boli u području lica više osjećaju bol (38), skloniji su razvitku depresivnih poremećaja (44), uz posljedično smanjenu funkcionalnost i lošiju kvalitetu života u odnosu na zdrave osobe (45).

Točan mehanizam nastanka i prijenosa osjeta boli u DPN još uvijek nije jasan. Izvor boli može biti bilo gdje na putu od oštećenih živaca do somatosenzornog korteksa mozga ili može nastati zbog kombinacije oštećenja (46).

Kronična hiperglikemija uzrokuje regeneracijsko izrastanje aksona oštećenih neurona dovodeći do oštećenja susjednih kolateralnih neurona. Uslijed periferne senzitacije hiperpodražljivi aksoni provode ektopične signale na susjedne neoštećene neurone i uzrokuju pojavu boli (47). Nakon oštećenja aksona C vlakana potiče se kolateralno grananje A $\beta$  vlakana koja otpuštaju ekscitacijske neurotransmitere i uzrokuju nastanak neuropatske boli (33). Iznenaadne promjene u glikemijskoj kontroli mogu uzrokovati strukturne i funkcionalne promjene u perineuralnim krvnim žilama, koje dovode do hipoksije i razvitka neuropatske boli (48). Pojačan izražaj o naponu ovisnih natrijevih, VGCC i o naponu neovisnih kalijevih kanala u SG štakora imaju značajnu ulogu u nastanku ektopičnog signala, razvitku osjeta boli i periferne osjetljivosti, koja pogoduje razvitku središnje preosjetljivosti. Ulazak iona kalcija u stanicu putem VGCC potiče lučenje tvari P i glutamata, koji sudjeluju u modulaciji osjeta boli u SG štakora (49). Sintetizirani metilglioksal depolarizira osjetne neurone aktiviranjem kapsaicinskih receptora (engl. *transient receptor potential vanilloid 1*; TRPV1) u SG štakora i potiče postranslacijsku modifikaciju o naponu ovisnih natrijevih kanala, s posljedičnom povećanom podražljivošću i učestalijim okidanjem akcijskih potencijala nociceptivnih neurona tijekom DPN (50). Dijabetička neuropatija uzrokuje pojačanu osjetljivost neurona mehanizmom simpatičkog grananja i razmjene adrenalina među neuronima (51). Prema teoriji nadziranog ulaza (engl. *gate control theory*) postoji mehanizam koji regulira protok signala iz periferije prema središnjem živčanom sustavu (SŽS). Pojačana percepcija boli pojačanjem signala nastaje ako nociceptivna informacija iz C i A $\delta$  vlakna nadmaši prijenos iz A $\beta$  vlakana, čime se „ulaz“ otvara i nociceptivni impulsi se pojačano provode do kralježnične moždine (52). U SG štakora ozljeda neurona hiperglikemijom potiče promjenu funkcije velikih mijeliniziranih neurona, inicijalno mehanoreceptora, prema prenošenju nociceptivnih informacija (53). Magnetskom rezonancijom potvrđena pojačana vaskularna perfuzija neurona talamusa u bolesnika s DPN pokazala je da modulacija i pojačavanje osjeta boli ne nastaje samo na razini SG nego i talamusa mehanizmom centralne senzitacije (49). U kroničnoj neuropatskoj boli adaptivnim mehanizmom plastičnosti mozga nastaju promjene kortikalnog remodeliranja, reorganizacije i somatosenzorne kortikalne aktivnosti kroz pretjeranu podražljivost korteksa u odsutnosti vanjskog podražaja (49).

Dijagnosticiranje dijabetičke neuropatije prema postavljenim standardnim protokolima temelji se na kliničkom pregledu i prepoznavanju vidljivih simptoma, provođenjem testova provodljivosti akcijskog potencijala, biopsijom kože, kornealnom konfokalnom mikroskopijom i određivanjem gustoće intraepidermalnih vlakana (24). Testiranje živčane

provodljivosti (engl. *nerve conduction*; NC) rani je i najčešće korišten test za otkrivanje DPN, (54), ali isti ne bilježi promjene i kod neuropatije malih neurona (40). Međutim, dijagnosticiranje neuropatske boli uvelike ovisi o subjektivnom opisu simptoma boli u bolesnika i provedenim testovima za neuropatsku bol, korištenjem vizualnih ljestvica i upitnika za stupnjevanje boli (55). Farmakološka terapija neuropatske boli se uglavnom temelji na simptomatskom liječenju (48). Budući istraživački pothvati teže prospektivnim istraživanjima u proučavanju učinka imunomodulacijske terapije u liječenju dijabetičke neuropatije (3). Usprkos mnogobrojnim provedenim istraživanjima s ciljem pojašnjenja etiologije i odgovarajuće terapije u bolesnika s dijabetičkom neuropatijom, do sada samo 50% pacijenata sa neuropatskom boli postiže zadovoljavajuću analgeziju, a kontrola razine glukoze u krvi se pokazala jedinim načinom bolje kontrole bolesti, s upitnim ishodom tijeka bolesti (56).

#### **1.4 Anatomske karakteristike trigeminalnog ganglija i živaca**

Trigeminalni sustav je osjetni sustav koji se sastoji od dvije populacije primarnih senzornih neurona; trigeminalnog ganglija (TG) i trigeminalne mezencefaličke jezgre (engl. *mesencephalic trigeminal nucleus*; MTN), njihovih perifernih i središnjih ciljnih područja i projekcijskih putova prema središnjem živčanom sustavu (SZS). Aksoni neurona TG se uglavnom projiciraju prema mehanoreceptorima, termoreceptorima i nociceptorima u području lica, usne i nosne šupljine, a MTN u proprioceptore žvačnih mišića. Pseudounipolarni neuroni u TG su somatotopski raspoređeni, tako da se tijela neurona koja šalju aksone u oftalmičku, maksilarnu i mandibularnu granu trigeminalnog živca nalaze redom u anteromedijalnim, srednjim i posterolateralnim dijelovima TG (46).

Trigeminalni živac, peti kranijalni živac, je najveći živac odgovoran za prijenos osjeta iz područja glave i određene motoričke funkcije poput žvakanja. Naziv "trigeminalni" potječe od činjenice da se dijeli u tri veća ogranka: oftalmički živac (lat. *n. ophthalmicus*; V<sub>1</sub>), maksilarni živac (lat. *n. maxillaris*; V<sub>2</sub>) i mandibularni živac (lat. *n. mandibularis*; V<sub>3</sub>). Oftalmički i maksilarni živac su osjetni živci, dok mandibularni živac ima osjetna i motorička vlakna. Osjetna funkcija trigeminalnog živca jest prijenos taktilnih, proprioceptivnih i nociceptivnih osjeta iz područje lica i usta u mozak. Motorički, aktivira mišiće za žvakanje, te mišiće *tensor tympani*, *tensor veli palatini*, milohioidni mišić i prednji trbuh digastričnog mišića (57). Trigeminalni živac izlazi iz mozga na ponsu moždanog debla, prelazi preko vrha

piramide i ulazi u *cavum Meckeli*, gdje je smješten trigeminalni ganglij (lat. *ganglion seminulare, ganglion Gasseri*; TG).

#### **1.4.1 Trigeminalni spinalni put i prenošenje informacija u glodavaca**

Trigeminalni ganglij je prvi dio osjetnog puta prilikom prenošenja informacija od brkova prema mozgu glodavaca. Trigeminalni ganglij sadrži stanična tijela osjetnih živčanih vlakana iz područja lica i glave. Ganglij je analogan SG, koji sadrže stanična tijela osjetnih vlakana iz regije trupa i udova. Osjetni korijen trigeminalnog živca izlazi kao glavna grana TG na putu prema moždanom deblu, dok vlakna motoričkog korijena prolaze mandibularnim živcem na svom putu do žvačnih mišića i njihova tijela nisu smještena u gangliju, nego u motoričkoj jezgri (engl. *trigeminal motor nucleus*; TMN) (57).

Većina osjetnih vlakana ulazi u TG, bez obzira na distribucijsku granu trigeminalnog živca. Tijela njihovih neurona, poput svih somatosenzornih neurona, leže izvan SŽS, u ganglijima, a proksimalni završetci ulaze u moždano deblo sredinom ponsa. Prvi aferentni akson zaobilazi glavnu osjetnu trigeminalnu jezgru (engl. *principal sensory trigeminal nucleus*; PrTN) i spušta se spinalnim trigeminalnim putem kroz moždano deblo. Akcijski potencijali se provode silaznim putem u spinalnu trigeminalnu jezgru (engl. *spinal trigeminal nucleus*; SpTN), gdje se otpuštaju neurotransmiteri iz prvog aferentnog aksona na tijelo drugog neurona unutar SpTN. Akson drugog neurona prelaskom na suprotnu stranu moždanog debla nastavlja prijenos akcijskog potencijala ventralnim trigeminalnim lemniskom. U talamusu akson drugog neurona otpušta neurotransmitere i aktivira tijelo trećeg neurona. Informacije iz područja lica i glave ulaze u ventroposteriornu medijalnu jezgru (VPM) i intralaminarnu jezgru (ILN) talamusa. Spinalni trigeminalni put dalje prevodi signal preko kapsule interne i završava u različitim kortikalnim regijama. Neurotransmiteri otpušteni iz trećeg aferentnog aksona aktiviraju kortikalne neurone i potiču obradu informacija višeg stupnja. Signali iz VPM završavaju u somatosenzornom korteksu, dok iz ILN u cingularnoj vijuzi i inzuli cerebralnog korteksa (46).

Taktilni (dodir i pritisak) osjet iz područja lica i oralne regije prenosi se preko velikih A $\beta$  aksona neurona TG do PrTN i rostralnog dijela (lat. *subnucleus oralis* i *interpolaris*) SpTN. Osjet boli i temperature iz orofacijalne regije prenosi se tankim A $\delta$  i C trigeminalnim primarnim aferentnim vlaknima prema subnucleus caudalis SpTN i zatim se nastavlja

spinotalamičkim putem prema tijelu trećeg neurona. Proprioceptijski osjet iz lica i oralne šupljine prenosi se izravno ili preko premotornih neurona u supratrigeminalu jezgru (engl. *supratrigeminal nucleus*; SuTN) i MTN, jedini ganglij smješten unutar SŽS. Eferentnu projekciju maseteričnog refleksnog luka iz TMN prenose aksoni trigeminalnih motoneurona, koji putuju motornim korijenom trigeminalnog živca u žvačne mišiće (58).

Trigeminalni ganglij ovisno o veličini sadrži A (velike), B (srednje) i C (male) neurone. Najveći broj neurona (70%) otpada na skupinu malih i srednjih neurona, zaduženih za procese nocicepcije (59). Različite populacije neurona u TG i MTN mogu se prepoznati prema morfološkim, elektrofiziološkim i neurokemijskim obilježjima. Neurofunkcionalna organizacija TG i TMN neurona može ovisiti o filogenetski različitim migracijama pojedinih primarnih aferentnih neurona, ali i obuhvaćanju različitih središnjih i perifernih ciljnih područja trigeminalnih grana. Trigeminalni osjetni neuroni kao kemijski heterogena skupina izlučuju različite kemijske neurotransmitere u sinaptičkom prijenosu i imaju mogućnost prilagođavanja neurokemijskog fenotipa u odgovoru na vanjske promjene (46).

#### **1.4.2 Trigeminalna neuropatija**

Kranijalna dijabetička neuropatija obično prvo zahvaća živce koji inerviraju očne mišiće s daljnjom tendencijom širenja na grane trigeminalnog živca. Međutim, u nekim studijama su prikazani slučajevi zahvaćanja isključivo trigeminalnog živca (20, 60). Trigeminalna neuropatija obilježena je simptomima boli, tikovima i mišićnim spazmom (61), uz žarenje usana, trnjenje i gubitak osjeta duž osjetnog područja trigeminalnog živca, što je ujedno i najčešća prezentacijska slika dijabetičkih neuroloških komplikacija u orofacijalnom području (20, 21). Trigeminalna neuropatija najčešće je jednostrana s radijalnim širenjem duž distribucijskog područja živca. Većinom zahvaća oftalmičku i maksilarnu granu trigeminalnog živca, uz pogoršanje simptoma s lošijom kontrolom glikemije (60). Dugotrajnost trigeminalne neuralgije uz česte remisije, razvitak depresivnog poremećaja i sklonost suicidalnosti bolesnika ukazuje na potrebu za pružanjem psihološke pomoći oboljelima (44). Raznovrsnost etiologije trigeminalne neuropatije (62) otežava pravovremenost postavljanja dijagnoze i provođenje terapijskih mjera (63).

Do sada je u malom broju studija prikazalo problem povezanosti dijabetesa i trigeminalne neuropatije, s varijabilnim rezultatima i još uvijek je nejasno zašto dijabetični bolesnici češće

doživljavaju akutne bolne trigeminalne atake (60). Urban i sur. prikazali su elektrofiziološkom studijom pojavu trigeminalne neuropatije u dijabetičnih bolesnika s DPN (64), dok su Finestone i sur. uočili da 50% bolesnika s trigeminalnom neuropatijom boluje od dijabetesa (65). Arap i sur. su testovima osjetljivosti u području trigeminalnog živca prikazali pojavnost orofacijalne boli i veći prag boli duž maksilarne grane trigeminalnog živca u dijabetičnih bolesnika (20). Dosadašnji rezultati istraživanja variraju, od onih bez vidljivih simptoma (37), preko izraženih promjena karaktera boli u orofacijalnom području, uz somatosenzorne ispade duž maksilarne grane trigeminalnog živca, kod lošije glikemijske kontrole bolesnika (20), do značajnih pogoršanja simptoma orofacijalne boli u oboljelih od dijabetesa (38).

Strukturne promjene u TG, kao posljedice dijabetesa, mijenjaju prijenos orofacijalne osjetne informacije i rezultiraju razvitkom trigeminalne dijabetičke neuropatije (19). Uz pozitivne testove odgovora na termalni bolni podražaj, patohistološke analize na TG dijabetičnih štakora prikazale su značajan gubitak neurona i smanjenje volumnog udjela neurona TG u dijabetičnih životinja (19).

Gangliji su primarno ciljno tkivo u patogenezi neuropatske boli jer strukturne promjene ganglija rezultiraju razvitkom neuropatije (66). Morfološke promjene SG uočene su već u ranom stadiju pokusno izazvane dijabetične neuropatije (67), uz vakuolarnu degeneraciju, membrana i propadanje neurona SG nakon šest mjeseci trajanja pokusnog dijabetesa (68). Isto tako, poznato je da periferno oštećenje živca evocira dinamičke promjene u razinama izražaja neuropeptida i njihovih receptora u projekcijskim područjima ozlijeđenih aksona, fenomenom neurokemijske plastičnosti (46). Na modelu dijabetičke neuropatije hiperglikemija je uzrokovala smanjenje izražaja vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF) u senzornim neuronima SG i intraepidermalnih vlakana u koži štakora, uz prateću mehaničku aloдинiju 2 mjeseca nakon indukcije DM (69).

Promjene neurokemijskog fenotipa kao posljedice hiperglikemije moguće je očekivati i na TG. Brojne su razlike u anatomiji i razvoju između SG i TG. Trigeminalni ganglij ima mnogo gušće inervacijsko područje s manje nemijeliniziranih vlakana; ozljeda živca rezultira manjom mogućnošću kompenzacijskog odgovora reinervacijskim grananjem simpatičkih vlakana, s učestalijim ektopičnim okidanjem akcijskog potencijala mijeliniziranih i nemijeliniziranih vlakana (70). Isto tako, rezultati brojnih studija ukazuju na razlike u

nocicepcijskoj populaciji neurona među tim ganglijima. Imunohistokemijskom metodom, je utvrđeno da u SG više neurona pokazuje dvostruku kolokalizaciju na CGRP i IB4 u odnosu na TG, dok su IB4 neuroni bili značajnije manji u SG (70). Shodno tim promjenama, opravdano je očekivati različitu patohistološku sliku u nocicepcijskoj populaciji TG u odnosu na SG i u stanjima hiperglikemije.

## **1.5 Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza II (CaMKII)**

Kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII) je enzim koji se nalazi u stanicama centralnog i perifernog živčanog sustava i ima važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, učenju i pamćenju (71). CaMKII katalizira fosforilaciju proteina i dugodjelujućom potencijacijom signala (engl. *long term potentiation*; LTP) posreduje u oscilacijama koncentracija iona kalcija u međustaničnom prostoru i odgovoru neurona kao što su: transkripcijska i translacijska regulacija, funkcija receptora i membranskih kanala, sinteza i oslobađanje neurotransmitera (72).

### **1.5.1 Struktura i regulacija enzimatske aktivnosti CaMKII**

CaMKII je multifunkcionalna oligomerna serin/treonin kinaza sa širokim spektrom djelovanja. U neuronima je CaMKII prisutna u četiri izoforme, koje su proizvodi četiriju zasebnih gena (73). Izoforme  $\alpha$  i  $\beta$  primarno se nalaze u SŽS, dok se izoforme  $\gamma$  i  $\delta$  mogu naći u svim tkivima. Izoforma  $\alpha$  je do sada najčešće istraživana (74).

Svojstvo podjedinica CaMKII da izgrade holoenzim od različitih odnosa izoformi joj omogućava složenost strukturne konfiguracije i različitost bioloških funkcija. Štakorska kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II  $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) je polipeptid sastavljen od 478 aminokiselina. Na aminoterminalnom odsječku (aminokiseline 1-128) nalazi se katalitička domena kinaze koja uključuje mjesto za vezanje *iona magnezija/adenozin-3-fosfata* (Mg<sup>2+</sup>/ATP) i mjesto za raspoznavanje supstrata. Regulacijska domena, definirana aminokiselinama 281-314 uključuje dvije međusobno preklapljene regije: auto-inhibitornu domenu i domenu za vezivanje kalmodulina, dok karboksiterminalni odsječak (aminokiseline 315-478) sudjeluje u sastavljanju holoenzima (75).

Vezivanje kalcija i kalmodulina aktivira CaMKII preko interakcije sa sekvencom koja se preklapa s katalitičkom domenom, mijenjajući time njezinu konformaciju i oslobađajući aktivno mjesto. Aktivirana kinaza katalizira fosforiliranje vanjskih supstrata i vlastitih podjedinica, što rezultira autofosforilacijom kinaze. Svojstvo autofosforilacije na 286. aminokiselini treonin povećava afinitet CaMKII za vezivanje kalcija i kalmodulina i do tisuću puta, te joj daje svojstvo „memorijske molekule“ u procesima dugoročne potencijacije i pamćenja (76). Autofosforilacija je autonomna aktivnost neovisna o daljnjoj kalcijskoj stimulaciji, jer se nakon defosforilacije nekih podjedinica one mogu ponovno refosforilirati putem susjednih autofosforiliranih podjedinica. Autofosforilacija smanjuje disocijaciju kalmodulina, nakon čega autofosforilirani enzim zadržava svoju aktivnu formu čak i nakon odvajanja kalmodulina i pada koncentracije kalcijevih iona. „Zarobljavanje“ kalmodulina ga održava vezanim za CaMKII na duže vrijeme i povećava vjerojatnost povećanja broja aktiviranih molekula kinaze (75).

Stoga, brza autofosforilacija rezultira autonomnom i konstitucijski aktivnom formom CaMKII, koja katalizira dodatne autofosforilacije na različitim mjestima i prevodi prolazna povećanja koncentracije iona kalcija u stanici u promjenu aktivnosti i fosforilaciju ciljnih proteina (71).

### **1.5.2 Uloga CaMKII u sinaptičkoj plastičnosti i pamćenju**

Jedno od temeljnih obilježja mozga je sinaptička plastičnost, koja se očituje jačanjem ili slabljenjem aktivnosti sinaptičkih veza između neurona kao odgovor na neuronske podražaje i međustaničnu aktivnost. Ta značajka je neophodna za formiranje i funkcioniranje neuronskih krugova. Ovisno o specifičnom obrascu stimulacije, pojedine sinapse mogu pojačati ili oslabiti ekscitacijsku postsinaptičku snagu prijenosa signala za nekoliko minuta do nekoliko mjeseci. Spomenuti oblici plastičnosti, LTP i dugoročna depresija (engl. *long term depression*; LTD) sudjeluju u regulaciji sinaptičke snage i pohrane informacija u neuronskim krugovima, neophodnima za procese učenja i pamćenja (71).

CaMKII $\alpha$  ima ulogu u sinaptičkoj plastičnosti neurona živčanog sustava, dekodiranjem poruke koju izražava amplituda, frekvencija i vremensko trajanje individualnog povećanja koncentracije iona kalcija (77). CA1 regija hipokampusa velikog mozga je neophodna u procesu stvaranja dugoročne memorije i korištena je kao primarni model za proučavanje dugoročne potencijacije sinaptičkog prijenosa signala. U hipokampusu dugoročna



potencijacija izaziva se promjenama u frekvenciji intradendritskih oscilacija kalcija, kojom upravljaju N-metil D-aspartat glutaminski receptori (NMDA), i brzim povećanjem autonomne aktivnosti CaMKII i njezine autofosforilacije (78). Visokofrekventna presinaptička stimulacija CA1 hipokampalnih sinapsi potiče izlučivanje neurotransmitora glutamata, koji aktivira NMDA i receptore  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionske kiseline (AMPA). Aktivacija NMDA receptora tijekom dugoročne potencijacije signala dovodi do ulaska kalcijevih iona, što u konačnici uzrokuje dugoročnu potencijaciju AMPA receptora, reguliranih ekscitacijskim postsinaptičkim strujama (79). Ulazak kalcija preko VGCC na membrani neurona ili otpuštanjem iz endoplazmatskog retikuluma, modulira sve funkcije neurona putem kratkoročne ili dugoročne regulacije sinaptičkih interakcija. Povećan utok iona kalcija započinje biokemijsku kaskadu reakcija preko aktivacije enzima CaMKII. Aktivirana CaMKII se difuzno translocira u sinapse i fosforilira AMPA glutamatne receptore, koji su važni u dugoročnoj potencijaciji i pohrani informacija u formi dugoročnog pamćenja (80).

Testovima promijenjenog ponašanja u štakora je potvrđena povezanost mehanizma učenja s brzim i specifičnim porastom CaMKII aktivnosti u hipokampusu (81). Tan i Liang su uočili povećanje aktivnosti CaMKII u amigdaloidnoj jezgri štakora nakon izvođenja testa prilagodbe novom okolišu (82). Prateće istraživanje potvrđuje da testiranje u Morrisovom bazenu inducira aktivaciju CaMKII u hipokampusu štakora, a zadržavanje memorije je ovisilo o stupnju autonomne aktivnosti CaMKII u hipokampusu (83). Životinje koje imaju točkastu mutaciju CaMKII $\alpha$ , koja blokira autofosforilaciju na aminokiselini 286. treonin pokazale su gubitak dugoročne potencijacije i poremećaj u provođenju zadatka povezanog s prostornom i radnom memorijom (84). Poremećaji fosforilacije CaMKII u hipokampusu štakora tijekom rane faze dijabetesa bili su praćeni kognitivnim ispadima i hipokampalnom atrofijom (85).

Osim uloge u postsinaptičkoj, CaMKII je uključena i u presinaptičku regulaciju otpuštanja neurotransmitera. CaMKII $\alpha$  i njezin aktivni oblik zabilježeni su i na presinaptičkim membranama C vlakana SG štakora. CaMKII $\alpha$  sudjeluje u katalizaciji otpuštanja sinaptičkih vezikula i izlučivanja neurotransmitera fosforilirajući proteine koji otpuštaju vezikule (77). Na neuropatskom modelu boli uzrokovanom kapsaicinom (CAP), CAP je stimulirao fosforilaciju CaMKII $\alpha$ , a inhibicija CaMKII $\alpha$  je dovela do smanjenja CAP potaknutog presinaptičkog otpuštanja neurotransmitera i aferentne aktivnosti neurona posredovane vaniloid receptorima (engl. *transient receptor potential vanilloid 1*; TRPV1) (77).

Promjene na razini izražaja, lokalizacije, interakcija ili aktivacije postsinaptičkih proteina reguliranih od strane kinaza, dovode do morfoloških i funkcionalnih promjena ekscitacijskih sinapsi odgovornih za procese sinaptičke plastičnosti. Pojedine psihijatrijske i neurološke bolesti povezane su s promjenama u broju i morfologiji dendritskih izbočina, što dovodi do disfunkcije sinaptičke plastičnosti i procesa učenja i pamćenja (79).

### 1.5.3 CaMKII i neuropatije

Ioni kalcija se važan su čimbenik u nastanku akcijskog potencijala na staničnoj membrani i regulira podražljivost neurona. Poremećaji u regulaciji prometa kalcija na staničnoj membrani, kao i poremećaji u njegovoj unutarstaničnoj signalizaciji, mogu doprinjeti razvoju neuroloških simptoma (36). CaMKII ima važnu ulogu u regulaciji intracelularnog kalcija (86), promjenama aktivnosti i fosforilaciji ciljnih proteina (87), te posljedičnoj podražljivosti osjetnih neurona (88). Autofosforilirana CaMKII zadržava autonomnu aktivnost neovisno o daljnjoj stimulaciji kalcijem, što čini molekularnu osnovu stanične memorije (76). Pretpostavlja se da aktivirana CaMKII služi kao ključna komponenta unutarstaničnih signalnih putova, pridonoseći razvoju simptoma neuropatije i trajne podraženosti neurona stražnjeg roga nakon ozljede kralježnične moždine (89). Liječenje inhibitorima CaMKII rezultiralo je značajnim smanjenjem mehaničke alodinije i širokog dinamičkog raspona neuralne aktivnosti potaknute raznim podražajima (90).

CaMKII $\alpha$  je glavna izoforma CaMKII, izražena u središnjem i perifernom živčanom sustavu (72). Nalazi se zajedno sa  $\mu$  opioidnim receptorima u različitim područjima mozga u kojima se obrađuje osjet boli, kao i u leđnoj moždini i SG (91). U SG, CaMKII $\alpha$  je prisutna u neuronima malog promjera, koji su povezani s prijenosom osjeta boli (72, 76, 89). Ozljeda perifernog živca je dovela do promjene izražaja CaMKII u SG i razvitka različitih simptoma neuropatije, kao što su hiperalgezija ili alodinija (92-94). Slično je pronađeno i na modelu visceralne neuropatije uz prateću visceralnu preosjetljivost (93). Izražaj CaMKII je zabilježen u 60% neurona TG, uglavnom malih i srednje velikih neurona, od kojih polovica bilježi kolokalizaciju s CGRP i TRPV1, za koje se smatra da su uglavnom prisutni u malim nociceptivnim neuronima (95). Takva distribucija CaMKII potvrđuje patofiziološku pozadinu aktivacijskog puta CaM-CaMKII u razvitku neuropatije i promjenjenom prijenosu nocicepcijskog signala u osjetnim neuronima. Od svih analiziranih izoformi CaMKII u istraživanju Ferhatović i sur., jedino se izražaj pCaMKII $\alpha$  značajno povećao nakon indukcije

DM1, što navodi na zaključak da je samo ta izoforma isključivo uključena u patofiziologiju rane dijabetičke neuropatije (96). S dužinom trajanja DM (od 6 mjeseci do 1 godinu) izražaj izoformi  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$  se smanjio u malim neuronima DRG (97).

