

# Uloga eksperimentalno izazvane denervacije na morfologiju kože štakora

---

**Restović-Dujmović, Ivana**

**Scientific master's theses / Magistarski rad**

**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:171:263644>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu**

**Medicinski fakultet**

**Ivana Restović-Dujmović**

**ULOGA EKSPERIMENTALNO IZAZVANE DENERVACIJE NA  
MORFOLOGIJU KOŽE ŠTAKORA**

**Magistarski rad**

**Split, 2007.**

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

Voditelj rada: prof.dr.sc. Damir Sapunar

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Damiru Sapunaru na stručnoj pomoći, korisnim savjetima i velikom strpljenju pri izradi ovog magistarskog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem mladoj znanstvenici Sanji Lovrić-Kojundžić, dr. med. na stručnoj i prijateljskoj pomoći i podršci.

Gospođi Asji Miletić hvala za stručnu pomoć pri izradi histoloških preparata, kao i svim dobrim i dragim ljudima sa Zavoda.

**Za moju obitelj,  
mog supruga i sina, i moje roditelje  
što ste bili tu,  
Uvijek  
za mene**

## SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Koža	1
1.1.1. Histološka građa kože	1
1.1.2. Krvna opskrba kože	3
1.2. Inervacija kože	4
1.2.1. Autonomna inervacija	5
1.2.2. Eferentna inervacija	5
1.2.3. Aferentna inervacija	6
1.2.4. Osjetni organi kože	7
1.3. Inervacija kože u eksperimentalnim modelima neuropatske boli	11
1.3.1. Neuropatska bol	11
1.3.2. Eksperimentalni modeli neuropatske boli	13
1.3.3. Nervus ischiadicus	14
1.3.4. Dermatomi	17
1.3.4.1. Dermatomi štakora	17
1.4. Denervacija kože	19
1.4.1. Morfološke promjene u koži uslijed denervacije	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. METODE I MATERIJAL	23
3.1. Eksperimentalne životinje	23
3.2. Eksperimentalni modeli izazivanja neuropatske boli	23
3.3. Ispitivanje ponašanja životinja	24
3.4. Histološke metode	24
3.5. Morfometrija	25
3.6. Imunofluorescencijske metode	27
3.7. Statistika	27

4. REZULTATI	28
4.1. SNL i CCI modeli izazivaju smanjenje debljine epidermisa kože	28
4.2. Lateralna strana šape pokazala je veće stanjenje epidermisa u odnosu na medijalnu stranu	30
4.3. Odnos debljine kože i ponašanja životinja	32
4.4. PGP/9.5 imunoreaktivna vlakna u koži	37
4.5. Pet tjedana nakon denervacije	38
5. RASPRAVA	40
5.1. Denervirana kože nastala primjenom SNL i CCI modela uzrokuje smanjenje debljine epidermisa	40
5.2. Uslijed denervacije kože epidermalna vlakna nestaju	42
5.3. Epidermalno stanjenje je izraženije na lateralnoj nego na medijalnoj strani šape	44
5.4. Hiperalgizija kao odgovor na denervaciju kože	45
6. ZAKLJUČCI	47
7. SAŽETAK	48
8. SUMMARY	49
9. LITERATURA	50
10. ŽIVOTOPIS	55

## 1. UVOD

### 1.1.Koža

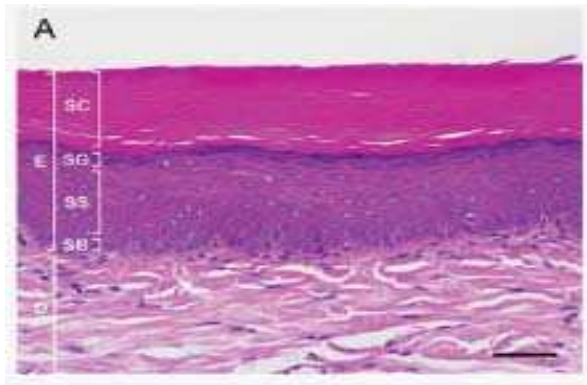
#### 1.1.1. Histološka građa kože

Koža je glavni osjetilni organ ljudskog tijela, s područjima različite osjetljivosti koja reagiraju na različite podražaje [1]. To je ujedno najveći i najteži organ u tijelu. Na kožu otpada 16% ukupne tjelesne težine, a prekriva površinu od 1,2 do 2,3 m<sup>2</sup>. Bogato je inervirana i djeluje kao osjetni organ za komunikaciju s okolišem te štiti organizam od ozljeda. Vanjski sloj je nepropustan za vodu što sprječava preveliki gubitak vode isparavanjem [1, 2].

