

# Uloga upale u neuropatskoj boli izazvanoj podvezivanjem spinalnog živca u štakora

---

Znaor, Ljubo

Doctoral thesis / Disertacija

2007

*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:171:445667>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu**

**Medicinski fakultet**

**Ljubo Znaor**

**ULOGA UPALE U NEUROPATSKOJ BOLI IZAZVANOJ**

**PODVEZIVANJEM SPINALNOG ŽIVCA U ŠTAKORA**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2007.**

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

Mentor rada: Prof. dr. sc. Damir Sapunar

## **Zahvale**

Posebno zahvaljujem mom mentoru Prof. dr. sc. Damiru Sapunaru na stručnoj i logističkoj podršci, te na neizmjernej strpljivosti i požrtvovnosti tijekom cijelog ovog istraživanja.

Zahvaljujem također kolegici dr. Sanji Lovrić na suradnji i nesebičnoj pomoći u provedbi ovog istraživanja.

Gospođi Asiji Miletić zahvaljujem na stručnoj pomoći pri izradi histoloških preparata.

Veliko hvala mojim roditeljima i dragoj noni na podršci i razumijevanju.

“Pain is a more terrible lord of mankind than even death himself“

„Bol je strašnji vladar ljudskog roda nego li je to i sama smrt“

Albert Schweitzer

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA .....	1
1. UVOD.....	2
1.1. Neuropatska bol.....	2
1.2. Eksperimentalni modeli neuropatske boli.....	3
1.3. Teorije nastanka neuropatske boli .....	5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Pokusne životinje.....	11
3.2. Podvezivanje spinalnog živca .....	11
3.3. Ispitivanje ponašanja.....	13
3.4. Histološke metode .....	13
3.5. Imunohistokemijske metode .....	15
3.6. Procjena upale i analiza broja upalnih stanica .....	17
3.7. Statističke metode.....	18
3.7.1. Statistička snaga.....	19
4. REZULTATI.....	21
4.1. Rezultati ispitivanja ponašanja .....	21
4.2. Rezultati mjerenja upalne reakcije .....	26
5. RASPRAVA .....	35
5.1. Ispitivanje ponašanja.....	35
5.2. Prepoznavanje reaktivne podgrupe životinja .....	36
5.3. Razlika u upalnoj reakciji.....	38

6. ZAKLJUČCI.....	43
7. SAŽETAK .....	45
8. SUMMARY .....	47
9. LITERATURA.....	49
10. ŽIVOTOPIS .....	58

## POPIS KRATICA

ATP	adenozin trifosfat (eng. adenosine triphosphate)
CCI	kronična konstriksijska ozljeda (eng. chronic constriction injury)
DAB	diaminobenzidin
eng.	engleski
GFAP	kiseli glijalni fibrilarni protein (eng. glial fibrillary acid protein)
IL	interleukin
LIF	(eng. leukemia inhibitory factor)
MCP-1	(eng. monocyte chemoattractant protein-1)
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex)
NALC	limfno tkivo povezano sa živcem (eng. nerve associated lymphoid tissue)
NO	dušikov monoksid
PBS	fosfatna puferska otopina (eng. phosphate buffered saline)
PGE2	prostaglandin E2
PO	preoperativno testiranje
PSL	parcijalno podvezivanje ishijadikusa (eng. partial sciatic ligation)
SNL	podvezivanje spinalnog živca (eng. spinal nerve ligation)
sur.	suradnici
TNF	faktor tumorske nekroze (eng. tumor necrosis factor)

# 1. UVOD

## 1.1. *Neuropatska bol*

Neuropatska bol je kompleksno kronično bolno stanje koje je uzrokovano oštećenjem perifernog ili centralnog živčanog sustava (1). Ona zahvaća približno 1/6 stanovništva diljem svijeta (2). Oštećenje neurona u velikom broju slučajeva dovodi do pojave neuropatske boli koja se manifestira povećanom osjetljivošću na bolni podražaj (hiperalgezija), spontanom boli i osjetljivošću na one podražaje koji u normalnim okolnostima ne izazivaju bol (alodinija) (3). Iako u mnogim slučajevima izgleda da je uzrok neuropatske boli nepoznat, najčešće se radi o oštećenju živca uzrokovanog traumom, alkoholizamom, raznim intoksikacijama, metaboličkim bolestima, ishemijom, infekcijama, tumorima, distrofijama i degeneracijama. Pacijenti neuropatsku bol opisuju kao različite kombinacije stalnog žarenja, bockanja i manje ili više jakih električnih pražnjenja, a što je značajno različit osjećaj u odnosu na „običnu“ akutnu bol. Varijabilnost kliničke manifestacije neuropatske boli ovisi o tipu bolesti koja je uzrokuje što sugerira različite mehanizme njenog razvoja. Razlika u osjećaju boli postoji jer su u akutnoj boli podražena isključivo vlakna za bol, dok u neuropatskoj boli dolazi do istovremene aktivacije nociceptivnih i osjetilnih živčanih vlakana koja inerviraju isto područje. Boivie i suradnici su prije 20-tak godina došli do zaključka da je oštećenje nociceptivnih živčanih putova neophodan preduvjet za nastanak neuropatske boli što do danas nije bilo opovrgnuto (4).

Prema patofiziološkom mehanizmu nastanka razlikuju se tri grupe neuropatske boli (5). Prva je deafferencijska bol koja nastaje zbog presijecanja perifernih ili



centralnih nociceptivnih vlakana, zatim periferna neuropatska bol koja je uzrokovana ozljedom perifernih živaca koji potiču nociceptivne impulse efaptičkim provođenjem (kratki spoj između demijeliniziranih vlakana), i na koncu neuropatska bol potaknuta simpatičkom aktivnošću (5).

## **1.2. Eksperimentalni modeli neuropatske boli**

Patofiziološki mehanizmi koji dovode do razvoja neuropatske boli, nažalost, su uvelike nepoznati. Za relativno spor napredak u istraživanjima te vrste boli dijelom je bio odgovoran nedostatak životinjskog eksperimentalnog modela koji bi imitirao simptomatologiju prisutnu u bolesnika s neuropatskom boli.

Posljednjih godina razvijeno je nekoliko eksperimentalnih modela koji repliciraju patofiziološke promjene u pacijenata s neuropatskom boli (6-10). Kvaliteta tih modela je da se međusobno bitno razlikuju glede simptomatologije koju izazivaju, te na taj način mogu predstavljati različite skupine neuropatskih pacijenata (11). Veliki korak u istraživanju neuropatske boli je napravljen otkrićem da labavo podvezivanje ishijadičnog živca u štakora može izazvati ponašanje koje je slično onom u ljudi s neuropatskom boli (6). Taj model se naziva kroničnom konstriksijskom ozljedom (eng. chronic constriction injury – CCI). Osim tog modela, trenutno se u istraživanju neuropatske boli najčešće koriste tri druga modela, a to su: potpuno presijecanje perifernog živca (12), presijecanje dijela perifernog živca (eng. partial sciatic ligation – PSL) (7) i podvezivanje spinalnog živca (spinal nerve ligation – SNL) (8). Svi navedeni modeli se zbog dobro definiranog i za testiranje lako dostupnog inervacijskog područja temelje na ozljedi ishijadičnog živca ili njegovih

ogranaka. Jedini model među navedenim koji omogućuje jasno anatomske odvajanje ozlijeđenih i neozlijeđenih stanica spinalnog ganglija je Chungov SNL model podvezivanja spinalnog živca (8). U tom modelu sve stanice koje pripadaju L5 i L6 spinalnim ganglijima imaju prekinute aksone, no, značajni dio inervacije stražnjih šapa ostaje netaknut što omogućava postoperativno testiranje hiperalgezije. Kako ozljeda nije jedini mogući uzrok neuropatske boli, razvijeni su i drugi modeli. U svrhu istraživanja neuropatske boli uzrokovane upalom razvijeni su modeli u kojima se upala izaziva upotrebom Freundovog dodatka, ekstrakta alge (eng. carrageenan) ili kapsaicina (eng. capsaicin)(13, 14). Neuropatska bol se često javlja prilikom liječenja citostaticima zbog čega su razvijeni modeli neuropatske boli s primjenom paclitaxela i vincristina (15). Zatim je tu i dijabetička neuropatija kao jedan od najčešćih uzroka neuropatske boli današnjice. Primjenom streptozotocina u eksperimentalnih životinja se izaziva razvoj dijabetesa što ima za posljedicu razvoj neuropatije (16).

Istraživanje boli dodatno je otežano zbog inherentne prirode boli koja se definira kao neugodno osjetno, ali i emocionalno iskustvo (17). Iako je u eksperimentalnih životinja relativno lako dokazati hiperalgezijsku, problematichnije je dokazati kroničnu bol što je tipična značajka neuropatske boli na koju se tuže pacijenti u kliničkoj praksi. Denervacija šape u štakora zna dovesti do fenomena autotomije (iz grčkog auto = "samo" i tomija = "odvajanje", u prijevodu samo-sakaćenje) koju neki autori objašnjavaju kao znak prisutnosti kronične boli zbog koje životinja želi ukloniti bolni dio tijela, dok drugi pak drže da se ona događa iz još nepoznatih razloga (18). Kako istraživač može jedino spekulirati o tome što eksperimentalna životinja osjeća, potrebno je osloniti se na određene vrste ponašanja. Primjerice lizanje udova, nesiguran hod, poštedno kretanje i slični znakovi mogu ukazivati na osjet boli u životinja odnosno na pojavu hiperalgezije (17).

### **1.3. Teorije nastanka neuropatske boli**

U drugoj polovini 60-tih godina se javljaju prve teorije o nastanku neuropatske boli. Prva značajnija teorija je bila takozvana „Teorija nadziranog ulaza“ (eng. „Gate control“ prema kojoj osjet boli ovisi o količini aferentnih signala koji se prenose A $\alpha$ / $\beta$  i A $\delta$  vlaknima, te o eferentnim signalima iz viših centara koji završavaju u dorzalnog rogu kralježničke moždine (19). Nakon te teorije radikalni preokret u razumijevanju patofiziologije neuropatske boli je predstavljalo otkriće da nociceptivni neuroni nakon ozljede mijenjaju svoja neurokemijska i električna svojstva, što bi trebalo biti u direktnoj svezi s pojavom kronične boli (20).

Moderne teorije o mehanizmima nastanka neuropatske boli se uglavnom temelje na spoznaji da se veliki broj fenotipskih promjena i zbivanja nakon ozljede živaca događaju kako u perifernom tako i u centralnom živčanom sustavu. Jedan od mogućih uzroka tih promjena jest prekid aksona primarnih aferentnih neurona što dovodi do prekida dotoka neurotrofičkih signala koji dolaze retrogradnim transportom iz perifernih tkiva (21, 22). Također se vidjelo da posljedice traume mogu pokazivati i okolni neuroni koji nisu pretrpjeli direktno oštećenje (23). To se može objasniti činjenicom da se susjednim neuronima djelomično preklapaju terminalna područja što u slučaju ispada funkcije jednog neurona dovodi do kompenzacijskog širenja terminalnog područja susjednog neurona, a što može rezultirati njegovom povećanom osjetljivošću. Zabilježeno je, također, da posttraumatske promjene u senzoričkim neuronima prvog reda mogu inducirati određene promjene u postsinaptičkim neuronima u dorzalnog rogu kralježničke moždine (24). Osim te kompleksne mreže posttraumatskih interakcija, predispozicija za razvijanje neuropatske boli ovisi i o genetskoj varijabilnosti. Naime, dokazano je da postoji značajna razlika u

vjerojatnosti posttraumatskog razvoja neuropatske boli među genetski različitim sojevima eksperimentalnih životinja (25).

Mnoge današnje teorije o nastanku neuropatske boli se temelje na ideji ektopičnog izvora akcijskih potencijala. Taj izvor okidanja akcijskih potencijala može biti neurom, aksotomizirane stanice spinalnog ganglija, ali i neozlijeđene stanice susjednih ganglija (20). Pretpostavlja se da postoje dva temeljna uzroka nastanka ektopičnih izvora akcijskih potencijala, a to su mehaničko oštećenje živca te upalni proces u blizini živca. Ektopični izvor signala neovisno o izvoru dovodi do promjena u dorzalnom rogu kralježničke moždine (eng. central sensitization) što u konačnici rezultira neuropatskom boli (20). Pošto je poznato da taktilna kao i nociceptivna vlakna konvergiraju prema stanicama u dorzalnom rogu, jedna hipoteza mehanizma centralne sensitizacije se bazira na pretpostavci da ektopični impulsi iz nociceptivnih vlakana smanjuju prag podražljivosti u dorzalnom rogu što pojačava efekt signala koji dolazi putem taktilnih vlakana (2). No, iako je većina studija istraživala centralnu sensitizaciju na nivou dorzalnog roga to, dakako, ne isključuje mogućnost da se taj proces također ne može odvijati i na talamičkoj i/ili kortikalnoj razini odnosno perifernije u spinalnom gangliju.