Mnogi nociceptivni podražaji, uključujući termalne, mehaničke, kemijske i upalne, mogu potaknuti povećanje koncentracije kalcija u osjetnim neuronima, podražujući posljedično nociceptore, preko aktivacijskog puta CaM-CaMKII (88). Povećanje izražaja VGCC unutar primarnih osjetnih neurona (98), može uzrokovati povećanje unutarstaničnih koncentracija iona kalcija i aktivaciju CaMKII preko mehanizma kalcij-kalmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) (99). Price i sur. imunohistokemijski su potvrdili kapsaicinom uzrokovano povećanje opsega autofosforilacije CaMKII $\alpha$  i promjene u aktivnosti TRPV1-pozitivnih nociceptivnih neurona u TG štakora (77). Uzimajući u obzir distribuciju CaMKII i odgovor na različite bolne podražaje uz povećanje koncentracije kalcijevih iona, Liang i sur. prikazali su da podražljivost malih i srednje velikih kapsaicin osjetljivih neurona TG može biti regulirana aktivnošću CaMKII preko staničnih naponom reguliranih kanala (88). U različitim modelima neuropatije o naponu ovisni natrijevi i kalijeve kanali reguliraju podražljivost neurona središnjeg i perifernog sustava (100, 101), preko aktivnosti CaMKII (95, 102). Aktivirana CaMKII na promatranim modelima neuropatija preko različitih vrsta receptora modulira podražljivost neurona osjetnih ganglija (102-105). CaMKII $\alpha$  djeluje preko nekoliko vrsta nocicepcijskih receptora:  $\mu$  opijatnih receptora (106), purinergičkih (P2X), NMDA (107), AMPA (108), TRPV1 (77). Aktivacija tih receptora rezultira povećanjem koncentracije unutarstaničnog kalcija i modulacijom nocicepcijske aktivnosti neurona (109). Na postoperativnom modelu incizije stražnje šape zamijećena je promjena ponašanja štakora kao sekundarna hiperalgezija uzrokovana aktivacijom CaMKII $\alpha$  preko AMPA receptora (110).

Do sada su promjene aktivnosti i izražaja CaMKII opisane na različitim modelima neuropatije (77). Na modelu dugotrajne upale, promjene u koncentraciji iona kalcija unutar osjetnih neurona, preko pojačane podražljivosti ili otpuštanja neurotransmitora, potenciraju razvitak promijenjenog osjeta boli (111). Promjene u prometu kalcija dovode i do promjena izražaja gena zaduženih za nocicepciju (112), tako da upalom uzrokovana promjena ponašanja može dovesti do hiperalgezije ili povratnom inhibicijskom spregom, do blokade u prijenosu osjeta boli (113). Na modelu traumatske ozljede prikazano je da ozljeda nociceptora SG dovodi do smanjenja otpuštanja kalcija u ozlijeđenim neuronima (114), te prolaznog propadanja evociranih  $\text{Ca}^{2+}$  struja (115), koji uz fenotipske promjene neurona, dovode do pretjerane podražljivosti membrane karakteristične za neuropatsku bol (116). Na

modelu neuropatije prikazano je da traumatska ozljeda, odnosno presijecanje perifernih živaca, smanjuje izražaj CaMKII u osjetnim neuronima SG štakora (89). Nakon ozljede ishijadičnog živca i stražnjeg roga kralježnične moždine podvezivanjem ili upalom, uočena je mogućnost središnjeg i perifernog transporta CaMKII $\alpha$ , za što se pretpostavlja da bi moglo imati ulogu u razvoju neuropatije (76). Dvostrukim imunohistokemijskim bojenjem utvrđena je kolokalizacija CaMKII $\alpha$  s nocicepcijskim biljezima IB4, CGRP i TRPV1 u SG štakora (76). Sve navedeno ukazuje na važnost CaMKII u prijenosu nociceptivnih informacija nakon ozljede perifernog živca i nastanku neuropatske boli. Nakon intraplantarnog injiciranja formalina, povećanje izražaja CaMKII $\alpha$  se uočava i u stražnjem rogu kralježnične moždine, uz inhibiciju mehaničke alodinije blokadom dugoročne potencijacije CaMKII $\alpha$  (77). Ferrari i sur. potvrdili su ulogu neuroplastičnosti CaMKII $\alpha$  na modelu dugotrajne upalne neuropatije, prilikom prelaska akutne u kroničnu fazu upale i prateći razvitak simptoma neuropatije (117).

#### 1.5.4 CaMKII i dijabetička neuropatija

Neuroni SG u štakora značajno se mijenjaju nakon indukcije DM i posljedično nastaju morfološke promjene živčanog tkiva (68), promjene u kalcijским strujama i povećana stanična podražljivost (85), što pridonosi razvitku simptoma neuropatije (98). Hiperglikemija uzrokuje poremećaj u prijenosu iona kalcija i odgođeni oporavak evociranog potencijala kalcijevih struja u SG (118), povećanu unutarstaničnu razinu kalcija u većini dijabetičkih tkiva i povećan izražaj VGCC u primarnim osjetnim neuronima dijabetičnih štakora (119). Cao i sur. su prikazali utjecaj pokusnog DM na promjenu izražaja naponom reguliranih kalijevih i natrijevih kanala u neuronima SG (120). Uz poremećen promet iona kalcija, oksidativni stres, kao produkt hiperglikemije, vrlo vjerojatno pridonosi mitohondrijskim promjenama i inducira programiranu smrt neurona (121).

Mehanizam opsežne aktivacije CaMKII uzrokovan dijabetesom je još uvijek nedovoljno istražen. Erickson i sur. pokazali su da putem O-povezane glikozilacije, hiperglikemija aktivira CaMKII, zaključavajući je tako u konstitucijski aktivnu konformaciju (122). N-acetilglukozamin transferaza (engl. *O-linked N-acetylglucosamine transferase*; O-GlcNAc) putem modulacije 279. aminokiseline serina u CaMKII, potiče autonomnu aktivnost CaMKII i stvaranje molekularne memorije, čak i nakon smanjenja koncentracije iona kalcija. Iako taj proces još nije istražen na živčanom sustavu, može se očekivati sličan proces i unutar osjetnih ganglija nakon izlaganja istih hiperglikemiji. Isto tako, povećanje izražaja VGCC unutar

primarnih osjetnih neurona na dijabetičkom modelu (123), može uzrokovati povećanje unutarstaničnih koncentracija iona kalcija i aktivaciju CaMKII preko mehanizma  $Ca^{2+}$ -CaM (99). Na dijabetičkim modelima različitih tkiva (124, 125) potvrđeno je da hiperglikemija potiče aktivnost CaMKII preko povećane sinteze ATP i otpuštanja kalcijevih iona (126).

Dosadašnja istraživanja na modelu dijabetičke neuropatije pokazala su da indukcija DM1 uzrokuje povećanje izražaja CaMKII i njene fosforilirane izoforme alfa. Potvrđeno je da CaMKII ima važnu ulogu u patogenezi dijabetičke neuropatije, gdje promjene u njezinom izražaju na razini SG pridonose nastanku simptoma neuropatije (96, 127). Povećanje izražaja CaMKII i njezine fosforilirane  $\alpha$  izoforme u DM1 životinja, u neuronima svih veličina, su bile praćene odgovarajućim promjenama i u ponašanju životinja povezanim s boli, vidljivim kroz razvoj mehaničke i termalne hiperalgezije (96). Izražaj CaMKII se povećao u oba spola štakora nakon indukcije DM1, dok je analiza ponašanja povezanog s boli u konačnici pokazala da ne postoje niti spolne razlike u odgovorima na mehaničke i termalne podražaje (127).

U istraživanjima dijabetičke neuropatije drugog dijela osjetnog puta, Borić i sur. su utvrdili da se 2 tjedna od indukcije DM izražaj CaMKII i pCaMKII $\alpha$  značajno povećao u stražnjem rogu DM1 štakora, dok u DM2 modelu takve promjene nisu utvrđene (128).

S duljinom trajanja dijabetesa (i do 6 mjeseci), bio je vidljiv trend značajnog povećanja izražaja CaMKII i pCaMKII $\alpha$ , međutim nakon 12 mjeseci od indukcije DM promjene izražaja istih više nisu zabilježene (129).

Budući da je koža mjesto terminalnih završetaka primarnih osjetnih neurona, a i dijeli isto ektodermalno podrijetlo kao SŽS, daljnji rezultati Borić i sur. su prikazali povećan izražaj CaMKII i pCaMKII $\alpha$  u koži, ali ne i u intraepidermalnim živčanim vlaknima DM1 štakora (130).

Intratekalnom i intraganglijskom primjenom inhibitora CaMKII, smanjio se izražaj CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine i SG, dok je utjecaj na bolno ponašanje nakon intraganglijske primjene inhibitora CaMKII smanjio osjetljivost na hladne i mehaničke podražaje 2 sata nakon injekcije (131).

Nastavno na rezultate prijašnjih istraživanja CaMKII bi mogla biti potencijalna nova farmakološka meta za liječenje dijabetičke neuropatije. Na tragu tih istraživanja predlaže se istraživanje povezanosti izražaja pCaMKII $\alpha$  i u drugim živčanim tkivima različitih

subpopulacija neurona na štakorskom modelu DM1 i DM2. Taj pristup bi mogao biti od velikog značaja u istraživanju patofiziologije trigeminalne dijabetičke neuropatije i liječenju modulacijom pCaMKII $\alpha$  u različitim subpopulacijama osjetnih neurona TG.

## 1.6 Dijabetes i upalni odgovor

Dijabetes je stanje kronične sustavne upale. Posljedične metaboličke i enzimatske promjene vode strukturnim i funkcionalnim poremećajima neurona (3, 68). Hiperglikemija utječe na poremećaje u odgovoru imunološkog sustava, lučenju citokina, čimbenika rasta i izražaja gena neuropeptida (132). Citokini, kao što su interleukin-1, interleukin-6, inhibicijski čimbenik leukemije, cilijarni neurotropni čimbenik i čimbenik nekroze tumora alfa pokazuju višestruki učinak na ravnotežu između glije i neurona u živčanom sustavu. Njihova uloga je regulacija obnavljanja i propadanja neurona, izravno ili preko neurotrofnih čimbenika, esencijalnog procesa u patogenezi dijabetičke neuropatije (133). Nedostatak potpore neurotrofičkih čimbenika, kao što su NGF ili VEGF, potencira proces stanične smrti i propadanja neurona SG na modelu dijabetesa (134).

Dijabetesom potaknute promjene u lučenju neuropeptida zabilježene su u različitim organima, kao što su organi gastrointestinalnog sustava, krvne žile, kralježnična moždina i mozak. Oscilacije u povećanju i smanjenju izražaja istih variraju, ovisno o tkivu koje inerviraju (135). Troger i sur. su uočili smanjenje izražaja tvari P i CGRP u TG štakora u kratkoročnom modelu DM1, s porastom izražaja istih nakon 4 tjedna (136). Povećano urastanje ili regeneracija NPY-imunoreaktivnih živčanih vlakana u jeziku štakora se može objasniti kompenziranim odgovorom plastičnosti neurona u dijabetičkom modelu, kao rezultat promjene u koncentraciji neurotrofnih čimbenika otpuštenih iz upalnih stanica imunološkog sustava (135). Čimbenik rasta neurona regulira otpuštanje neuropeptida, kao dio signalnog puta regeneracije neurona u odgovoru neurona na ozljedu. U ranom stadiju dijabetesa, sinteza različitih neuropeptida je najčešće potaknuta izlučivanjem NGF iz upalnih stanica, koji sprječava razvitak osjetne dijabetičke neuropatije (137). Gyorffi i sur. potvrdili su slično na modelu kratkoročnog dijabetesa, promatrajući promjene i oštećenja na razini mijeliniziranih i nemijeliniziranih neurona (138). Upala potencira osjet boli i hiperalgezije, preko pojačane podražljivosti osjetnih neurona, uslijed aktivacije kalcijjskih struja i izlučivanja neurotransmitera (113). Pretpostavlja se da je poremećena homeostaza kalcija uključena u patogenezu dijabetičke neuropatije (118). Uz upalnim putem stimuliran proces

aktivacije kalcij–CaM–CaMKII (88), dijabetes uzrokuje poremećaj u unutarstaničnom prijenosu informacija unutar neurona SG i razvitak neuroloških simptoma (98, 118).

Nakon ozljede primarnih osjetnih neurona dolazi do brojnih promjena u izražaju gena. Razvoj oligonukleotidne mikročip tehnologije omogućio je istodobnu procjenu razine izražaja nekoliko tisuća mRNA transkripata. Tim studijama otkrivene su tisuće gena čiji se izražaj mijenja nakon ozljede neurona, koji su potencijalni kandidati za terapijske zahvate u različitim modelima neuropatije. Daljnjim promatranjem je utvrđeno da se samo određeni broj gena nakon ozljede opetovano pojavljuje u neovisnim studijama. Među genima čije su promjene izražaja nakon ozljede potvrdile u više studija su i geni za NPY i VEGF (139).

### **1.6.1 Neuropeptid Y**

Neuropeptid Y se sastoji od 36 aminokiselina i pripada obitelji peptida gušterače. Jedan je od najraspostranjenijih peptida u tijelu svih živih vrsta. Aktivnost ovog peptida ovisi o raspostranjenosti NPY receptora u perifernom i središnjem živčanom sustavu (140). Sudjeluje u regulaciji aktivnosti neuroendokrinog i metaboličkog sustava. Njegova primarna funkcija nije ograničena samo na održavanje energetske ravnoteže, nego i na regulaciju krvnog tlaka i anksioznosti. U posljednje vrijeme se naglašava njegova uloga u procesu stvaranja stanične memorije i reguliranju aktivnosti nocicepcije (141).

NPY je pronađen u neuronima SG i TG (142). U zdravom tkivu izražaj NPY se teško bilježi, ali nakon ozljede neurona zabilježene su promjene istoga (143). Nakon periferne aksotomije ili nekih drugih vrsta pokusne ozljede živca dolazi do dugotrajnih promjena u izražaju neuropeptida i njihovih receptora u primarnim osjetnim neuronima. U različitim modelima ozljede živca i indukcije boli, potvrđeno je povećanje izražaja proteina i mRNA NPY (144). Promjene su zabilježene pretežno u srednjim i velikim neuronima SG i rezultiraju izrazitim povećanjem NPY imunoreaktivnih primarnih aferentnih vlakana koja se protežu u duboke lamine dorzalnog roga kralježnične moždine štakora i oslobađaju NPY (145). Nasuprot navedenome, nakon aksotomije neuroni SG majmuna pokazuju neznatčan porast NPY mRNA, bez vidljivih promjena u NPY inervaciji dorzalnog roga kralježnične moždine (146). Nakon ozljede živca medijanusa uslijedilo je povećanje izražaja NPY i nociceptivnog biljega c-Fos, zaduženog za prijenos signala u neuropatskoj boli (147). Štoviše, intezitet izražaja NPY u SG štakora nakon ozljede je bio povezan s promjenom bolnog ponašanja (148). U TG je prisutnost NPY zabilježena nakon perifernog presjecanja i podvezivanja grana donjeg

alveolarnog živca (149). Banoliel i sur. su uočili povećanje izražaja NPY u TG štakora, uz pretpostavku da dovoljno visoke koncentracije NPY mogu biti povezane s hiperalgezijskim odgovorom na ozljedu infraorbitalnog živca (141). Uloga NPY je do sada istraživana i na upalnim modelima ozljede živca, pri čemu je utvrđen njegov pojačani izražaj u neuronima (150). Rezultati Kostić i sur. ukazuju na to da bi neurogena upala mogla biti važan okidač za nastanak simptoma neuropatije i da sprječavanje razvoja upalnog odgovora umanjuje prezentaciju istih. Lokalna primjena NPY stvara značajnu neurogenu upalu, koja može biti odgovorna za pojačano bolno ponašanje u odnosu na bolno ponašanje koje nastaje kao rezultat oštećenja živca (151). Ozljeda živca također mijenja i izražaj NPY-receptora u neuronima SG. Izražaj proteina i mRNA Y1 receptora je smanjen u malim neuronima SG štakora nakon aksotomije perifernog živca, u odnosu na povećanje izražaja Y2 receptora u štakora (152). Međutim, iste promjene nisu vidljive i na modelu miša (144), što sugerira međuvrsne razlike u načinu na koji NPY receptori reagiraju za ozljede perifernog živca. Na modelu ozljede perifernog živca u štakora i miša nisu otkrivene promjene u izražaju Y1 i Y2 receptora u stražnjem rogu kraljeznične moždine. Međutim, varijacije u vezanju NPY za dorzalni rog kraljeznične moždine, ipsilateralno od oštećenja živaca opisane su na modelu štakora i majmuna (153).

Nakon ozljede perifernog živca dolazi do kompenzacijskog urastanja simpatičkih vlakana koja otpuštaju neuropeptide (25). Oslobođanje NPY iz simpatičkih, noradrenalinskih živčanih završetaka oko krvnih žila, unutar i izvan SG, kao i iz kromafinih stanica medularnog dijela nadbubrežnih žlijezda može doprinijeti nastanku stresom inducirane hiperalgezije. U TG za razliku od SG povećan izražaj NPY nakon ozljede živca nastaje na razini neurona TG, a ne simpatičkih vlakana (141). Pojačan izražaj NPY kao i povećan broj NPY vezikula u somi neurona sudjeluje u nastanku 'unakrsnog pobuđivanja neurona'. Mehanizam 'unakrsnog pobuđivanja neurona' izaziva brzu depolarizaciju i pobuđivanje susjednih neurona uz nastanak promjenjenog bolnog ponašanja nakon ozljede (154). Nadalje, hiperalgezijski odgovor na podražaj može nastati i mehanizmom 'kemijskog unakrsnog pobuđivanja neurona' između A i C neurona. Naime, poznato je da NPY otpušten iz oštećenih velikih neurona potiče aktivnost malih nociceptivnih NPY-receptor-pozitivnih neurona, izazivajući osjet boli (155). Stoga, neuroni SG postaju jače stimulirani na pobuđivanje i sudjelovanje u nastanku neuropatske boli preko mehanizma unakrsnog pobuđivanja neurona. Akumulirani NPY unutar ozlijeđenih neurona sudjeluje u interakciji s Y2 receptorima, potičući spontano izbijanje akcijskog potencijala u osjetnim neuronima (156). Regulacijom VGCC, NPY



povećava podražljivost malih neurona SG zaduženih za nocicepciju i sudjeluje u modulaciji prijenosa osjetne informacije (156).

Iako je poznato da NPY sudjeluje u nocicepciji, njegova funkcija u neuropatskoj boli još uvijek je nedovoljno razjašnjena, a istraživanja pokazuju različite pa čak i proturječne rezultate (151). U nizu studija pokazano je da farmakološka primjena NPY uzrokuje analgeziju u zdravih i ozlijeđenih štakora. Ovaj antinociceptivni učinak se može postići samo malim dozama NPY (157). Nasuprot tome, druge studije su pokazale da NPY primijenjen subkutano u stražnju šapu životinje s kroničnom ozljedom živca pogoršava hiperalgezijske odgovore na nociceptivne podražaje (158). Razlike u rezultatima nakon primjene NPY mogu biti ishod sudjelovanja različitih podtipova NPY receptora, njihova izražaja u različitim vrstama stanica, primjene NPY na različitim mjestima, korištenja različitih pokusnih modela boli, kao i utjecaja vremena aplikacije NPY. Specifično djelovanje NPY se može povezati i s promjenama u njegovom izražaju koje nastaju nakon ozljede neurona (151).

Fiziološki učinak NPY ostvaruje se vezanjem na receptore vezane za G proteine. NPY se veže za najmanje pet različitih receptora (Y1-Y5 receptori), od kojih najčešće za Y1 i Y2 receptore (152). Vezanje NPY na receptore posljedično utječe na unutarstaničnu distribuciju iona kalcija, preko modulacije inozitol 1, 4, 5-trifosfatnog (IP3) puta ili pak aktivacijom i inhibicijom VGCC na membrani neurona. Oba tipa Y1 i Y2 receptora mogu regulirati N i P/Q tip kalcijevih kanala, dok Y1 receptori aktiviraju R i L tip kalcijevih kanala (144). Dugo vremena se smatralo da NPY ostvaruje inhibicijski učinak djelujući na neurone koji izražavaju Y1 receptor, a da vezanje za Y2 receptor povećava podražljivost neurona. Međutim, kasnije je utvrđeno da Y2 receptor također pokazuje inhibicijsku ulogu, putem smanjenja otpuštanja ekscitacijskog neurotransmitera glutamata. Mutacija gena za Y1 receptor u miša je pokazala da antinociceptivni učinak u dorzalnom rogu kralježničke moždine ovisi o nedostatku aktivnosti Y1 receptora (152). Dakle, vrsta NPY receptora, kao i lučenje odgovarajućeg neurotransmitera, selektivno inhibira ili pojačava kalcijske struje u neuronima i utječe na moduliranje osjeta boli preko nociceptivnih senzornih neurona.

Komunikacija između neurona uključuje receptore koji se mogu nalaziti na presinaptičkim (na živčanim završecima) i postsinaptičkim (na dendritima ili tijelu neurona) dijelovima neurona, pri čemu presinaptički receptori obično moduliraju otpuštanje neurotransmitera, dok postsinaptički receptori utječu na aktivnost postsinaptičkih neurona. Iako se dugo vremena pretpostavljalo da Y1 receptor djeluje postsinaptički, a Y2 receptor presinaptički, novije

morfološke i elektrofiziološke studije ukazuju da oba tipa receptora mogu imati presinaptičku i postsinaptičku funkciju u regulaciji prijenosa signala (144).

Osjetni neuroni izražavaju funkcijski povezane Y1 i Y2 receptore, iako je njihov izražaj ovisan također i o tipu stanica i o vrsti organizma u kojem se istražuju. Korištenjem metoda *in situ* hibridizacije i imunohistokemije NPY jedva da je zabilježen u neuronima SG glodavaca (142). Nasuprot tome, proteini Y1 receptora se lako vizualiziraju u malim, nociceptivnim neuronima SG štakora (20%), a Y2 receptora u srednjim i velikim neuronima miša. U isto vrijeme, manji broj (10%) malih neurona SG majmuna izražava mRNA Y2 receptora, sa samo nekoliko mRNA pozitivnih neurona na Y1 receptor (159). U neuronima štakora zabilježena je kolokalizacija Y1 receptora s CGRP, biljegom subpopulacije peptidergičkih neurona SG. U miša je utvrđeno da Y2 receptor lokaliziran u vakuolama citoplazme neurona SG kolokalizira s CGRP i IB4, dok u neuronima s membranskim tipom Y2 receptora ova kolokalizacija nije zamijećena (154), iz čega se zaključuje da će ovisno o različitim subcelularnim lokalizacijama Y2 receptora ovisiti i afinitet za vezanje liganda, kao i odgovor na agoniste i antagoniste u prijenosu osjeta boli.

NPY je zabilježen i u površinskim slojevima dorzalnog roga kraljeznične moždine štakora. Izražaj NPY potječe uglavnom iz lokalnih NPY inhibicijskih interneurona, koji kao neurotransmitter koriste  $\gamma$ -aminomaslačnu kiselinu (engl.  *$\gamma$ -Aminobutyric acid*; GABA) (160), dok manji udio potječe od NPY pozitivnih primarnih aferentnih živčanih završetaka i eferentnih neurona iz *lokus coeruleus*-a, koji otpuštaju noradrenalin i kolokaliziraju s NPY (160). Y1 receptor vrlo je rasprostranjen u kralježničnoj moždini štakora. Do sada su pronađeni Y1 receptori u najmanje sedam različitih subpopulacija malih i velikih neurona, u različitim slojevima sive tvari kralježnične moždine. S druge strane, Y2 receptori su isključivo rasprostranjeni u aferentnim živčanim završetcima, koji završavaju u površnim laminama kralježnične moždine (144).

### **1.6.2 Neuropeptid Y i dijabetes**

U ljudi oboljelih od dijabetesa, kao i u animalnim modelima DM, uočeno je drastično povećanje koncentracije NPY u krvnoj plazmi (161). Dosadašnja istraživanja o izražaju NPY provedena su na različitim tkivima u modelu dijabetičkog oštećenja. Smatra se da promjene izražaja NPY i njegovih receptora u tkivu srca i na srčanim živčanim završetcima, uz

strukturne promjene miokarda i unutarstaničnog signaliziranja kalcija, potiču nastanak dijabetičke miokardijalne neuropatije (162). Povećani izražaj NPY i/ili regeneracija NPY-imunoreaktivnih živčanih vlakana u jeziku štakora može se objasniti kompenziranim odgovorom plastičnosti neurona u dijabetičkom modelu, kao rezultat promjene u koncentraciji neurotrofnih čimbenika otpuštenih iz upalnih stanica imunološkog sustava (135).

Uz navedeno, utvrđeno je da NPY posjeduje i imunomodulacijsku ulogu kod upalnih stanja. Iako je izlučivanje NPY iz neurona enteričkog autonomnog živčanog sustava stimulirano upalnim medijatorima i citokinima, aktivirani NPY posjeduje svojstvo “neurogenske regulacije upale” putem parakrinog utjecaja na imunološki sustav (163). Nabzdyk i sur. su na kunićjem modelu zacjeljivanja ishemijskih dijabetičkih rana prikazali smanjenje genskog i proteinskog izražaja NPY u koži životinja zbog poremećaja u imunološkom odgovoru (132). Slabije cijeljenje dijabetičkih rana, kao rezultat dijabetičke neuropatije, regulirano je od strane imunološkog sustava preko neuropeptida NPY i povratnog odgovora istog, ne samo na stanice imunološkog, nego i epitelnog sustava kože, koja ima istu ektodermalnu osnovu razvoja kao i živčani sustav (132).

Do sada su samo 3 studije proučavale izražaj NPY u živčanom tkivu SG na modelu dijabetesa. Izražaj NPY nije zabilježen u SG nakon izlaganja hiperglikemiji, kao niti u kontrolnim skupinama štakora (147, 164, 165). Lin i sur. istražili su izražaj NPY u SG na modelu oštećenja živca medianusa u dijabetičnih štakora, objašnjavajući razvitak simptoma neuropatije već nakon 2 tjedna pratećom hiperglikemijom (147). Burnand i sur. metodom RNA hibridizacije na mikročipovima, 8 tjedana od indukcije dijabetesa nisu uspjeli pronaći promjene u genskom izražaju različitih čimbenika, koje su karakteristične za aksotomiju (a među koje se ubraja i gen za NPY), u SG dijabetičnih štakora. Iako model DM u mnogome oponaša model aksotomije, povećanje izražaja ovih gena je izostalo vjerojatno zbog gubitka neurotrofičkih čimbenika rasta u dijabetičkom modelu oštećenja neurona (164). Chottova Dvorakova i sur. također nisu utvrdili promjene izražaja NPY unutar SG štakora, na kroničnom modelu srčane dijabetičke neuropatije, u trajanju od 26 do 53 tjedna, korištenjem RT-PCR i imunohistokemijskog bojanja (165).

### 1.6.3 Vaskularni endotelni čimbenik rasta

VEGF-A je član obitelji dimernih glikoproteina. Pripada velikoj obitelji čimbenika rasta koji nastaju iz trombocita. Ostali članovi ove obitelji su VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i čimbenik rasta placente (engl. *placental growth factor*; PGF) (166). Svi tipovi VEGF, ovisno o tipu stanica i staničnih procesa, vežu se različitim afinitetom i selektivnošću na različite receptore na membrani stanica. Aktivnost VEGF posredovana je transmembranskim tirozin-kinaznim receptorima visokog afiniteta: VEGFR-1 i VEGFR-2, kao i VEGF tirozin-kinaznim koreceptorima iz obitelji neuropilina (NRP): NRP1 NRP2. Miševi koji nemaju VEGF receptora ugibaju u embrionalnoj fazi razvoja (166).