Koža se sastoji od dva sloja: epidermisa, epitelnog sloja ektodermalnog podrijetla i korijuma (dermisa), sloja vezivnog tkiva mezodermalnog podrijetla. Granica između ta dva sloja nije pravilna jer izdanci korijuma (papile) ulaze u izbočine epidermisa tzv. epidermalne grebene. Ispod korijuma nalazi se subkutis ili potkožno tkivo. To je sloj rahlog vezivnog tkiva koje sadrži reznjiće masnog tkiva. Potkožno tkivo se ne smatra dijelom kože, ono rahlo spaja kožu s podlogom i anatomske odgovara površinskoj fasciji. Ukupna debljina kože različita je ovisno o području pa razlikujemo debelu i tanku kožu. Debela koža je glatka, nalazi se na dlanovima i tabanima, a tanka koža je dlakava, te čini preostali dio kože [2]

Epidermis je sastavljen od oroženog mnogoslojnog pločastog epitela koji pored keratinocita sadrži tri posebne vrste stanica: melanocite, Langerhansove i Merkelove stanice. Keratinociti su orožene epitelne stanice koje čine glavninu epidermisa. Od korijuma prema površini epidermis se sastoji od pet slojeva stanica koji stvaraju roževinu ili keratin. To su: temeljni sloj (stratum basale), nazubljeni sloj (stratum spinosum), zrnati sloj (stratum

granulosum), svijetli sloj (stratum lucidum) i rožnati sloj (stratum corneum) (Slika 1.). Epidermis čovjeka obnavlja se svakih 15-30 dana ovisno o dobi, području tijela i drugim čimbenicima. Obnavljanje epidermisa omogućuju neprekidne diobe stanica u temeljnom i nazubljenom sloju, tzv. Malpighijevom sloju [2].



**Slika 1.** Histološka građa kože. Na slici se vidi epidermalni sloj (E), koji se sastoji od četiri sloja: temeljni sloj (SB), nazubljeni sloj (SS), zrnati sloj (SG) i rožnati sloj (SC). Osim epidermisa vidi se i područje korijuma (C).

Melanociti su stanice u kojima se stvara pigment kože. Za boju kože najvažnija je količina melanina i karotena, broj krvnih žila u korijumu te boja krvi koja u njima teče. Melaninska zrnca sintetiziraju se u melanocitima, te se preko citoplazmatskih izdanaka prenose u citoplazmu susjednih keratinocita. Langerhansove stanice su zvjezdolike stanice u nazubljenom sloju epidermisa. One sudjeluju u imunološkim reakcijama kože. Djeluju kao makrofazi koji vezuju antigene i predočuju ih T-limfocitima. Merkelove stanice su mehanoreceptori kože koji se najčešće nalaze u debeloj koži tabana i dlanova. U derivate epidermisa ubrajaju se dlake, nokti te žlijezde lojnice i znojnice [2].

Korijum je građen od vezivnog tkiva koje podupire epidermis i povezuje ga s potkožnim tkivom. Tijekom embrionalnog razvoja korijum određuje diferencijaciju



epidermisa iznad sebe. Korijum se sastoji od dva sloja: gornjeg papilarnog i donjeg retikularnog sloja. Papilarni sloj je građen od rahlog, a retikularni od gustog vezivnog tkiva. Između temeljnog sloja epidermisa i papilarnog sloja korijuma nalazi se bazalna lamina ispod koje je fina mreža retikularnih vlakana koji zajedno čine bazalnu membranu [2].

### **1.1.2. Krvna opskrba kože**

Krv ulazi u kožu kroz mišiće i potkožno tkivo preko arteriola koje tvore dva spleta. Jedan se nalazi između papilarnog i retikularnog sloja, a drugi između korijuma i potkožnog tkiva. Vene su raspoređene u tri spleta, dva na mjestima arterijskih spletova i treći u sredini korijuma. U korijumu se nalazi gusta mreža krvnih i limfnih kapilara. Naime, krvne žile korijuma mogu primiti 4,5% ukupnog volumena krvi. Bogata kapilarna mreža u papilarnom sloju okružuje epidermalne grebene i sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature i prehrani epidermisa, koji nema vlastitih krvnih žila [2]. U nekim područjima kože krv direktno prelazi iz arterija u vene arterijsko-venskim anastomozama što ima važnu ulogu u regulaciji temperature i krvnog tlaka. Protok krvi kroz kožu je reguliran potrebom za gubitkom topline ili njenim zadržavanjem, a u nekim dijelovima tijela i emocionalnim stanjem. Metabolički zahtjevi kože nisu veliki, i u normalnim uvjetima protok krvi prelazi 10 puta hranidbene potrebe kože. On čini 5% ukupnog srčanog protoka krvi [1]. Limfne žile započinju u papilama korijuma kao slijepe vreće, spajaju se i tvore dva spleta smještena uz arterijske spletove [2].

## 1.2. Inervacija kože

Primanje podražaja iz okoline je jedna od najvažnijih uloga kože. Ona obiluje osjetnim živcima. Slobodni živčani završeci ulaze u epidermis i kožne žlijezde, dok se u korijumu i potkožnom tkivu nalaze posebno građeni receptori. Korijum je bogato inerviran postganglijskim vlaknima iz simpatičkih ganglija paravertebralnog lanca, dok parasimpatičke inervacije nema.