Temeljni razlog zbog kojeg neozlijeđene stanice susjednih spinalnih ganglija mogu biti izvor ektopičnog okidanja je širenje upale iz područja oštećenog živca. Zbog toga izgleda da imunološki sustav ima golem značaj u genezi neuropatske boli (26). Svaka mehanička ozljeda živca u navedenim modelima uključuje upalu različitog intenziteta zbog velike količine ostatne tvari i enzima koji se oslobađaju nakon ozljede. Pored oslobađanja proinflammatory tvari kao rezultata mehaničke ozljede, upala može biti i rezultat infekcije ili nekroze okolnog tkiva koja prati kirurški zahvat tijekom eksperimentalnog postupka ozljede spinalnog živca (27).

Glavna zbivanja u akutnoj upalnoj reakciji uključuju: a) infiltraciju upalnim stanicama i njihovu aktivaciju (polimorfonuklearnih stanica u prvom razdoblju, a monocita i limfocita u fazi razvoja specifičnog imunskog odgovora), b) pokretanje biokemijskih proinflamatornih mehanizama, c) promjene žilne propusnosti (posredovane selektivnim molekulama) i d) promjene u histološkoj građi i funkciji tkiva.

Spinalni ganglij nije u potpunosti zaštićen krvno-moždanom barijerom, te je stoga u upalnoj reakciji pored aktivacije glija stanica moguća i infiltracija upalnih stanica iz krvi (28). Mnoga istraživanja u kojima se nastoji ispitati upalni odgovor na modelima neuropatske boli temelje se na razjašnjenju specifičnosti imunoloških reakcija u živčanom tkivu, te na interakciji živčanog i imunološkog sustava (29).

Ozljeda živca uzrokuje promjene koje se odražavaju ne samo na živčane nego i na okolne stanice s kojima su u uskoj sprezi. Veliki dio tih istraživanja usmjeren je prema otkrivanju utjecaja mikroglije na razvoj neuropatske boli (30-32). Stanice mikroglije dijelom predstavljaju makrofage središnjeg živčanog sustava i sudjeluju u brojnim imunološkim funkcijama. Aktivacija mikroglije je proces koji najvećim dijelom nastaje kao rezultat retrogradnog transporta proinflamatornih tvari duž aksona susjednih neozlijeđenih živčanih stanica (33). Značajno je da se nakon primjene SNL modela aktivacija mikroglije može dogoditi i na mjestu koje je poprilično daleko od mjesta ozljede (34, 35), pa tako i na kontralateralnoj strani (11, 36-38). Ipak, u nekim istraživanjima i pored očite aktivacije mikroglije nije ustanovljena njena povezanost s neuropatskim ponašanjem (39). Utvrđeno je da se neuropatsko ponašanje životinje vremenski pojavljuje puno prije aktivacije mikroglije stoga se taj proces ne može dovesti u izravnu vezu s razvojem neuropatske boli (39).

Druga skupina istraživanja uključuje promjene u ekspresiji proinflammatory tvari koje nastaju kao posljedica upalne reakcije nakon eksperimentalnog oštećenja živca. Upalne i ostale stanice oslobađaju tvari koje mogu utjecati na živčano tkivo. Već je poznato da nociceptori posjeduju veliki broj receptora za tvari poput različitih iona ( $K^+$  i  $H^+$ ) (40), amina (serotonin, histamin) (41), kinina (bradikinin) (42), prostaglandina ( $PGE_2$ ) (43), purina (ATP) (44), NO-a i brojnih citokina (interleukini, interferoni, faktori rasta i TNF) (45). Neke od navedenih tvari same po sebi mogu aktivirati primarna aferentna vlakna, izazvati depolarizaciju i posljedični akcijski potencijal, te time izazvati osjet boli. Ipak, većina ovih tvari djeluje neizravno mijenjajući fenotip osjetnih neurona. Dokazano je, da se na mjestu upalnog procesa oko mjesta ozljede živca oslobađaju citokini koji mogu potaknuti susjedne stanice na proizvodnju tvari koje izazivaju osjet boli (41, 46, 47). U slučaju presijecanja živčanih vlakana vidjelo se da Schwannove stanice izgubivši kontakt s propadajućim živčanim stanicama luče LIF (eng.-leukemia inhibitory factor) i MCP-1 (eng.-monocyte chemoattractant protein-1) koji na mjestu ozljede potiču infiltraciju makrofaga (48).

Što se tiče imunoloških mehanizama u centralnom živčanom sustavu, sve je više dokaza da oni također imaju značajnu ulogu u nastanku neuropatske boli (49). U slučaju aktivacije mikroglijalnih stanica, koje imaju funkciju makrofaga centralnog živčanog sustava, izlučuju se TNF,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , NO te prostaglandini (50-53). Neke od tvari koje se oslobađaju tijekom upalnog procesa mogu djelovati protuupalno i analgezijski, dok je u nekih izražena dualna priroda kao primjerice kod  $IL-1\beta$  koji može polučiti oba učinka (54, 55). Sve više studija također ukazuju da su, kako centralni, tako i periferni imunološki mehanizmi više povezani s indukcijom nego održavanjem neuropatske boli (56).

Središnji živčani sustav se smatra imunološki privilegiranim područjem, a spinalni ganglij zauzima specijalno mjesto jer nije u potpunosti zaštićen barijerom krv-mozak (28). Osim mikroglije u imunološkoj zaštiti spinalnog ganglija sudjeluju i bijele krvne stanice, te nakupine makrofaga i mastocita smještene u okolnom vezivnom tkivu ganglija koje nazivamo "limfno tkivo povezano sa živcem" (eng. Nerve Associated Lymphoid Tissue, NALC) (57). U prilog tome govori i dokaz prisutnosti stanica koje posjeduju MHC II molekule i limfocita T u spinalnom gangliju nakon presijecanja ishijadičnog ili spinalnog živca (36). Prisutnost leukocita nakon podvezivanja L5 spinalnog živca je dokazana čak i u leđnoj moždini (58).

O značenju upale svjedoči i činjenica da ozljeda motornih vlakana također može izazvati hiperalgeziju (59). U tom slučaju neozlijeđene stanice postaju izvor ektopičnog okidanja zbog upale koja se razvija nakon oštećenja motornih vlakana. Aktivnost neozlijeđenih stanica dokazana je i nakon presijecanja spinalnih živaca (60). Također, u CCI modelu različite vrste konaca upotrijebljene pri podvezivanju mogu izazvati različit intenzitet upale, a time i različitu razinu neuropatskih simptoma (61).

Zato upalni proces zasigurno ima značajnu ulogu u nastanku neuropatske boli. Ipak, odnos između upalne i mehaničke komponente ozljede živca u razvoju neuropatske boli nije poznat.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je dokazati da u patogenezi razvoja neuropatske boli nakon eksperimentalno izazvanog oštećenja živca (SNL model) upalna komponenta ima veće značenje od samog mehaničkog presijecanja aksona kao medija za širenje električnog impulsa, te odvajanja inerviranog područja od središnjeg živčanog sustava. Prema toj hipotezi životinje koje nakon eksperimentalnog podvezivanja i presijecanja spinalnog živca u punoj mjeri razviju neuropatske simptome imat će izraženiji upalni odgovor u području ozlijeđenih spinalnih ganglija od onih životinja koje su bile podvrgnute istoj eksperimentalnoj proceduri i koje nisu u punoj mjeri razvile neuropatsku simptomatologiju.



## **3. MATERIJALI I METODE**

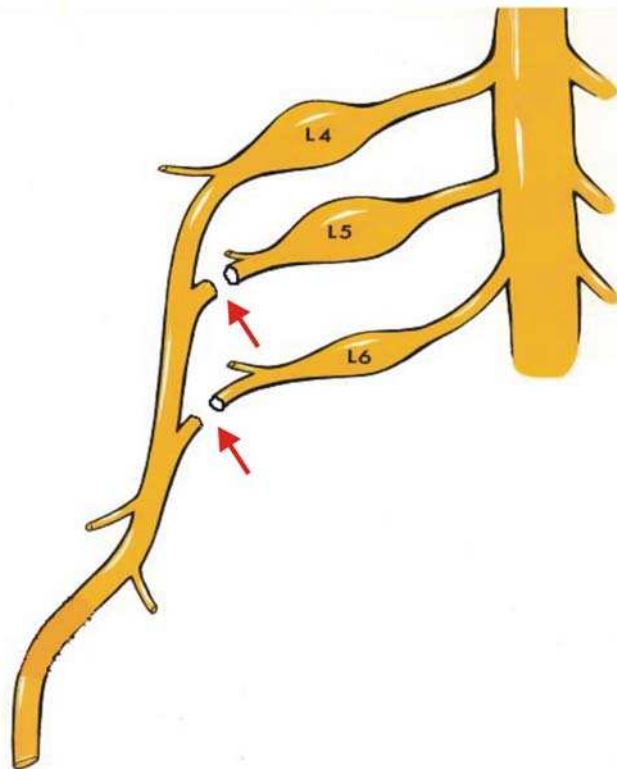
### **3.1. Pokusne životinje**

Pokusi su provedeni na štakorima soja Sprague-Dawley nabavljenim u Nastambi za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu. Sukladno rezultatima izračuna veličine uzorka (vidi poglavlje 3.7. Statističke metode) u radu je upotrijebljeno 96 štakora i to isključivo mužjaka težine od 150 do 250 g. Tijekom pokusa životinje su se čuvale u priručnoj nastambi za eksperimentalne životinje Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju. Bile su smještene u zasebnim kavezima standardnih veličina na temperaturi od 21-22 °C, te uz fiksne cikluse od 12 sati svijetla i 12 sati tame. Dijeta je sadržavala 23% proteina od kojih je oko 50% bilo porijeklom od soje. Životinje su bile podijeljene metodom slučajnog odabira u eksperimentalnu grupu od 46 štakora, lažnu pokusnu grupu od 22 štakora, te kontrolnu grupu od 28 štakora. Cijelo istraživanje je prethodno dobilo odobrenje od Etičke komisije Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

### **3.2. Podvezivanje spinalnog živca**

Svi kirurški zahvati su izvođeni pod dubokom anestezijom halotanom (5% za uvođenje u anesteziju i 2% za održavanje anestezije) u 100% kisiku. Podvezivanje spinalnog živca provodilo se u skladu s originalnim opisom metode autora Kima i

Chunga (8). Inicijalnom desnom paramedijalnom incizijom u lumbarnom predjelu prikazao bi se šesti lumbalni transverzalni nastavak. Nakon uklanjanja šestog transverzalnog nastavka prikažu se i izoliraju ventralni ogranci petog i šestog lumbalnog (L5 i L6) živca, koji se zatim podvežu svilenim koncem debljine 6-0. Nakon podvezivanja spinalni živci se presjeku distalno od ligature (Slika 1), te se zatvori kožni defekt metalnim spojnica.



**Slika 1.** Model podvezivanja spinalnog živca (eng. Spinal nerve ligation-SNL).  
Strelice označavaju mjesto podvezivanja i presijecanja L5 i L6 ventralnog ogranka spinalnog živca.

Lažna pokusna grupa je bila podvrgnuta identičnom kirurškim zahvatu, ali bez presijecanja živca. Kontrolne životinje su bile anestezirane, te im je napravljen samo rez na koži leđa kako bi se omogućilo slijepo testiranje ponašanja.

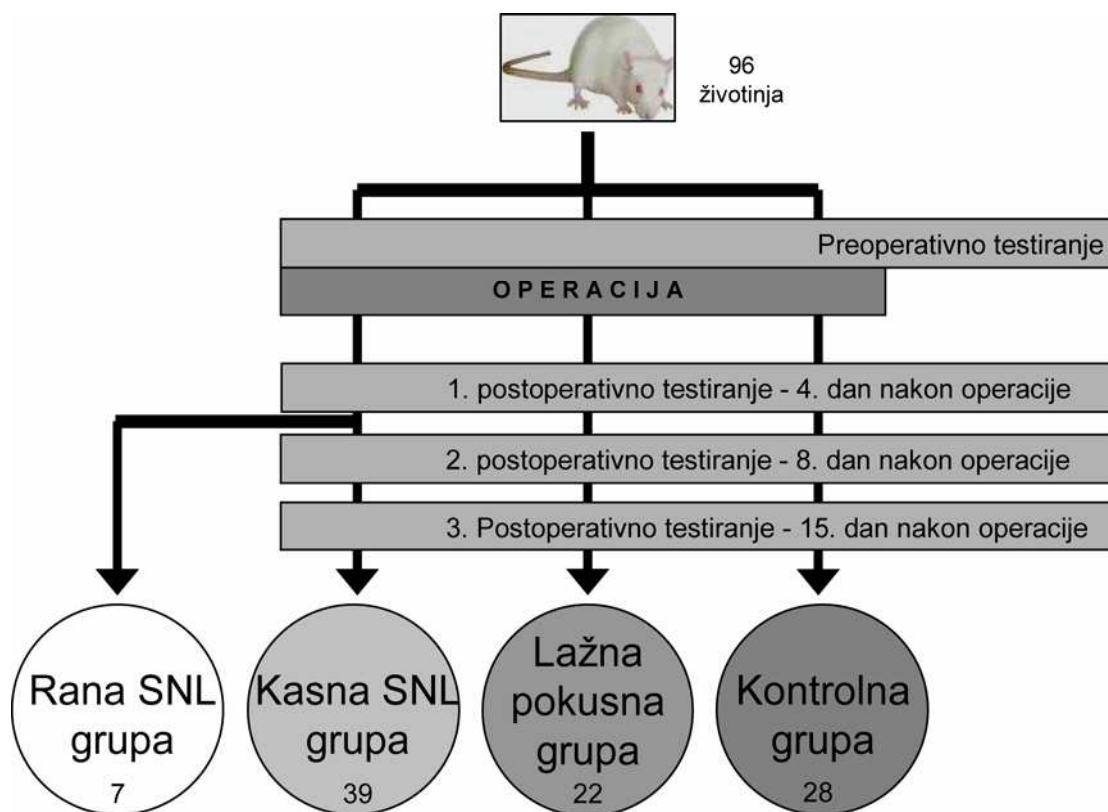
### **3.3. Ispitivanje ponašanja**

Životinje su se prethodno ostavljale u prostoriji za testiranje kroz 24 sata da bi se privikle na novu okolinu. Da bi se omogućio pristup plantarnoj površini šape u svrhu ispitivanja ponašanja, životinje su se stavljale u plastične kaveze veličine (10x25x30) cm postavljene na stolić čija je gornja ploha bila zamijenjena metalnom mrežom s otvorima veličine (3x3) mm. Testiranje se provodilo dan prije kirurškog zahvata, te četvrtog, osmog i petnaestog postoperativnog dana. Ponašanje se testiralo na obje stražnje šape u odgovarajućim intervalima (5 sekundi). Plantarne strane stražnje šape su se naizmjenično podražavale 15 puta iglom od 22 Gauge (silom koja je dovoljna da izazove ugibanje kože). Kao posljedica mehaničkog podražaja registrirao se hiperalgezijski tip reakcije kao glavni kriterij za potvrdu razvoja neuropatske boli u životinja. Pozitivnim hiperalgezijskim odgovorom smatralo se produljeno vrijeme uzmaca (više od 1 sekunde), lizanje šape i vokalizacija. Rezultat testiranja je bio izražen u vidu vjerojatnosti pozitivnog hiperalgezijskog odgovora na ozlijeđenoj strani.