Vaskularni endotelni čimbenik rasta je signalni protein rasta koji utječe na permeabilnost krvnih žila i proliferaciju endotelnih stanica. VEGF ima presudnu ulogu u patološkoj i fiziološkoj angiogenezi. Multifunkcionalni je protein, koji pokazuje višestruke učinke na endotelne stanice krvnih žila i uzrokuje neoangiogenezu. VEGF stimulira endotelne stanice na migraciju, diobu te ih štiti od apoptoze i starenja (166). Na molekularnoj razini, VEGF reprogramira gensku ekspresiju endotelnih stanica, što dovodi do povećanog izražaja brojnih specifičnih proteina kao što su: prokoagulantni tkivni čimbenik, proteini uključeni u fibrinolitičke puteve, matriks metaloproteinaze i brojni antiapoptotički čimbenici. Njegova druga značajna uloga je povećavanje permeabilnosti krvnih žila (167). Iako primarno djeluje na endotel krvnih žila, VEGF ima učinak i na druge stanice koje izražavaju VEGF receptore. VEGF stimulira monocito/makrofagu kemotaksiju, ima učinak na limfocite, granulocitno-makrofagne progenitorske stanice, osteoblaste, i neke tumorske stanice. VEGF kao permeabilni vaskularni čimbenik rasta ima ulogu u stanjima upale i drugim patološkim procesima. U različitim upalnim stanjima mastociti su glavne stanice koje sudjeluju u izlučivanju proinflamatornih molekula VEGF (168). VEGF ima značajnu ulogu u normalnoj angiogenezi, tijekom upale, u procesima koji su vezani uz zarastanje rana, razvoju embrija, reproduktivnom ciklusu i trudnoći. Osim u fiziološkim stanjima, povećanje izražaja VEGF gena je pronađeno i tijekom razvoja cijelog niza bolesti kao što su reumatoidni artritis, dijabetička retinopatija, a veže se i uz rast, invaziju i metastaziranje tumora (169). Smatra se da je VEGF od kritične važnosti u tumorskoj angiogenezi, zbog svoje važne uloge u stimulaciji staničnog preživljavanja, mitogenezi, migraciji, diferencijaciji, kao i krvožilnoj propusnosti i mobilizaciji endotelnih progenitorskih stanica (170). Tumorski mikrookoliš karakteriziran hipoksijom, acidozom, prisutnošću slobodnih radikala i citokina, povezan je s

promjenama u izražaju i djelovanju VEGF i njegovih receptora. Povišena koncentracija VEGF u krvnome serumu korelira s lošijom prognozom u nekih solidnih tumora. Istovremeno, novije spoznaje ukazuju da inhibicija tumorske angiogeneze povećava učinak primjenjene kemoterapije i radioterapije (171).

Novija istraživanja naglašavaju njegovu pluripotentnu ulogu i u živčanom sustavu. VEGF posjeduje neurotrofnu (preživljavanje) i neurotropnu (neurogeneza i rast neurona) ulogu u parakrinom nadziranju neurona središnjeg i perifernog živčanog sustava (170). Protektivna uloga VEGF s naglaskom na neuronalnoj komponenti zaštite obuhvaća neurogenezu, sinaptičku plastičnost, neuroprotekciju i neuroregeneraciju različitih vrsta neurona i potpornih stanica (172). Zaštitna uloga VEGF opisana je na modelima različitih neuroloških bolesti, uključujući oporavak nakon moždanog udara, u Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti, multiploj sklerozi i epilepsiji (134). Na najproučavanijem modelu amiotrofične lateralne skleroze prikazana je progresivna degeneracija motornih neurona, kao rezultat delecije gena zaduženog za izražaj VEGF, kao i poboljšanje simptoma, povećanjem izražaja VEGF u neuronima nakon injiciranja istog (173). Iako je do sada terapijski učinak VEGF na ozljede neurona u dijabetičkoj neuropatiji smatran isključivo posrednim, preko poticanja angiogeneze i reperfuzije (174), današnji rezultati upućuju na izravnu ulogu VEGF u zaštiti neurona (170). U hipoksičnim uvjetima tijekom upalnih stanja i na dijabetičkom modelu neuropatije, VEGF je pokazao neuroprotektivnu ulogu povećanjem moždanog protoka, smanjenjem odgovora neurona na stres i povećanjem preživljavanja neurona (175, 176).

U cilju uspostavljanja funkcionalne mreže neurona, neuroni tijekom razvoja prolaze faze diferencijacije, migracije, usmjeravanja aksona prema specifičnim mjestima inervacije i uspostavljanja sinaptičke mreže kontakata. VEGF i njegovi receptori imaju izravne učinke u spomenutim funkcijama (177). Nedavna istraživanja su pokazala da u nepovoljnim uvjetima hipoksije, oksidativnog stresa i hipoglikemije VEGF posredovanjem različitih mehanizama, inhibira staničnu smrt i potiče neurogenezu (177). Diferencijacija neurona iz matičnih neuralnih i progenitornih stanica odvija se za vrijeme razvitka, ali i u odrasloj dobi. Endotelne stanice utječu na njihovu proliferaciju preko aktivnosti VEGF. Intracerebroventrikularno injiciranje VEGF potiče neurogenezu i preko različitih čimbenika rasta, kao što je BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*) stimulira proliferaciju neurona (169). Putem sličnog mehanizma, povećanjem izražaja VEGF i VEGF-2 receptora, antidepresivi djeluju na proliferaciju neurona hipokampusa (178). Budući da, u patogenezi psihijatrijskih bolesti značajnu ulogu imaju apoptoza i atrofija neurona, trofični čimbenik VEGF se pokazao

neophodnim u održavanju morfologije i plastičnosti neurona. Iako novije studije na štakorskom modelu depresije nisu zabilježile promjene VEGF u serumu, izražaj VEGF je bio nizak u hipokampusu i frontalnom režnju štakora. S druge pak strane, povećan izražaj VEGF je pokazao antidepresivni i anksiolitički učinak, koji se očitovao povećanom mobilnošću miševa u izvršavanju zadatka plivanja (178). Povećan izražaj VEGF u hipokampalnoj formaciji posljedično poboljšava pamćenje i mehanizme učenja (177). Suprotno tome, gubitak VEGF tijekom razvitka mozga rezultira smanjenjem vaskularizacije mozga i apoptozom neurona, s posljedičnom atrofijom hipokampusa i mikrocefalijom (178). Učinak VEGF u zaštiti neurona od hipoksije ili glutamatom inducirane neurotoksičnosti je vidljiv na različitim vrstama stanica; hipokampusnih, dopaminergičkih i cerebelarnih neurona, neurona mrežnice i perifernog živčanog sustava. VEGF ostvaruje izravnu neuroprotektivnu ulogu inhibicijom apoptoze neurona preko enzima kaspaze 9, kao i povećanjem izražaja vlastitih, VEGF-2 receptora (169). Neizravnu neuroprotektivnu ulogu VEGF ostvaruje povećanjem moždanog protoka i dilatacijom cerebralnih arterija, povećanjem opskrbe mozga glukozom i antioksidativnom aktivnošću preko hem oksigenaze (169).

VEGF je pokazao i ulogu u regeneraciji neurona nakon ozljede. Na modelu kompresijske ozljede cervikalnog SG štakora regeneracija neurona je bila potaknuta povećanjem izražaja VEGF i VEGF-2 receptora (179). Izlaganje miševa novom okolišu uzrokovalo je povećanje izražaja VEGF i brojnih dendrita u hipokampalnim neuronima, što ukazuje na njegovu funkciju u dendritogenezi i modulaciji sinaptičke plastičnosti (178). U perifernom živčanom sustavu, VEGF se pokazao neophodnim u poticanju rasta i preživljavanja aksona senzornih neurona SG, djelujući preko VEGF-2 receptora, dok je u SG novorođenih štakora isti proces bio posredovan preko NRP2 receptora. Povećan izražaj VEGF-2 receptora je zaštitio neurone od paklitaxelom izazvane neuropatije, dok je inhibicija istoga rezultirala razvitkom senzorne periferne neuropatije (180).

Uloga VEGF je do sada istraživana na modelima upalne i konstriktivske ozljede živca i razvitka simptomatske neuropatije, pri čemu je utvrđen promjenjen izražaj istog u neuronima (181-183). Injiciranje cisplatina uzrokuje alodiniju i termalnu hiperalgeziju, uz gubitak regeneracijske sposobnosti osjetnih neurona u miša. Bol vjerojatno nastaje kao rezultat smanjenja izražaja VEGF i regeneracijskih biljega u osjetnim neuronima odgovornim za procese neuroregeneracije i neuroprotekcije. Ovakav model odgovora kemoterapijskom modelu u pacijenata oboljelih od malignih bolesti, gdje injiciranje VEGF pokazuje ulogu u zaštiti nerona od apoptoze i razvitka simptoma neuropatije (184).

Na modelu ozljede kralježnične moždine, aplikacija VEGF smanjila je posljedice ozljede, inhibicijom upale putem povećanja staničnog procesa autofagije, što je imalo kritičnu ulogu u preživljavanju i funkcionalnom oporavku motornih neurona. Iako je paradokсно, budući da autofagija ima ulogu u staničnoj smrti, u ovom slučaju autofagosomi štite neurone od stanične smrti i potiču preživljavanje, čišćenjem upalnih čimbenika iz citoplazme neurona (185). Na modelu kompresijske ozljede cervikalnog SG, lokalna upala je uzrokovala povećanje apoptotskih promjena neurona, ali i izražaja VEGF. VEGF je kompenzacijski zaštitio neurone stimulacijom regeneracije krvnih žila koje opskrbljuju neurone i izravnim poticanju regeneracije neurona preko njihovih membranskih receptora (179). Povećanje izražaja VEGF-A i VEGF-B u neuronima TG, kao i subkonjunktivalna aplikacija VEGF-B uzrokovala je regeneraciju oštećenih neurona, bez obuhvaćanja zdravih neurona i poticanja neovaskularizacije. Proces regeneracije primijećen je i na perifernim tkivima, poboljšanjem osjeta rožnice (186). Dhondt i sur. su potvrdili neuroprotektivnu ulogu VEGF-B, na osjetnim neuronima u različitim patološkim stanjima. Povećani izražaj VEGF-B u SG štakora je smanjio hiperglikemijski uzrokovani odgovor neurona na stres i povećao preživljavanje neurona (187).

#### **1.6.4 Vaskularni endotelni čimbenik rasta i dijabetes**

Promjene izražaja VEGF u živčanom sustavu su proučavane i na dijabetičkim modelima. Međutim, iako su promjene izražaja VEGF važan čimbenik u patofiziologiji dijabetičke neuropatije te su praćene promjenama u bolnom ponašanju štakora, rezultati dinamike izražaja VEGF u SG na dijabetičkom modelu su za sada proturječni, dok njegov izražaj u TG do sada nije istraživan (69, 176, 183). Samii i sur. pokazali su da hiperglikemija izravno potiče povećan izražaj VEGF u SG miša 12 tjedana nakon indukcije DM (188). Taiana i sur. potvrdili su isto na embrionalnim SG štakora već 2 dana nakon izloženosti hiperglikemiji (183), dok su Pawson i sur. zabilježili smanjenje izražaja VEGF u malim i srednjim osjetnim neuronima SG štakora 3 tjedna nakon indukcije DM2 (69).

Verheyen i sur. potvrdili su terapijsku ulogu VEGF u izravnoj zaštiti osjetnih neurona na modelu dijabetičke neuropatije (176). Funkcionalne promjene perifernih neurona 12 tjedana nakon indukcije DM, uz povećanje izražaja VEGF u neuronima SG, ukazuju na njegovu ulogu u regeneraciji nakon oštećenja neurona (188). Patogeneza dijabetičke neuropatije je usko povezana s mikroangiopatijom i neuralnom ishemijom (174). VEGF se pokazao kao

dobar čimbenik u zaštiti neurona SG od staničnog stresa uzrokovanog hiperglikemijom, na modelima dijabetičke periferne neuropatije *in vivo* i *in vitro*. Verheyen i sur. prikazali su utjecaj hiperglikemije na povećan izražaj čimbenika aktivacije transkripcije vezanog uz stres (engl. *stress-related gene-activating transcription factor 3*; ATF3), jednog od prvih biljega odgovora neurona na stres izazvan ozljedom. Injiciranje VEGF u stražnju šapu štakora smanjuje odgovor neurona na stres kao i oštećenje mitohondrijskih membrana potaknuto hiperglikemijom. Dvostrukim imunohistokemijskim bojenjem na VEGF receptor 1 i protein gen produkt (engl. *protein gene product 9,5*; PGP 9,5) u osjetnim neuronima i živčanim završecima kože dijabetičnih štakora, potvrđen je utjecaj VEGF na smanjenje izražaja simptoma neuropatije, što je rezultiralo smanjenjem mehaničke hiperalgezije (176). Unos VEGF putem plazmidnog vektora, u dva životinjska modela poboljšao je ishod ishemijske dijabetičke neuropatije, regeneracijom malih osjetnih i velikih neurona perifernog živčanog sustava te rezultirao smanjenjem znakova termalne hiperalgezije (174). Natsume i sur. su na dijabetičkom modelu, povezali utjecaj povećanog izražaja VEGF u tibijalnom živcu štakora s zaštitom neurona od oštećenja, poboljšanjem ishoda neuroloških mjerenja i ponašanja povezanog s boli (168). U pacijenata oboljelih od oba tipa dijabetesa utvrđeno je da hiperglikemija *per se* uzrokuje smanjenje izražaja VEGF u koži, progresivno oštećenje endotela i gubitak intraepidermalnih živčanih vlakana. Izražaj VEGF je smanjen u tkivima dijabetičnih bolesnika, s većim intenzitetom gubitka izražaja istog u težim oblicima simptomatskih neuropatija (167). Navedeno se povezuje s gubitkom intraepidermalnih živčanih vlakana, koji je praćen pojavom neuroloških simptoma u dijabetičkoj neuropatiji.

VEGF ima ulogu u sinaptičkoj plastičnosti neurona SŽS i u ranoj fazi dugoročne potencijacije (172). Djeluje preko NMDA receptora (189), koji su važni u dugoročnoj potencijaciji i pohrani informacija u formi dugoročnog pamćenja (190). U hipokampusu VEGF izaziva dugoročnu potencijaciju modulacijom aktivnosti CaMKII (189), promjenama u frekvenciji intradendritskih oscilacija kalcija kojom upravljaju NMDA glutaminski receptori (191), uzrokujući promjene u sinaptičkom prijenosu signala. Aktivirana CaMKII služi kao ključna komponenta unutarstaničnih signalnih putova pridonoseći razvoju neuropatije i trajne podraživosti neurona stražnjeg roga u DM neuropatiji (192).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je bio istražiti promjenu izražaja fosforiliranog oblika enzima CaMKII $\alpha$ , VEGF i NPY u neurokemijski specifičnim subpopulacijama osjetnih neurona trigeminalnog ganglija u štakora, dva tjedna i dva mjeseca nakon indukcije šećerne bolesti tipa 1 i 2. Dodatni cilj je bio analizirati morfološke promjene u trigeminalnom gangliju izražene prosječnim promjerom neurona. Dinamika promjena istraživanih čimbenika će ukazati na njihovu moguću ulogu u nastanku dijabetične trigeminalne neuropatije.

### 3. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Nakon izazivanja dijabetesa tipa 1 i 2 u štakorskom modelu će se:

1. povećati intenzitet izražaja fosforilirane CaMKII $\alpha$  u trigeminalnom gangliju štakora;
2. povećati udio VEGF-imunorektivnih neurona;
3. povećati udio NPY-imunorektivnih neurona;
4. promjene izražaja istraživanih čimbenika će biti naglašenije u subpopulacijama malih nociceptivnih neurona trigeminalnog ganglija;
5. promjene izražaja istraživanih čimbenika razlikovati će se u dva eksperimentalna tipa dijabetesa.

## **4. METODE I MATERIJALI**

### **4.1 Etička pitanja**

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i financirano sredstvima projekta Mehanizmi srčane boli u ishemiji, metaboličkim promjenama i u starosti (216-2160528-0067, MZOŠ). Animalni model financiran je u okviru projekta Molekularna memorija u dijabetičkoj neuropatiji (MEMODIN), sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) br. 02.05/28. Za provođenje istraživanja suglasnost je izdalo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (Klasa 003-08/10-03/0011, Ur.br.: 2181-198-04-10-0008). Svi pokusni postupci izvedeni se u skladu sa smjernicama IASP-a.

### **4.2 Pokusne životinje**

U istraživanju su korišteni Sprague-Dawley štakori muškog spola (mase oko 200 g), iz Nastambe za male pokusne životinje Sveučilišta u Splitu. Štakori su bili smješteni u plastične kaveze s podlogom od piljevine i kukuruzne stelje, u omjeru 3:1 da bi se izbjegao razvoj kompresijske neuropatije (193). U prostoriji u kojoj su štakori bili smješteni za vrijeme istraživanja održavana je konstantna temperatura od  $\sim 22^{\circ}\text{C}$ , a automatska izmjena dnevno-noćnih ciklusa odvijala se svakih 12 h.

Životinje su uzgajane 2 tjedna ili 2 mjeseca nakon indukcije pokusnog modela, ovisno o pripadnosti istraživanim skupinama. Istraživanje je obavljeno na 40 štakora, koji su bili raspoređeni u osam pokusnih skupina:

DM1-2t - štakori sa šećernom bolešću tip 1 žrtvovani nakon 2 tjedna (n=6) i C-DM1-2t– kontrolni štakori za dvotjedni model šećerne bolesti tipa 1 (n=4);

DM2-2t - štakori sa šećernom bolešću tipa 2 žrtvovani nakon 2 tjedna (n=4) i C-DM2-2t– kontrolni štakori za dvotjedni model dijabetesa tipa 2 (n=5);

DM1-2m - štakori sa šećernom bolešću tipa 1 žrtvovani nakon 2 mjeseca (n=5) i C-DM1-2m - kontrolni štakori za dvomjesečni model šećerne bolesti tipa 1 (n=3);

DM2-2m - štakori sa šećernom bolešću tipa 2 žrtvovani nakon 2 mjeseca (n=3) i C-DM2-2m- kontrolni štakori za dvomjesečni model šećerne bolesti tipa 2 (n=5).

### 4.3 Štakorski modeli dijabetesa

Ovisno o vrsti hrane koju su dobivali štakori su bili podijeljeni u dvije skupine. 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 korišteni 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 dijabetične ili kontrolne pokusne skupine (194).

Šećerna bolest tipa 1 i 2 izazvane su životinjama prema do sada poznatim modelima (194). Model DM1 izazvan je jednokratnim intraperitonealnim ubrizgavanjem streptozotocina (STZ) u dozi od 55 mg/kg. STZ je toksičan za  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u gušterači. Nakon primanja injekcije STZ unutar 2-4 dana životinje razvijaju hiperglikemiju, osnovnu karakteristiku dijabetesa (195). DM1 štakori tijekom cijelog trajanja pokusa hranjeni su standardnom hranom za pokusne štakore. Kako bi razvili DM2 štakori su od početka pokusa hranjeni 2 tjedna masnom hranom, te im je intraperitonealno aplicirana manja doza STZ (35 mg/kg). Na taj način oponaša se dijabetes na štakorskom modelu koji se odlikuje metaboličkim abnormalnostima i oponaša prirodni razvoj dijabetesa tipa 2 kod čovjeka (194). Kontrolna skupina za DM2 štakore (C-DM2) tijekom cijeloga pokusa je hranjena hranom s visokim udjelom masti, a 2 tjedna nakon početka takve ishrane štakori su dobili intraperitonealnu injekciju citratnog pufera.

Štakori iz DM1 skupine testirani tijekom 2 mjeseca su primali jednom tjedno jednu jedinicu dugodjelujućeg inzulina (Lantus Solostar, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Njemačka), kako bi se izbjegao razvitak ketoacidoze i smanjenje tjelesne mase, koji bi mogli dovesti do lošeg općeg stanja pokusne životinje. Korištena je minimalna doza inzulina, koja se obično upotrebljava u istraživanjima dijabetične neuropatije na STZ modelu štakora, dovoljna za održavanje dobrog stanja štakora, a nedovoljna za utjecaj na istraživane varijable.

Pokusnim životinjama je pomoću glukometra One Touch Vita (LifeScan, High Wycombe, Velika Britanija) izmjerena koncentracija glukoze u plazmi četiri dana nakon indukcije dijabetesa, uzorkovanjem kapljice krvi s vrha repa.

U nastavak istraživanja uključeni su samo DM1 štakori koji su natašte imali koncentraciju glukoze u plazmi iznad 300 mg/dL i DM2 štakori čija je razina glukoze u plazmi bila veća od 200 mg/dL, uz odsustvo bolnog ponašanja na početku istraživanja i razvoj pretjerano bolnog ponašanja 2 tjedna nakon indukcije DM. Kriteriji isključenja štakora u studiji su bili: koncentracija glukoze u plazmi ispod propisanih vrijednosti za dijagnosticiranje dijabetesa, postojanje pretjeranog bolnog ponašanja na početku istraživanja, odsustvo pretjeranog bolnog ponašanja 2 tjedna nakon indukcije DM i smrt životinje.

#### **4.4 Priprema tkiva za imunofluorescenciju**

Dva tjedna ili dva mjeseca nakon početka pokusa štakori su anestetizirani 5%-tnim izofluranom (Forane, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Velika Britanija), te perfundirani fiziološkom otopinom i Zambonijevim fiksativom (4% paraformaldehid i 0,20% pikrinska kiselina u 0,1M fosfatnom puferu – PBS).

Trigeminalni gangliji su izvađeni, fiksirani 48 h u Zambonijevu fiksativu. Desni TG je podvrgnut postupku krioprotekcije, u 30%-tnoj otopini saharoze u 0,01M PBS preko noći. Sljedeći dan su tkiva uklapana u inertni medij za uklapanje (Optimal Cutting Temperature OCT freezing medium, Tissue Tek, Tokyo, Japan) i zamrznuta. Tkivo je izrezano na kriotomu (Thermo Shandon Cryotome, Pittsburgh, PA, SAD), na rezove debljine 7 µm uzduž duge osi ganglija i rezovi zalijepljeni su na predmetna stakalca (Histobond +, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Njemačka). Lijevi TG je nakon fiksacije i ispiranja u PBS-u dehidriran, uklopljen u paraffin i izrezan na serijske parafinske rezove, debljine 5 µm.

#### **4.5 Bojenje hemalaun eozinom**

Deaparafinirani tezovi TG su bojani hemalaunom u vremenskom periodu od 3-5 minuta, nakon čega su isprani jednu minutu u destiliranoj, a potom 5-10 minuta u vodovodnoj vodi.

Nakon 3-5 minuta bojenja eozinom i dehidriranja preparata, rezovi su uklopljeni u kanadski balzam i prekriveni pokrovnim stakalcem.

#### **4.6 Imunofluorescencijska bojenja**

Imunofluorescencijskom metodom je prikazana prisutnost biljega pCaMKII $\alpha$ , VEGF i NPY u tkivu TG. Kao biljeg ne-peptidergičkih neurona korištena je kolokalizacija s IB4.

Za dvostruko imunofluorescencijsko bojenje korištena je kombinacija primarnih protutijela i konjugata aglutinina IB4 s fluoresceinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, kat. br. 2895, uz razrjeđenje 1:200), u kojoj su rezovi inkubirani preko noći u tamnoj komori, te odgovarajuća sekundarna protutijela. Nakon 1,5 h inkubacije preparata u otopinama sekundarnog protutijela, rezovi su isprani u otopini PBS i preklopljeni pokrovnica s tekućinom za prekrivanje histoloških rezova (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Za kontrolu nespecifične reakcije sekundarnih protutijela, dijelu preparata u proceduri bojanja je izostavljena inkubacija s primarnim protutijelima. Tim bojenjima nije dobiven fluorescentni signal i potvrđena je specifičnost korištenih sekundarnih protutijela.

U istraživanju su korištena sljedeća primarna protutijela:

1. Kunićje monoklonsko protutijelo za pCaMKII $\alpha$  (sc-12886-P, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, SAD), razrjeđenje 1:100;
2. Kunićje poliklonsko protutijelo za VEGF (ab46154, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), razrjeđenje 1:200;
3. Ovcje poliklonsko protutijelo za NPY (ab6173, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), razrjeđenje 1:300;
4. Kozje poliklonsko protutijelo za GFAP (ab53554, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), razrjeđenje 1:100;
5. Mišje monoklonsko protutijelo za NeuN (1B7) (ab104224, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), razrjeđenje 1:100;

kao i sljedeća sekundarna protutijela:

1. Magareće protutijelo za IgG kunića konjugirano s rodaminom (Rhodamine Red TM; 711-295-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD), razrjeđenje 1:300;
2. Magareće protutijelo za IgG koze konjugirano s rodaminom (Rhodamine Red TM; 705-295-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD), razrjeđenje 1:300;
3. Magareće protutijelo za IgG miša konjugirano s fluorescein izotiocijanatom (FITC; 715-095-150; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD), razrjeđenje 1:150.

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 (89). U ekstraktu mišjeg mozga analiziranom Western Blot metodom, to protutijelo prepoznaje jedinstveni stupac od ~50 kDa proteina, koji odgovara očekivanoj molekulskoj masi CaMKII (prema tehničkoj podatkovnoj tablici proizvođača). Slični proteinski stupci opisani su u ekstraktu ljudskih astrocita (196) i neuronima hipokampusa štakora (197).

Za sekundarnu detekciju pCaMKII $\alpha$  i VEGF korišteno je magareće anti-kuniće protutijelo konjugirano s fluorescentnom bojom Rhodamine Red TM (711-295-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD), u razrjeđenju 1:300. To sekundarno protutijelo je pCaMKII $\alpha$  i VEGF pozitivne neurone obojilo crvenom fluorescencijom. Magareće anti-kozje Rhodamine Red TM-konjugirano protutijelo (705-295-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD) korišteno je za sekundarnu detekciju NPY, u razrjeđenju 1:300.

Kao biljeg nepeptidergičkih nociceptora korišten je konjugat aglutinina IB4 s fluoresceinom, izoliran iz alge *Bandeiraea simplicifolia*. To je aglutinin vrlo visokog afiniteta za terminalne  $\alpha$ -D galaktozidne ostatke, dok u manjoj mjeri pokazuje afinitet i za terminalne N-acetil- $\alpha$ -D-galaktozaminilne ostatke. Odabran je konjugirani oblik aglutinina IB4 koji na sebi ima vezan fluorescein (IB4 labeled FITC, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO; SAD, kat. br. 2895; 1:200), tako da su IB4 pozitivni neuroni fluorescirali zelenom bojom.

#### 4.7 Analiza slika i kvantifikacija

Svaki četvrti rez trigeminalnog ganglija pregledan je mikroskopom (BX61, Olympus, Tokio, Japan) i fotografiran korištenjem hladene digitalne kamere (DP71, Olympus, Tokio, Japan). Sve slike su snimljene pri povećanju 40x i pri istoj vremenskoj ekspoziciji za svako pojedino bojenje. Slike su analizirane kao monokromne mikrofotografije (2040x1536 piksela, 12 bitova, 0-4096 razina sive boje) u računalnom programu Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Kod metode dvostrukog bojenja načinjene su mikrofotografije s filterom za zelenu boju (stanice koje su pozitivno obilježene FITC) i filterom za crvenu boju (stanice koju su pozitivno obilježene Rhodamine Red-om), te su te dvije slike međusobno spojene u jednu kako bi se vizualizirale stanice koje su dvostruko pozitivno obojene. U istraživanju je osigurano provođenje slijepog ispitivanja, tako da su rezovi bili označeni brojevima, a ispitivač koji je fotografirao rezove nije znao kojoj pokusnoj skupini pripadaju isti.