Epidermalna živčana vlakna prolaze kroz subepidermalni pleksus, zalaze duboko u dermalno-epidermalnu bazalnu membranu, a onda prodiru između slojeva keratinocita prema površini kože. Čak se neka pojavljuju u orožnjelom sloju. Epidermalna živčana vlakna predstavljaju nastavak osjetnih neurona, od kojih neki eksprimiraju CGRP (engl. calcitonin gene related protein) i tvar P. Smatra se da epidermalna živčana vlakna prate keratinocite za vrijeme njihove migracije u rožnati sloj [3].

Periferni živci i spinalni korijenovi su mješoviti živci. Njihova živčana vlakna razlikuju se temeljem promjera i brzine provođenja akcijskih potencijala, stoga se aksone perifernih živaca svrstava u tri skupine:

a) A-vlakna, mijelinizirana, somatska aferentna i eferentna vlakna promjera 1-20  $\mu\text{m}$ , brzine vođenja akcijskog potencijala 5-120 m/sec; među A-vlaknima razlikuju se:

- $A\alpha$ -vlakna koja su najdeblja i najbrža,
- $A\beta$ -vlakna koja su tanja i sporija,
- $A\delta$ -vlakna koja su najtanja i najsporija

b) B-vlakna, mijelinizirana eferentna preganglijska vlakna autonomnog živčanog sustava, imaju sličnu brzinu vođenja akcijskih potencijala kao i  $A\delta$ -vlakna

c) C-vlakna, nemijelinizirana vlakna koja mogu biti C-vlakna dorzalnih korijena (promjer 0,4-1,2  $\mu\text{m}$ , a brzina vođenja 0,6-2 m/sec) ili preganglijska eferentna simpatička C-vlakna (promjer 0,3-1,3  $\mu\text{m}$ , a brzina vođenja 0,7-2,3 m/sec)

### **1.2.1. Autonomna inervacija kože**

Autonomni živčani sustav regulira i koordinira pojedine funkcije organizma važne za održavanje života. Ovaj sustav ne prima samo podražaje iz organizma, nego i iz okoline. Svi podražaji koji se zamjećuju osjetilima odražavaju se i na vegetativnom živčanom sustavu. U autonomnom živčanom sustavu također postoje aferentna i eferentna vlakna. Aferentna vlakna se ni morfološki ni funkcionalno ne razlikuju od aferentnih vlakana u moždinskim živcima. Eferentna vlakna se međutim razlikuju od eferentnih vlakana somatskog sustava time što isto vlakno ne dolazi neprekinuto do izvršnog organa. U tok eferentnog vlakna vegetativnog sustava uvijek je uklopljen bar jedan ganglij. Zato eferentni krak ima najmanje dva neurona [4].

### **1.2.2. Eferentna inervacija kože**

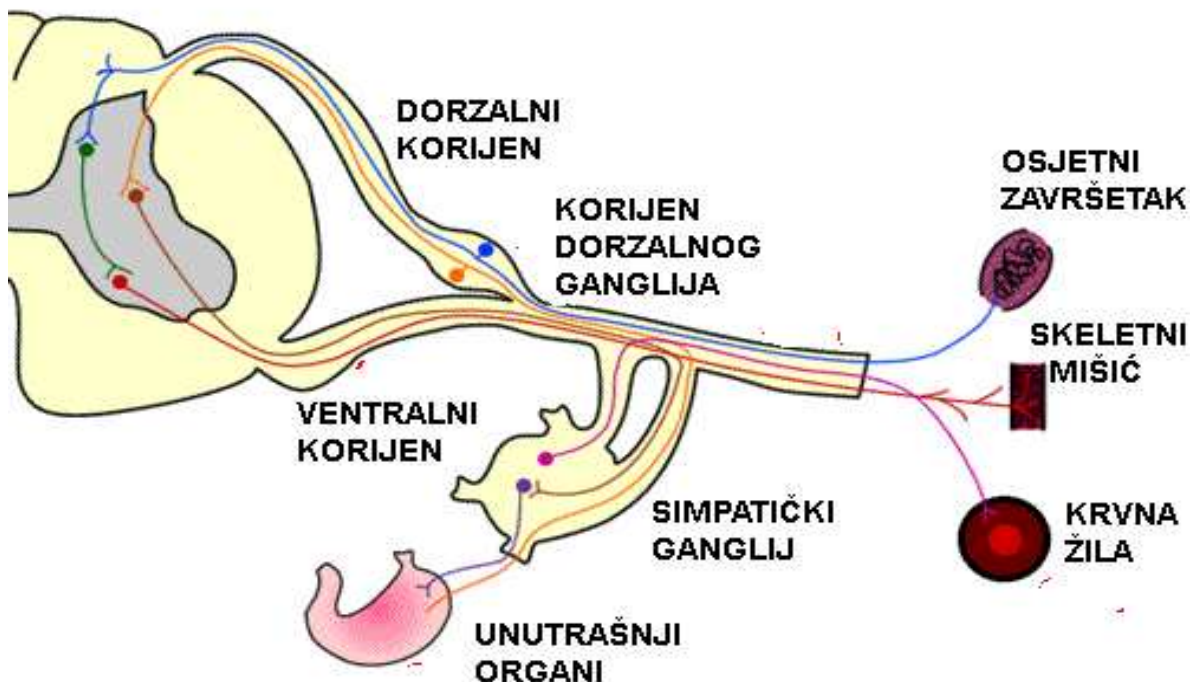
Eferentna autonomna vlakna su noradrenergična i kolinergična nemijelinizirana vlakna koja inerviraju arteriole, mišiće dlaka i mioepitelocitne stanice. Aktivnost autonomnih eferentnih vlakana je uglavnom povezana s regulacijom gubitka topline vazodilatacijom i vazokonstrukcijom, produkcijom znoja i (samo u ljudi) "kostriješanjem" dlaka [1].