### **3.4. Histološke metode**

Kako bi se omogućilo preuzimanje histološkog materijala, životinje su bile žrtvovane ubrizgavanjem prekomjerne doze anestetika u peritonealnu šupljinu. Dio životinja iz pokusne grupe (Kasna pokusna grupa - 39 štakora) je žrtvovano nakon provedenog ukupnog testiranja ponašanja, a ostatak (Rana pokusna grupa – 7 štakora)

nakon prvog postoperativnog testiranja, što nam je omogućilo uvid u kretanje broja upalnih stanica u dorzalnom gangliju u ranom poslijeoperacijskom razdoblju (Slika 2).



**Slika 2.** Plan istraživanja. Životinje su bile podijeljene metodom slučajnog odabira na tri glavne grupe (pokusna, lažna pokusna i kontrolna grupa). Zatim se provelo preoperativno ispitivanje ponašanja nakon čega su životinje bile operirane. Uslijedila su tri postoperativna testiranja (četvrtog, osmog i petnaestog postoperativnog dana). Sedam životinja iz eksperimentalne grupe su bile žrtvovane odmah nakon prvog testiranja što nam je dozvolilo uvid u kretanje broja upalnih stanica u dorzalnom gangliju u ranom poslijeoperacijskom razdoblju.

Za klasične histološke i imunohistokemijske metode bojenja cijeli ganglij se fiksirao u 4% paraformaldehidu tijekom 24 sata, a zatim se isprao u 0.1 M fosfatnom puferu. Nakon dehidracije u sve višim koncentracijama alkohola i ksilolu, materijal se uklapao u parafin na 56°C. Komadići tkiva uklopljeni u parafin su se zatim serijski izrezali na rezove debljine 4-6  $\mu\text{m}$  i prilijepili na silanizirana predmetna stakalca. Određeni broj histoloških rezova su se obojili hematoksilin-eozinom. Presjeci su se zatim pregledali svjetlosnim mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokio, Japan). Svaki deseti presjek pojedinog spinalnog ganglija je uzet za imunohistokemijsko bojanje.

### **3.5. Imunohistokemijske metode**

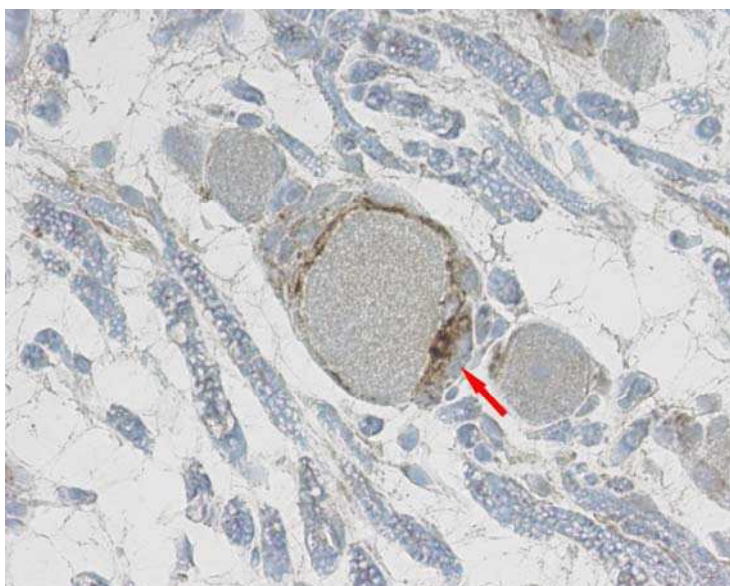
Histološki rezovi su se nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije kroz alkohole sve niže koncentracije kuhali u natrijevu citratu tijekom 10 min na oko 95°C. Naknadna inkubacija u 3%-tnom  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min na sobnoj temperaturi) inaktivirala je endogenu peroksidazu. Potom su se rezovi ispirali u otopini fosfatnog pufera (Phosphate buffered saline-PBS) i inkubirali s primarnim protutijelom u vlažnoj komori tijekom noći na +4 °C. Kako se spinalni ganglij nalazi na imunološki specifičnom mjestu u upalnom procesu osim satelitnih stanica sudjeluju i sistemske imunološke stanice koje migriraju iz krvotoka. Zbog toga su se upotrijebila mišja primarna protutijela za: a) kiseli glijalni fibrilarni protein (eng. glial fibrillary acidic protein, GFAP) koji je biljeg aktiviranih astrocita i satelitskih stanica (62), b) CR3 (OX-42) antigen prisutan u aktiviranim stanicama mikroglije i monocita/makrofaga

(63), c) receptor T stanica koji je prisutan na 97% štakorskih T limfocita (64). GFAP primarno protutijelo se koristilo u razrjeđenju od 1:1000, OX-42 u razrjeđenju od 1:100 te Pan-T u razrjeđenju od 1:1000 (sva antitijela istog proizvođača Chemicon International, Inc Temecula, CA, USA). U procesu bojenja dijela preparata bio je izostavljen korak inkubacije s primarnim protutijelom, a ti su preparati bili inkubirani u vlažnoj komori tijekom noći na +4°C s čistim PBS-om kako bi se dobila negativna kontrola. Prisutnost citokina se nije analizirala pod pretpostavkom da je njihova prisutnost uglavnom posljedica infiltracije upalnih stanica, te da bez njih nije ni moguće značajnije nakupljanje citokina. Nakon ispiranja u PBS-u rezovi su se inkubirali sa sekundarnim protutijelom, tj. sa sustavom za sekundarnu detekciju (Calbiochem, EMD Biosciences Inc, San Diego, CA, USA) u vlažnoj komori tijekom 60 min na sobnoj temperaturi. Tako tretirani rezovi su se zatim ispirali u PBS-u, te inkubirali 30 min s kompleksom avidin-biotin-peroksidaza te su se naknadno obojili s 0.05% diaminobenzidinom (DAB) tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon završnog ispiranja u destiliranoj vodi, preparati su se bojili hematoksilinom, te prekrili pokrovnim stakalcem koristeći sredstvo za prekrivanje preparata pripravljeno na vodenoj osnovi. Tako obojeni presjeci su se pregledali svjetlosnim mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokio, Japan).

### **3.6. Procjena upale i analiza broja upalnih stanica**

U procjeni upalne reakcije koristili smo se brojem upalnih stanica izbrojenih nakon imunohistokemijskog bojenja. Mikroskopska analiza i obrada dobivenih podataka poslužila je u određivanju srednje vrijednosti broja upalnih stanica po zadanom području veličine  $2500 \mu\text{m}^2$ .

Da bi se osigurala izotropnost presjeka, komadići tkiva su se uklapali tako da orijentacija tkiva bude slučajna. Svaki ganglij je serijski bio izrezan na rezove debljine 4-6  $\mu\text{m}$  kako bi se izbjegao Holmesov efekt (efekt debljine reza na stereološka mjerenja). Kako je već prije spomenuto za mjerenje se upotrijebio svaki deseti presjek koji je prethodno bio imunohistokemijski obrađen. Na svakom obojenom preparatu su se napravile dvije do tri digitalne mikrofotografije (kamera: Olympus DP-11, Japan) koristeći isto povećanje (400X) i dužinu ekspozicije. Fotografije su bile označene na način da se omogući slijepo ispitivanje. Svaka fotografija je bila kompjuterski podijeljena na dvanaest jednakih kvadratnih polja površine  $2500 \mu\text{m}^2$ , te su sve imunohistokemijski pozitivno obojene stanice bile prebrojene uz pomoć kompjutorskog programa za analizu slika (DP-Soft 3.1, Olympus). Kao zasebna stanica se računalo svako stanično proširenje u neposrednoj blizini stanične jezgre (Slika 3). Rezultat brojenja je bio prikazan u obliku srednje vrijednosti broja imunopozitivnih stanica prebrojenih u pregledanim poljima svih imunohistokemijski obrađenih presjeka dorzalnog ganglija pojedine životinje.



**Slika 3.** Ganglijska stanica okružena GFAP pozitivnom satelitskom stanicom. Strelica označava zadebljanje citoplazme satelitske stanice u neposrednoj blizini stanične jezgre. Povećanje 1000X.

### **3.7. Statističke metode**

Podaci su bili prikupljeni i obrađeni uz pomoć kompjutorskih programa Excel 2003 (Microsoft, SAD) i Statistica 6.0 (StatSoft, SAD). Sve kontinuirane varijable (broj stanica i vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora) izražene su u obliku srednjih vrijednosti i standardnih devijacija. Za usporedbu razlika između grupa pokusnih životinja prema njihovim vjerojatnostima hiperalgezijskog odgovora zabilježenih kroz četiri testiranja ponašanja upotrijebila se analiza varijance s ponovljenim mjerenjima (eng. repeated measures ANOVA), dok su se ostali parametri uspoređivali jednosmjernom analizom varijance. Srednje su se vrijednosti broja upalnih stanica u



različitim grupama uspoređivale Mann-Whitney U testom i Kruskal-Wallis testom. Odabrana razina značajnosti iznosila je 0.05.

### 3.7.1. Statistička snaga

Glavni cilj ovog istraživanja je usporedba srednje vrijednosti broja GFAP, OX-42 i Pan-T imunopozitivnih stanica u SNL životinja kod kojih je testiranje ponašanja pokazalo da su razvile neuropatsku bol nakon ozljede živca sa srednjom vrijednošću kod SNL životinja koje je nisu razvile.

U ovoj studiji je bilo uključeno 39 životinja koje su bile podvrgnute SNL operaciji. Iz dobivenih podataka smo pristupili izračunu statističke snage studije. Tablica 1 prikazuje rezultate srednjih vrijednosti broja stanica po kvadratnom polju površine  $2500 \mu\text{m}^2$  u životinja koje su razvile i onih koje nisu razvile neuropatsku bol nakon podvezivanja spinalnog živca.

**Tablica 1** Srednja vrijednost broja imunopozitivnih stanica u SNL operiranih životinja koje su razvile neuropatsku bol (n=17, 43,6%) i onih koje je nisu razvile (n=22, 56,4%).

Neuropatska bol	Srednja vrijednost $\pm$ SD		Z*	p
	Razvijena	Nerazvijena		
GFAP	4.0 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.8	-3.956	<0.001
OX-42	7.7 $\pm$ 1.0	4.8 $\pm$ 1.8	-2.572	0.01

\*Mann-Whitney U test

Na temelju tih podataka izračunato je da se u slučaju GFAP-a s 11 životinja po grupi postiže 91%-tna snaga testa u detektiranju razlike od 1.2 između nul-hipoteze da obje srednje vrijednosti iznose 3.96 i alternativne hipoteze da srednja vrijednost druge grupe iznosi 2.76 uz poznate standardne devijacije od 0.68 i 0.75 i značajnost (alfa) od 0.01, i to koristeći dvokračni Mann-Whitney U test. U slučaju bojanja s OX-42, sa 7 životinja po grupi se postiže 90%-tna snaga u detektiranju razlike od 2.96 između nul-hipoteze da obje srednje vrijednosti iznose 7.71 i alternativne hipoteze da srednja vrijednost druge grupe iznosi 4.75 uz poznate standardne devijacije od 1.03 i 1.76 i značajnost (alfa) od 0.01, i to ponovno koristeći dvokračni Mann-Whitney U test.

Ovim je dokazano da nam je bilo potrebno najmanje 11 životinja koje su razvile neuropatsku bol i 11 koje nisu razvile neuropatsku bol nakon operacije podvezivanja spinalnog živca kako bi smo sa zadovoljavajućom sigurnošću mogli potvrditi ili odbaciti nul-hipotezu.