Na vidnim poljima veličine 100x100  $\mu\text{m}$ , u kojima su neuroni pokrivali više od 80% površine slike, mjereno je izražaj i promjer svakog pojedinog neurona s vidljivom jezgrom. Optičku gustoću (OG) enzimske imunoekspresije, temeljenu na imunoflorescentnom bojenju aktivnog oblika CaMKII $\alpha$ , mjerilo se analizom mikrofotografija, delineacijskom metodom ocrtavanja obrisa neurona, uz izuzimanje jezgara, u programu Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Analizirano je oko 150 neurona po svakoj životinji. Navedena metoda, omogućuje veoma precizno mjerenje (slično preciznosti mjerenja optičke gustoće metodom Western blota), a njezino korištenje višestruko je opisano u suvremenoj literaturi upravo za mjerenje intenziteta izražaja različitih proteina u ganglijskim neuronima (198). Dodatni cilj je bio mjerenje uzdužnog i poprečnog promjera svakog pojedinog neurona s vidljivom jezgrom. Dobiveni podatci podijeljeni su na tri skupine, ovisno o veličini i neurokemijskom sastavu neurona: IB4 pozitivni neuroni, mali IB4 negativni neuroni (promjera manjeg od 30  $\mu\text{m}$ ) i veći IB4 negativni neuroni (promjera većeg od 30 $\mu\text{m}$ ).

U istraživanju su korištena imunohistokemijska mjerenja, gdje je kvantitativnim metodama mjereno udio VEGF i NPY imunoreaktivnih neurona, samostalno i u kolokalizaciji s IB4; uzdužni i poprečni promjer imunoreaktivnih neurona s vidljivom jezgrom na području cijeloga reza. Kod analiziranja izražaja VEGF brojeni su VEGF pozitivni i negativni neuroni, samostalno i u kolokalizaciji s IB4, na uzorku od oko 300-500 neurona po životinji, uz istovremeno mjerenje promjera neurona, te je izračunat udio istih. Analiza izražaja NPY



provedena je na isti način kao i analiza VEGF, na uzorku od oko 1400-2300 neurona po životinji. Postotak obojenih stanica je izračunat dijeljenjem broja imunopozitivnih stanica (VEGF ili NPY), odnosno dvostruko obojenih stanica (VEGF/IB4, NPY/IB4) s ukupnim brojem neurona. Također, određen je i uzdužni i poprečni promjer svake stanice. Pod pretpostavkom da su ganglijske stanice okruglog oblika, prosječni promjer stanica je izračunat kao zbroj duljine i širine neurona s vidljivom jezgrom podijeljen s dva.

#### **4.8 Statistički postupci**

Za provjeru pravilnosti raspodjele korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test. Za usporedbu izražaja istraživanih čimbenika između kontrolnih i dijabetičnih skupina korišten je Studentov t-test. Kolmogorov-Smirnovljev test distribucija (engl. *Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test*) korišten je za usporedbu raspodjela neurona prema prosječnom promjeru. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (aritmetička sredina)  $\pm$  standardna devijacija ( $M \pm SD$ ). Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ . Za statističku obradu korišten je računalni program Statistica 7,0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD).

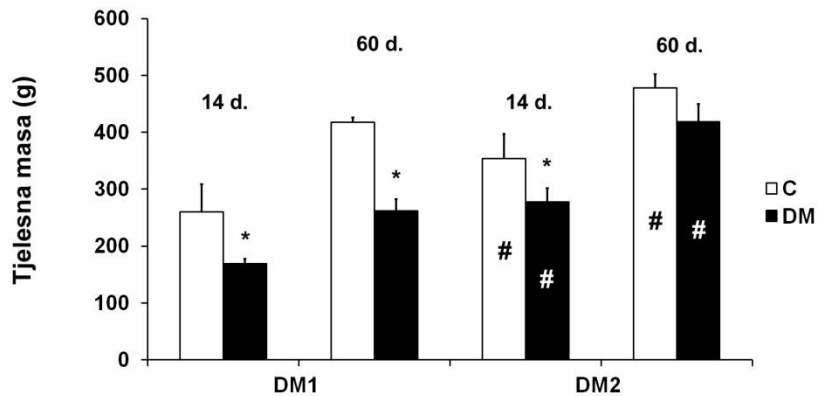
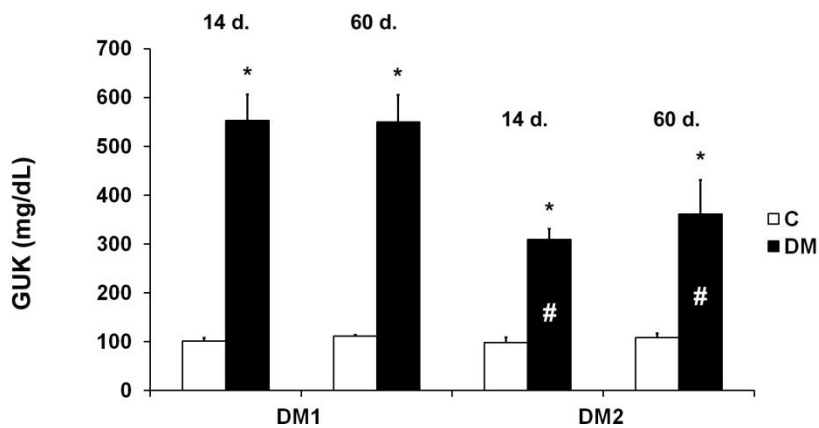
Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun veličine uzorka korišteni su podatci dobiveni pilot istraživanjem na tri životinje, gdje su uspoređene skupine DM1 i odgovarajuća kontrola. Izračunom veličine uzorka dobiven je minimalan broj od 3 štakora po skupini da bi studija imala snagu istraživanja od 80% ( $1 - \beta$ ), uz razinu značajnosti od  $\alpha = 5\%$ . Na početku istraživanja uključen je veći broj štakora, kako bi nakon primjene kriterija uključanja i isključenja životinja u istraživanje u svakoj skupini ostalo najmanje 3 štakora.

## 5. REZULTATI

### 5.1 Validacija životinjskih modela za indukciju dijabetesa tipa 1 i tipa 2

Tjelesna masa životinja u pokusu su značajno se smanjila u DM1 i DM2 skupinama štakora nakon injekcije STZ u oba vremenska razdoblja. Težina DM1 životinja nakon 8 tjedana odgovarala je težini kontrolne skupine nakon 2 tjedna indukcije DM1 (oko 260 grama), dok su težine C-DM1 životinje nakon 8 tjedana dosegle skoro 420 grama. U modelu DM2 uočena je sličnost u raspodjeli težina, međutim razlika je bila manja među kontrolama DM2, nego DM1 modela s dužinom trajanja dijabetesa. Životinje u modelu DM2, kao i kontrolne skupine su imale značajno veće težine, u oba vremenska perioda u odnosu na istoimene skupine u modelu DM1 (Slika 1).

Koncentracija glukoze u plazmi značajno se povećala u DM1 i DM2 skupinama štakora nakon injekcije STZ u oba vremenska perioda. Međutim, DM1 životinje su imale značajno veće koncentracije glukoze u plazmi u oba vremenska razdoblja u odnosu na životinje DM2. C-DM1 i C-DM2 životinje su tijekom cijelog pokusa zadržale normalne vrijednosti glukoze u plazmi, koje se nisu razlikovale od početnih vrijednosti (Slika 1).

**A****B**

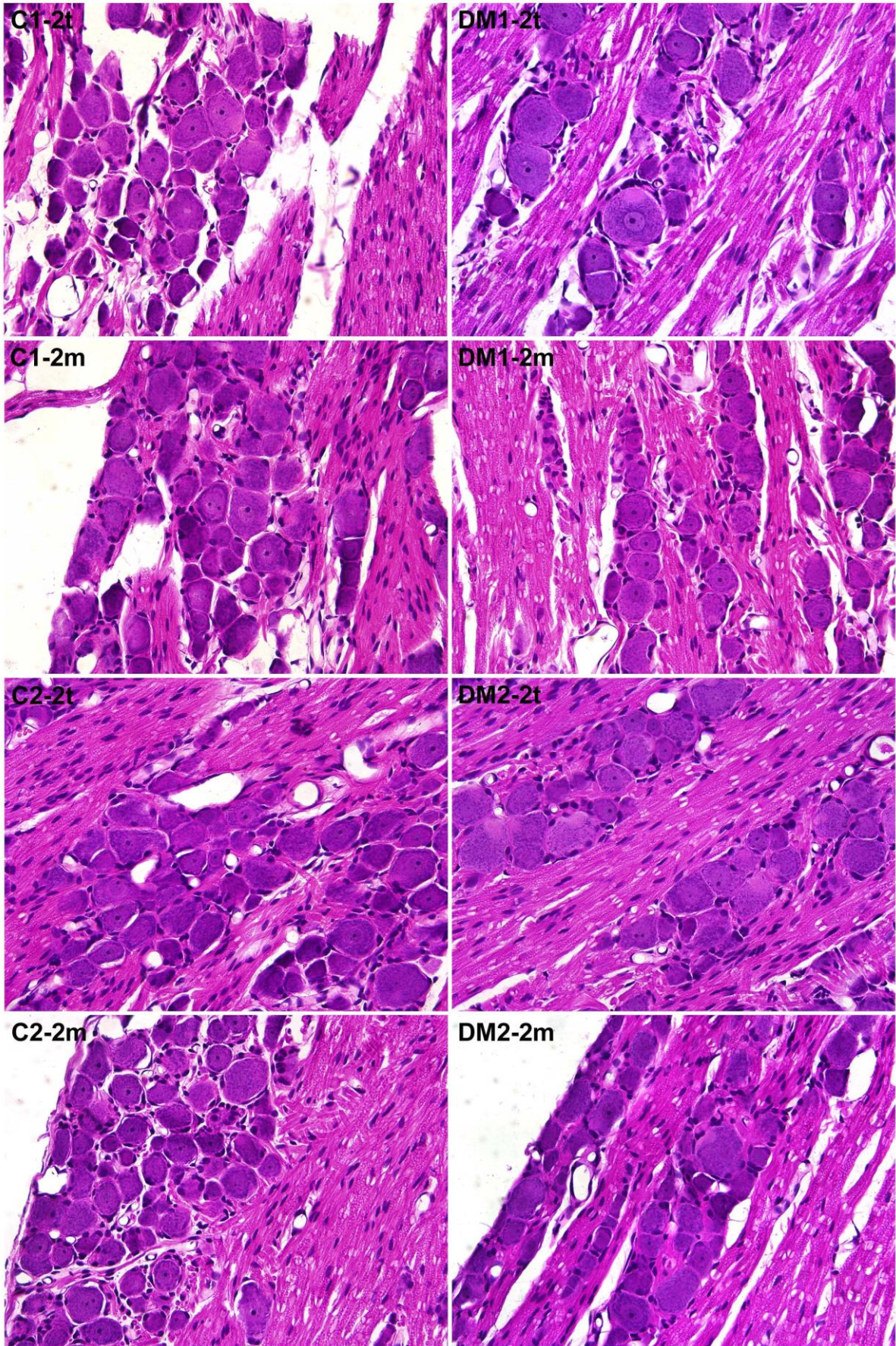
**Slika 1. Tjelesne mase i razine glukoze u plazmi štakora u svim pokusnim i kontrolnim skupinama 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa. Kontrolna skupina za dijabetes tipa 1 (C-DM1), skupina s dijabetesom tipa 1 (DM1), kontrolna skupina za dijabetes tipa 2 (C-DM2), skupina s dijabetesom tipa 2 (DM2). Podatci su prikazani kao  $M \pm SD$ ; \* označava statistički značajnu razliku u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom; # označava statistički značajnu razliku u usporedbi s odgovarajućom skupinom modela DM1 (Student t-test).**

## **5.2 Morfološke promjene u neuronima trigeminalnih ganglija štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa**

Na histološkom presjeku kroz trigeminalni ganglij štakora u kontrolnih i dijabetičnih skupina štakora obojanih hemalaun-eozinom (Slika 2) vide se tijela pseudounipolarnih osjetnih neurona sa okruglom središnje smještenom svjetlijom jezgrom i vidljivom tamnom jezgrićom. Neuroni nisu jednakomjerno raspoređeni, ali imaju tendenciju grupiranja u uzdužne formacije odvojene usporednim snopovima mijeliniziranih živčanih vlakana. Potrebno je uočiti da mijelin nije primio boju, ali se može vidjeti valoviti niz snopova živčanih vlakana. Satelitske i Schwannove stanice se ne mogu jasno razlikovati, međutim satelitske stanice oko tijela neurona pokazuju znakove nabujalosti citoplazme u dijabetičnim skupinama u odnosu na njihove kontrole. Između živčanih vlakana prisutno je mnogo Schwannovih stanica. Iako je struktura i orijentacija snopova živčanih vlakana slična i u kontrolnim i u pokusnim skupinama, DM skupine imaju mnogo veće vezikule u vidu dvostrukih pupova stanične membrane u području Ranvierovih čvorova, koje su posebice izražene u dvo-mjesečnoj DM1 i DM2 skupini.

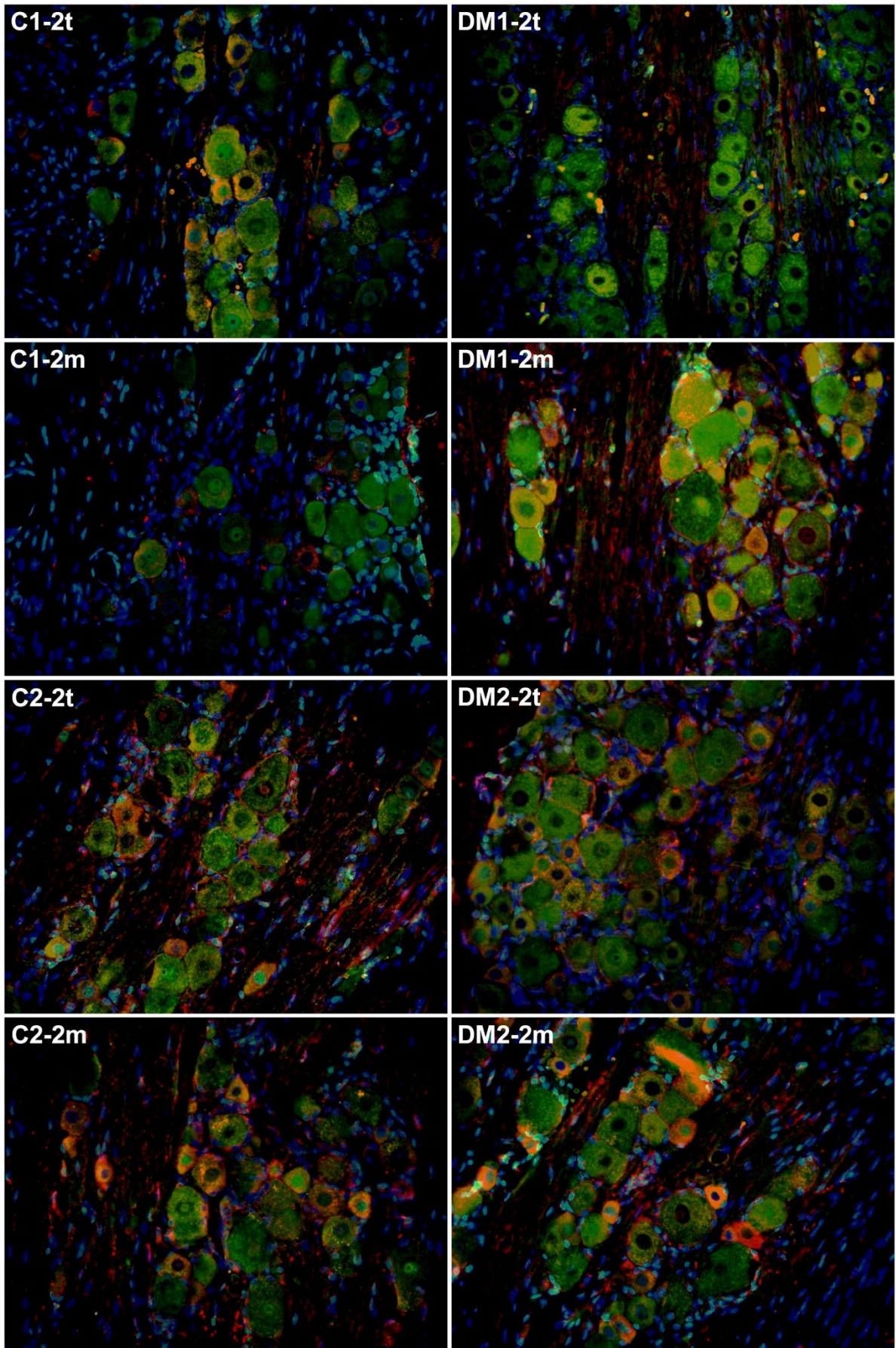
Imunofluorescencijsko bojenje na gfap (engl. *glial fibrilar acidic protein*) pokazalo je intenzivniji izražaj gfap u zadebljalim satelitskim stanicama dijabetičnih štakora, kao i kontrolnih štakora u modelu DM2, 2 mjeseca nakon indukcije (Slika 3).







**Slika 2. Utjecaj dijabetesa tipa 1 i 2 na morfološke promjene u neuronima trigeminalnih ganglija (TG) štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa.** Reprezentativna slika hemalaun-eozin bojenja TG 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa u kontrolnih DM1 i DM1 te u kontrolnih DM2 i DM2 štakora. C1 – kontrolna DM1 grupa; DM1 – tip 1 dijabetes; C2- kontrolna DM2 grupa; DM2 – tip 2 dijabetes; 2t – dvotjedni pokus; 2m – dvomjesečni pokus.



**Slika 3. Utjecaj dijabetesa tipa 1 i 2 na morfološke promjene glije u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa.** Reprezentativna slika imunohistokemijskog bojenja TG na gfap (crveno) 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa u kontrolnih DM1 i DM1 te u kontrolnih DM2 i DM2 štakora. Neuronu su kontrastno obojeni protutijelom za NeuN (zeleno). C1 – kontrolna DM1 grupa; DM1 – tip 1 dijabetes; C2 – kontrolna DM2 grupa; DM2 – tip 2 dijabetes; 2t – dvotjedni pokus; 2m – dvomjesečni pokus.

### **5.3 Distribucija neurona trigeminalnog ganglija štakora prema veličini u ranom stadiju šećerne bolesti tipa 1 i 2**

Analiza distribucije prema veličini neurona pokazala je atrofiju neurona u dijabetičnih DM1 štakora, kao i debelih štakora skupine C-DM2, dok je DM2 nakon 2 mjeseca rezultirao hipertrofijom izolektin pozitivnih i negativnih (IB4+/IB4-) neurona TG.

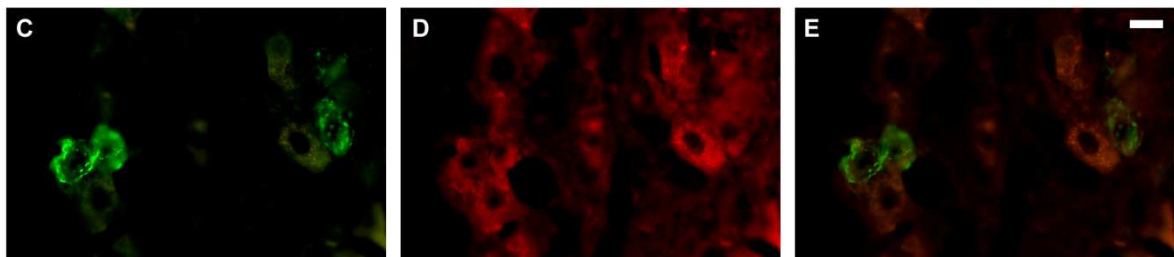
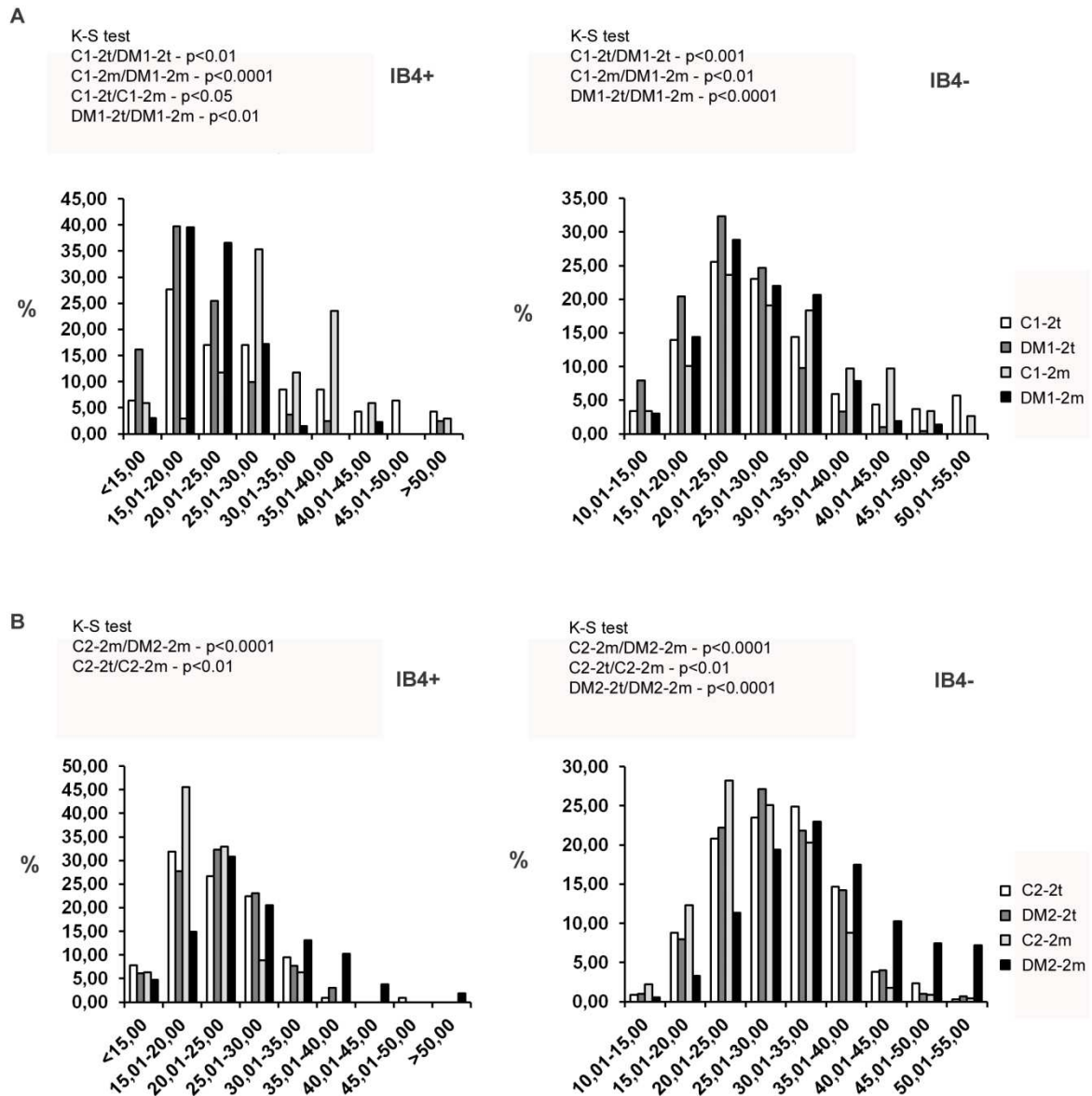
U subpopulaciji IB4+ neurona, značajno veći broj neurona TG je bio manjeg prosječnog promjera u DM1 životinja u odnosu na njihovu C-DM1 skupinu, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa ( $p < 0,05$ ; Slika 4A). Isto tako, značajna razlika u distribuciji veličina IB4+ neurona bila je vidljiva između kontrolnih skupina, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon početka pokusa, s porastom u veličini neurona u C-DM1-2m skupini, u odnosu na C-DM1-2t skupinu ( $p < 0,05$ ; Slika 4A). Značajna razlika u distribuciji veličina IB4+ neurona bila je vidljiva između pokusnih skupina, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon početka pokusa, gdje su IB4+ neuroni u DM1-2m skupini bili značajno veći u odnosu na neurone DM1-2t životinja ( $p < 0,05$ ; Slika 4A).

S druge strane, 2 mjeseca nakon indukcije DM2, IB4+ neuroni su bili značajno veći u odnosu na C-DM2-2m ( $p < 0,05$ ; Slika 4B). Među kontrolnim skupinama DM2, IB4+ neuroni su bili manjeg promjera 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa, u odnosu na C-DM2-2t skupinu ( $p < 0,05$ ; Slika 4B).

Slične promjene zabilježene su i u populaciji IB4- neurona, gdje je DM1 rezultirao raspodjelom veličine neurona prema značajno većem broju manjih neurona, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa ( $p < 0,05$ ; Slika 4A). Unutar DM1-2m skupine, IB4- neuroni su također bili nešto većeg promjera u odnosu na neurone DM1-2t skupine ( $p < 0,05$ ; Slika 4A).



Dva mjeseca nakon indukcije DM2, IB4- neuroni su bili značajno veći u odnosu na C-DM2-2m i DM2-2t skupinu ( $p < 0,05$ ; Slika 4B). Među kontrolnim skupinama, IB4- neuroni su bili manji 2 mjeseca nakon početka pokusa u skupini C-DM2-2m, u odnosu na C-DM2-2t skupinu ( $p < 0,05$ ; Slika 4B).



**Slika 4. Distribucija neurona trigeminalnog ganglija (TG) prema veličini u ranom stadiju šećerne bolesti tipa 1 i 2.** Dijabetes tip 1 (DM1; A) i dijabetes tip 2 (DM2; B). Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojenja na izolektin B4 (IB4; C; zeleno) i pCaMKII $\alpha$  (D; crveno) u TG; preklopljena slika (E). C1 – kontrolna DM1 skupina; DM1 – tip 1 dijabetes; C2- kontrolna DM2 grupa; DM2 – tip 2 dijabetes; 2t – dvotjedni pokus; 2m – dvomjesečni pokus; IB4+ – izolektin pozitivni neuroni; IB4- – izolektin negativni neuroni; % - postotak ukupnog broja neurona; K-S g.f.t. – *Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit* test. Povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m; podatci su prikazani kao M $\pm$ SD.