Eferentni dio autonomnog živčanog sustava sastoji se od preganglijskih neurona (čija tijela su smještena u lateralnom rogu kraljezničke moždine – *columna intermediolateralis*), te od postganglijskih neurona, čija tijela su smještena u paravertebralnim (*ganglion trunci sympathici*) i paravertebralnim (*ganglion paravertebrale*) autonomnim ganglijima

### 1.2.3. Aferentna inervacija kože

Primarni aferentni neuroni su pseudounipolarne stanice (Slika 2.). Njihova tijela su smještena u spinalnim ganglijima (ili u kranijalnim ganglijima u slučaju moždanih živaca). Akson tih neurona je primarno aferentno vlakno, a dijeli se na dva kraka, tj. nastavka:

- a) periferni nastavak koji je izravno povezan s perifernim osjetnim receptorom (npr. s Pacinijevim tjelešcom, učahurenim mehanoreceptorom) ili sam predstavlja osjetni receptor (slobodni živčani završetak)
- b) centralni nastavci, čine dorzalne korijenove, tj. onaj dio primarnog aferentnog vlakna što završava u središnjem živčanom sustavu. Aferentna živčana vlakna tvore površinsku mrežu oko folikula dlaka, ali inerviraju i učahurene osjetne organe (Meissnerova i Paccinijeva tjelešca). Folikuli dlaka obavijeni su gustom mrežom živčanih završetaka kojima se prenosi osjet laganog dodira [5].



**Slika 2.** Shematski prikaz djelovanja aferentnog sustava

#### 1.2.4. Osjetni organi kože

Osjetni receptori pretvaraju fizikalni ili kemijski podražaj u živčane impulse koji prema mozgu putuju kao akcijski potencijali primarnih aferentnih vlakana. Taj proces je prevođenje podražaja (engl. stimulus transduction). Svaki osjetni receptor ima svoje receptivno polje unutar kojeg se nalazi i unutar kojega prevodi podražaje. Osjet nastaje kombinacijom četiriju značajki: modaliteta, inteziteta, trajanja i lokacije. Osjetni receptori preoblikuju različite oblike energije iz okoline u različite oblike osjeta tj. osjetnih modaliteta. Pet je glavnih modaliteta osjeta: vid, sluh, okus, miris i dodir, te pet vrsta specijaliziranih receptora: kemoreceptori, mehanoreceptori, termoreceptori, fotoreceptori i nociceptori (receptori za bol) [6].

Neovisno o vrsti receptora, sve somatosenzorne informacije prenose se preko neurona spinalnih ganglija. Akson ima dvije grane, jedna se projecira na periferiju, a druga u CNS. Završetak periferne grane aksona je jedini koji prima podražaje. Dva su tipa perifernog završetka. On može biti goli živčani završetak ili može biti kapsuliran ne-neuralnim strukturama. Oni koji su kapsulirani posreduju u tjelesnim osjetima dodira i proprioceptiji, dok neuroni s golim živčanim završecima posreduju kod osjeta boli i topline. Mehanoreceptori i proprioceptori su inervirani mijeliniziranim vlaknima spinalnog ganglija velikog dijametra, koja prenose akcijski potencijal jako brzo. Termoreceptori i nociceptori imaju aksone malog promjera koji su ili nemijelizirani ili s vrlo malo mijelina. Ovi živci prenose impulse jako sporo [5].

**Termoreceptori** su osjetni receptori koji omogućuju svjesni osjet topline i hladnoće, sudjeluju u regulaciji tjelesne temperature tijela, ali i u nekim funkcijama autonomnog živčanog sustava. Kožni termoreceptori su slobodni živčani završeci A $\delta$  ili C-vlakana. Završno razgranjenje svakog ovog vlakna prodire u dermis i stvara točkasto receptivno polje. Dvije su skupine termoreceptora koji bilježe promjene kožne temperature:

- a) termoreceptori za hladno su hladna receptivna A $\delta$ -vlakna koja se aktiviraju pri kožnim temperaturama nižim od normalne površinske kožne temperature (35°C),
- b) termoreceptori za toplo su topla C-vlakna niskog praga podražljivosti i male brzine provođenja koja se aktiviraju kad kožna temperatura postane viša od 30°C. Najjače se aktiviraju pri temperaturi od 39-40°C.