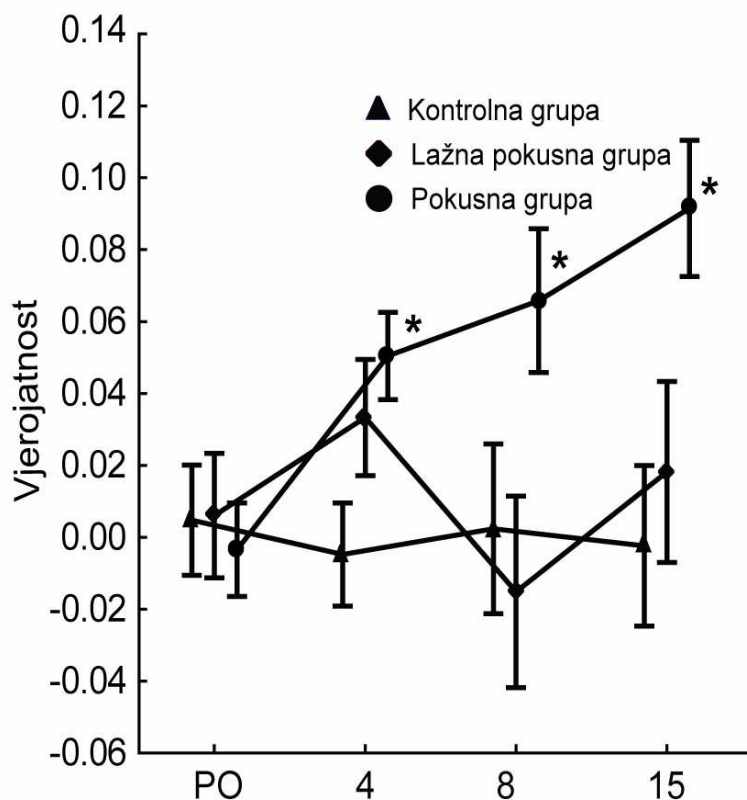
## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati ispitivanja ponašanja

Podvezivanje spinalnog živca je rezultiralo značajnim povećanjem vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora. Kako je to već opisano u poglavlju materijala i metoda, bile su ispitivane i bilježene vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora na podražaj plantarne površine šape iglom debljine 22 gauge. Prilikom svakog od ukupno četiri testiranja, obje su stražnje šape bile naizmjenično podražavane petnaest puta, te je broj pozitivnih odgovora na ukupno petnaest podražaja predstavljao vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora za pojedinu šapu. Preoperativno testiranje ponašanja je pokazalo da nije bilo statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora desne i lijeve stražnje šape (T-student test;  $t=0.032$ ,  $df=126$ ;  $p=0.975$ ) niti među vjerojatnostima hiperalgezijskog odgovora među trima grupama (ANOVA;  $F=0.217$ ,  $df=2$ ,  $p=0.805$ ).

Poslije operacije u kojoj je kod pokusnih životinja izvedeno podvezivanje i presijecanje desnih ventralnih ogranaka petog i šestog lumbalnog živca provedena su još tri istovjetna testiranja ponašanja. Statistička analiza interakcije između tipa primijenjene kirurgije i vremena je pokazala da je postojala statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima hiperalgezijskog odgovora među grupama životinja (ponovljeno mjerenje ANOVA;  $F=2.18$ ,  $df=6$ ,  $p<0.05$ ). Naknadno je Bonferronijevom post-hoc analizom utvrđeno da je u usporedbi s kontrolnom i lažnom pokusnom grupom, operacijski zahvat podvezivanja i presijecanja spinalnih živaca uzrokovao

statistički značajno povećanje vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u sva tri postoperativna testiranja ponašanja (Slika 4).

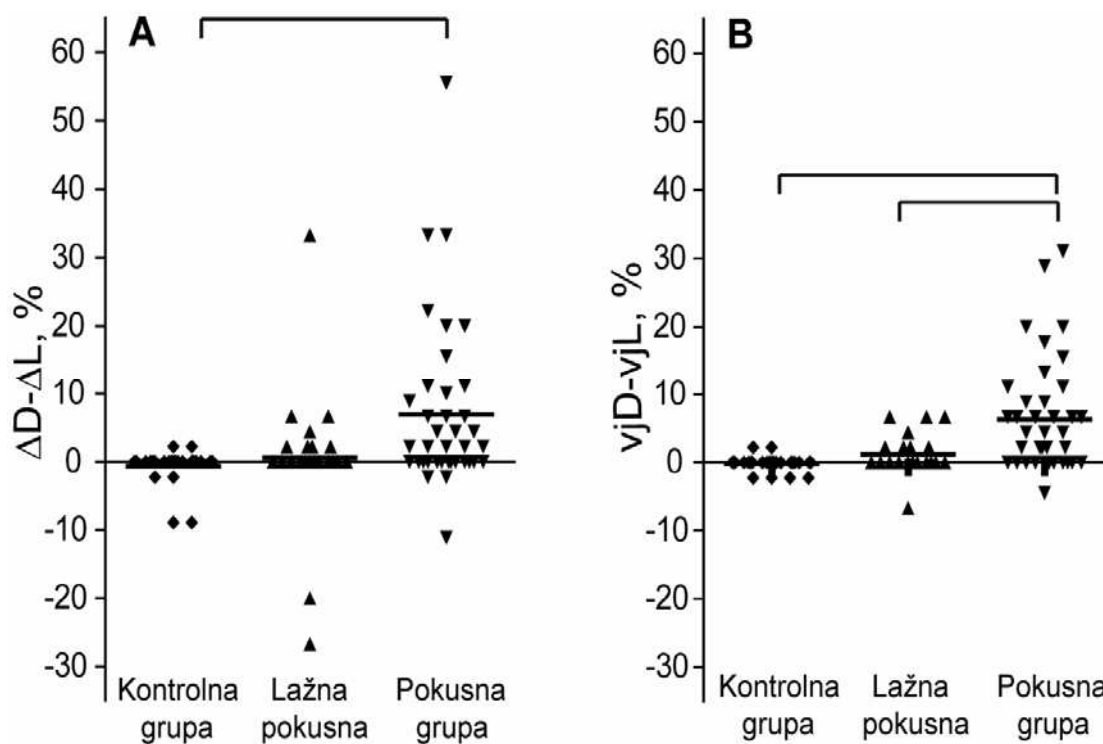


**Slika 4.** Razlika vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora desne i lijeve stražnje šape u preoperativnim i postoperativnim testiranjima ponašanja u sve tri grupe životinja. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška. Zvezdica označava statistički značajnu razliku od preoperativne vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora. PO-preoperativno testiranje.

Određeni dio životinja iz pokusne grupe kojima je bio podvezan i presječen spinalni živac tijekom postoperativnih testiranja ponašanja ipak nije pokazao znakove razvoja hiperalgezije. S ciljem identifikacije tih životinja za svaku životinju su se uprosječile vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora zabilježene prilikom tri postoperativna testiranja ponašanja. Kako bi se provjerio utjecaj preoperativne

individualne osjetljivosti na bolni podražaj svake od ispitanih životinja, dobivene uprosječne vrijednosti su se grafički prikazale na dva načina, prvo kao promjenu vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u odnosu na preoperativne vrijednosti ( $\Delta D - \Delta L$ ) (Slika 5A), te drugi način, jednostavno, kao razliku vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora zabilježenih testiranjima lijeve i desne stražnje šape ( $v_{jD} - v_{jL}$ ) (Slika 5B). Vrijednosti  $\Delta D - \Delta L$  predstavljaju učinak ozljede na desnoj strani u odnosu na lijevu stranu i to prikazano kao postotak uprosječne vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora zabilježenih u tri postoperativna testiranja što se izračunavalo na sljedeći način:  $100 \times [(srednja\ vrijednost\ desnih\ postoperativnih\ V) - (desna\ preoperativna\ V)] - 100 \times [(srednja\ vrijednost\ lijevih\ postoperativnih\ V) - (lijeva\ preoperativna\ V)]$ , gdje V stoji za vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora. Vrijednosti  $v_{jD} - v_{jL}$  predstavljaju razliku u vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora dobivenih testiranjem desne (ozlijeđene) i lijeve stražnje šape i to prikazano kako postotak a izračunavala se na slijedeći način:  $[(srednja\ vrijednost\ desnih\ postoperativnih\ V) - (srednja\ vrijednost\ lijevih\ postoperativnih\ V)]$ . Statistička analiza je pokazala značajnu razliku među trima grupama u oba slučaja, bilo kada smo uzeli u obzir vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u odnosu na preoperativne vrijednosti ( $\Delta D - \Delta L$ ) (ANOVA  $F=9.423$ ,  $df=2$ ,  $p=0.003$ ), ili kada smo uzeli u obzir razliku vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora zabilježenih testiranjima lijeve i desne stražnje šape ( $v_{jD} - v_{jL}$ ) (ANOVA  $F=5.267$ ,  $df=2$ ,  $p=0.007$ ). Bonfferonijeva post-hoc analiza je pokazala da je u oba slučaja pokusna grupa imala, statistički značajno, više vrijednosti nego kontrolna grupa dok se lažna pokusna grupa razlikovala od pokusne samo kada je vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora bila izražena bez obzira na preoperativne vrijednosti (Slika 5B). S obzirom da su se grupe statistički značajno razlikovale i ne vodeći računa o preoperativnim vrijednostima hiperalgezijskog odgovora, u nastavku

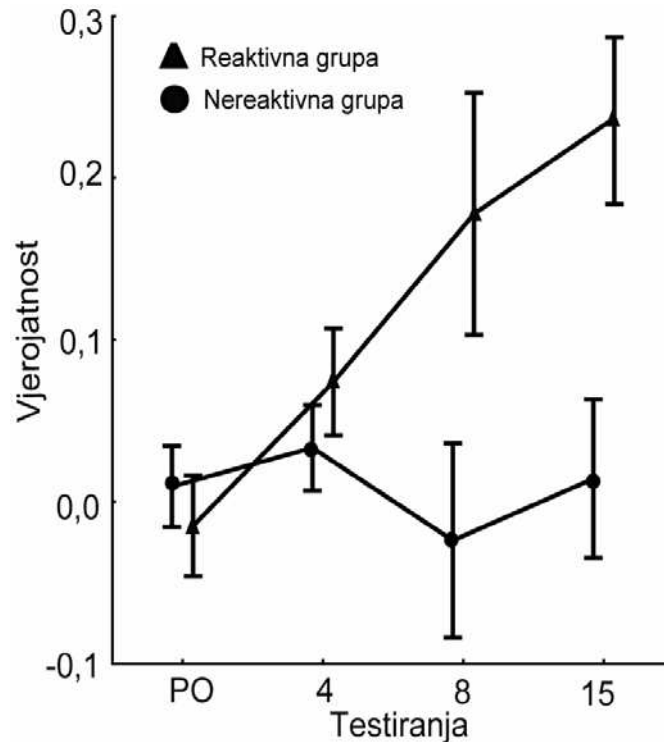
će se koristiti samo asimetrija vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora zabilježene na desnoj i lijevoj stražnjoj šapi bez oduzimanja preoperativnih vrijednosti.



**Slika 5.** Prikaz vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora po grupama. (A) Vrijednosti  $\Delta D - \Delta L$  predstavljaju učinak ozljede na desnoj strani u odnosu na lijevu stranu i to prikazanu kao uprosječno povećanje vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora zabilježenih u trima postoperativnim testiranjima u odnosu na preoperativnu vrijednost. (B) Vrijednosti  $vjD - vjL$  predstavljaju razliku u vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora dobivenih testiranjem desne (ozlijeđene) i lijeve (neozlijeđene) stražnje šape i to prikazanu kao postotak. Srednje vrijednosti za grupu su prikazane vodoravnim crtama. Razlike među grupama su izračunate analizom varijance s Bonfferonijevim post-hoc testom. Vodoravne uglate zagrade ukazuju značajne post-hoc razlike između grupa.

Vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora životinja u kasnoj pokusnoj grupi su pokazale široki raspon vrijednosti koje su imale tendenciju grupiranja oko dvije različite centralne vrijednosti kao što se to može primijetiti i iz grafičkih prikaza na Slici 5. To znači da je određeni dio životinja iz pokusne grupe imao izrazito visoke postoperativne vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora za razliku od ostatka jednako operiranih životinja kod kojih nije zabilježen značajan skok u tim vrijednostima. Isti fenomen nije bio zabilježen na grafičkim prikazima za lažnu pokusnu i kontrolnu grupu. Životinje iz pokusne grupe su bile podijeljene u dvije odvojene podgrupe s ciljem razlikovanja onih koje su razvile značajno povećanje hiperalgezijskog odgovora nakon operacije podvezivanja spinalnog živca od onih koje nisu pokazale to povećanje. Prva podgrupa je obuhvaćala životinje koje su nakon podvezivanja spinalnog živca imale vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora  $\geq 0.33$ , te su upravo to bile životinje koje su uspješno razvile hiperalgeziju nakon operacije podvezivanja spinalnog živca. Tih životinja je bilo ukupno 17 (43.6%) i nazvane su reaktivnom podgrupom. Ostale 22 (56.4%) životinje iz pokusne grupe nisu imale značajan porast vjerojatnost hiperalgezijskog odgovara, koji je iznosio  $< 0.33$ , te je ta podgrupa životinja bila nazvana nereaktivnom podgrupom.

Vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora reaktivne i nereaktivne podgrupe životinja su se pokazale statistički značajno različitim. (Mann-Whitney U test,  $Z = -6.959$ ,  $p < 0.001$ ). Ako se grafički zasebno prikažu srednje vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora za svako od četiri testiranja može se vidjeti da su preoperativne vrijednosti, kako za reaktivnu tako i za nereaktivnu podgrupu bile približno jednake (Slika 6). No, u postoperativnim testiranjima te vrijednosti u reaktivnoj podgrupi su progresivno rasle iz testiranja u testiranje, dok su se vrijednosti zabilježene za nereaktivnu podgrupu kretale oko preoperativne vrijednosti.



**Slika 6.** Preoperativne i postoperativne srednje vrijednosti razlika vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora desne i lijeve stražnje šape zabilježene u reaktivnoj i nereaktivnoj podgrupi prilikom četiri testiranja. PO=preoperativno testiranje. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška.

#### **4.2. Rezultati mjerenja upalne reakcije**

Da bi dokazali i izmjerili jačinu upale uzrokovane operacijom, primijenjene su imunohistokemijske metode bojenja za specifične antigene prisutne na stanicama koje svojom aktivacijom sudjeluju u postoperativnom upalnom odgovoru, što je već bilo opširnije objašnjeno u poglavlju materijala i metoda. Nakon imunohistokemijskog bojenja presjeka spinalnog ganglija i priliježućeg dijela spinalnog živca, istraženo je postoji li statistički značajna razlika u broju stanica koje su se imunohistokemijskim



bojenjem obojile kako između različitih grupa životinja tako i između reaktivne i nereaktivne podgrupe životinja.

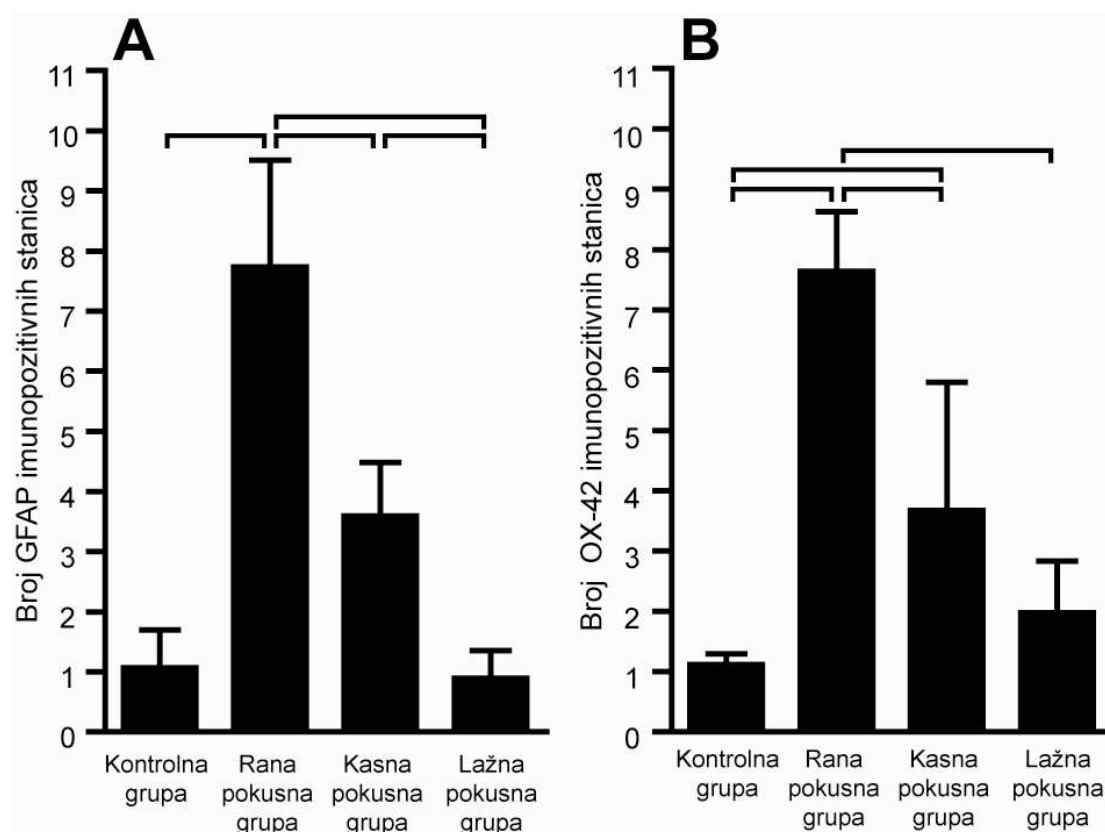
Prebrojavanjem imunopozitivnih stanica obojenih GFAP i OX-42 primarnim protutijelom dobile su se vrijednosti njihove gustoće prikazane u tablici 2.

**Tablica 2.** Gustoća GFAP i OX-42 imunopozitivnih stanica u dorzalnim ganglijima po grupama. Vrijednosti prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška/2500  $\mu\text{m}^2$ .

	GFAP	OX-42
Kontrolna grupa	1.1 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.2
Rana pokusna grupa (4 dana nakon operacije)	7.9 $\pm$ 1.8	7.7 $\pm$ 0.9
Kasna pokusna grupa (15 dana nakon operacije)	3.6 $\pm$ 0.9	3.7 $\pm$ 2.1
Lažna pokusna grupa	0.9 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.9

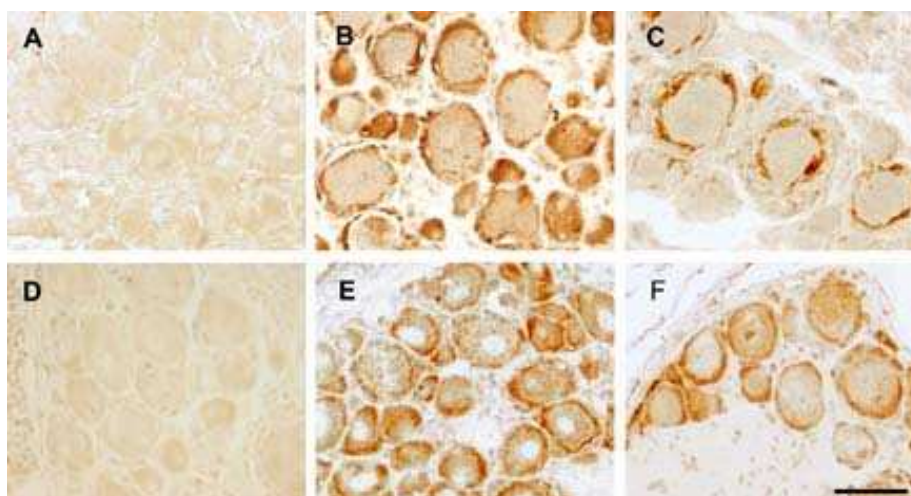
Iz tih podataka vidimo da je najveća gustoća stanica zabilježena u pokusnoj grupi i to 4 dana nakon operacije podvezivanja spinalnog živca, te skoro upola manje nakon 15 dana. U lažnoj pokusnoj grupi i u kontrolnoj grupi se našla gotovo ista gustoća imunopozitivnih stanica koja je bila daleko niža od one nađene u pokusnoj grupi. Statistička analiza je pokazala značajnu razliku u gustoći imunopozitivnih stanica između te četiri grupe kako za GFAP specifično imunohistokemijsko bojanje (Kruskal-Wallis test;  $H=82.42$ ,  $p<0.001$ ), tako i za OX-42 bojanje (Kruskal-Wallis

test;  $H=36.45$ ,  $p<0.001$ ). Naknadna Bonferronijeva post-hoc analiza je pokazala da je u pokusnoj grupi zabilježena značajno veća gustoća GFAP i OX-42 imunopozitivnih stanica, za razliku od lažne pokusne i kontrolne grupe koje se nisu međusobno razlikovale (Slika 7).



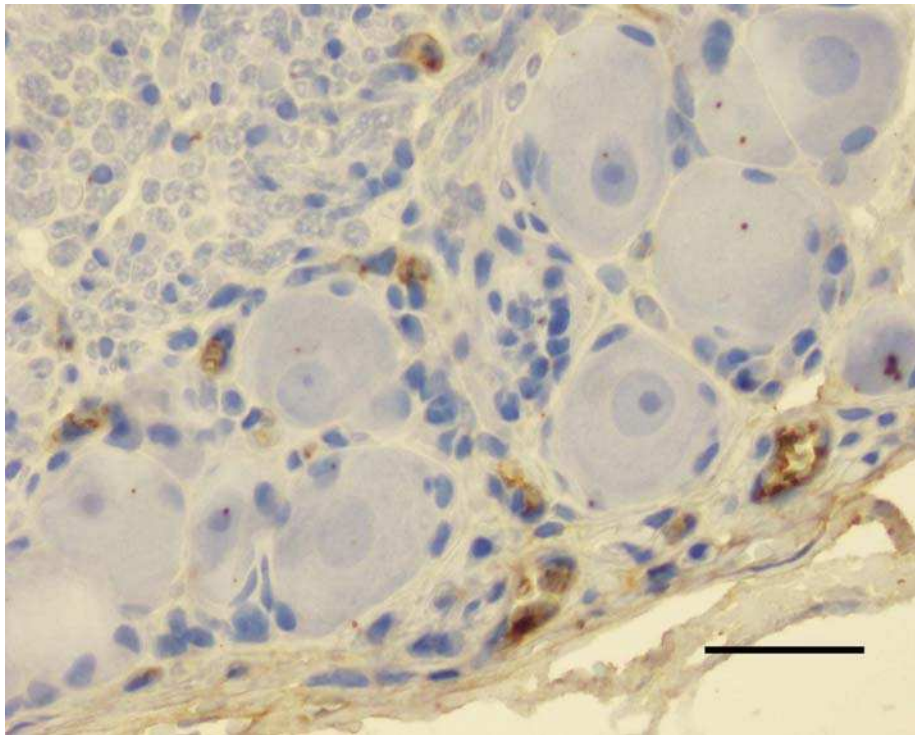
**Slika 7.** Srednja vrijednost gustoće GFAP (A) i OX-42 (B) imunopozitivnih stanica izbrojenih na histološkim presjecima spinalnog ganglija po grupama životinja. Životinje iz rane pokusne grupe su bile žrtvovane četvrti dan nakon operacije podvezivanja spinalnog živca dok su životinje iz kasne pokusne grupe bile žrtvovane nakon petnaest dana. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška/ $2500 \mu\text{m}^2$ . Vodoravne uglate zagrade pokazuju značajne razlike među grupama izračunate Bonferronijevom post-hoc analizom.

Osim što je četvrtog dana nakon operacije podvezivanja spinalnog živca na preparatima spinalnih ganglija iz rane pokusne grupe nađen najveći broj imunopozitivnih stanica, te iste stanice su se također tada i najintenzivnije bojile bilo da su se koristila GFAP ili OX-42 primarna protutijela (Slika 8).



**Slika 8.** Imunoreaktivnost histoloških presjeka spinalnog ganglija na glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP) i OX-42. (A) Mikrofotografija histološkog presjeka spinalnog ganglija iz kontrolne grupe obojenog GFAP-om. GFAP imunoreaktivnost presjeka spinalnog ganglija životinja žrtvovanih četiri (B) i petnaest (C) dana nakon operacije podvezivanja spinalnog živca. (D) Histološki preparat kontrolne grupe obojen OX-42 protutijelom. OX-42 imunoreaktivnost presjeka spinalnog ganglija životinja žrtvovanih osam (E) i petnaest (F) dana nakon operacije podvezivanja spinalnog živca. Povećanje 400X. Mjerna oznaka, 50  $\mu$ m.

Što se tiče imunoreaktivnosti na Pan-T primarna antitijela općenito je zabilježena veoma mala gustoća takovih imunopozitivnih stanica. U pokusnoj grupi prosječna gustoća stanica po području od  $2500 \mu\text{m}^2$  se kretala oko  $1.3 \pm 0.4$  u spinalnom gangliju (Slika 9), te  $1.6 \pm 0.5$  među živčanim vlaknima dok su u lažnoj pokusnoj i kontrolnoj grupi zabilježene samo sporadične imunopozitivne stanice.



**Slika 9.** Imunoreaktivnost zabilježena na histološkom preparatu spinalnog ganglija na Pan-T primarno antitijelo nakon operacije podvezivanja spinalnog živca. Povećanje 400X. Mjerna oznaka,  $50 \mu\text{m}$ .

Među živčanim vlaknima koja prolaze između nakupina tijela ganglijskih stanica nalaze se ovalne i nepravilno oblikovane GFAP i OX-42 pozitivne stanice.

Srednje vrijednosti gustoće tih stanica u različitim grupama životinja su navedene u tablici 3.

**Tablica 3.** Gustoća GFAP i OX-42 imunopozitivnih stanica među živčanim vlaknima po grupama. Vrijednosti prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška/2500  $\mu\text{m}^2$ .