#### **5.4 Intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$ u neuronima trigeminalnog ganglija štakora samostalno i u kolokalizaciji s IB4 tijekom ranog stadija šećerne bolesti tipa 1 i 2**

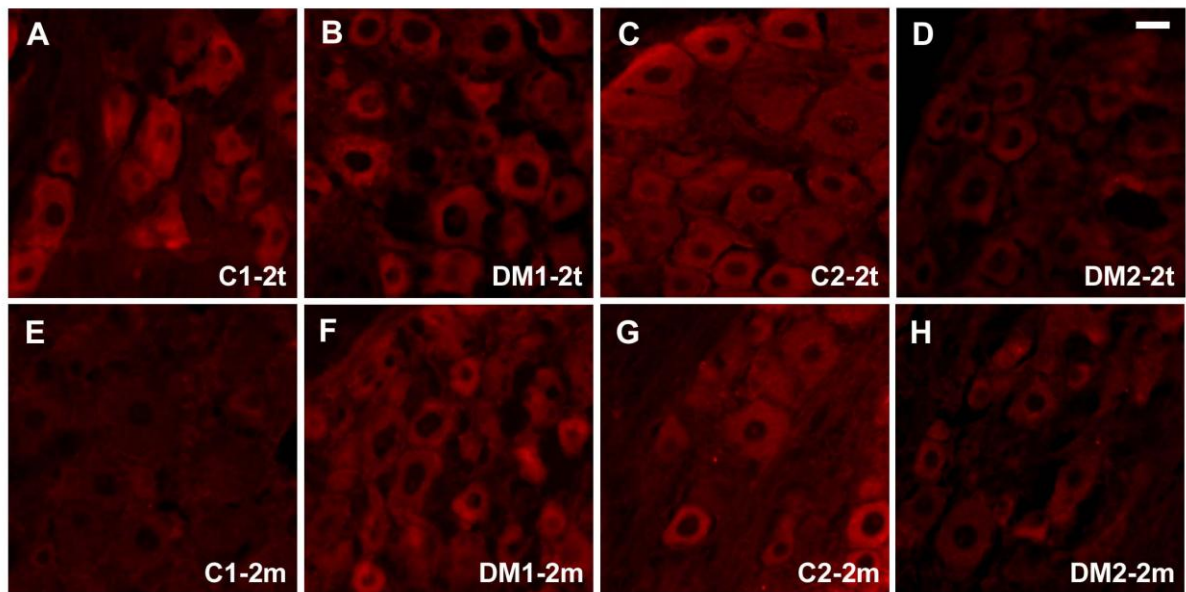
Imunohistokemijska metoda korištena je za analizu promjene intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u trigeminalnom gangliju 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa tipa 1 i 2.

Indukcija DM1 i DM2 nije uzrokovala promjene u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  nakon 2 tjedna u trigeminalnim ganglijima, neovisno o subpopulaciji analiziranih neurona (Slike 5 i 6).

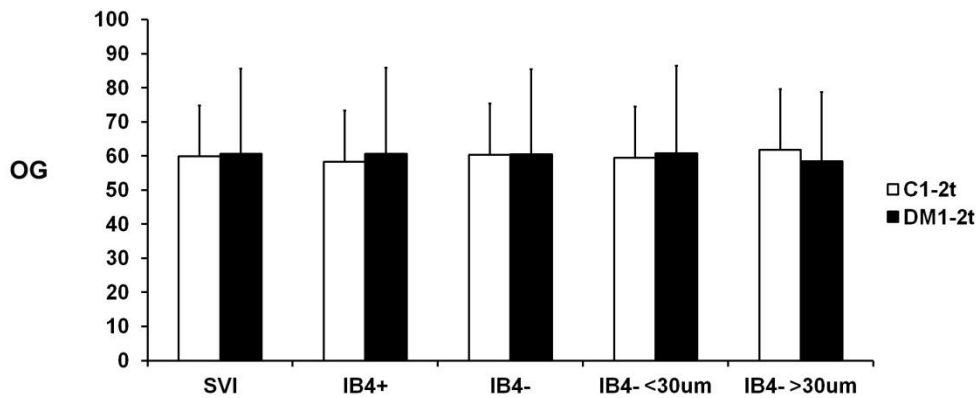
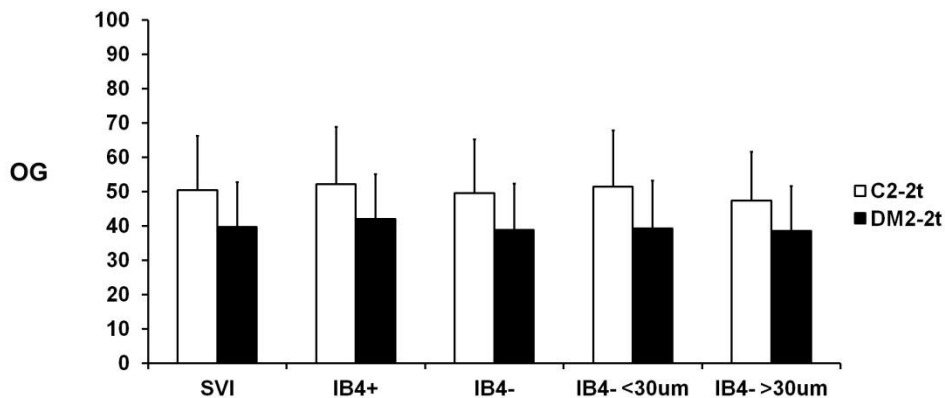
Dva mjeseca nakon ubrizgavanja STZ intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$  značajno se povećao u trigeminalnom gangliju DM1 štakora u usporedbi s njihovim kontrolama ( $p < 0,05$ ; Slike 5 i 7). Daljnje istraživanje na DM1 štakorima pokazalo je povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u neuronima malog promjera ( $d < 30 \mu$ m;  $p < 0,05$ ), posebice u subpopulaciji IB4-negativnih neurona  $< 30 \mu$ m trigeminalnog ganglija ( $p < 0,05$ ; Slike 5 i 7).

Neovisno o vremenskom razdoblju nakon indukcije DM2 modela nije uočena statistički značajna promjena izražaja pCaMKII $\alpha$  u trigeminalnim ganglijima štakora.

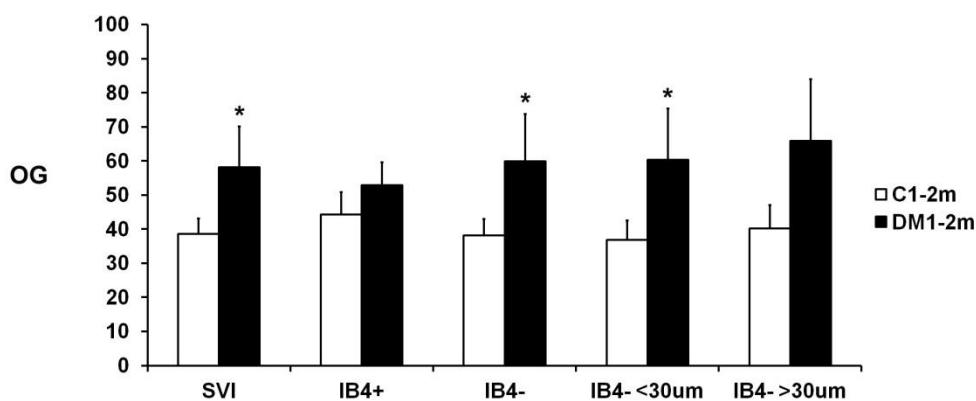
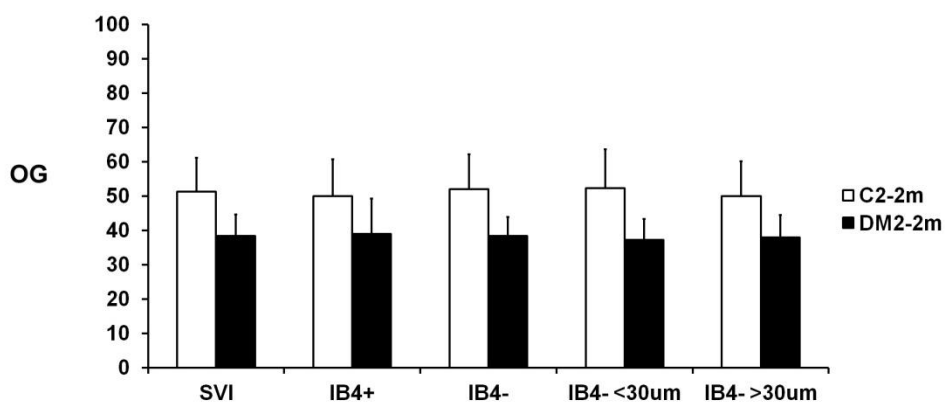
Statistička analiza je pokazala da ne postoji značajna razlika u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  između dvaju pokusnih modela – DM1 i DM2, 2 tjedna niti 2 mjeseca nakon indukcije ( $p > 0,05$ ; Slike 5-7).



**Slika 5. Utjecaj dijabetesa tipa 1 i 2 na intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$  u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna i 2mjeseca nakon indukcije dijabetesa.** Reprezentativna slika imunofluorescencijskog bojenja pCaMKII $\alpha$  u TG 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa u kontrolnih DM1 (A; E), DM1 (B; F) i pCaMKII $\alpha$  u kontrolnih DM2 (C; G) i DM2 (D; H) štakora. C1 – kontrolna DM1 grupa; DM1 – tip 1 dijabetes; C2- kontrolna DM2 grupa; DM2 – tip 2 dijabetes; 2t – dvotjedni pokus; 2m – dvomjesečni pokus; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike.

**A****B**

**Slika 6. Utjecaj dijabetesa tipa 1 i 2 na intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$  u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa.** Intenzitet fluorescencije pCaMKII $\alpha$  u neuronima različitog promjera i neurokemijskog sastava TG na modelu DM1 (A) i DM2 (B) 2 tjedna nakon injekcije STZ; kontrolne skupine – bijeli stupci; pokusne skupine – crni stupci; C1 – kontrolna DM1 grupa; DM1 – tip 1 dijabetes; C2 – kontrolna DM2 grupa; DM2 – tip 2 dijabetes; 2t – dvotjedni pokus; 2m – dvomjesečni pokus; SVI – sve stanice; IB4- – izolektin negativne stanice; IB4- <30  $\mu$ m – male IB4- stanice; i IB4- >30  $\mu$ m - velike IB4- stanice; IB4+ – izolektin pozitivne stanice; OG – optička gustoća; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike; podatci su prikazani kao M $\pm$ SD; \* označava statistički značajnu razliku između pokusne i kontrolne skupine.

**A****B**

**Slika 7. Utjecaj dijabetesa tipa 1 i 2 na intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$  u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa.** Intenzitet fluorescencije pCaMKII $\alpha$  u neuronima različitog promjera i neurokemijskog sastava TG na modelu DM1 (E) i DM2 (F) 2 mjeseca nakon injekcije STZ; kontrolne skupine – bijeli stupci; pokusne skupine – crni stupci; C1 – kontrolna DM1 grupa; DM1 – tip 1 dijabetes; C2 – kontrolna DM2 grupa; DM2 – tip 2 dijabetes; 2t – dvotjedni pokus; 2m – dvomjesečni pokus; SVI – sve stanice; IB4- – izolektin negativne stanice; IB4- <30  $\mu$ m – male IB4- stanice; i IB4- >30  $\mu$ m – velike IB4- stanice; IB4+ – izolektin pozitivne stanice; OG – optička gustoća; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike; podatci su prikazani kao M $\pm$ SD; \* označava statistički značajnu razliku između pokusne i kontrolne skupine.

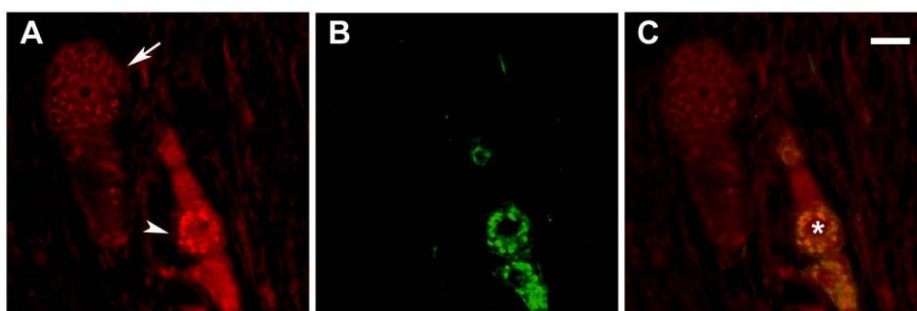
## 5.5 Udio NPY samostalno i u kolokalizaciji s IB4 u trigeminalnom gangliju ranog stadija šećerne bolesti tipa 1 i 2

Imunohistokemijska metoda je korištena za analizu promjene izražaja NPY u trigeminalnom gangliju štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa tipa 1 i 2. Udio NPY pozitivnih neurona u TG se povećao 2 tjedna i 2 mjeseca nakon ubrizgavanja STZ, u DM1 modelu u odnosu na njihove kontrolne skupine ( $p < 0,05$ ; Slike 9 i 10).

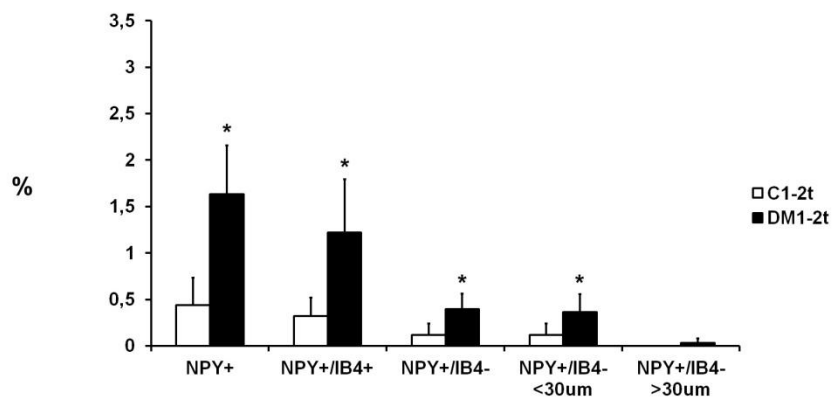
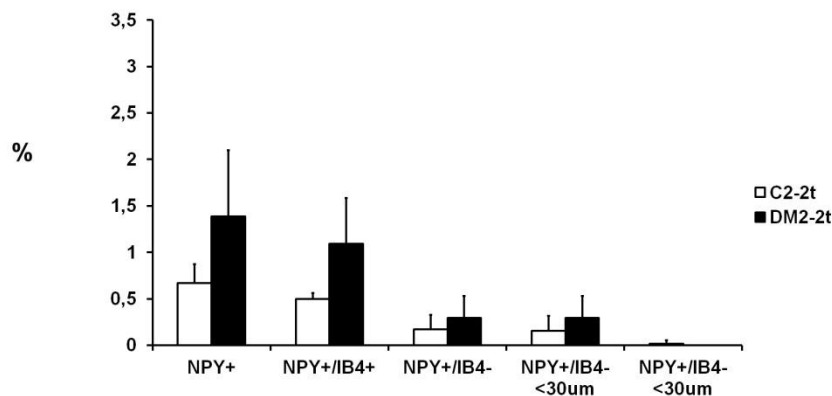
Kako bi se prikazale promjene u neurokemijski specifičnim subpopulacijama neurona TG, provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojenje na NPY i IB4. Nakon indukcije DM1 u oba vremenska razdoblja, značajno se povećao udio NPY/IB4+ neurona TG u odnosu na njihove kontrolne skupine, dok se udio NPY/IB4- neurona TG značajno promijenio samo u 2-tjednoj, u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ; Slika 8, 9A, 10A). Udio NPY/IB4-neurona malog promjera ( $< 30 \mu\text{m}$ ) se povećao u skupini DM1 modela u odnosu na kontrole u oba vremenska perioda od indukcije.

Nadalje, indukcija DM2 je uzrokovala značajnu promjenu udjela NPY/IB4+ i NPY/IB4- neurona TG nakon 2 mjeseca od indukcije DM u odnosu na njihovu kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ; Slika 9B i 10B).

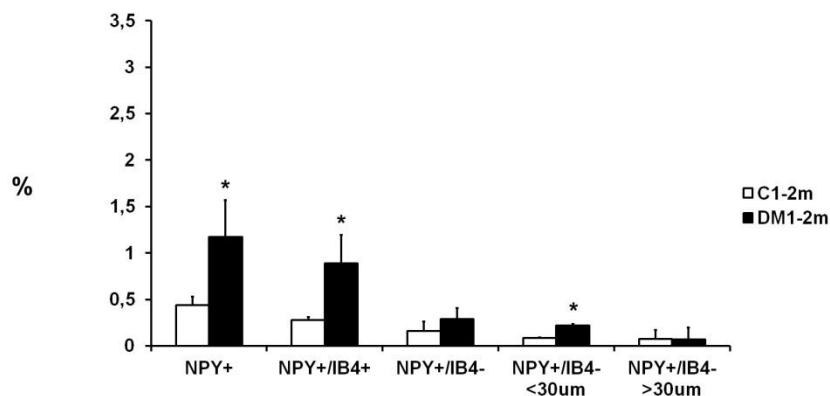
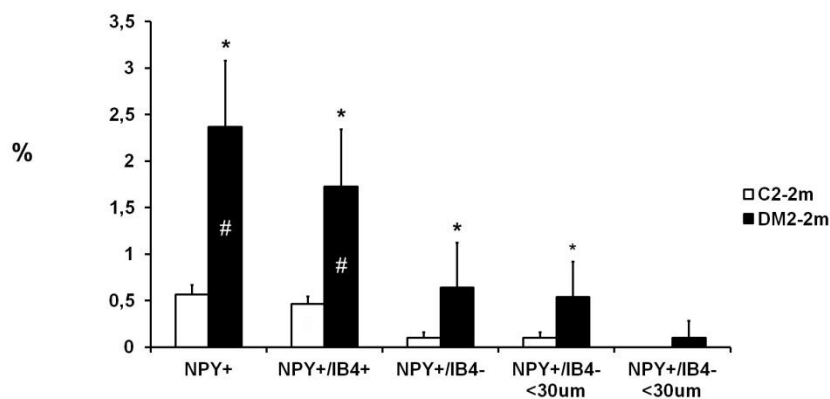
Usporedbom oba DM modela, udio NPY pozitivnih i NPY/IB4+ neurona u TG 2 mjeseca nakon ubrizgavanja STZ, bio je značajno veći u DM2 modelu u odnosu na DM1 model ( $p < 0,05$ ; Slike 10).



**Slika 8. Reprezentativna slika imunofluorescencijskog bojenja na NPY (crveno; A) i IB4 (zeleno; B) u trigeminalnom gangliju štakora 2 tjedna nakon indukcije DM1; preklopljena slika (C). Strjelica označava veliki NPY+ neuron, vrh strjelice označava mali NPY+ neuron, koji je ujedno i IB4+; zvjezdica označava kolokalizaciju NPY i IB4. Povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu\text{m}$  i odnosi se na sve slike.**

**A****B**

**Slika 9. Utjecaj dijabetesa tipa 1 (DM1) i 2 (DM2) na izražaj NPY i IB4 u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa.** Udio NPY i IB4 u neuronima različitog promjera i neurokemijskog sastava TG na modelu DM1 (A) i DM2 (B) 2 tjedna nakon injekcije STZ; kontrolne skupine - bijeli stupci; pokusne skupine - crni stupci. % - udio neurona; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike; podatci su prikazani kao M $\pm$ SD; \*označava statistički značajnu razliku između pokusne i odgovarajuće kontrolne skupine, # označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću skupinu u DM1 modelu ( $p < 0,05$ ).

**A****B**

**Slika 10. Utjecaj dijabetesa tipa 1 (DM1) i 2 (DM2) na izražaj NPY i IB4 u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa. Udio NPY i IB4 u neuronima različitog promjera i neurokemijskog sastava TG na modelu DM1 (A) i DM2 (A) 2 mjeseca nakon injekcije STZ; kontrolne skupine - bijeli stupci; pokusne skupine - crni stupci. % - udio neurona; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike; podaci su prikazani kao  $M \pm SD$ ; \*označava statistički značajnu razliku između pokusne i odgovarajuće kontrolne skupine, # označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću skupinu u DM1 modelu ( $p < 0,05$ ).**



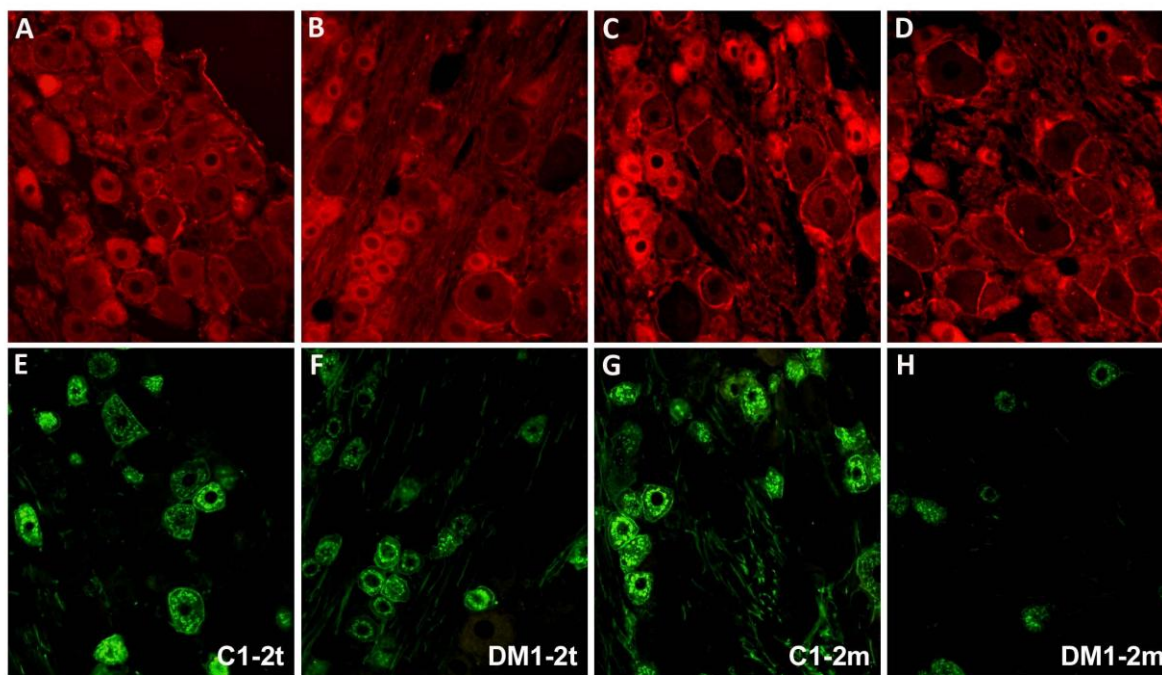
## 5.6 Udio VEGF imunoreaktivnih neurona samostalno i u kolokalizaciji s IB4 u trigeminalnom gangliju štakora tijekom ranog stadija šećerne bolesti tipa 1 i 2

Imunohistokemijska metoda korištena je za analizu promjene izražaja VEGF u neuronima trigeminalnog ganglija štakora, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa tipa 1 i 2.

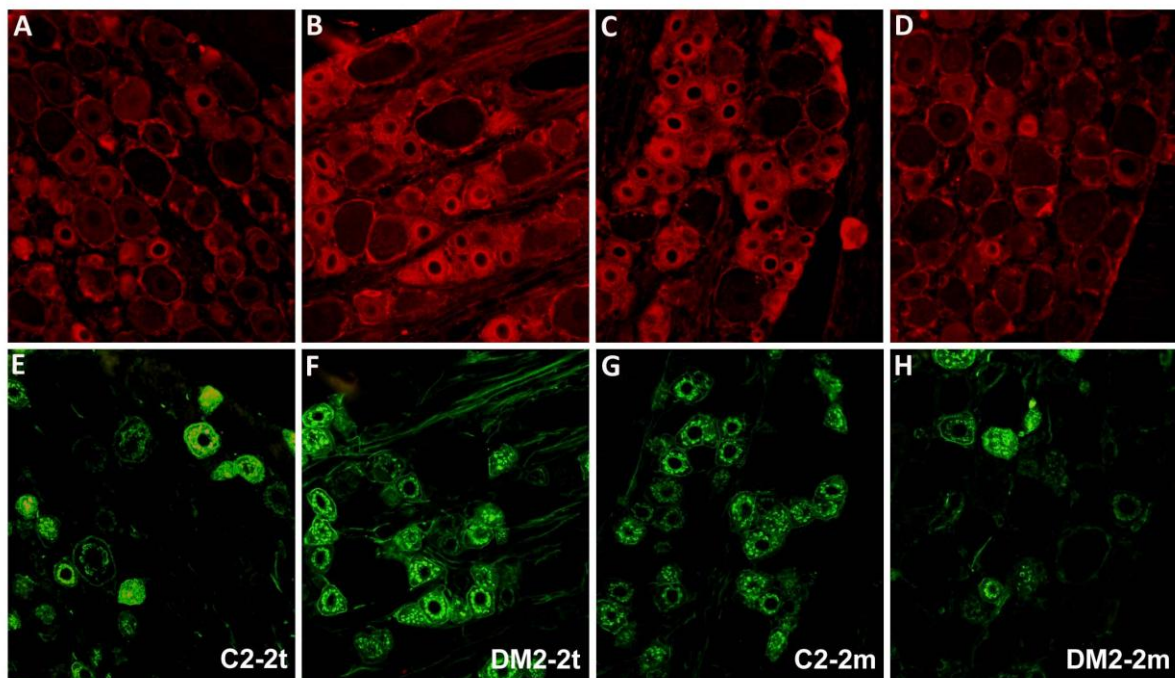
Usporedbom oba DM modela, 2 tjedna nakon ubrizgavanja STZ, udio VEGF pozitivnih neurona u TG bio je značajno veći u kontrolnoj skupini DM2 u odnosu na kontrolnu skupinu DM1 modela, dok je udio VEGF/IB4+ neurona bio veći u eksperimentalnoj skupini DM2 u odnosu na eksperimentalnu skupinu DM1 modela ( $p < 0,05$ ; Slika 13).

Kako bi se prikazale promjene u neurokemijski specifičnim subpopulacijama neurona TG, provedeno je dvostruko imunohistokemijsko bojenje na VEGF i IB4. Istraživanje je pokazalo povećanje udjela VEGF+/IB4- neurona velikog promjera ( $d > 30 \mu\text{m}$ ) 2 tjedna od indukcije DM1. Dva tjedna od indukcije DM2, značajno se povećao udio VEGF+/IB4+ neurona TG u odnosu na njihove kontrolne skupine ( $p < 0,05$ ; Slika 13B). Udio VEGF+/IB4- neurona ukupno i VEGF+/IB4- neurona malog promjera ( $d < 30 \mu\text{m}$ ) smanjio se 2 mjeseca nakon indukcije DM1 u odnosu na njihove kontrolne skupine ( $p < 0,05$ ; Slike 13B i 14A).

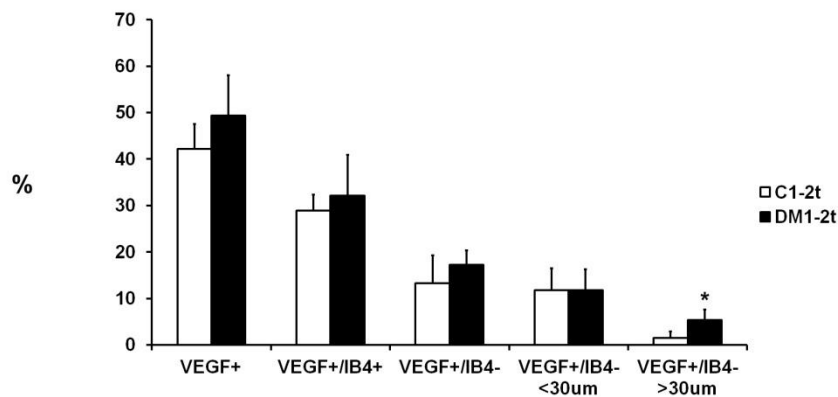
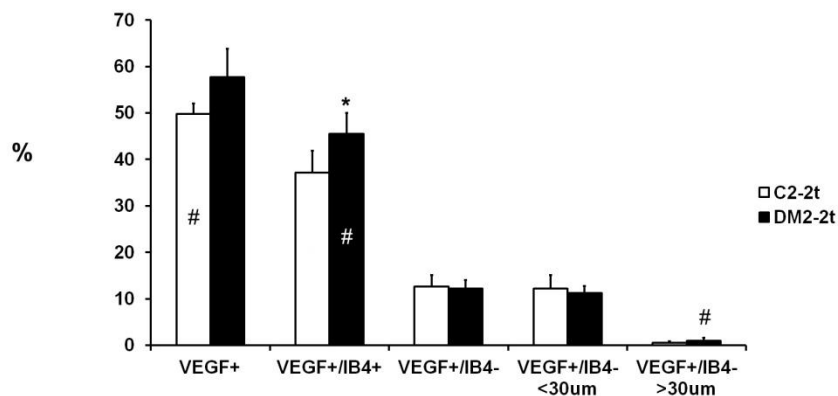
Udio VEGF+/IB4- neurona većeg promjera od  $30 \mu\text{m}$  je bio niži u DM2 modelu u odnosu na DM1 model nakon 2-tjedne indukcije, dok je nakon 2-mjesečne indukcije udio kontrolne skupine DM2 bio niži u odnosu na kontrolnu skupinu DM1 modela ( $p < 0,05$ ; Slike 13 i 14).