U rasponu od 30-35°C podjednako su aktivna i jedna i druga termoreceptivna vlakna. Na promjene temperature termoreceptori reagiraju prolaznim povećanjem ili smanjenjem živčane aktivnosti [6].

**Nociceptori** su receptori koji reagiraju na podražaje koji oštećuju tkivo. Prag za podražaje im je jako visok, stoga ih aktiviraju tek oni podražaji koji oštećuju tkivo. Kad su jednom aktivirani na podražaje odgovaraju sve snažnije (za razliku od ostalih kožnih receptora), tako da bol može trajati satima pa i danima. Tri su glavne vrste boli:

1. brza, oštra, štipajuća ili sjekuća bol koja se prenosi A $\delta$ -vlaknima, točno je lokalizirana i brzo prolazi,
2. žareća, pekuća bol, prenosi se C-vlaknima, dugotrajnija je i slabije je lokalizirana,
3. duboka, probadajuća, tupa i difuzna bol iz utrobnih organa i potkožnih tkiva, mišića i zglobova, prenosi se C-vlaknima nociceptora dubokih tkiva

Dvije su glavne vrste nociceptora u koži:

- a) mehanički nociceptori su slobodni završeci primarnih aferentnih A $\delta$ -vlakana visokog praga podražljivosti i velike brzine provođenja. Njihova aktivacija dovodi do osjeta oštre, štipajuće boli.
- b) Polimodalni nociceptori su slobodni završeci C-vlakana niskog praga podražljivosti i male brzine provođenja. Reagiraju na mehaničke, kemijske ili termičke podražaje poput smrzavajuće hladnoće (manje od 10°C), visoke temperature (više od 45°C), jakih kiselina i lužina [6].

Mehaničko podraživanje kože uzrokuje različite oblike svjesnog osjeta, od blagog šakljanja do bolnog pritiska. Mehanička deformacija kože je primjereni podražaj za osjet dodira. **Mehanoreceptori** se stoga razvrstavaju na temelju njihove sposobnosti da signaliziraju jačinu, brzinu i usmjerenost podražaja. Kožni mehanoreceptori su:

- a) slobodni živčani završeci (A $\delta$ -vlakna),
- b) učahureni završeci (Paccinijeva, Meissnerova, Krauseova i Ruffinijeva tjelešca),
- c) receptori oko folikula dlaka i Merkelove ploče.

Prema smještaju mehanoreceptori mogu biti površinski (kožni) i dubinski (potkožni), a prema fiziološkim obilježjima mogu biti brzoadaptirajući (RA - od engl. rapidly adapting) i sporoadaptirajući (SA - od engl. slowly adapting) mehanoreceptori [6].

Dlakava i koža bez dlake (jagodice prstiju, tabani, dlanovi i usne) se razlikuju po vrsti mehanoreceptora koje posjeduju. Zajedničke su im Merkelove ploče kao SA površinski receptor, te Paccinijeva tjelešca kao RA potkožni receptor. Dlakava koža kao SA potkožni receptor ima Ruffinijeva tjelešca, a kao površinski RA receptor ima receptore folikula dlake. Najvažniji osjetni organ za dodir u čovjeka je koža bez dlaka dlanova i prstiju, stoga se na jagodicama prstiju nalaze 4 glavne vrste mehanoreceptora. Kožni RA receptor je Meissnerovo tjelešce, a SA receptor je Merkelova ploča. Potkožni RA je Paccinijevo, a SA receptor je Ruffinijevo tjelešce.

Meissnerovo tjelešce i Merkelove ploče imaju mala receptivna polja, dok potkožni Paccinijevi i Ruffinijevi receptori imaju velika receptivna polja. Podraživanje Meissnerovih tjelešaca uzrokuje svjesni osjet blagog podrhtavanja kože, dok podraživanje Paccinijevih tjelešaca uzrokuje osjet vibracije. RA receptori daju informacije o vremenskom slijedu mehaničkih podražaja, dok SA kožni receptori točno lociraju podražaj. Potkožni SA receptori, Ruffinijeva tjelešca pružaju informacije i o položaju i jačini podražaja [6].

**Propriocepcijom** se smatra svjesni osjet položaja (statička propriocepcija) i kretanja tijela (dinamička propriocepcija). Ova vrsta osjeta bitna je za odražavanje ravnoteže tijela, za nadzor nad pokretima udova te za procjenu oblika predmeta na temelju opipa. Tri su glavne vrste mehanoreceptora koji omogućuju ovaj osjet:

- a) mišićna vretena
- b) mehanoreceptori smješteni u zglobnim čahurama
- c) kožni mehanoreceptori

Put kojim se prenose informacije mehanoreceptorima je somatotropan, tj. svaki djelić kože je povezan s točno određenim skupinama neurona u produljenoj moždini, talamusu i moždanoj kori. To znači da svaki neuron ima odgovarajuće receptivno polje na tjelesnoj površini, odnosno da je većina tih neurona povezana s točno određenom vrstom mehanoreceptora [6].