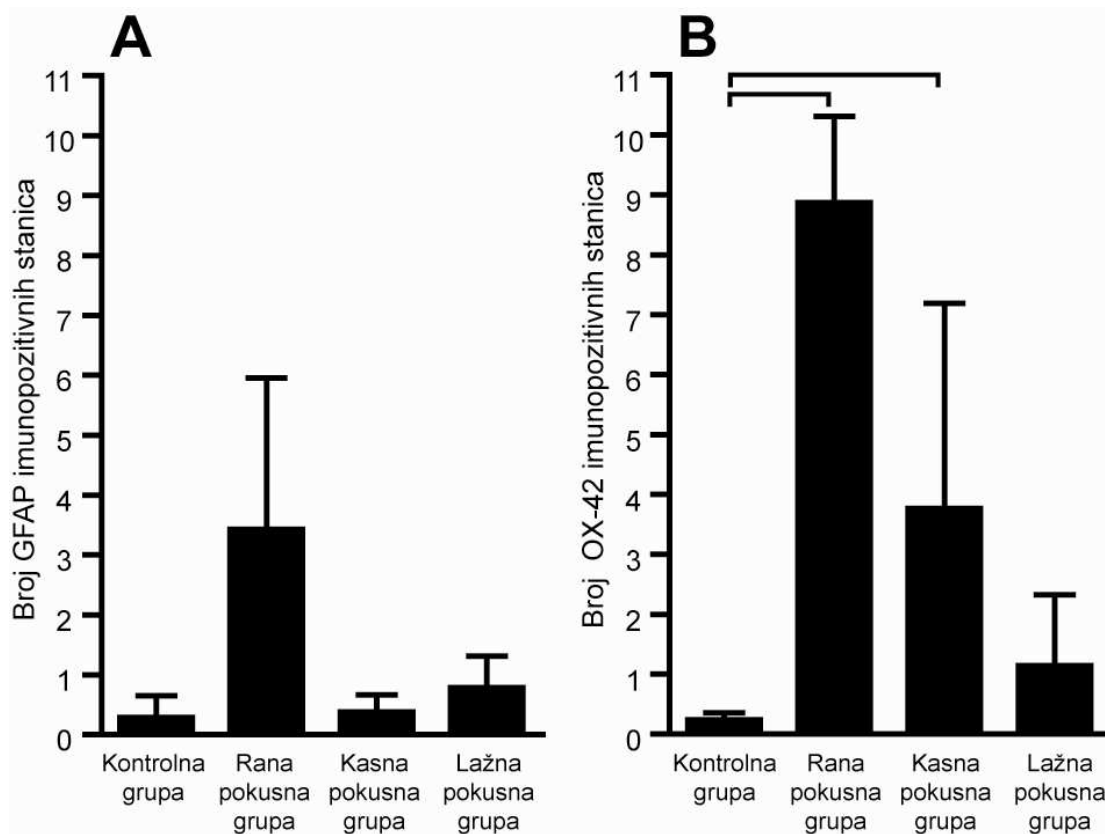
	GFAP	OX-42
Kontrolna grupa	0,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
Rana pokusna grupa (4 dana nakon operacije)	3,5 $\pm$ 2,5	8,9438 $\pm$ 1,5
Kasna pokusna grupa (15 dana nakon operacije)	0,4 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 3,5
Lažna pokusna grupa	0,8 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 1,2

Iz tablice 3 se vidi da je najveća gustoća GFAP imunopozitivnih stanica zabilježena u pokusnoj grupi i to četiri dana nakon operacije podvezivanja spinalnog živca i mnogo manja nakon petnaest dana. Lažna pokusna i kontrolna grupa također su imale nisku gustoću GFAP imunopozitivnih stanica koja je bila daleko niža od one nađene u pokusnoj grupi četiri dana nakon operacije. U slučaju OX-42 imunohistokemijskog bojenja zabilježena je vršna vrijednost gustoće imunopozitivnih stanica u pokusnoj grupi četiri dana nakon operacije. Ta gustoća je u istoj grupi životinja petnaest dana nakon operacije opala na polovicu vršne vrijednosti, ali je još

uvijek bila viša od onih zabilježenih u lažnoj pokusnoj i kontrolnoj grupi. Statistička analiza je ponovno pokazala značajnu razliku u gustoći imunopozitivnih stanica između te četiri grupe kako za GFAP specifično imunohistokemijsko bojanje (Kruskal-Wallis test;  $H=8.28$ ,  $p=0.041$ ), tako i za OX-42 bojanje (Kruskal-Wallis test;  $H=17.99$ ,  $p<0.001$ ). Naknadna Bonfferonijeva post-hoc analiza je pokazala da se u pokusnoj, u odnosu na ostale grupe životinja, našao značajno viši broj OX-42 imunopozitivnih stanica, za razliku od lažne pokusne i kontrolne grupe koje se međusobno nisu razlikovale (Slika 10).

Svi gore navedeni podaci govore da je ozljeda spinalnog živca dovela do povećanja gustoće GFAP i OX-42 pozitivnih stanica u L5 spinalnom gangliju u pokusnoj grupi, ali ne i u lažnoj pokusnoj grupi što potvrđuje da sama manipulacija živca, kakva je napravljena u slučaju lažne pokusne grupe, ne može prouzročiti značajni upalni proces u ozlijeđenom spinalnom gangliju.

U konačnici s ciljem da se provjeri valjanost hipoteze ovog istraživanja da je za razvoj neuropatske boli nakon eksperimentalno izazvanog oštećenja živca upalna komponenta daleko značajnija od samog mehaničkog presijecanja aksona, bilo je bitno razlikovati postoji li statistički značajna razlika u gustoći upalnih stanica u spinalnom gangliju životinja iz reaktivne i nereaktivne podgrupe životinja, to jest iz dvije podgrupe izdvojene iz pokusne grupe (u kojoj su sve životinje bile podvrgnute istovjetnom zahvatu podvezivanja spinalnog živca) ovisno o tome je li im se ili nije povećala postoperativna vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora.



**Slika 10.** Srednja vrijednost gustoće GFAP (A) i OX-42 (B) imunopozitivnih stanica izbrojenih među živčanim vlaknima na histološkim presjecima spinalnog ganglija po grupama životinja. Životinje iz rane pokusne grupe su bile žrtvovane četvrti dan nakon operacije podvezivanja spinalnog živca dok su životinje iz kasne pokusne grupe bile žrtvovane nakon petnaest dana. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška/2500  $\mu\text{m}^2$ . Vodoravne uglate zagrade ukazuju značajne post-hoc razlike između grupa izračunate Bonfferonijevom post-hoc analizom.

Gustoća GFAP imunopozitivnih stanica u reaktivnoj podgrupi je iznosila  $3.96 \pm 0.68$  stanica/2500  $\mu\text{m}^2$  i u nereaktivnoj podgrupi  $2.76 \pm 0.75$  stanica/2500  $\mu\text{m}^2$ .

Razlika u gustoći GFAP imunopozitivnih stanica u reaktivnoj i nereaktivnoj podgrupi se pokazala statistički značajnom (Mann-Whitney U test;  $Z=-3.956$ ,  $p<0.001$ ).

Slično je nađeno i kod bojenja OX-42 primarnim antitijelima. Gustoća OX-42 pozitivnih stanica u reaktivnoj podgrupi je iznosila  $7.71\pm 1.03$  stanica/ $2500\ \mu\text{m}^2$  i u nereaktivnoj  $3.96\pm 0.68$  stanica/ $2500\ \mu\text{m}^2$  što se ponovno pokazalo statistički značajno različito (Mann-Whitney U test;  $Z=-2.572$ ,  $p=0.01$ ).



## **5. RASPRAVA**

### ***5.1. Ispitivanje ponašanja***

Obradom podataka dobivenih u jednom preoperativnom i trima postoperativnim ispitivanjima ponašanja različitih grupa životinja potvrđeno je da eksperimentalni model podvezivanja spinalnog živca uspješno izaziva povećanje hiperalgezije, za razliku od lažne pokusne grupe gdje je napravljen istovjetni operativni zahvat uz izostavljanje podvezivanja i presijecanja spinalnog živca. To potvrđuje rezultate prethodnog istraživanja autora Hogana i sur. (65). Kako je vidljivo na slici 1, preoperativno testiranje ponašanja je pokazalo da su sve tri grupe imale veoma slične vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora. To ukazuje da su sve pokusne životinje uključene u ovu studiju preoperativno jednako reagirale na mehanički podražaj što je bitno za postoperativno praćenje povećanja vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora. Postoperativnim testiranjima ponašanja se vidjelo da je statistički značajan porast hiperalgezijskog odgovora zabilježen jedino u pokusnoj grupi čije vrijednosti su pokazale skoro linearni rast kroz vrijeme. To potvrđuje efikasnost operativnog zahvata podvezivanja spinalnog živca kao valjanog eksperimentalnog modela za izazivanje kronične boli. Interesantno je također kretanje vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u lažnoj pokusnoj grupi koja je pokazala početni porast prilikom prvog postoperativnog testiranja da bi se na posljednja dva testiranja vrijednosti ponovno približile onima iz kontrolne grupe. Takvo specifično kretanje vrijednosti hiperalgezijskog odgovora u lažnoj pokusnoj grupi može značiti da sama manipulacija spinalnog živca i stvaranje okolne upale

može dovesti do tranzitornog stanja smanjenog praga boli, ali da ne može samostalno pokrenuti proces nastanka neuropatske boli.

Iako srednje vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u pokusnoj grupi ukazuju na uspješnost eksperimentalnog modela podvezivanja spinalnog živca u izazivanju neuropatske boli, primijećeno je tijekom ispitivanja ponašanja da ipak samo dio životinja (reaktivna podgrupa) ima značajno postoperativno povećanje vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora. Slična zapažanja su zabilježena i u drugim eksperimentalnim istraživanjima Kotinena i sur., te Cuia i sur. (66, 67). Interesantno je također da je u jednom kliničkom istraživanju autora Alia i sur. zabilježeno slično zapažanje (68). Naime, radilo se o grupi pacijenata podvrgnutih istovjetnom neurokirurškom operativnom zahvatu u kojih je kontralateralni C7 spinalni živac bio kirurški podijeljen i presađen u svrhu reinervacije ozlijeđenog kontralateralnog brahijalnog plexusa, a što je samo u nekih pacijenata izazvalo ozbiljnu neuropatsku bol.

## **5.2. Prepoznavanje reaktivne podgrupe životinja**

Neuropatska bol je po svojoj prirodi kronična bol i zbog toga je vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora praćena postoperativno u više navrata. U svrhu identificiranja životinja koje su razvile značajnu postoperativnu hiperalgeziju koristila se uprosječena vrijednost vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora dobivenih u tri postoperativna ispitivanja ponašanja. Da bi se izbjegao moguć utjecaj preoperativne varijabilnosti osjetljivosti svake pojedinačne eksperimentalne životinje, ispitano je i statistički dokazano, da iako ona postoji, uočene minimalne razlike statistički

značajno ne utječu na postoperativne rezultate. Naknadno se pokazalo da se pokusna grupa životinja statistički značajno razlikovala od ostalih dviju čak i kad se uprosječe tri postoperativne vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora, što dodatno potvrđuje valjanost eksperimentalnog modela podvezivanja spinalnog živca.

Nadalje se može zapaziti da uprosječene vrijednosti vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora svake pojedinačne životinje imaju tendenciju grupiranja u dvije podgrupe, onu s visokim vrijednostima koju smo nazvali reaktivnom podgrupom, jer su životinje u njoj reagirale razvijanjem značajne hiperalgezije nakon operacije podvezivanja spinalnog živca, i onu s nižim vrijednostima koju smo iz suprotnih razloga nazvali nereaktivnom podgrupom. Statistički je dokazano da postoji značajna razlika u vrijednostima vjerojatnosti tih dviju podgrupa što potvrđuje gore navedeno zapažanje da nakon ozljede spinalnog živca ne sve životinje neophodno i razviju neuropatsku bol.

Dosadašnja istraživanja su se uglavnom temeljila na pretpostavci da sve ili barem velika većina pokusnih životinja podvrgnutih operaciji ozljeđivanja živca po nekom od postojećih modela razviju neuropatsku bol. Iz rezultata ove studije vidimo da to nije slučaj, te da je postotak životinja koji postoperativno razvije neuropatsku bol daleko niži. Ovo zapažanje odgovara i nekim zapažanjima iz kliničke prakse gdje je poznato da na sreću samo relativno mali broj pacijenata s veoma sličnim ozljedama živčanog sustava razvije kroničnu bol (68). Saznanje da nakon ozljede živčanog sustava relativno mali broj pokusnih životinja razvije neuropatsku bol i ne mora predstavljati značajan problem u istraživanjima koja se provode na relativno velikim brojevima životinja. Kako se znanja i teorije o mehanizmima neuropatske boli gomilaju, već današnja i buduća istraživanja na području neuropatske boli postaju sve zahtjevnija, skuplja i dugotrajnija, kao što je to slučaj u mehanicističkim

istraživanjima. Zbog toga je neophodno limitirati broj pokusnih životinja koje se uključuje u istraživanje. U tom slučaju prema podacima dobivenim u ovoj studiji neophodno je prije početka provođenja planiranog istraživanja provesti testiranje ponašanja kako bi se identificiralo životinje koje su nakon ozljede živčanog sustava pokazale značajan porast vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora.