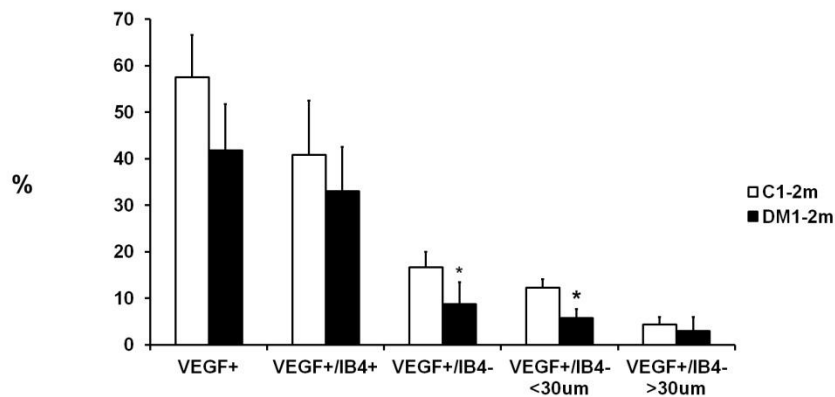
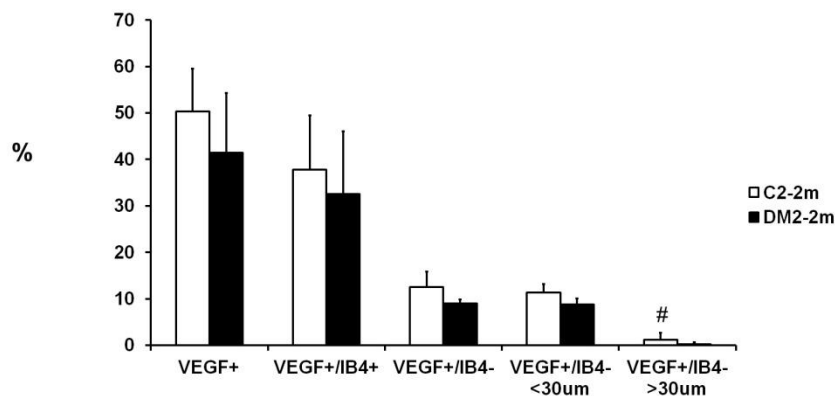
**Slika 11. Utjecaj dijabetesa tipa 1 (DM1) na izražaj VEGF u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa.** Reprezentativna slika imunofluorescencijskog bojanja VEGF (crveno) i IB4 (zeleno) u trigeminalnim ganglijima, 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa u kontrolnoj skupini DM1 (A; E), u skupini DM1 (B; F) i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa u kontrolnoj skupini DM1 (C; G), u skupini DM1 (D; H). Povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu\text{m}$  i odnosi se na sve slike.



**Slika 12. Utjecaj dijabetesa tipa 2 (DM2) na izražaj VEGF u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa.** Reprezentativna slika imunofluorescencijskog bojanja VEGF (crveno) i IB4 (zeleno) u trigeminalnim ganglijima, 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa u kontrolnoj skupini DM2 (A; E), skupini DM1 (B; F) i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa u kontrolnoj skupini DM2 (C; G), skupini DM1 (D; H). Povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu\text{m}$  i odnosi se na sve slike.

**A****B**

**Slika 13. Utjecaj dijabetesa tipa 1 (DM1) i dijabetesa tipa 2 (DM2) na izražaj VEGF u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa. Udio VEGF u neuronima različitog promjera i neurokemijskog sastava TG na modelu DM1 (A) i modelu DM2 (B) 2 tjedna nakon injekcije STZ; kontrolne skupine - bijeli stupci; pokusne skupine - crni stupci. % - udio neurona; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike; podatci su prikazani kao M $\pm$ SD; \*označava statistički značajnu razliku između pokusne i odgovarajuće kontrolne skupine, # označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću skupinu u DM1 modelu (p<0,05).**

**A****B**

**Slika 14. Utjecaj dijabetesa tipa 1 (DM1) i dijabetesa tipa 2 (DM2) na izražaj VEGF u trigeminalnim ganglijima (TG) štakora 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa. Udio VEGF u neuronima različitog promjera i neurokemijskog sastava TG na modelu DM1 (A) i DM2 (B) 2 mjeseca nakon injekcije STZ; kontrolne skupine - bijeli stupci; pokusne skupine - crni stupci. % - udio neurona; povećanje: 40x; mjerilo: 20  $\mu$ m i odnosi se na sve slike; podatci su prikazani kao  $M \pm SD$ ; \*označava statistički značajnu razliku između pokusne i odgovarajuće kontrolne skupine, # označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću skupinu u DM1 modelu ( $p < 0,05$ ).**

## 6. RASPRAVA

Istražene su promjene intenziteta izražaja fosforilirane CaMKII $\alpha$ , VEGF i NPY u TG štakora, kako bi se prikazao utjecaj dijabetesa na promjenu izražaja istih u različitim subpopulacijama neurona TG i otkrila njihova moguća uloga u dijabetičkoj trigeminalnoj neuropatiji. Također su istražene morfološke promjene neurona TG izazvane DM1 ili DM2.

Validacija pokusnih modela ukazuje da su životinje oba modela razvile hiperglikemiju, koje ja bila naglašenija u DM1 štakora (Slika 1). Također je razvidno da su tjelesne mase dijabetičnih štakora DM1 modela bile niže u odnosu na njihove kontrole iste dobi. Nasuprot, tjelesna masa kontrolnih životinja DM2 2 mjeseca nakon indukcije bila je viša u odnosu na kontrolne štakore DM1 modela.

Morfometrija SG u pokusnoj dijabetičkoj neuropatiji pokazuje da je indukcija dijabetesa povezana sa strukturnim promjenama perifernog živčanog sustava (19). Ta otkrića impliciraju da stanično-specifične studije primarnih osjetnih neurona mogu biti važne u istraživanju funkcionalnih razlika među različitim skupinama primarnih osjetnih neurona i njihovih uloga u patofiziologiji dijabetičke neuropatije.

Na modelima eksperimentalnog DM1 i DM2 uočene su morfološke promjene u TG štakora, izazvane kako dijabetesom, tako i prehranom s visokim udjelom masnoća (HFD, eng. *high fat diet*) – u kontrolnih skupina DM2 (Slika 2). Navedene promjene očitovale su se zadebljanjem satelitskih stanica, kao i progresivnom pojavom vakuola u vidu dvostrukih pupova stanične membrane Schwannovih stanica u području Ranvierovih čvorova, koja je bila najintenzivnija u DM2 modelu, 2 mjeseca nakon indukcije. Imunofluorescencijsko bojenje na gfap pokazalo je intenzivniji izražaj gfap u zadebljalim satelitskim stanicama dijabetičnih štakora, kao i kontrolnih štakora u modelu DM2, 2 mjeseca nakon indukcije (Slika 3). Ove promjene ukazuju na aktivaciju satelitskih stanica, kao dio upalnog odgovora na oštećenje izazvano hiperglikemijom i HFD. Pojava vakuola u Schwannovim stanicama ukazuje na progresivno oštećenje živčanih vlakana primarnih osjetnih neurona TG u oba dijabetička modela, ali također ukazuje da HFD izravno (bez prisutnosti znakova DM) rezultira oštećenjem aksona trigeminalnih osjetnih neurona. Zamijećene vakuolarne promjene mijelinske ovojnice mogle bi doprinijeti poremećenom aksonalnom transportu NGF prema tijelima neurona, a koje su do sada opisane u eksperimentalnim modelima DM (22). Morfološke promjene koje smo uočili u TG štakora u ranoj fazi DM1 i DM2 odgovaraju već do sada opisanima, koje uključuju

degeneraciju aksona i disfunkciju Schwannovih stanica s posljedičnom demijelinizacijom (18).

Još dramatičnije promjene s gubitkom neurona TG 5 tjedana od indukcije DM utvrdili su u štakora Nones i sur. (19). Oni navedenim promjenama objašnjavaju ispad u prijenosu senzornih informacija orofacijalne regije utvrđen u dijabetičnih štakora. Nadalje, senzorni poremećaji uslijed razvitka DM komplikacija u modelu kroničnog DM (do godinu dana) također se povezuju s apoptozom neurona u SG štakora (199).

Uz promjene intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$ , NPY i VEGF u specifičnim subpopulacijama neurona TG izazvane utjecajem DM1, u ovoj studiji istražene su i promjene u veličini neurona TG nakon indukcije DM1 i DM2. Smanjenje veličine IB4+ i IB4- neurona je uočeno 2 tjedna, kao i 2 mjeseca nakon indukcije STZ-DM1 modela. Slično smanjenje veličine neurona SG u akutnoj (4 tjedna) (200) i kroničnoj (12 mjeseci) pokusnoj dijabetičkoj neuropatiji je bilo objašnjeno atrofičnim promjenama neurona uzrokovanim hiperglikemijom (68). S druge strane, DM2 je rezultirao značajnim povećanjem promjera neurona obiju populacija, IB4+ i IB4-, 2 mjeseca nakon indukcije DM2. Dalje, usporedbom raspodjele neurona prema kriteriju prosječnog promjera, prikazane su značajne razlike između kontrolne DM1 i kontrolne DM2 skupine, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa, ukazujući da pretilost samostalno može rezultirati manjim promjerom IB4+ i IB4- neurona u TG. Ozljeda korijena spinalnog živca uzrokuje nocicepcijsku hipertrofiju (201), a neozlijeđeni neuroni SG hipertrofiraju prilikom *in vivo* impregnacije s NGF ili GDNF (202). Promjene u prisutnosti NGF u perifernim tkivima i aksonalnom transportu istoga prema tijelima neurona, koje su do sada opisane u pokusnom DM modelu (22), moguće su objašnjenje hipertrofije neurona TG u štakora 2 mjeseca nakon indukcije DM2.

U ovom istraživanju prikazano je povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u neuronima TG štakora, 2 mjeseca nakon indukcije DM1 modela. Povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  pronađeno u neuronima TG dijabetičnih štakora je u suglasju sa studijama provedenim na SG štakora (96, 127). Ferhatović i sur. su opisali povećanje izražaja pCaMKII $\alpha$  u DM1 životinja već 2 tjedna nakon indukcije dijabetesa (96, 127), uglavnom u velikim neuronima, mehanoreceptorima (203). Nasuprot spomenutom istraživanju na SG štakora, u ovom istraživanju nisu nađene promjene u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  u neuronima TG unutar 2 tjedna od indukcije DM1 (Slika. 6). U spomenutom istraživanju, dva mjeseca nakon

indukcije dijabetesa se izražaj pCaMKII $\alpha$  značajno povećao u svim neuronima SG DM1 životinja i u svim skupinama neurona (mali, srednji i veliki) (96).

U suprotnosti sa spomenutom studijom na SG, u ovom je istraživanju povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u TG DM1 životinja 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa bilo prisutno isključivo u malim neuronima (Slika 7), za koje se zna da sudjeluju u procesu prenošenja osjeta boli (203). Daljnjim istraživanjem potvrđeno je povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u neuronima malog promjera (<30  $\mu$ m), subpopulacije IB4-negativnih neurona TG, koji prema dosadašnjim spoznajama većinom pripadaju peptidergičnim malim C-neuronima (203). Streptozotocinom izazvan DM1 u štakora uzrokuje ranu neurološku disfunkciju (204), uključujući promijenjenu osjetljivost na bol (205), što sugerira ranu uključenost malih nocicepcijskih neurona (33, 206, 207). Dvije subpopulacije malih osjetnih neurona, IB4+ i IB4- se ne razlikuju samo po svojim neurokemijskim značajkama (vezivanje za IB4; sinteza i sekrecija neuropeptida) i funkcionalnim karakteristikama, nego i odgovoru na patološke procese, kao što je aksotomija (208).

Preživljavanje IB4- neurona ovisi o NGF, a IB4+ neurona o GDNF (30). IB4- neuroni pokazuju kraće trajanje akcijskog potencijala i manju gustoću ionskih kanala ovisnih o naponu (209). Visokom temperaturom aktivirane struje unutar ove subpopulacije neurona (209), uz uočene promjene u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  unutar ove studije, mogu biti djelomično obrazložene razvitka termalne hiperalgezije u STZ induciranom DM1 modelu (19).

Dosadašnje imunohistokemijske studije koje su proučavale izražaj CaMKII u perifernom živčanom sustavu opisale su ulogu CaMKII u procesu nocicepcije (76, 89, 95). Studija na kranijalnim ganglijima štakora je dokazala da je 50% neurona TG, nodoznog i jugularnog ganglija imunoreaktivno na CaMKII i da se nalaze u kategoriji malih do srednje velikih neurona (95). Carlton i sur. su utvrdili da 39% IB4+ neurona SG štakora također izražava CaMKII $\alpha$  (76). Rezultati Price i sur. ukazuju na ulogu CaMKII $\alpha$  u nocicepcijskoj preosjetljivosti, preko modulacije aktivnosti TRPV1 u osjetnim neuronima štakora (77).

Iako je do sada povećan izražaj pCaMKII $\alpha$  uočen na modelu akutnog i kroničnog DM u SG (96, 97, 127), u središnjem živčanom sustavu (128, 129, 210) i na različitim drugim tkivima (124, 125, 128), mehanizam masivne aktivacije CaMKII uzrokovan DM je još uvijek nedovoljno istražen. Erickson i sur. pokazuju da putem O-povezane glikozilacije, hiperglikemija aktivira CaMKII, zaključavajući je tako u konstitucijski aktivnoj konformaciji

(122). Iako taj proces još nije proučavan na živčanom tkivu, razumno je za očekivati sličan proces i unutar osjetnih ganglija, nakon izlaganja istih visokim koncentracijama glukoze. Drugo potencijalno obrazloženje bi se moglo odnositi na povećanje izražaja VGCC unutar primarnih osjetnih neurona (98, 123), što može uzrokovati povećanje unutarstaničnih koncentracija iona kalcija i aktivaciju CaMKII preko kompleksa kalcij-kalmodulin (99).

Aktivacija CaMKII u neuronima potiče mnoge stanične procese, uglavnom fosforilacijom različitih staničnih supstrata i njihovom posljedičnom aktivacijom/deaktivacijom (211). Neki od tih procesa uključuju regulaciju različitih staničnih ionskih kanala i posljedičnu promjenu stanične podražljivosti (120). Pokazano je da aktivna CaMKII regulira podražljivost malih i srednje velikih neurona TG osjetljivih na kapsaicin (88). Jedna od najbitnijih uloga CaMKII je dugoročna potencijacija i pohrana informacija u formi dugoročnog pamćenja, za koju se smatra da je molekularna osnova procesa učenja (99). Povećan izražaj CaMKII $\alpha$  u specifičnoj populaciji malih peptidergičnih neurona, može rezultirati bržom i jačom reakcijom neurona na bolni podražaj ili pretjeranom reakcijom na normalni podražaj, s kliničkim simptomima hiperalgezije i alodinije u orofacijalnoj regiji u dijabetičnih bolesnika, kao i u pokusnim životinjskim modelima DM (19, 20). Taj učinak se može uzeti u obzir i u patofiziologiji migrena povezanih s dijabetesom, budući da su primarni osjetni neuroni koji inerviraju duru mater lokalizirani u TG (212). Iako su spomenuti neuroni koji inerviraju duru mater uglavnom veći po veličini (212), a u ovoj studiji je pronađeno povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  isključivo unutar malih neurona, nije moguće isključiti mogućnost zahvaćanja velikih neurona TG nakon dužeg trajanja dijabetesa.

Patofiziološke promjene nastale povećanjem izražaja CaMKII $\alpha$  u osjetnim neuronima, rezultiraju nocicepcijskom preosjetljivošću i mehaničkom hiperalgezijom, preko modulacije aktivnosti TRPV1 i interakcije s NMDA receptorima (77, 213); aktivacijom purinergičkih receptora (P2X<sub>3</sub>) (214) ili pak povećanjem oksidativnog staničnog stresa i oštećenjem stanica (124, 125). Različiti putovi aktivirani hiperglikemijom dovode do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva, koji uzrokuju oksidativni stres i upalu tkiva (215). Di Pietro i sur. su uočili važnost signalizacijskog puta CaMKII u regulaciji aktivnosti sintetaze dušikovog oksida (engl. *nitric oxide synthase*; NOS) na modelu DM (216). CaMKII je modulirajući aktivnost NOS, doprinjela apoptozi pericita mrežnice u DM modelu (125). Oksidativni stres nastao djelovanjem visokih koncentracija glukoze je već mjesec dana nakon indukcije DM uzrokovao apoptotske promjene neurona SG, kao i u akutno hiperglikemičnih štakora 6 h nakon primanja infuzije otopine glukoze (217).



Hiperglikemija i CaMKII mogu izravno utjecati na patogenezu srčanih i neurodegenerativnih bolesti (122) te neuroloških poremećaja, modulacijom prometa iona kalcija na razini kalcijevih kanala, uz promjene genske transkripcije (118). Simptomi dijabetičke neuropatije povezani su s izravnim neuropatskim učinkom hiperglikemije. U STZ-induciranim životinjskim modelima dijabetesa prikazana je pozitivna korelacija hiperalgezije s razinom hiperglikemije (218). Isto tako, u zdravih osoba, podizanje koncentracije glukoze u plazmi infuzijama glukoze, posljedično akutno snižava prag osjeta boli (219). Kontrolirana razina glukoze povezana je s poboljšanjem živčane provodljivosti i kliničkih manifestacija neuropatije u pacijenata s DM1, te mogućim poboljšanjem u pacijenata s DM2 (220).

Statistička analiza je pokazala da ne postoji značajna razlika u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  u TG životinja oboljelih od DM2. Dva tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije DM2 modela, intenzitet izražaja pCaMKII $\alpha$  se smanjio, ali ne značajno, u svim neuronima TG DM2 štakora. Ti rezultati su u suglasnosti s rezultatima prethodnih istraživanja na SG štakora (96). Dijabetička neuropatija je bez sumnje potvrđena na različitim DM2 modelima štakora (221, 222). Isto tako, trigeminalna bol i osjetni poremećaji su uočeni u pacijenata oboljelih od DM2 (20). Međutim, taj oblik neuropatije je najčešće subklinički (64). Izostanak povećanja intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u DM2 životinja može se opravdati nižim hiperglikemijama koje prate kliničku sliku DM2 (96, 128). Za pretpostaviti je da je potrebno duže vremensko izlaganje nižim hiperglikemijama, kako bi došlo do promjena u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  u trigeminalnim neuronima. Isto tako, spomenuti izostanak povećanja intenziteta izražaja bi mogao biti rezultat pretilosti kontrolne skupine DM2 životinja i HFD prehrane (3) ili pak smanjenog, ali perzistentnog lučenja inzulina u DM2 modelu, koji bi potencijalno mogao dovesti do promjena u intenzitetu izražaja pCaMKII $\alpha$  (33, 96, 128).

U ovom istraživanju utvrđeno je povećanje udjela NPY pozitivnih neurona TG 2 tjedna i 2 mjeseca nakon ubrizgavanja STZ, u DM1 štakora, dok je izražaj NPY u TG DM2 štakora značajno porastao tek 2 mjeseca nakon indukcije dijabetesa (Slike 9. i 10). Pojačan izražaj NPY potvrđen je u različitim modelima ozljede neurona (141, 151), međutim, promjene u izražaju NPY u različitim tkivima na dijabetičkim modelima su prijeporne (132, 135). Do sada su samo 3 studije proučavale izražaj NPY u živčanom tkivu SG na modelu dijabetesa (147, 164, 165). Izražaj NPY nije zabilježen u SG nakon izlaganja hiperglikemiji, kao niti u kontrolnim skupinama štakora u istim istraživanjima. Lin i sur. su prikazali izražaj NPY u SG na modelu oštećenja živca medianusa u dijabetičkih štakora, opravdavajući brzi razvitak simptoma neuropatije, pratećom hiperglikemijom, već 2 tjedna nakon indukcije DM (147).

Burnand i sur. metodom RNA hibridizacije na mikročipovima, 2 mjeseca od indukcije dijabetesa nisu uspjeli pronaći promjene u genskom izražaju NPY, koje su karakteristične za fenotip neurona nakon aksotomije (a među koje se ubraja i promjena izražaja gena za NPY) u SG dijabetičnih štakora. Iako model DM oponaša model aksotomije, autori smatraju da je povećanje u izražaju ovih gena izostalo vjerojatno zbog gubitka neurotrofičnih čimbenika rasta u dijabetičkom modelu oštećenja neurona (164). Chottova Dvorakova i sur. također nisu zabilježili promjene izražaja NPY mRNA niti NPY imunoreaktivnosti unutar SG štakora na kroničnom modelu kardijalne dijabetičke neuropatije, u trajanju od 26 do 53 tjedna (165). U fiziološkim uvjetima u zdravom tkivu osjetni neuroni ne prikazuju izražaj NPY ili ga prikazuju u vrlo malim količinama, ali nakon ozljede neurona zabilježene su promjene NPY u smjeru povećanja izražaja istog u SG štakora (141, 151). Rezultati navedenih istraživanja potvrđuju da se morfologija neurona u dijabetičkoj neuropatiji nije promijenila, tj. dijabetes nije uzrokovao vidljivo oštećenje struktura neurona u dijabetičkom modelu, čime je izostalo i povećanje izražaja NPY u intaktnim neuronima SG štakora. Slično je potvrđeno i u istraživanju Thomas i sur. gdje nisu uočene morfološke promjene neurona SG štakora do 12 tjedna od indukcije DM (223). Stoga, rezultati ovog istraživanja sugeriraju da je povećanje izražaja NPY u TG u oba tipa dijabetesa nastalo kao rezultat oštećenja neurona u dijabetesu. Nedavno istraživanje Nones i sur. stereološkom analizom neurona TG 5 tjedana nakon indukcije DM prikazuje značajan gubitak neurona u TG štakora (19), što potvrđuje ove rezultate. Čimbenik rasta neurona regulira otpuštanje neuropeptida, kao dio signalnog puta regeneracije neurona u odgovoru neurona na ozljedu. U ranom stadiju dijabetesa, sinteza različitih neuropeptida je najčešće potaknuta izlučivanjem NGF iz upalnih stanica, koji sprječava razvitak osjetne dijabetičke neuropatije (137). Stoga se povećani broj NPY imunoreaktivnih živčanih vlakana u jeziku štakora 4 tjedna nakon indukcije DM tumači promjenama u koncentraciji neurotrofnih čimbenika otpuštenih iz upalnih stanica, kao kompenzacijskog mehanizma zaštite neurona nakon oštećenja (135). Gyorffi i sur. potvrđuju slično na modelu kratkoročnog dijabetesa, promatrajući promjene i oštećenja na razini mijeliniziranih i nemijeliniziranih neurona (138).

Utvrđeni porast udjela NPY imunoreaktivnih neurona oba pokusna modela (DM1 i DM2), obuhvaćao je dvije subpopulacije: IB4+, kao i male IB4- neurone, dok u velikim IB4- neuronima nisu zabilježene značajne promjene izražaja NPY. Kako je već spomenuto, zahvaćene dvije populacije neurona pripadaju nociceptorima (25, 40). Navedeno je u suglasju

s podacima da neuropatske promjene izazavane dijabetesom zahvaćaju najčešće prvo mala A $\delta$  i C vlakna (3, 18, 40).

Poznato je da NPY povećava podražljivost malih neurona SG zaduženih za nocicepciju i sudjeluje u modulaciji prijenosa osjetne informacije regulacijom VGCC (156). Uočene promjene u povećanju izražaja NPY u ovdje opisanom istraživanju, mogu djelomično obrazložiti pojavu termalne hiperalgezije u STZ-induciranom DM modelu (19). Nasuprot ovdje prikazanim rezultatima, Tsai i sur. potvrđuju u svom istraživanju neuropatije da se udio NPY imunoreaktivnih neurona SG povećava u korist srednjih i velikih neurona SG nakon presjecanja n. medijanusa (224).

Zanimljivo je da, iako je kasnije nastupio, porast izražaja NPY u neuronima DM2 modela je bio intenzivniji, rezultirajući gotovo dvostruko većim udjelom NPY+ neurona u usporedbi s TG štakora u DM1 modelu. Navedene razlike između dvaju modela mogle bi se objasniti različitom patogenezom oštećenja kod ova dva tipa bolesti. Naime, osnovnu značajku DM2, uz hiperglikemiju i hiperinzulinemiju, predstavlja razvoj inzulinske rezistencije (225). Inzulinska rezistencija, iako izravno ne utječe na transport glukoze u neuronima, izaziva oštećenje neurona drugim mehanizmima; uključujući oksidativni stres, proapoptičke učinke, poremećenu funkciju različitih receptora i ionskih kanala, utjecaj na sinaptičku plastičnost, kao i regulaciju upalnog odgovora glija stanica (225). Također se može uočiti da HFD, unatoč uočenim morfološkim posljedicama, nije sama po sebi izazvala porast izražaja NPY u neuronima TG.

Izražaj VEGF u TG se značajno povećao 2 tjedna nakon indukcije DM1 modela samo u populaciji velikih IB4- neurona (mehanoreceptora) (Slika 13). Veliki neuroni sadrže pretežito mijelinizirane A $\beta$  i A $\delta$  aksone, od kojih su neki i nociceptivna vlakna, koja potaknuta oštećenjem ili upalnim procesom, pridonose nastanku osjeta boli (226). Isto tako, zna se da povećana podražljivost srednjih i velikih neurona TG izlučivanjem tvari P aktivira susjedne male nociceptivne neurone, zadužene za inervaciju orofacijalne regije (155).