## 1.3. Inervacija kože u eksperimentalnim modelima neuropatske boli

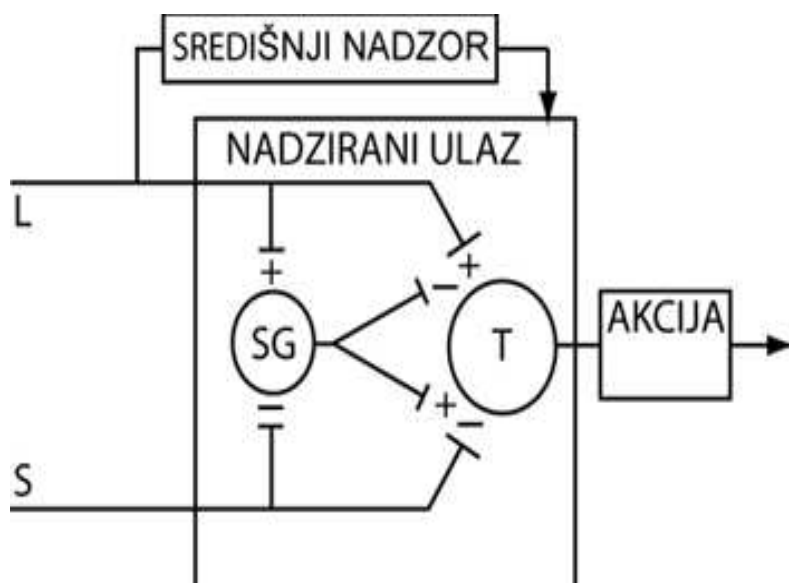
### 1.3.1. Neuropatska bol

Kao posljedica ozljede perifernih živaca i gubitka aferentne somatosenzorne funkcije razvija se neuropatska bol [7]. Značajke te boli su spontana bol, bol izazvana podražajem koji inače ne boli (alodinija) ili pretjerani odgovor na umjereno bolni podražaj (hiperalgezija).

Mehanizam nastanka neuropatske boli nije potpuno razjašnjen [8, 9]. Pretpostavlja se da je neuropatska bol izazvana različitim etiološkim faktorima koji pokreću veliki broj različitih mehanizama koji djeluju na različitim mjestima i u različito vrijeme. Da bi se razumjeli ti mehanizmi i nastanak neuropatske boli, razvijeno je nekoliko životinjskih modela periferne ozljede živca koji oponašaju simptome karakteristične za kliničku sliku neuropatske boli [7].

Jedna od teorija razvoja neuropatske boli je teorija Nadziranog ulaza (engl. Gate control theory) (Slika 3.). Patric Wall i Ronald Melzack su 1965. g. Predložili su da se prijenos osjeta boli može modulirati promjenom ravnoteže aktivnosti između nociceptivnih i dugih ulaznih osjetnih informacija na razini dorzalnog roga kralježnične moždine [10]. Za takvu modulaciju prijenosa boli potrebna je interakcija četiri skupine neurona tj. aferentnih vlakana:

1. C-vlakana
2. A-vlakana koja nisu nocicepcijska ( $A\beta$  i  $A\alpha$ ) – prenose osjetne informacije na projekcijske neurone
3. sekundarnih osjetnih (projekcijskih) neurona dorzalnog roga
4. inhibicijskih interneurona dorzalnog roga (nadziru tijekom nocicepcijskih informacija od prvog do drugog neurona osjetnog puta za bol)