### **5.3. Razlika u upalnoj reakciji**

Osnovni cilj ove studije je bio ispitati korelaciju pojave hiperalgezije i upale živčanog tkiva koja je uzrokovana njegovim ozljeđivanjem. U tu svrhu je bilo upotrijebljeno GFAP primarno antitijelo koje je marker aktiviranih satelitskih stanica koje obuhvaćaju tijela ganglijskih stanica i OX-42 primarno antitijelo koje je marker aktiviranih mikroglialnih stanica, monocita/makrofaga, te nekih neutrofilnih stanica (62, 69).

Gustoća GFAP i OX-42 imunopozitivnih stanica u spinalnom gangliju i između živčanih vlakana koja prolaze u blizini spinalnog ganglija bila je najveća u pokusnoj grupi, te se statistički značajno razlikovala po njihovom broju od ostalih grupa. Ti rezultati zajedno s rezultatima nekih drugih prethodnih istraživanja potvrđuju da porast broja GFAP i OX-42 imunopozitivnih stanica u spinalnom gangliju i dorzalnom rogu leđne moždine korelira s pojavom hiperalgezije nakon ozljede spinalnog živca (39, 69-71). Također je nađeno da se vršna vrijednost koncentracije tih imunopozitivnih stanica javlja između trećeg i desetog dana nakon ozljede živca, te da se ona poslije postupno smanjuje.

Bila su upotrebljena i primarna protutijela specifična za štakorske T limfocite (64) no nađena je niska koncentracija tih stanica u spinalnim ganglijima životinja iz pokusne grupe za razliku od kontrolne i lažne pokusne grupe gdje su te stanice bile samo sporadične. Slični rezultat su dobili također Lu i suradnici (72) iako su u jednoj drugoj studiji autori Hu i McLachlan (36) zabilježili nešto značajniju infiltraciju pan-T imunopozitivnih stanica. To bi upućivalo da su T-limfociti veoma rijetki ili ih uopće nema u normalnom spinalnom gangliju. Put kojim oni infiltriraju živčano tkivo nakon ozljede nije moguće utvrditi na temelju ove studije no kako je vidljivo na slici 9 gustoća T limfocita u spinalnom gangliju životinja iz pokusne skupine je bila najveća u blizini krvnih žila što govori više u prilog da T limfociti infiltriraju ganglij preko stijenke krvnih žila negoli da ulaze u živčano tkivo na mjestu prekida kontinuiteta živca. To bi dakako trebalo biti detaljnije istraženo u nekom budućem istraživanju.

Iako su se većina dosada publiciranih znanstvenih radova fokusirali na upalnu infiltraciju leđne moždine, ovo istraživanje se bavilo daleko manje istraženom upalnom reakcijom u spinalnom gangliju gdje rezidentne stanice zadužene za upalni odgovor mogu doći u kontakt sa stanicama sustavnog imunološkog sustava zbog nedostatka krvno-tkivne barijere (73). Zbog toga se može posumnjati da je povećanje broja GFAP i OX-42 imunopozitivnih stanica u spinalnom gangliju rezultat aktivacije ili fenotipske promjene satelitskih stanica, no, na temelju ovog istraživanja nije moguće isključiti da njihov povećani broj nije dijelom uzrokovan i nagomilavanjem hematogenih monocita (74). Značajno slabiji utjecaj živčane ozljede na promjenu broja GFAP imunopozitivnih stanica koje se nalaze među živčanim vlaknima događa se zbog toga što se aktivirane neuroinflamatorne stanice najviše koncentriraju u blizini tijela ganglijskih stanica, dok se OX-42 imunopozitivne stanice ravnomjerno

raspoređuju između živčanih vlakana i tijela ganglijskih stanica u spinalnom gangliju (Slika 7 A i B).

Poznato je da  $2.5 \pm 0,1\%$  volumena neozlijeđenog dorzalnog ganglija predstavlja brojčano relativno stabilna populacija mirujućih makrofaga (75). Kako je OX-42 primarno antitijelo specifično za aktivirane mikroglijalne stanice (koje se nalaze isključivo u mozgu i leđnoj moždini), monocite/makrofage, te aktiviranih neutrofilnih stanica, nađeni povećani broj OX-42 pozitivnih stanica među živčanim vlaknima dorzalnog ganglija može značiti aktivaciju i proliferaciju rezidentnih makrofaga odnosno infiltraciju spinalnog živca od strane cirkulirajućih monocita/makrofaga. Autori Hu i sur. su dokazali prisutnost četiri funkcijska podtipa makrofaga u dorzalnog gangliju nakon ozljede spinalnog živca (76). Oni se mogu imunohistokemijski razlikovati po različitoj kombinaciji ekspresije CD68 (detekcija upotrebom ED1 primarnog protutijela), CD 163 (detekcija upotrebom ED2 primarnog protutijela) i MHC II molekule. Makrofazi u dorzalnog gangliju imaju važan zadatak odstranjivanja mijelinskih ostataka i produkata degeneracije neurona nakon traume, infekcije ili autoimune reakcije u živčanom sustavu, no, uloga svakog podtipa makrofaga u generiranju neuropatske boli i njihova interakcija s okolnim stanicama je još uvijek nedovoljno istražena.

Kad se usporede rezultati dobiveni ispitivanjem ponašanja s intenzitetom upale u spinalnom gangliju, vidi se da, iako je vršna vrijednost broja upalnih stanica zabilježena četiri dana poslije operacije podvezivanja spinalnog živca uz naknadno postupno smanjenje njihovog broja, testiranja ponašanja su pokazala kontinuirani linearni rast vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora. To sugerira da povećanje broja upalnih stanica može u prvom mahu doprinijeti preživljenju neurona. No, te stanice imaju potencijal izlučivanja ekscitatornih citokina koji mogu nakon ozljede u osjetnim

neuronima generirati ektopične akcijske potencijale. Na taj način njihova dugotrajna prisutnost može igrati važnu ulogu kao pokretač mehanizma nastanka neuropatske boli.

Pokazalo se također da postoji značajna razlika u broju aktiviranih upalnih stanica između reaktivne i nereaktivne podgrupe. Preglednom dostupne literature ovo je prva studija koja dokazuje razliku u upali uzrokovanoj ozljedom živca između životinja koje su razvile neuropatsku bol nakon ozljede živca (reaktivna podgrupa) i onih koje je nisu razvile (nereaktivna podgrupa). Kao što je već prije spomenuto u sličnoj studiji autora Kima i sur., nađeno je da promjena koncentracije vazoaktivnog intestinalnog polipeptida (VIP) i neuropeptida Y u leđnoj moždini nakon periferne ozljede živca nije statistički značajno različita između životinja koje su nakon operativnog zahvata razvile neuropatsku bol i onih koje je nisu razvile (77). U toj je studiji samo 22.32% životinja razvilo neuropatsku bol, što približno odgovara i rezultatima ove studije. Taj postotak uspješnosti kojom model podvezivanja spinalnog živca inducira nastanak neuropatske boli nam ukazuje na važnost identifikacije životinja u kojih je eksperimentalno oštećenje živca izazvalo neuropatsku bol. Na taj bi se način zajamčilo donošenje zaključaka na temelju podataka koji nisu kontaminirani rezultatima dobivenim mjerenjima provedenim na životinjama koje nisu razvile neuropatsku bol.

S obzirom da su u ovoj studiji sve životinje iz eksperimentalne grupe bile operirane istom tehnikom od strane istog operatera te da je testiranje ponašanja bilo provedeno u istim uvjetima i istom metodom, to ne može predstavljati uzrok zabilježene varijabilnosti u razvoju neuropatske boli nakon ozljede spinalnog živca. No poznato je da postoji varijabilna sklonost k razvijanju kronične boli među različitim sojevima glodavaca podvrgnutih istovjetnom Chung-ovom modelu

podvezivanja spinalnog živca (78, 79). U jednoj kasnijoj studiji je dokazano da se pomnom selekcijom i planiranim križanjem kroz mnoge generacije mogu uzgojiti legla eksperimentalnih životinja s izrazito jakom ili slabom sklonošću razvoju neuropatske boli (25). Zbog toga se prilikom planiranja složenijih istraživanja o mehanizmima nastanka neuropatske boli koja se moraju provesti na limitiranom broju pokusnih životinja može predvidjeti upotreba ovih pomno selektiranih legla pokusnih životinja koja imaju jaku sklonost razvoju neuropatske boli. Na taj bi se način značajno povećala učinkovitost eksperimentalnih modela i smanjila vjerojatnost donošenja pogrešnih zaključaka. No, testiranje postoperativnog ponašanja, gdje je ono primjenjivo i opravdano, i dalje važi kao metoda koja osim što je daleko jednostavnija i ekonomičnija, jedina omogućuje sigurnu detekciju životinja koje su postoperativno razvile neuropatsku bol.

Pošto su u ovom istraživanju korišteni isključivo štakori soja Sprague-Dawley čije križanje nije bilo kontrolirano, može se pretpostaviti da se radilo o životinjama s veoma heterogenom genetskom podlogom koja posljedično može garantirati jednako raznoliku sklonost razvoju neuropatske boli.

Iako su ovi rezultati pokazali značajnu razliku u broju aktiviranih stanica između reaktivne i nereaktivne podgrupe, nepredvidiv učinak ozljede živca na razvoj neuropatske boli može biti rezultat mnogih drugih faktora kao na primjer anatomska varijabilnost neuralnih putova i njihova različita periferna raspodjela, razlike u opsegu ozljede okolnih tkiva i posljedične upale, već spomenute različite osjetljivosti pokusnih životinja na ozljedu, te utjecaj različitih faktora iz okoliša (65).



## 6. ZAKLJUČCI

Ispitivanja ponašanja su pokazala da su životinje iz pokusne grupe, koje su bile podvrgnute operaciji podvezivanja i presijecanja spinalnog živca, u prosjeku uspješno razvile neuropatsku bol za razliku od onih u lažnoj pokusnoj grupi gdje je napravljena istovjetna operacija ali je bilo izostavljeno podvezivanje i presijecanje spinalnog živca. To ukazuje da sama manipulacija živca i posljedična okolna upalna reakcija ne mogu uspješno izazvati nastanak neuropatske boli.

Osim što je ova studija pokazala da podvezivanje spinalnog živca uspješno izaziva nastanak neuropatske boli, zabilježeno je da sve eksperimentalne životinje koje se podvrgnu toj operaciji kasnije ne razviju neophodno neuropatsku bol. To je od posebne važnosti za buduće studije, posebice one mehanicističke u kojima bi rezultati testiranja ponašanja trebali postati jedan od kriterija za uključivanje u studiju kako bi se osigurao pravilan izbor pokusnih životinja koje su zaista razvile neuropatsku bol nakon ozljede živca.

Postojala je značajna razlika u broju upalnih stanica u spinalnom gangliju u životinja koje su razvile neuropatsku bol nakon ozljede spinalnog živca za razliku od onih koje je nisu razvile. Pregledom dostupne literature može se zaključiti da je ovo prva studija koja je dokazala da je upala u spinalnom gangliju značajan faktor u nastanku neuropatske boli nakon operacije podvezivanja spinalnog živca.

Bio je također zabilježen približno linearan progresivni rast vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora nakon ozljede živca, iako broj upalnih stanica u spinalnom gangliju započinje opadati oko četvrtog postoperativnog dana. Iz toga se može

zaključiti da je upalna reakcija živčanog tkiva bitan pokretač za nastanak neuropatske boli, te da izostanak potpunog razvoja upalnog odgovora ograničava njezin razvoj.

Ova studija je ukazala da dolazi do značajne upale u spinalnom gangliju nakon ozljede živca no još uvijek je ostalo neistraženo podrijetlo tih upalnih stanica u spinalnom gangliju, odnosno radi li se o aktiviranim rezidentnim stanicama koje mogu provesti određene fenotipske promjene ili se pak radi o cirkulirajućim imunosnim stanicama koje infiltriraju živčani sustav.

## 7. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je objasniti varijabilnost reakcije bolnog ponašanja nakon podvezivanja spinalnoga živca promatranjem odnosa između nastanka neuropatske boli i pokazatelja upale u spinalnom gangliju i živcu.

Devedeset i šest štakora soja Sprague-Dawley nasumice su bili raspoređeni u pokusnu grupu kojoj je bio podvezan spinalni živac, lažnu pokusnu grupu koja je bila podvrgnuta istoj operaciji, ali bez podvezivanja spinalnog živca ili u kontrolnu grupu. Testiranjem bolnog ponašanja identificirani su štakori koji su razvili neuropatsku bol (reaktivni) i oni koji nisu (nereaktivni). Stupanj upale u tim dvjema grupama procijenjen je uz pomoć primarnih antitijela za bojenje glijalne fibrilarne kisele bjelančevine (eng., glial fibrillary acid protein, kratica GFAP), receptora za komponentu C3 štakorskog komplementa (protutijela OX-42) i T limfocita (pan-T protutijela).