Nasuprot gore navedenome, istovremeno je, 2 tjedna nakon indukcije DM2 modela, porastao izražaj VEGF samo u populaciji IB4+ neurona TG štakora. Utvrđeni porast izražaja VEGF u TG je u suglasju s rezultatima drugih istraživanja, kojima je utvrđeno da je kompenzacijsko povećanje izražaja VEGF povezano s njegovom ulogom u zaštiti neurona SG od oštećenja hiperglikemijom (134). Naime, smatra se da bi funkcionalne promjene perifernih neurona zabilježene 12 tjedana nakon indukcije DM, uz povećanje izražaja VEGF u neuronima SG,

mogle ukazivati na ulogu VEGF u regeneraciji nakon oštećenja neurona (188). Verheyen i sur. u povećanom izražaju VEGF tijekom dijabetične periferne neuropatije vide zaštitu neurona SG, koja vodi smanjenju izražaja simptoma neuropatije i rezultira manjom učestalošću mehaničke hiperalgezije u odgovoru na bolni podražaj (176). Uočene razlike između dvaju modela mogle bi se pripisati različitim mehanizmima. Jedno od mogućih obrazloženja je pojava inzulinske rezistencije u DM2 modelu, na koju bi, prema našim rezultatima, bili osjetljiviji IB4+ neuroni. Navedeno potkrepljuje i činjenica da je HFD (koja se povezuje s nastankom inzulinske rezistencije i oštećenja neurona) (3, 227) sama po sebi rezultirala povećanim udjelom VEGF+ neurona u TG (Slika 13). Nasuprot tome, veliki IB4-neuroni mogli bi, prema tome, biti znatno osjetljiviji na hiperglikemiju i nedostatak inzulina, karakteristične za DM1. Prema tome, zabilježene razlike u ranom izražaju VEGF u različitim subpopulacijama neurona TG između dvaju različitih modela – DM1 i DM2, ukazuju na ovisnost samog izražaja VEGF, ne samo o oštećenju neurona, već i o nedostatku inzulina i/ili pojavi inzulinske rezistencije, koje različito pogađaju različite funkcionalne subpopulacije neurona. Ova pojava mogla bi biti u podlozi obrazloženja različite dinamike pojave oštećenja malih i velikih neurona tijekom razvoja dijabetičke neuropatije (33). Nakon početnog porasta izražaja VEGF u neuronima TG, 2 mjeseca nakon indukcije DM uslijedilo je smanjenje udjela VEGF+ neurona, koje je doseglo razinu značajnosti samo u subpopulaciji malih, IB4-neurona (peptidergički nociceptori) i to isključivo u DM1 modelu (Slika 14). Mogući razlog gubitka izražaja neuropeptida u neuronima, mogao bi se nalaziti u kontinuiranom izlučivanju i gubitku VEGF iz staničnih vezikula na razinu nedovoljnu za imunohistokemijsku detekciju (150). Smanjenje izražaja VEGF u malim peptidergičkim neuronima moglo biti barem djelomično obrazloženje razvitka termalne hiperalgezije u STZ-induciranom DM modelu (19). Ovo potkrepljuje i nalaz da gubitak intenziteta izražaja VEGF i VEGF imunoreaktivnih živčanih vlakana u koži DM bolesnika korelira s pojavom neuroloških simptoma i težinom simptoma DM neuropatije (167). Također, utvrđena je povezanost između povećanog izražaja VEGF i poboljšanja ishoda ishemijske dijabetičke neuropatije, koja se pripisuje pojačanoj regeneraciji malih osjetnih i velikih neurona perifernog živčanog sustava, a praćena je smanjenjem znakova termalne hiperalgezije (174). Pad izražaja VEGF selektivno u subpopulaciji malih peptidergičkih neurona u modelu DM1 mogao bi se objasniti i njihovom ovisnošću o izravnom djelovanju inzulina, koji u ovom modelu, za razliku od DM2, gotovo potpuno nedostaje (33).

Iako je utvrđeno da su promjene izražaja VEGF važan čimbenik u patofiziologiji dijabetičke neuropatije te su praćene promjenama u bolnom ponašanju štakora, promjene dinamike izražaja VEGF u SG na dijabetičkom modelu su za sada proturječne, dok njegov izražaj u TG do sada nije istraživani. Ograničen broj studija sugerira dinamičku varijaciju u izražaju VEGF u SG u različitim vremenskim intervalima razvitka DM. Samii i sur. su pokazali da hiperglikemija izravno potiče povećan izražaj VEGF u SG miša 12 tjedana nakon indukcije DM (188), dok su Pawson i sur. utvrdili smanjenje izražaja VEGF u neuronima SG štakora 3 tjedna nakon indukcije DM (69). U ranom stadiju DM, NGF izlučen iz upalnih stanica potiče sintezu različitih neuropeptida, koji kompenzacijski sprječavaju razvitak osjetne dijabetičke neuropatije (137). Kompenzacijski mehanizam kojim oštećeni neuroni potiču povećanje izlučivanja NGF i izražaja VEGF, implicira da DM već u ranom stadiju izaziva DPN. Međutim, 4 tjedna nakon oštećenja dolazi do dekompenzacije mehanizma u lučenju NGF (34), što bi moglo obrazložiti smanjenje udjela VEGF pozitivnih neurona TG, utvrđeno ovim istraživanjem, 2 mjeseca nakon indukcije DM1. Napredovanjem bolesti, nedostatak potpore neurotrofnih čimbenika, kao što su NGF ili VEGF, potiče proces stanične smrti i propadanja neurona SG na modelu dijabetesa (134).

Ovo istraživanje je prikazalo prisutnost NPY i VEGF u različitim subpopulacijama neurona TG, uključujući nociceptore. Fenotipske promjene istih subpopulacija neurona bi mogle biti uključene u promjene prijenosa osjetnih informacija TG tijekom DM. Ovdje prikazano istraživanje ukazuje da je indukcija oba tipa dijabetesa povezana sa strukturnim promjenama neurona, gdje promjene u izražaju pCaMKII $\alpha$  u nociceptorima, kao i promjene veličine neurona mogu igrati važnu ulogu u razvitku trigeminalne dijabetičke neuropatije (228).

Buduće studije bi mogle promatrati ponašanje štakora karakteristično za bol orofacijalne regije kako bi se bolje razjasnila povezanost morfoloških i funkcionalnih orofacijalnih senzornih promjena uzrokovanih STZ-DM.

Koncentracije glukoze u ovdje opisanoj studiji su bile mnogo veće od onih opisanih u studiji Nones i sur. (19), jedine koja je prikazala orofacijalnu termalnu hiperalgeziju, ali ne i pojačanu reakciju štakora na mehanički podražaj u orofacijalnoj regiji.

Rano liječenje je jedan od presudnih čimbenika u ublažavanju komplikacija dijabetičke neuropatije, s ciljem sprječavanja ireverzibilnih oštećenja osjetnih neurona. Trigeminalna neuropatija je još uvijek nedovoljno istraženo područje, ali od velikog kliničkog značaja zbog još uvijek nepoznate incidencije, ograničenog znanja o specifičnim obilježjima bolesti,

odgođenog postavljanja dijagnoze i neusuglašenosti oko najboljeg terapijskog pristupa i učinkovitosti terapije. Iako se simptomatski farmakološki pristup čini kao najbolji terapijski izbor, odgovor trigeminalne neuropatije na terapije protiv boli je i dalje nezadovoljavajući. Poznavanje neuroanatomije i razumijevanje složenih patofizioloških mehanizama nastanka promjena unutar TG, temelj je uspješnog terapijskog pristupa dijabetičkoj trigeminalnoj neuropatiji.

Promjena izražaja enzima CaMKII $\alpha$  je ključna u patogenezi dijabetične neuropatije. Iako su promjene izražaja CaMKII $\alpha$  do sada opisane na različitim tkivima i modelima neuropatije, još uvijek je nedovoljno istražena njezina uloga u TG dijabetičnoj neuropatiji. Budući da se promjene izražaja VEGF i NPY javljaju kao odgovor na upalni podražaj u dijabetičkom modelu, pretpostavljeno je da promjene izražaja istih, mogu biti vezane uz strukturne i funkcionalne promjene neurona TG u pokusnom modelu DM, putem plastičnosti neurona i modulacije nocicepcijske aktivnosti. Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti promjenu intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  i izražaj VEGF i NPY, u neuronima TG, samostalno i u neurokemijski različitim subpopulacijama osjetnih neurona. Dobiveni rezultati sugeriraju da promjene intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$ , kao i izražaja VEGF i NPY, koje su bile izraženije u nocicepcijskim neuronima, ukazuju na njihovu moguću ulogu u patogenezi dijabetičke trigeminalne neuralgije. Dobivene spoznaje bi mogle biti od velikog značaja u daljnjim istraživanjima patofiziologije trigeminalne dijabetičke neuropatije i njezinom liječenju, modulacijom izražaja pCaMKII $\alpha$ , VEGF i NPY.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Indukcija DM1 i DM2 u štakora, kao i prehrana masnom hranom, rezultira morfološkim promjenama u TG, koje se očituju aktivacijom satelitskih stanica, oštećenjem aksona s formiranjem vakuola, te atrofijom neurona u modelu DM1 i hipertrofijom neurona TG u modelu DM2.
2. Indukcija DM1 uzrokovala je povećanje intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  u malim IB4-negativnim neuronima TG štakora, koji odgovaraju populaciji peptidergičkih nocicepcijskih neurona, 2 mjeseca nakon aplikacije STZ.
3. DM1 uzrokuje intenzivni porast izražaja NPY u neuronima TG štakora već nakon 2 tjedna, dok isti u DM2 modelu nastupa tek 2 mjeseca nakon indukcije.
4. Porast izražaja NPY u oba modela, DM1 i DM2, zahvaća prvenstveno nociceptivne male neurone - IB4- i IB4+ populacije.
5. DM1 uzrokuje porast izražaja VEGF isključivo u populaciji velikih IB4- neurona, koji odgovaraju mehanocepcijskim neuronima. Suprotno, DM2 istovremeno rezultira porastom izražaja VEGF u populaciji IB4+ neurona.
6. Dva mjeseca nakon indukcije obaju modela, izražaj VEGF u neuronima TG štakora se smanjuje, posebice u populaciji malih peptidergičkih neurona štakora DM1 modela.
7. Uočene promjene izražaja istraživanih čimbenika koje zahvaćaju prvenstveno subpopulacije nociceptivnih neurona, mogu se povezati s već poznatom dinamikom neuropatskih promjena izazvanih dijabetesom, koje zahvaćaju najprije male A $\delta$  i C neurone.
8. Morfološke i neurokemijske promjene neurona TG uočene u kontrolnih životinja modela DM2, u usporedbi s kontrolnim životinjama modela DM1, bi se mogle pripisati utjecaju prehrane s velikim udjelom masnoća.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Dijabetes uzrokuje promjene funkcije trigeminalnog živca, što se očituje promijenjenim provođenjem osjetnih informacija iz područja lica i mijenjanjem odgovora na bolni podražaj. Kalcij/kalmodulin-ovisna kinaza II alfa ( $\text{CaMKII}\alpha$ ) može imati važnu ulogu u modulaciji nocicepcijske aktivnosti i plastičnosti osjetnih trigeminalnih neurona. Dijabetesom podržavan upalni odgovor preko medijatora neuropeptida Y (NPY) i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) upućuje na moguću ulogu istih u patogenezi dijabetičke neuropatije. Cilj istraživanja bio je istražiti izražaj VEGF i NPY, te promjenu intenziteta izražaja aktivnog oblika enzima  $\text{CaMKII}\alpha$  na štakorskom modelu trigeminalnog ganglija (TG) ranog dijabetesa tipa 1 (DM1) i tipa 2 (DM2). Dodatni cilj je bio istražiti distribuciju prema veličini neurona i postojanje razlike u ispitivanim parametrima u neurokemijski specifičnim subpopulacijama osjetnih neurona TG, 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije DM1 i DM2.

**Metode:** U pokusu su korišteni Sprague-Dawley štakori muškog spola (mase oko 200 g). Model DM1 izazvan je intraperitonealnim (i.p.) ubrizgavanjem streptozotocina (STZ) u dozi od 55 mg/kg. Model DM2 dobiven je i.p. ubrizgavanjem manje doze STZ (35 mg/kg) i hranjenjem štakora hranom s visokim udjelom masti. Štakori su žrtvovani 2 tjedna i 2 mjeseca nakon induciranja dijabetesa, a zatim je imunohistokemijski analiziran intenzitet izražaja p $\text{CaMKII}\alpha$ , izražaj VEGF i NPY, samostalno, ili u kolokalizaciji s izolektinom B4 (IB4).

**Rezultati:** Oba modela dijabetesa uspješno su inducirana, što je potvrđeno mjerenjem glukoze u plazmi i tjelesne mase. U TG štakora oba DM modela utvrđene su morfološke promjene, koje su se očitovale promjenom dijametra neurona te aktivacijom satelitskih stanica i propadanjem Schwanovih stanica. Dva mjeseca nakon ubrizgavanja STZ, intenzitet izražaja p $\text{CaMKII}\alpha$  se značajno povećao u TG DM1 štakora, isključivo u malim IB4-negativnim neuronima. DM1 model, kao i pretilost (kontrolna DM2 skupina) su rezultirali atrofijom, dok je DM2 model uzrokovao hipertrofiju neurona TG. Porast izražaja NPY u oba modela, u DM1 već nakon 2 tjedna, a DM2 tek nakon 2 mjeseca, zahvatio je prvenstveno nociceptivne male neurone - IB4- i IB4+ subpopulacija. Dva tjedna nakon indukcije, DM1 je uzrokovao porast izražaja VEGF isključivo u populaciji velikih IB4- neurona, dok je DM2 istovremeno rezultirao porastom izražaja VEGF u populaciji IB4+ neurona. Dva mjeseca nakon indukcije obaju modela, izražaj VEGF u neuronima TG štakora se smanjio, posebice u



populaciji malih peptidergičkih neurona štakora DM1 modela.

**Zaključci:** Dobiveni rezultati sugeriraju na promjene intenziteta izražaja pCaMKII $\alpha$  i izražaja VEGF i NPY, upravo u nocicepcijskim neuronima, što ukazuje na njihovu moguću ulogu u patogenezi dijabetičke trigeminalne neuropatije. Promatrane promjene mogu imati kritičnu ulogu u modulaciji nocicepcijske aktivnosti i plastičnosti primarnih osjetnih neurona TG. Dobivene spoznaje doprinose poznavanju patofiziologije trigeminalne dijabetičke neuropatije.

## 9. SUMMARY

**Background:** DM influences the trigeminal nerve function by changing the pain response and transduction of the orofacial sensory pathways. The activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha (CaMKII $\alpha$ ) may play a critical role in the modulation of nociceptor activity and plasticity of primary sensory trigeminal neurons. Diabetes affects inflammatory response via neuropeptide Y (NPY) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which potentially have relevant role in pathophysiology of diabetic neuropathy. The aim of this study was to investigate the expression of pCaMKII $\alpha$ , VEGF and NPY in subpopulations of trigeminal ganglion (TG) neurons in rat models of early diabetes type 1 (DM1) and 2 (DM2). Additional aim was to analyze change in the diameter of TG neurons 2 weeks and 2 months after the induction of both DM models.

**Methods:** DM1 model was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) (55 mg/kg). DM2 rats were fed with the high fat diet (HFD) for two weeks and then received 35 mg/kg of STZ i.p. Two weeks and 2 months after the STZ-diabetes induction, rats were sacrificed and immunohistochemical analysis for detection of pCaMKII $\alpha$ , VEGF and NPY expression and in addition to double immunofluorescent labelling with isolectin (IB4) was performed in TG.

**Results:** Increased expression of pCaMKII $\alpha$ , restricted to IB4-negative small-diameter neurons, was seen in TG two months after STZ-DM1 induction. DM1 model, as well as the obesity (control DM2 groups) resulted in the decrease of neuronal diameter, while DM2 model led to neuron hypertrophy in TG. Increased percentage of NPY was observed 2 weeks after DM1 and 2 months post DM2 induction. It was restricted to IB4-negative small-diameter and IB4+ neurons. Two weeks after the induction of DM a percentage increase of VEGF/IB4- large-diameter neurons was observed in DM1 animals while in DM2 animals there was a percentage increase in VEGF/IB4+ neurons. Reduced ratio of VEGF/IB4- small-diameter neurons was observed after two months of DM1 induction.

**Conclusion:** Observed changes may play a critical role in the modulation of nociceptor activity and plasticity of primary sensory trigeminal neurons. The results contribute to understanding of the basic pathophysiology of trigeminal diabetic neuropathy. Modulation of pCaMKII $\alpha$ , VEGF and NPY expression in specific subpopulations of neurons could be used in therapeutic approaches for diabetic trigeminal neuropathy.

## 10. LITERATURA

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010;33 Suppl 1:S62-9.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes atlas*. Sixth edition. 2013; [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas).
3. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nature reviews. Neurology*. 2011;7:573-83.
4. Grant RW, Kirkman MS. Trends in the evidence level for the American Diabetes Association's "Standards of Medical Care in Diabetes" from 2005 to 2014. *Diabetes care*. 2015;38:6-8.
5. Wang MY, Tsai PS, Chou KR, Chen CM. A systematic review of the efficacy of non-pharmacological treatments for depression on glycaemic control in type 2 diabetics. *Journal of clinical nursing*. 2008;17:2524-30.
6. Chiu KM, Wu CC, Wang MJ, Lu CW, Shieh JS, Lin TY, et al. Local infusion of bupivacaine combined with intravenous patient-controlled analgesia provides better pain relief than intravenous patient-controlled analgesia alone in patients undergoing minimally invasive cardiac surgery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;135:1348-52.
7. Gushchin PV, Tyan MR, Bokach NA, Revenco MD, Haukka M, Wang MJ, et al. Novel tailoring reaction for two adjacent coordinated nitriles giving platinum 1,3,5-triazapentadiene complexes. *Inorganic chemistry*. 2008;47:11487-500.
8. WHO. World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Geneva, Switzerland. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who\\_ncd\\_ncs\\_99.2.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who_ncd_ncs_99.2.pdf). 1999.
9. Jerng JS, Ko WJ, Lu FL, Chen YS, Huang SF, Yu CJ, et al. Incidence and significance of clinically abnormal events in a tertiary referral medical center: implementation of the clinical alert system (CAS). *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2008;107:396-403.
10. Lin JL, Wang MJ, Lee D, Liang CC, Lin S. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates matrix metalloproteinase-1 activity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FEBS letters*. 2008;582:2615-9.

11. Yin Y, Ren HY, Cen XN, Qiu ZX, Ou JP, Wang WS, et al. [Clinical study of double units unrelated cord blood transplantation in adult patients with hematological malignancies]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*. 2008;29:73-7.
12. Du YS, Li HF, Vance A, Zhong YQ, Jiao FY, Wang HM, et al. Randomized double-blind multicentre placebo-controlled clinical trial of the clonidine adhesive patch for the treatment of tic disorders. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. 2008;42:807-13.
13. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Retinopathy in diabetes. *Diabetes care*. 2004;27 Suppl 1:S84-7.
14. Wu XL, Wang MJ, Kuang Y, Zhang WJ, Ao QX. [A clinical research of Naoxingqing tablet's effects on blood fat and viscosity]. *Zhong yao cai = Zhongyao cai = Journal of Chinese medicinal materials*. 2008;31:171-4.
15. Lee JL, Wang MJ, Sudhir PR, Chen JY. CD44 engagement promotes matrix-derived survival through the CD44-SRC-integrin axis in lipid rafts. *Molecular and cellular biology*. 2008;28:5710-23.
16. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18:1-14.
17. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2005;28:956-62.
18. Said G. Diabetic neuropathy--a review. *Nature clinical practice. Neurology*. 2007;3:331-40.
19. Nones CF, Reis RC, Jesus CH, Veronez DA, Cunha JM, Chichorro JG. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. *Brain research*. 2013;1501:56-67.
20. Arap A, Siqueira SR, Silva CB, Teixeira MJ, Siqueira JT. Trigeminal pain and quantitative sensory testing in painful peripheral diabetic neuropathy. *Archives of oral biology*. 2010;55:486-93.
21. Nasri C, Teixeira MJ, Okada M, Formigoni G, Heir G, Siqueira JT. Burning mouth complaints: clinical characteristics of a Brazilian sample. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62:561-6.
22. Hellweg R, Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Journal of neuroscience research*. 1990;26:258-67.

23. Tang Q, Bangaru ML, Kostic S, Pan B, Wu HE, Koopmeiners AS, et al. Ca(2)(+)-dependent regulation of Ca(2)(+) currents in rat primary afferent neurons: role of CaMKII and the effect of injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32:11737-49.
24. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempner P, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care*. 2010;33:2285-93.
25. Taylor AM, Osikowicz M, Ribeiro-da-Silva A. Consequences of the ablation of nonpeptidergic afferents in an animal model of trigeminal neuropathic pain. *Pain*. 2012;153:1311-9.
26. Dyck PJ, Davies JL, Clark VM, Litchy WJ, Klein CJ, Rizza RA, et al. Modeling chronic glycemic exposure variables as correlates and predictors of microvascular complications of diabetes. *Diabetes care*. 2006;29:2282-8.
27. Wang LH, Ren HY, Li Y, Qiu ZX, Cen XN, Ou JP, et al. [Clinical contrasting study on hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical sibling and partially HLA-mismatched related donors]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*. 2008;29:507-11.
28. Wang MJ, Duan S, Xiang LF, Yang YC, Tu YQ, Wang JB, et al. [Study on the drug resistance situation among recently infected HIV-1 patients in Dehong]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. 2008;29:905-8.
29. Hendry C, Farley AH. Examinations: a practical guide for students. *Nurs Stand*. 2003;17:48-53; quiz 4-5.
30. Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, et al. IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*. 1997;19:849-61.
31. Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes care*. 2001;24:1448-53.
32. Sveen KA, Karime B, Jorum E, Mellgren SI, Fagerland MW, Monnier VM, et al. Small- and large-fiber neuropathy after 40 years of type 1 diabetes: associations with glycemic control and advanced protein glycation: the Oslo Study. *Diabetes care*. 2013;36:3712-7.
33. Kamiya H, Murakawa Y, Zhang W, Sima AA. Unmyelinated fiber sensory neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2005;21:448-58.

34. Kou ZZ, Li CY, Hu JC, Yin JB, Zhang DL, Liao YH, et al. Alterations in the neural circuits from peripheral afferents to the spinal cord: possible implications for diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Frontiers in neural circuits*. 2014;8:6.
35. Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH, et al. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127:1593-605.
36. Dyck PJ, Herrmann DN, Staff NP. Assessing decreased sensation and increased sensory phenomena in diabetic polyneuropathies. *Diabetes*. 2013;62:3677-86.
37. Shinkai RS, Hatch JP, Cornell JE, Yeh CK. Intraoral tactile sensitivity in adults with diabetes. *Diabetes care*. 2004;27:869-73.
38. Rahim-Williams B, Tomar S, Blanchard S, Riley JL, 3rd. Influences of adult-onset diabetes on orofacial pain and related health behaviors. *Journal of public health dentistry*. 2010;70:85-92.
39. Vinik AI, Kong X, Megerian JT, Gozani SN. Diabetic nerve conduction abnormalities in the primary care setting. *Diabetes technology & therapeutics*. 2006;8:654-62.
40. Hoeijmakers JG, Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Waxman SG. Small-fibre neuropathies--advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nature reviews. Neurology*. 8:369-79.
41. Niv D, Devor M. Position paper of the European Federation of IASP Chapters (EFIC) on the subject of pain management. *Eur J Pain*. 2007;11:487-9.
42. Ablin JN, Buskila D. "Real-life" treatment of chronic pain: Targets and goals. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 2015;29:111-9.
43. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes care*. 2004;27:1458-86.
44. Komiyama O, Obara R, Uchida T, Nishimura H, Iida T, Okubo M, et al. Pain intensity and psychosocial characteristics of patients with burning mouth syndrome and trigeminal neuralgia. *Journal of oral science*. 2012;54:321-7.
45. Adamo D, Schiavone V, Aria M, Leuci S, Ruoppo E, Dell'Aversana G, et al. Sleep disturbance in patients with burning mouth syndrome: a case-control study. *Journal of orofacial pain*. 2013;27:304-13.
46. Lazarov NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Progress in neurobiology*. 2002;66:19-59.

47. Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*. 1988;32:89-94.
48. Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2012;28 Suppl 1:8-14.
49. Aslam A, Singh J, Rajbhandari S. Pathogenesis of painful diabetic neuropathy. *Pain research and treatment*. 2014;2014:412041.
50. Andersson DA, Gentry C, Light E, Vastani N, Vallortigara J, Bierhaus A, et al. Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1. *PloS one*. 2013;8:e77986.
51. Kanno T, Yaguchi T, Nishizaki T. Noradrenaline stimulates ATP release from DRG neurons by targeting beta(3) adrenoceptors as a factor of neuropathic pain. *Journal of cellular physiology*. 2010;224:345-51.
52. Kunnumpurath S, Srinivasagopalan R, Vadivelu N. Spinal cord stimulation: principles of past, present and future practice: a review. *J Clin Monit Comput*. 2009;23:333-9.
53. Woodbury CJ, Kullmann FA, McIlwrath SL, Koerber HR. Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *The Journal of comparative neurology*. 2008;508:500-9.
54. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempner P, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care*. 33:2285-93.
55. Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2010;17:1113-e88.
56. Wang MJ, Wang WX. Temperature-dependent sensitivity of a marine diatom to cadmium stress explained by subcellular distribution and thiol synthesis. *Environmental science & technology*. 2008;42:8603-8.
57. Leston JM. [Functional anatomy of the trigeminal nerve]. *Neuro-Chirurgie*. 2009;55:99-112.
58. Dessem D, Luo P. Jaw-muscle spindle afferent feedback to the cervical spinal cord in the rat. *Experimental brain research*. 1999;128:451-9.
59. Sankaran P.K., Sivanandan R, J. S. Histomorphometric study of neurons in the trigeminal ganglia in male wistar albino rats. *Recent Research in Science and Technology*. 2012;4:28-31.

60. Takayama S, Osawa M, Takahashi Y, Iwamoto Y. Painful neuropathy with trigeminal nerve involvement in type 2 diabetes. *The Journal of international medical research*. 2006;34:115-8.
61. Chen J, Zhang GC, Zhang SY, Wang MJ. [Response processes of *Aralia elata* photosynthesis and transpiration to light and soil moisture]. *Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology / Zhongguo sheng tai xue xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban*. 2008;19:1185-90.
62. Sabalys G, Juodzbaly G, Wang HL. Aetiology and pathogenesis of trigeminal neuralgia: a comprehensive review. *Journal of oral & maxillofacial research*. 2013;3:e2.
63. Viana M, Tassorelli C, Allena M, Nappi G, Sjaastad O, Antonaci F. Diagnostic and therapeutic errors in trigeminal autonomic cephalalgias and hemicrania continua: a systematic review. *The journal of headache and pain*. 2013;14:14.
64. Urban PP, Forst T, Lenfers M, Koehler J, Connemann BJ, Beyer J. Incidence of subclinical trigeminal and facial nerve involvement in diabetes mellitus. *Electromyography and clinical neurophysiology*. 1999;39:267-72.
65. Tyan MR, Bokach NA, Wang MJ, Haukka M, Kuznetsov ML, Kukushkin VY. Facile cyanamide-ammonia coupling mediated by cis- and trans-[PtIII<sub>2</sub>] centers and giving metal-bound guanidines. *Dalton Trans*. 2008;5178-88.
66. Low PA, Lagerlund TD, McManis PG. Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic, and ischemic neuropathy. *International review of neurobiology*. 1989;31:355-438.
67. 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. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65:722-32.
68. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2002;51:819-24.
69. Pawson EJ, Duran-Jimenez B, Surosky R, Brooke HE, Spratt SK, Tomlinson DR, et al. Engineered zinc finger protein-mediated VEGF-a activation restores deficient VEGF-a in sensory neurons in experimental diabetes. *Diabetes*. 59:509-18.
70. Price TJ, Flores CM. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8:263-72.



71. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews. Neuroscience*. 2012;13:169-82.
72. Carlton SM. Localization of CaMKIIalpha in rat primary sensory neurons: increase in inflammation. *Brain research*. 2002;947:252-9.
73. Hoelz A, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *Molecular cell*. 2003;11:1241-51.
74. Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain research bulletin*. 2011;85:2-8.
75. Colbran RJ, Brown AM. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*. 2004;14:318-27.
76. 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. *Journal of Comparative Neurology*. 2002;448:102-10.
77. Price TJ, Jeske NA, Flores CM, Hargreaves KM. Pharmacological interactions between calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha and TRPV1 receptors in rat trigeminal sensory neurons. *Neuroscience letters*. 2005;389:94-8.
78. Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature reviews. Neuroscience*. 2008;9:813-25.
79. Shonesy BC, Jalan-Sakrikar N, Cavener VS, Colbran RJ. CaMKII: A Molecular Substrate for Synaptic Plasticity and Memory. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014;122:61-87.
80. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews. Neuroscience*. 2002;3:175-90.
81. 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. *Neurobiology of learning and memory*. 1995;64:257-64.
82. Tan SE, Liang KC. Inhibitory avoidance learning alters the amygdala calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain research*. 1997;748:227-33.
83. Tan SE, Liang KC. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain research*. 1996;711:234-40.