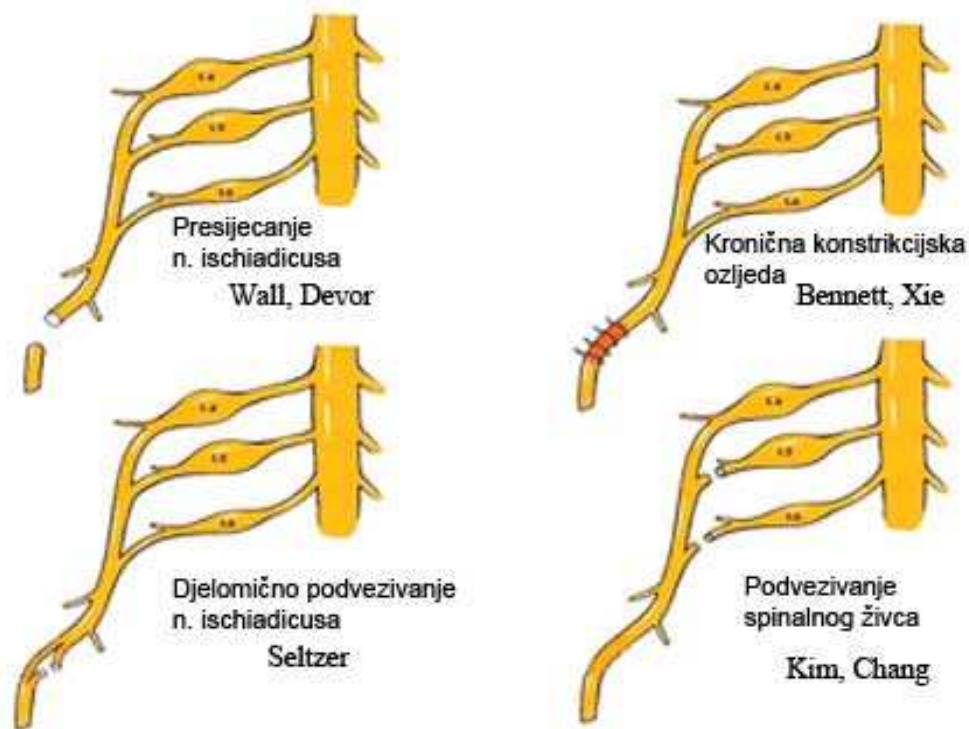


**Slika 3.** Shematski prikaz teorije Nadziranog ulaza. Inhibicijski interneuron je spontano aktivan (neurotransmiter je encefalin) i normalno inhibira projekcijski osjetni neuron pa time prigušuje osjet boli. A-vlakna ekscitiraju, a C-vlakna (i vjerojatno A $\delta$ -vlakna) inhibiraju interneuron. Zato C-vlakna djeluju na projekcijski neuron i izravno i neizravno preko inhibicijskog interneurona pojačavaju prijenos tj. intezitet osjeta boli. U prvom slučaju ekscitiraju projekcijski neuron, a u drugom inhibiraju inhibicijski neuron s čime disinhibiraju projekcijski neuron tj. facilitiraju njegovu aktivnost. A $\alpha$ /A $\beta$ -vlakna ekscitiraju inhibicijski interneuron što povećava inhibiciju projekcijskog neurona. Kada su aktivirana ova vlakna (tj. mehanoreceptori niskog praga) smanjena je aktivnost projekcijskog sekundarnog neurona i time je ublažen osjet boli. Aktivacijom mehanoreceptora istovremeno s nociceptorima aktivira se inhibicijski interneuron i time se smanjuje aktivnost projekcijskog neurona. U ovom modelu interneuroni djeluju kao "vrata za protok informacija" pa se zato ova teorija i naziva teorijom "nadziranog ulaza"[6].

Neke neuropatije se razvijaju na opisani način, ali mnoge i ne. Danas je jasno da se mnoge promjene nakon ozljede živca moraju dogoditi i u perifernom i središnjem živčanom sustavu [7].

### 1.3.2. Eksperimentalni modeli neuropatske boli

Tri najčešće korištena modela neuropatske boli su: kronična konstriksijska ozljeda, CCI [11], djelomično podvezivanje ishijadičnog živca [12] i L5 i L6 podvezivanje spinalnog živca [13]. Svi ovi modeli baziraju se na djelomičnoj ozljedi živca (Slika 4.).



**Slika 4.** Shematski prikazi eksperimentalnih modela neuropatske boli

Ozljede nervus ischiadicus su najčešće istraživane ozljede jer n. ischiadicus inervira plantarnu stranu šape u štakora. Živci distalno od odsječenog kraja degeneriraju [14]. Međutim, kompletna ozljeda živca nije praktična za ispitivanje ponašanja životinja jer izaziva motornu slabost i autotomiju (samoozljeđivanje). Zato se pokušalo napraviti model djelomične ozljede živca. Takvi pokušaji uključivali su labavo podvezivanje ili kroničnu konstrikciju ishijadičnog živca tako da ozljeda nastane samo na nekim aksonima [15]. Kao posljedica ozljede u CCI modelu smanjena je inervacija kože u području n. ischiadicus.

Nasuprot tome, u čvrstom podvezivanju n. ischiadicusa, dolazi do potpunog gubitka epidermalnih živaca [14]. Oba ova modela onemogućuju analizu netaknutih, neozlijeđenih živčanih vlakana na ponašanje životinja. U oba slučaja stupanj ozljede je teško povezati s promjenama u ponašanju životinja. Model kojeg su razvili Chung i suradnici (SNL) je imao drugačiji pristup [13]. Oni su čvrsto podvezali dva spinalna živca L5 i L6, ostavljajući L4 segment n. ischiadicusa slobodnim.

CCI model, koji podrazumijeva 4 labave ligature n. ischiadicusa, je jedan od najpopularnijih modela neuropatske boli [16, 17]. Pojavljivanje i točnost znakova neuropatije u eksperimentalnih životinja podvrgnutih ovom modelu su vrlo različite, variraju između 10-80%. Nije do kraja razjašnjeno koliko neurona DRG je aksotomizirano u CCI modelu u usporedbi s Chungovim (SNL) i Seltzerovim (PSL) modelom. U Changovom modelu L5 i L6 su aksotomizirani, dok je u Seltzerovom 1/3 do 1/2 dorzalnog dijela spinalnog živca aksotomizirana [18-20].

### **1.3.3. Nervus ischiadicus**

Nervus ischiadicus je najveći živac sakralnog pleksusa. Plexus sacralis (krstačni splet) i plexus lumbalis (slabinski splet) čine plexus lumbosacralis. Plexus lumbosacralis je najveći živčani splet koji tvori osam živaca; L1-L5 i S1-S3.