Gustoća stanica imunopozitivnih na GFAP i OX-42 bila je značajno veća u životinja koje su pokazivale značajnu hiperalgeziju. Gustoća stanica u gangliju dorzalnoga korijena imunopozitivnih na GFAP bila je  $4.0 \pm 0.6$  u reaktivnih, a  $2.8 \pm 0.8$  u nereaktivnih životinja (Mann-Whitneyev U-test.  $Z = -3.965$ ,  $P < 0.001$ ). Gustoća stanica u spinalnom živcu imunopozitivnih na OX-42 bila je  $7.7 \pm 1.0$  u reaktivnih i  $4.8 \pm 1.8$  u nereaktivnih životinja (Mann-Whitneyev U-test.  $Z = -2.572$ ,  $P = 0.01$ ). Također je zabilježena veoma mala gustoća pan-T imunopozitivnih stanica. U pokusnoj grupi prosječna gustoća tih stanica se kretala oko  $1.3 \pm 0.4$  u spinalnom

gangliju te  $1.6 \pm 0.5$  među živčanim vlaknima dok su u lažnoj pokusnoj i kontrolnoj grupi zabilježene samo sporadične imunopozitivne stanice.

Hiperalgezijski odgovor pojačavao se kroz vrijeme usprkos tome što je četvrti dan nakon ozljede gustoća imunopozitivnih stanica počela opadati.

Ovi rezultati ukazuju da upala ima značajnu ulogu u nastanku neuropatske boli, te da je s ciljem točnog odabira ispitanika za mehanicistička istraživanja neophodno razlikovati eksperimentalne životinje koje su zadovoljavajuće razvile neuropatsku bol od onih koje je nisu razvile.

## 8. SUMMARY

### **Association of Neural Inflammation with Hyperalgesia Following Spinal Nerve Ligation**

Aim: To explain the variability in the behavioral response after spinal nerve ligation, we examined the relation between the development of the neuropathic pain and the expression of inflammatory indicators; the increase of glial fibrillary acid protein (GFAP primary antibodies) expression, rat C3 complement receptor (OX-42 primary antibodies), and the presence of T lymphocytes (Pan-T primary antibodies) in dorsal root ganglia and spinal nerve.

Methods: Ninety-six male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to the modified spinal nerve ligation, sham, and control group. Hyperalgesia behavioral testing identified rats that have successfully developed neuropathic pain (responders) and those which did not (non responders). The extent of neuroinflammation in the two groups was assessed by immunohistochemical staining of dorsal root ganglions.

Results: GFAP and OX-42 immunopositive cell density in the DRG and spinal nerve was significantly higher in hyperalgesic animals (GFAP: responders  $4.0 \pm 0.6$ , non responders  $2.8 \pm 0.8$ ,  $Z = -3.965$ ,  $P < 0.001$ ; OX-42: responders  $7.7 \pm 1.0$ ; non responders  $4.8 \pm 1.8$ ,  $Z = -2.572$ ,  $P = 0.01$ ). With Pan-T antibodies, only occasional lymphocytes were identified. Hyperalgesic behavior progressively increased during the testing period, although immunopositive cell density peaked on day 4 post-injury and progressively decreased afterwards.

Conclusion: These results suggest that inflammation has a decisive role in initiating neuropathic pain. Also, this study confirms that for the sake of selecting appropriate subjects for mechanistic study, it is necessary to discriminate experimental subjects that develop pain satisfactorily from those which do not.

## 9. LITERATURA

1. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:129-36.
2. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52:77-92.
3. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:23-37.
4. Boivie J, Leijon G, Johansson I. Central post-stroke pain-a study of the mechanisms through analyses of the sensory abnormalities. *Pain* 1989;37:173-85.
5. Pezerović Dž, Gamulin S. Patofiziološka podloga boli. In: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, editors. *Patofiziologija*. 5 ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2002: p. 401-12.
6. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.
7. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-18.
8. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50(3):355-63.
9. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S, Colburn RW, Fromm C, Wagner R, Twitchell BB. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain* 1994;56:9-16.

10. Na HS, Han JS, Ko KH, Hong SK. A behavioral model for peripheral neuropathy produced in rat's tail by inferior caudal trunk injury. *Neurosci Lett* 1994;177:50-2.
11. Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 1997;113:200-6.
12. Wall PD, Gutnick M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature* 1974;248:740-3.
13. Torebjork HE, Lundberg LE, LaMotte RH. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol* 1992;448:765-80.
14. Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain* 1988;35:313-26.
15. Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109:150-61.
16. Ahlgren SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats is not sympathetically maintained. *Brain Res* 1993;616:171-5.
17. Mersky H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl* 1986;3:S1-226.
18. Devor M. Sensory basis of autotomy in rats. *Pain* 1991;45:109-10.
19. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150:971-9.



20. Devor M. Neuropathic pain: what do we do with all these theories? *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:1121-7.
21. Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, Ji RR, Acheson A, Lindsay RM, Wilkinson GA, Woolf CJ. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9385-90.
22. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765-9.
23. Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 1979;185:211-20.
24. Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 1983;306:686-8.
25. Liu CN, Raber P, Ziv-Sefer S, Devor M. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. *Neuroscience* 2001;105:265-75.
26. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:521-32.
27. Piani D, Fontana A. Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage- induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* 1994;152:3578-85.
28. Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain* 1999;Suppl 6:S27-35.
29. Perry VH, Andersson PB, Gordon S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 1993;16:268-73.

30. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain* 2001;93:201-5.
31. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 2001;24:450-5.
32. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19:312-8.
33. Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull* 1999;49:419-27.
34. Svensson M, Eriksson P, Persson JK, Molander C, Arvidsson J, Aldskogius H. The response of central glia to peripheral nerve injury. *Brain Res Bull* 1993;30:499-506.
35. Eriksson NP, Persson JK, Svensson M, Arvidsson J, Molander C, Aldskogius H. A quantitative analysis of the microglial cell reaction in central primary sensory projection territories following peripheral nerve injury in the adult rat. *Exp Brain Res* 1993;96:19-27.
36. Hu P, McLachlan EM. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. *Neuroscience* 2002;112:23-38.
37. Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 2003;23:1026-40.
38. Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994;59:369-76.

39. Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 1997;79:163-75.
40. Waldmann R, Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:418-24.
41. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 1995;75:125-31.
42. Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 1995;26:1-16.
43. Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:141-7.
44. Burnstock G, Wood JN. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:526-32.
45. DeLeo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 2001;90:1-6.
46. Jeanjean AP, Moussaoui SM, Maloteaux JM, Laduron PM. Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. *Neuroscience* 1995;68:151-7.
47. Inoue M, Shimohira I, Yoshida A, Zimmer A, Takeshima H, Sakurada T, Ueda H. Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:308-13.
48. Sugiura S, Lahav R, Han J, Kou SY, Banner LR, de Pablo F, Patterson PH. Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to

injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur J Neurosci* 2000;12:457-66.

49. Watkins LR, Maier SF. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *J Intern Med* 2005;257:139-55.

50. Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2001;103:529-39.

51. Arruda JL, Sweitzer S, Rutkowski MD, DeLeo JA. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res* 2000;879:216-25.

52. Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier F, Watkins LR. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 2000;861:105-16.

53. Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* 1998;18:7008-14.

54. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 1995;63:289-302.

55. Souter AJ, Garry MG, Tanelian DL. Spinal interleukin-1beta reduces inflammatory pain. *Pain* 2000;86:63-8.

56. Xu JT, Xin WJ, Zang Y, Wu CY, Liu XG. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain* 2006;123:306-21.
57. Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, Lee JE, Tilders FJ, Maier SF, Watkins LR. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 1999;19:2799-806.
58. Sweitzer SM, Hickey WF, Rutkowski MD, Pahl JL, DeLeo JA. Focal peripheral nerve injury induces leukocyte trafficking into the central nervous system: potential relationship to neuropathic pain. *Pain* 2002;100:163-70.
59. Sheth RN, Dorsi MJ, Li Y, Murinson BB, Belzberg AJ, Griffin JW, Meyer RA. Mechanical hyperalgesia after an L5 ventral rhizotomy or an L5 ganglionectomy in the rat. *Pain* 2002;96:63-72.
60. Ma C, Shu Y, Zheng Z, Chen Y, Yao H, Greenquist KW, White FA, LaMotte RH. Similar electrophysiological changes in axotomized and neighboring intact dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2003;89:1588-602.
61. Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, Meller ST. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1993;54:57-69.
62. George R, Griffin JW. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp Neurol* 1994;129:225-36.
63. Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 1988;239:290-2.
64. Hunig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that

induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med* 1989;169:73-86.

65. Hogan Q, Sapunar D, Modric-Jednacak K, McCallum JB. Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 2004;101:476-87.

66. Kontinen VK, Paananen S, Kalso E. The effects of the alpha2-adrenergic agonist, dexmedetomidine, in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain in rats. *Anesth Analg* 1998;86:355-60.

67. Cui JG, Holmin S, Mathiesen T, Meyerson BA, Linderoth B. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain* 2000;88:239-48.

68. Ali Z, Meyer RA, Belzberg AJ. Neuropathic pain after C7 spinal nerve transection in man. *Pain* 2002;96:41-7.

69. Hu P, McLachlan EM. Inflammation in sympathetic ganglia proximal to sciatic nerve transection in rats. *Neurosci Lett* 2004;365:39-42.

70. Inoue K, Tsuda M, Koizumi S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J Pharmacol Sci* 2004;94:112-4.

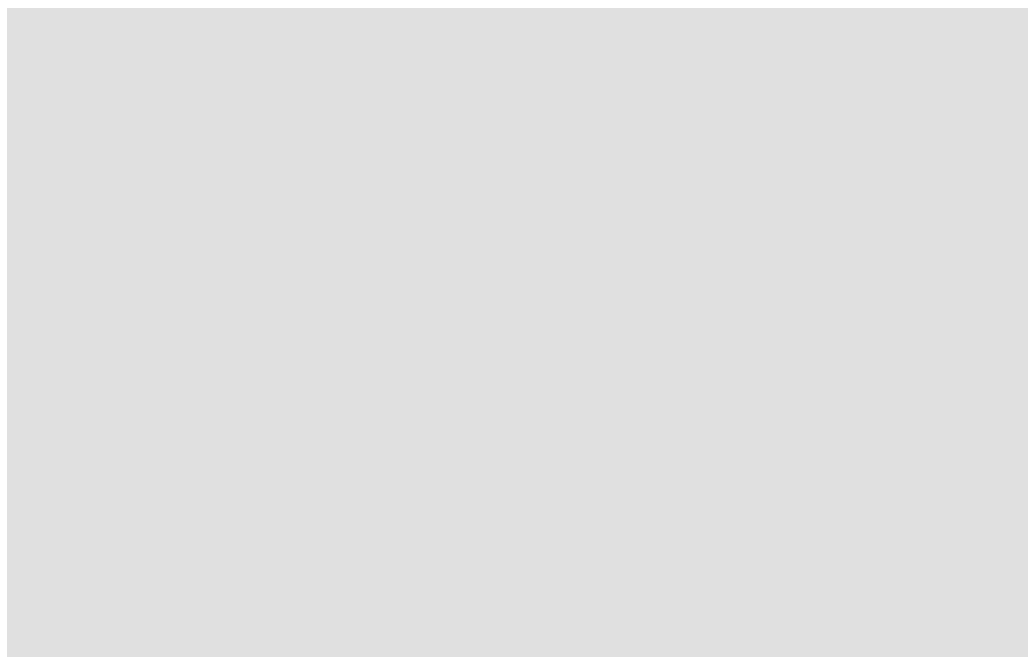
71. Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol* 2001;439:127-39.

72. Lu X, Richardson PM. Responses of macrophages in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J Neurocytol* 1993;22:334-41.

73. Schreiber RC, Shadiack AM, Bennett TA, Sedwick CE, Zigmond RE. Changes in the macrophage population of the rat superior cervical ganglion after postganglionic nerve injury. *J Neurobiol* 1995;27:141-53.
74. Smith ML, Jr., Adrian EK, Jr. On the presence of mononuclear leucocytes in dorsal root ganglia following transection of the sciatic nerve. *Anat Rec* 1972;172:581-7.
75. Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* 2007;21:599-616.
76. Hu P, McLachlan EM. Distinct functional types of macrophage in dorsal root ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. *Exp Neurol* 2003;184:590-605.
77. Kim HJ, Back SK, Kim J, Sung B, Hong SK, Na HS. Increases in spinal vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y are not sufficient for the genesis of neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 2003;342:109-13.
78. Yoon YW, Lee DH, Lee BH, Chung K, Chung JM. Different strains and substrains of rats show different levels of neuropathic pain behaviors. *Exp Brain Res* 1999;129:167-71.
79. Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 1999;80:67-82.

## 10. ŽIVOTOPIS

LJUBO ZNAOR



Osnovnu školu i opću gimnaziju sam završio u Splitu. Studij medicine upisao sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Padovi (Italija) 1994. godine. Tijekom cijelog studija sam bio stipendist grada Splita i Sveučilišta u Padovi. Šestu godinu studija sam pohađao kao stipendist Europske unije na Medicinskom fakultetu, Universidad autonoma u Barceloni (Španjolska). Diplomirao sam 2001. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Padovi.

Po završetku studija upisao sam 2002. godine znanstveni doktorski studij "Temeljne i kliničke znanosti", smjer Klinička medicina pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.



Obvezni liječnički staž obavio sam u KB Split nakon čega sam Državni ispit položio 2003. godine od kada sam i član Hrvatske liječničke komore.

Od 2004. godine radim u KBC Split na Klinici za očne bolesti u svojstvu specijalizanta. Pišem i govorim tri strana jezika: engleski, talijanski i španjolski.

Autor sam više znanstvenih radova u indeksiranim časopisima.

Osim Hrvatske liječničke komore, član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog oftalmološkog društva, te American Academy of Ophthalmology.