84. Gustin RM, Shonesy BC, Robinson SL, Rentz TJ, Baucum AJ, 2nd, Jalan-Sakrikar N, et al. Loss of Thr286 phosphorylation disrupts synaptic CaMKIIalpha targeting, NMDAR activity and behavior in pre-adolescent mice. *Molecular and cellular neurosciences*. 2011;47:286-92.
85. Liao MH, Xiang YC, Huang JY, Tao RR, Tian Y, Ye WF, et al. The disturbance of hippocampal CaMKII/PKA/PKC phosphorylation in early experimental diabetes mellitus. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19:329-36.
86. Burgoyne RD. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nature reviews. Neuroscience*. 2007;8:182-93.
87. Morris EP, Torok K. Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of molecular biology*. 2001;308:1-8.
88. Liang R, Liu X, Wei L, Wang W, Zheng P, Yan X, et al. The modulation of the excitability of primary sensory neurons by Ca<sup>2+</sup>(+)-CaM-CaMKII pathway. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2012;33:1083-93.
89. Kojundzic SL, Puljak L, Hogan Q, Sapunar D. Depression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons after spinal nerve ligation. *The Journal of comparative neurology*. 2010;518:64-74.
90. 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;153:710-21.
91. 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 research. Molecular brain research*. 2000;85:239-50.
92. 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. *Molecular pain*. 2009;5:22.
93. 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. *European journal of pharmacology*. 2010;647:75-83.
94. 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;106:8725-30.

95. Ichikawa H, Gouty S, Regalia J, Helke CJ, Sugimoto T. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the rat cranial sensory ganglia. *Brain research*. 2004;1005:36-43.
96. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Kurir TT, Novak A, Vrdoljak L, et al. Expression of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Pain-Related Behavior in Rat Models of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Anesth Analg*. 2013;116:712-21.
97. Ferhatovic L, Jelacic Kadic A, Boric M, Puljak L. Changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in dorsal root ganglia during maturation in long-term diabetes. *Histology and histopathology*. 2014;29:649-58.
98. 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;27:3305-16.
99. Lisman J. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358:829-42.
100. Lai J, Porreca F, Hunter JC, Gold MS. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:371-97.
101. Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol*. 2004;61:55-71.
102. Xu J, Kang N, Jiang L, Nedergaard M, Kang J. Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25:1750-60.
103. Smith MR, Nelson AB, Du Lac S. Regulation of firing response gain by calcium-dependent mechanisms in vestibular nucleus neurons. *Journal of neurophysiology*. 2002;87:2031-42.
104. Young KA, Caldwell JH. Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *The Journal of physiology*. 2005;565:349-70.
105. Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AA, et al. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 2002;415:442-7.
106. 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 research. Molecular brain research*. 2000;85:239-50.
107. Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, Min KT, Kennedy MB. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-independent protein kinase II in the NR2B subunit

of the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:31670-8.

108. Yakel JL, Vissavajhala P, Derkach VA, Brickey DA, Soderling TR. Identification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:1376-80.

109. Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neuroscience letters*. 1995;197:25-8.

110. Jones TL, Lustig AC, Sorkin LS. Secondary hyperalgesia in the postoperative pain model is dependent on spinal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha activation. *Anesth Analg*. 2007;105:1650-6, table of contents.

111. Flake NM, Gold MS. Inflammation alters sodium currents and excitability of temporomandibular joint afferents. *Neuroscience letters*. 2005;384:294-9.

112. Fields RD, Lee PR, Cohen JE. Temporal integration of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling networks in regulating gene expression by action potentials. *Cell Calcium*. 2005;37:433-42.

113. Lu SG, Gold MS. Inflammation-induced increase in evoked calcium transients in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 2008;153:279-88.

114. Fuchs A, Lirk P, Stucky C, Abram SE, Hogan QH. Painful nerve injury decreases resting cytosolic calcium concentrations in sensory neurons of rats. *Anesthesiology*. 2005;102:1217-25.

115. Fuchs A, Rigaud M, Hogan QH. Painful nerve injury shortens the intracellular Ca<sup>2+</sup> signal in axotomized sensory neurons of rats. *Anesthesiology*. 2007;107:106-16.

116. Gold MS. Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain*. 2000;84:117-20.

117. Ferrari LF, Bogen O, Levine JD. Role of nociceptor alphaCaMKII in transition from acute to chronic pain (hyperalgesic priming) in male and female rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33:11002-11.

118. Huang TJ, Sayers NM, Fernyhough P, Verkhatsky A. Diabetes-induced alterations in calcium homeostasis in sensory neurones of streptozotocin-diabetic rats are restricted to lumbar ganglia and are prevented by neurotrophin-3. *Diabetologia*. 2002;45:560-70.

119. Hall KE, Sima AA, Wiley JW. Voltage-dependent calcium currents are enhanced in dorsal root ganglion neurones from the Bio Bred/Worcester diabetic rat. *The Journal of physiology*. 1995;486 ( Pt 2):313-22.

120. 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;114:1460-75.
121. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA. Diabetic neuropathy--a continuing enigma. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2000;16:408-33.
122. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013;502:372-6.
123. 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;79:1995-2000.
124. 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;52:1103-11.
125. Kim YH, Kim YS, Park SY, Park CH, Choi WS, Cho GJ. CaMKII regulates pericyte loss in the retina of early diabetic mouse. *Molecules and cells*. 2011;31:289-93.
126. Dixit SS, Wang T, Manzano EJ, Yoo S, Lee J, Chiang DY, et al. Effects of CaMKII-mediated phosphorylation of ryanodine receptor type 2 on islet calcium handling, insulin secretion, and glucose tolerance. *PLoS one*. 2013;8:e58655.
127. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic 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*. 2013;115:496-504.
128. Boric M, Jelacic Kadic A, Puljak L. The expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the dorsal horns of rats with type 1 and type 2 diabetes. *Neuroscience letters*. 2014;579:151-6.
129. Boric M, Kadic AJ, Ferhatovic L, Sapunar D, Puljak L. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal horn neurons in long-term diabetes. *Neuroreport*. 2013;24:992-6.
130. Boric M, Jelacic Kadic A, Ferhatovic L, Sapunar D, Puljak L. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal horn neurons in long-term diabetes. *Neuroreport*. 2013;In press:
131. Jelacic Kadic A, Boric M, Ferhatovic L, Banozic A, Sapunar D, Puljak L. Intrathecal inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in diabetic neuropathy adversely affects pain-related behavior. *Neuroscience letters*. 2013;554:126-30.

132. Pradhan Nabzdyk L, Kuchibhotla S, Guthrie P, Chun M, Auster ME, Nabzdyk C, et al. Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *Journal of vascular surgery*. 2013;58:766-75 e12.
133. Skundric DS, Lisak RP. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. *Experimental diabetes research*. 2003;4:303-12.
134. Carmeliet P, Storkebaum E. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13:39-53.
135. Batbayar B, Zelles T, Ver A, Feher E. Plasticity of the different neuropeptide-containing nerve fibres in the tongue of the diabetic rat. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2004;9:215-23.
136. Troger J, Humpel C, Kremser B, Kralinger M, Teuchner B, Kunze C, et al. The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in the rat trigeminal ganglion. *Brain research*. 1999;842:84-91.
137. Apfel SC. Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. *Eur Neurol*. 1999;41:27-34.
138. Gyorfı A, Fazekas A, Feher E, Ender F, Rosivall L. Effects of streptozotocin-induced diabetes on neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in rat. *Journal of periodontal research*. 1996;31:249-55.
139. LaCroix-Fralish ML, Austin JS, Zheng FY, Levitin DJ, Mogil JS. Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain. *Pain*. 2011;152:1888-98.
140. Wan CP, Lau BH. Neuropeptide Y receptor subtypes. *Life sciences*. 1995;56:1055-64.
141. Benoliel R, Eliav E, Iadarola MJ. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? *Pain*. 2001;91:111-21.
142. Mantyh PW, Allen CJ, Rogers S, DeMaster E, Ghilardi JR, Mosconi T, et al. Some sensory neurons express neuropeptide Y receptors: potential paracrine inhibition of primary afferent nociceptors following peripheral nerve injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14:3958-68.
143. Zhang X, Ji RR, Arvidsson J, Lundberg JM, Bartfai T, Bedecs K, et al. Expression of peptides, nitric oxide synthase and NPY receptor in trigeminal and nodose ganglia after nerve lesions. *Experimental brain research*. 1996;111:393-404.

144. Brumovsky P, Shi TS, Landry M, Villar MJ, Hokfelt T. Neuropeptide tyrosine and pain. *Trends in pharmacological sciences*. 2007;28:93-102.
145. Wakisaka S, Kajander KC, Bennett GJ. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neuroscience letters*. 1991;124:200-3.
146. Zhang X, Meister B, Elde R, Verge VM, Hokfelt T. Large calibre primary afferent neurons projecting to the gracile nucleus express neuropeptide Y after sciatic nerve lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study in rats. *The European journal of neuroscience*. 1993;5:1510-9.
147. Lin CT, Tsai YJ, Chen SH, Wang HY, Lin LH, Lue JH. Early expression of injury-induced neuropeptide Y in primary sensory neurons and the cuneate nucleus in diabetic rats with median nerve transection. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2010;40:102-11.
148. Munglani R, Hudspith MJ, Hunt SP. The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, anxiolytic and antihypertensive. *Drugs*. 1996;52:371-89.
149. Wakisaka S, Youn SH, Maeda T, Kurisu K. Neuropeptide Y-like immunoreactive primary afferents in the periodontal tissues following dental injury in the rat. *Regulatory peptides*. 1996;63:163-9.
150. Damico JP, Ervolino E, Torres KR, Sabino Batagello D, Cruz-Rizzolo RJ, Aparecido Casatti C, et al. Phenotypic alterations of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide-containing neurons innervating the rat temporomandibular joint during carrageenan-induced arthritis. *European journal of histochemistry : EJH*. 2012;56:e31.
151. Kostic S, Puljak L, Sapunar D. Attenuation of pain-related behaviour evoked by carrageenan injection through blockade of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors. *Eur J Pain*. 2013;17:493-504.
152. Smith PA, Moran TD, Abdulla F, Tumber KK, Taylor BK. Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides*. 2007;28:464-74.
153. Brumovsky PR, Bergman E, Liu HX, Hokfelt T, Villar MJ. Effect of a graded single constriction of the rat sciatic nerve on pain behavior and expression of immunoreactive NPY and NPY Y1 receptor in DRG neurons and spinal cord. *Brain research*. 2004;1006:87-99.
154. Brumovsky P, Stanic D, Shuster S, Herzog H, Villar M, Hokfelt T. Neuropeptide Y2 receptor protein is present in peptidergic and nonpeptidergic primary sensory neurons of the mouse. *The Journal of comparative neurology*. 2005;489:328-48.
155. Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Nasu M, Kadoi J, Shima Y, et al. Temporomandibular joint inflammation potentiates the excitability of trigeminal root

ganglion neurons innervating the facial skin in rats. *Journal of neurophysiology*. 2005;93:2723-38.

156. Abdulla FA, Smith PA. Neuropeptide Y actions and the distribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> conductance in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of the autonomic nervous system*. 1999;78:24-9.

157. Mellado ML, Gibert-Rahola J, Chover AJ, Mico JA. Effect on nociception of intracerebroventricular administration of low doses of neuropeptide Y in mice. *Life sciences*. 1996;58:2409-14.

158. White DM. Intrathecal neuropeptide Y exacerbates nerve injury-induced mechanical hyperalgesia. *Brain research*. 1997;750:141-6.

159. Zhang X, Xu ZQ, Bao L, Dagerlind A, Hokfelt T. Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *Journal of Neuroscience*. 1995;15:2733-47.

160. Hokfelt T, Brumovsky P, Shi T, Pedrazzini T, Villar M. NPY and pain as seen from the histochemical side. *Peptides*. 2007;28:365-72.

161. Skarstrand H, Dahlin LB, Lernmark A, Vaziri-Sani F. Neuropeptide Y autoantibodies in patients with long-term type 1 and type 2 diabetes and neuropathy. *Journal of diabetes and its complications*. 2013;27:609-17.

162. Matyal R, Mahmood F, Robich M, Glazer H, Khabbaz K, Hess P, et al. Chronic type II diabetes mellitus leads to changes in neuropeptide Y receptor expression and distribution in human myocardial tissue. *European journal of pharmacology*. 2011;665:19-28.

163. Chandrasekharan B, Nezami BG, Srinivasan S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 2013;304:G949-57.

164. Burnand RC, Price SA, McElhaney M, Barker D, Tomlinson DR. Expression of axotomy-inducible and apoptosis-related genes in sensory nerves of rats with experimental diabetes. *Brain research. Molecular brain research*. 2004;132:235-40.

165. Chottova Dvorakova M, Wiegand S, Pesta M, Slavikova J, Grau V, Reischig J, et al. Expression of neuropeptide Y and its receptors Y1 and Y2 in the rat heart and its supplying autonomic and spinal sensory ganglia in experimentally induced diabetes. *Neuroscience*. 2008;151:1016-28.

166. Pronto-Laborinho AC, Pinto S, de Carvalho M. Roles of vascular endothelial growth factor in amyotrophic lateral sclerosis. *BioMed research international*. 2014;2014:947513.



167. Quattrini C, Jeziorska M, Boulton AJ, Malik RA. Reduced vascular endothelial growth factor expression and intra-epidermal nerve fiber loss in human diabetic neuropathy. *Diabetes care*. 2008;31:140-5.
168. Natsume T, Iwatsuki K, Nishizuka T, Arai T, Yamamoto M, Hirata H. Prostaglandin E1 alleviates neuropathic pain and neural dysfunction from entrapment neuropathy associated with diabetes mellitus. *Microsurgery*. 2014;34:568-75.
169. Carmeliet P, Ruiz de Almodovar C. VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70:1763-78.
170. Beazley-Long N, Hua J, Jehle T, Hulse RP, Dersch R, Lehrling C, et al. VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *The American journal of pathology*. 2013;183:918-29.
171. Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, Buttler A, Reisser C, et al. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999;79:1573-82.
172. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiological reviews*. 2009;89:607-48.
173. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2004;26:943-54.
174. Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, et al. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107:1083-92.
175. McLaren AT, Marsden PA, Mazer CD, Baker AJ, Stewart DJ, Tsui AK, et al. Increased expression of HIF-1alpha, nNOS, and VEGF in the cerebral cortex of anemic rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292:R403-14.
176. Verheyen A, Peeraer E, Lambrechts D, Poesen K, Carmeliet P, Shibuya M, et al. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. *Neuroscience*. 2013;244:77-89.
177. Nowacka M, Obuchowicz E. BDNF and VEGF in the pathogenesis of stress-induced affective diseases: an insight from experimental studies. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65:535-46.

178. Newton SS, Fournier NM, Duman RS. Vascular growth factors in neuropsychiatry. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70:1739-52.
179. Tang ZY, Shu B, Cui XJ, Zhou CJ, Shi Q, Holz J, et al. Changes of cervical dorsal root ganglia induced by compression injury and decompression procedure: a novel rat model of cervical radiculoneuropathy. *Journal of neurotrauma*. 2009;26:289-95.
180. Verheyen A, Peeraer E, Nuydens R, Dhondt J, Poesen K, Pintelon I, et al. Systemic anti-vascular endothelial growth factor therapies induce a painful sensory neuropathy. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135:2629-41.
181. Borsani E, Giovannozzi S, Cocchi MA, Boninsegna R, Rezzani R, Rodella LF. Endothelial nitric oxide synthase in dorsal root ganglia during chronic inflammatory nociception. *Cells Tissues Organs*. 197:159-68.
182. Liu S, Xu C, Li G, Liu H, Xie J, Tu G, et al. Vatalanib decrease the positive interaction of VEGF receptor-2 and P2X2/3 receptor in chronic constriction injury rats. *Neurochemistry international*. 60:565-72.
183. Taiana MM, Lombardi R, Porretta-Serapiglia C, Ciusani E, Oggioni N, Sassone J, et al. Neutralization of schwann cell-secreted VEGF is protective to in vitro and in vivo experimental diabetic neuropathy. *PloS one*. 9:e108403.
184. Vencappa S, Donaldson LF, Hulse RP. Cisplatin induced sensory neuropathy is prevented by vascular endothelial growth factor-A. *American journal of translational research*. 2015;7:1032-44.
185. Wang H, Wang Y, Li D, Liu Z, Zhao Z, Han D, et al. VEGF inhibits the inflammation in spinal cord injury through activation of autophagy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464:453-8.
186. Guaiquil VH, Pan Z, Karagianni N, Fukuoka S, Alegre G, Rosenblatt MI. VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:17272-7.
187. Dhondt J, Peeraer E, Verheyen A, Nuydens R, Buysschaert I, Poesen K, et al. Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25:1461-73.
188. Samii A, Unger J, Lange W. Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience letters*. 1999;262:159-62.

189. Kim BW, Choi M, Kim YS, Park H, Lee HR, Yun CO, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cellular signalling*. 2008;20:714-25.
190. 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;21:356-62.
191. De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science*. 1998;279:227-30.
192. 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;88:4756-60.
193. 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;698:130-6.
194. 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;52:313-20.
195. Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The metabolic fate and elimination of streptozotocin. *Biochemical Society transactions*. 1975;3:410-4.
196. 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;26:3299-308.
197. Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, et al. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *Journal of cell science*. 2008;121:2301-7.
198. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*. 2001;49:931-7.
199. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2003;52:165-71.
200. Sidenius P, Jakobsen J. Reduced perikaryal volume of lower motor and primary sensory neurons in early experimental diabetes. *Diabetes*. 1980;29:182-6.

201. Ramer LM, van Stolk AP, Inskip JA, Ramer MS, Krassioukov AV. Plasticity of TRPV1-Expressing Sensory Neurons Mediating Autonomic Dysreflexia Following Spinal Cord Injury. *Frontiers in physiology*. 2012;3:257.
202. Ramer MS, Bradbury EJ, McMahon SB. Nerve growth factor induces P2X(3) expression in sensory neurons. *Journal of neurochemistry*. 2001;77:864-75.
203. Ruscheweyh R, Forsthuber L, Schoffnegger D, Sandkuhler J. Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with A-beta-, A-delta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *The Journal of comparative neurology*. 2007;502:325-36.
204. 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;1:131-43.
205. 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 : JPNS*. 2004;9:62-9.
206. Hong SS, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:618-27.
207. Craner MJ, Klein JP, Black JA, Waxman SG. Preferential expression of IGF-I in small DRG neurons and down-regulation following injury. *Neuroreport*. 2002;13:1649-52.
208. Stucky CL, Lewin GR. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19:6497-505.
209. Stucky CL, Lewin GR. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19:6497-505.
210. Bhardwaj SK, Kaur G. Effect of diabetes on calcium/calmodulin dependent protein kinase-II from rat brain. *Neurochemistry international*. 1999;35:329-35.
211. Fink CC, Meyer T. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Current opinion in neurobiology*. 2002;12:293-9.
212. Huang D, Li S, Dhaka A, Story GM, Cao YQ. Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molecular pain*. 2012;8:66.

213. Lee J, Saloman JL, Weiland G, Auh QS, Chung MK, Ro JY. Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. *Pain*. 2012;153:1514-24.
214. Nair A, Simonetti M, Birsa N, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Giniatullin R, et al. Familial hemiplegic migraine Ca(v)2.1 channel mutation R192Q enhances ATP-gated P2X3 receptor activity of mouse sensory ganglion neurons mediating trigeminal pain. *Molecular pain*. 2010;6:48.
215. Dobretsov M, Romanovsky D, Stimers JR. Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13:175-91.
216. Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, et al. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIdelta(2)). *Atherosclerosis*. 2013;226:88-94.
217. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiology of disease*. 1999;6:347-63.
218. Joseph EK, Levine JD. Sexual dimorphism in the contribution of protein kinase C isoforms to nociception in the streptozotocin diabetic rat. *Neuroscience*. 2003;120:907-13.
219. 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;77:79-82.
220. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;6:CD007543.
221. Sima AA, 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;43:786-93.
222. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia*. 1999;42:773-88.
223. Thomas PK. A critical assessment of vascular factors in the causation of diabetic polyneuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1993;10 Suppl 2:62S-3S.

224. Tsai YJ, Lin CT, Lue JH. Characterization of the induced neuropeptide Y-like immunoreactivity in primary sensory neurons following complete median nerve transection. *Journal of neurotrauma*. 2007;24:1878-88.
225. Talbot K, Wang HY. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 10:S12-25.
226. Barabas ME, Mattson EC, Aboualizadeh E, Hirschmugl CJ, Stucky CL. Chemical structure and morphology of dorsal root ganglion neurons from naive and inflamed mice. *The Journal of biological chemistry*. 2014; DOI:10.1074/jbc.M114.570101.
227. Talbot K. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs. *Neurodegener Dis Manag*. 4:31-40.
228. Jeric M, Vuica A, Boric M, Puljak L, Jelicic Kadic A, Grkovic I, et al. Diabetes mellitus affects activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal ganglia. *Journal of chemical neuroanatomy*. 64-65C:12-9.

## 11. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: **Milka Jerić, dr.med.**

Adresa: Matoševa 59 b, 21 000 Split

Mobilni telefon: +385 98 9151609

E-pošta: milka.jeric@mefst.hr

Datum rođenja: 16. travnja 1987.

Državljanstvo: hrvatsko

Matični broj iz Upisnika znanstvenika: 340564

### Školovanje

2013. Poslijediplomski studij Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE), Medicinski fakultet u Splitu

2012. Položen stručni državni ispit

2005 – 2011. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split

2001 – 2005. I. gimnazija – klasični smjer, Split

### Radno iskustvo

Rujan 2013 - Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, asistentica za područje Biomedicine i zdravstva, polje Temeljne medicinske znanosti, grana Anatomija na Katedri za anatomiju

Siječanj-srpanj 2013. Croatia zdravstveno osiguranje  
dr. med. u liječničkoj službi zdravstvenog osiguranja

Studeni 2011/2012. Pripravnica Zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije

(staž – KBC Zagreb, KB Dubrava, KBC Sestre Milosrdnice, KB Sv. Duh, Psihijatrijska bolnica Vrapče, ZJZ SDŽ-Split)

### **Profesionalno usavršavanje**

1. „Nove spoznaje o dijabetesu “poslijediplomski tečaj TM II. kategorije, 20. ožujka 2015, Split, Hrvatska.
2. The 6th international symposium of clinical and applied anatomy, 26-29. lipnja 2014, Malinska, Hrvatska.
3. 6th Croatian Cochrane symposium, 6. lipnja 2014, Split, Hrvatska
4. Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific Conference, 29. svibnja – 1. lipnja 2014, Split, Hrvatska.
5. “Protect and publish” workshop, 28-29. svibnja 2014, Split, Hrvatska.
6. “Diabetes mellitus, other metabolic disorders and metabolic effects of wine”, 11-12. travnja 2014, Split, Hrvatska.
7. „Prošlost i sadašnjost prevencije prijevremenog rađanja u organizaciji KB Sveti Duh i Medicinskog fakulteta Sveučilista u Zagrebu “, 2013, Zagreb, Hrvatska.
8. „Nenormalna krvarenja iz maternice“ u organizaciji Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetrijku, srpanj, 2013, Zagreb, Hrvatska.
9. „XXVI. Perinatalni dani Ante Dražančić“, 23-25. studenoga 2012, Zagreb, Hrvatska.
10. Međunarodna razmjena studenata – Samara State Medical University, 2010., Samara, Rusija.
11. Međunarodna razmjena studenata – St. Istvan hospital Medical University, 2009, Budimpešta, Mađarska.
12. Članica CroMSIC-a (Croatian Medical Students' International Committee), 2007 - 2011.

### **Strani jezici**

Engleski - C1

Talijanski - A2





## Publikacije

1. **Jerić M**, Vuica A, Borić M, Puljak L, Jeličić Kadić A, Grković I, Filipović N. Diabetes mellitus affects activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in rat trigeminal ganglia. *J Chem Neuroanat.* 2015; 64-65:12-19.
2. Vuica A, Hamzić LF, Vukojević K, **Jerić M**, Puljak L, Grković I, Filipović N. Ageing and a long-term diabetes mellitus increase expression of 1  $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptors in the rat liver. *Exp Gerontol.* 2015; 167-176.
3. Filipovic N, Vrdoljak M, Vuica A, **Jeric M**, Jelacic Kadic A, Utrobicic T, Masek T, Grkovic I. Expression of PTHrP and PTH/PTHrP receptor 1 in the superior cervical ganglia of rats. *Neuropeptides.* 2014; 48: 353-359.
4. **Jerić M**, Roje D, Medić N, Strinić T, Meštrović Z, Vulić M. Maternal pre-pregnancy underweight and fetal growth in relation to Institute of medicine recommendations for gestational weight gain. *Early Human Development*, 2013; 89: 277-281.
5. Medić N, Roje D, **Jerić M**, Low A, Meštrović Z, Vulić M. Porodaj hipotrofične novorođenčadi u Splitskom rodilištu. *Gynecologia et Perinatologia, Gynecol perinatol*, 2012; 21 :45-49.

## Sažetci i prezentacije na znanstvenim skupovima:

1. **Jerić M**, Roje D, Medić N, Strinić T, Meštrović Z, Vulić M. Maternal pre-pregnancy underweight and fetal growth in relation to Institute of medicine recommendations for gestational weight gain. Oral presentation. XXVI. Perinatalni dani Ante Dražančić. November 23-25, 2012. Zagreb, Croatia.
2. **Jerić M**, Roje D, Medić N, Strinić T, Meštrović Z, Vulić M. Maternal pre-pregnancy underweight and fetal growth in relation to Institute of medicine recommendations for gestational weight gain. Oral presentation. XXIV. European Congress of Perinatal medicine. June 4-7, 2014. Florence, Italy.
3. Grkovic I, Jelacic Kadic A, **Jeric M**, Vuica AS, Filipovic N. Different components of the final grade in anatomy; how do they compare with subjective pre-exam evaluation of student performance. Oral presentation. The 6th international symposium of clinical and applied anatomy. June 26-29, 2014. Malinska, Croatia.
4. Filipovic N, Vrdoljak M, Vuica A, **Jeric M**, Jelacic Kadic A, Utrobicic T, Masek T, Grkovic I. Expression of PTHrP and PTH/PTHrP receptor 1 in the superior cervical

ganglia of rats. Poster presentation. The 6th international symposium of clinical and applied anatomy. June 26-29, 2014. Malinska, Croatia.

5. **Jerić M**, Vuica A, Borić M, Puljak L, Jeličić Kadić A, Grković I, Filipović N. Changes of VEGF and NPY expression in rat trigeminal ganglion induced by diabetes. Oral presentation. Science 10<sup>th</sup> Annual Scientific Conference, RECOOPHST Association, 2015, Wrocław.
6. Vuica A, Hamzić LF, Vukojević K, **Jerić M**, Puljak L, Grković I, Filipović N. Ageing and a long-term diabetes mellitus increase expression of 1  $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptors in the rat liver. MCM 2015, Eger, Hungary.

### **Nagrade i priznanja**

2005 – 2011. Stipendija Republike Hrvatske za akademsku izvrsnost (top 10 % najboljih redovnih studenata).