Plexus lumbalis oblikuju četiri lumbalna živca koja se spajaju ispred rebrenih nastavaka kralješaka i dvanaesti međurebreni živac. Četvrti lumbalni živac daje granu što s L5 tvori medijalno od m. psoasa truncus lumbosacralis koji s prednjim granama krstačnih živaca čini plexus sacralis.

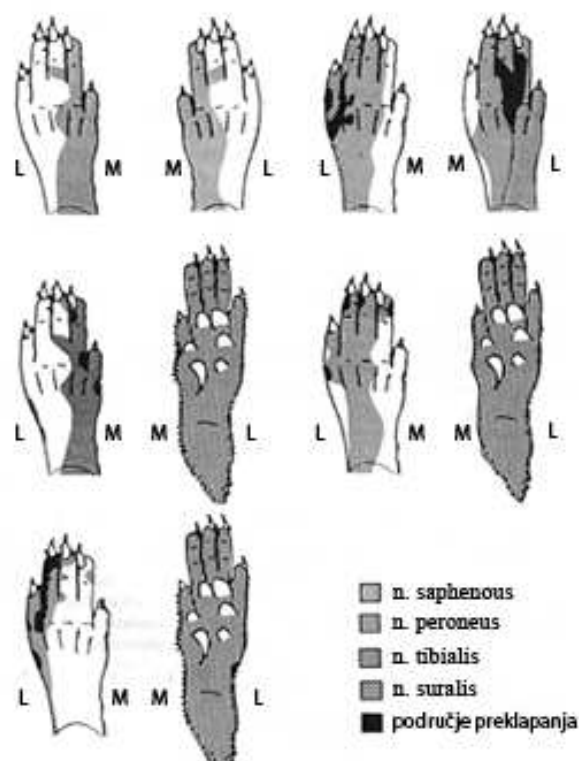
Plexus sacralis je živčani splet na prednjoj strani krstačne kosti i piriformnog mišića. Nastaje spajanjem po jedne grane četvrtog i petog lumbalnog živca, koji tvore truncus lumbosacralis te prvih triju sakralnih živaca. Krstačni živci izlaze iz kanala krstačne kosti i tu

tvore živčani splet. Ogranci sakralnog pleksusa konvergiraju prema velikom ishijadičnom otvoru kroz koji izlaze iz zdjelice prema svojim inervacijskim područjima.

N. ischiadicus istovremeno je i najveći i najdeblji živac u ljudskom tijelu. On je direktni i jedini terminalni nastavak krstačnog spleta. To je mješoviti živac koji izlazi iz zdjelice kroz foramen infrapiriforme. U vrhu poplitealne jame dijeli se na n. tibialis i n. fibularis (peroneus) communis. U oko 28% osoba živčano stablo ishijadičnog živca podijeljeno je na tibijalni i peronealni dio već na izlazu iz zdjelice.

N. ischiadicus inervira motorno stražnju skupinu mišića natkoljenice i sve mišiće potkoljenice i stopala. Senzibilno inervira kožu stražnje strane natkoljenice, posterolateralne i prednje strane potkoljenice [4].

U štakora n. ischiadicus inervira plantarnu stranu glatke kože šape štakora (Slika 5.). Kao miješani živac sadrži motorne, senzorne i simpatičke aksone [21]. Od ukupno 27 000 aksona 6% je mijeliniziranih motornih aksona, 23% mijeliniziranih i 48% nemijeliniziranih senzornih aksona te 23% nemijeliniziranih simpatičkih aksona [22]. N. ischiadicus izvire iz L4-L6 spinalnih ganglija. Grana se prvo na dvije, a onda u 4 grane. Dvije velike su tibijalni i fibularni (peronealni) živac koji opskrbljuju dorzalne i ventralne dijelove stražnje šape, a sadrže uglavnom motorne aksone. Tibijalni dio grana se na tibijalni i suralni živac, a fibularni dio na fibularni živac i grane koje inerviraju mišiće proksimalno-lateralne strane bedra [22]. Neuron korijena dorzalnog ganglija n. ischiadicusa leže u lumbalnom gangliju L3-L6. Približno 98-99% svih neurona leži u L4 i L5, na L6 otpada tek 0,4%, a na L3 1,2% aferentnih neurona [23].



**Slika 5.** Raspored inervacijskih područja živaca šape štakora (L = lateralno, M = medijalno)

Ozljede n. ischiadicusa su najčešće proučavane ozljede. Neuralna struktura n. ischiadicusa u štakora je lako dostupna i koristi se u većini eksperimentalnih modela [23].

Kompletne ozljede n. ischiadicusa nisu praktične za ispitivanje ponašanja životinja jer nakon takve ozljede nastaje motorna slabost i autotomija. Ovo se izbjegava izazivanjem selektivnih ozljeda pojedinačnog spinalnog živca (L4-L6). Kako L4 sadrži mnoštvo motornih vlakana, njegova ozljeda može izazvati motornu slabost što može poremetiti ispitivanje ponašanja. Ozljeda L5 i/ili L6 spinalnog živca izaziva brzu, robusnu bol bez autotomije ili motorne slabosti [24].

### **1.3.5. Dermatomi**

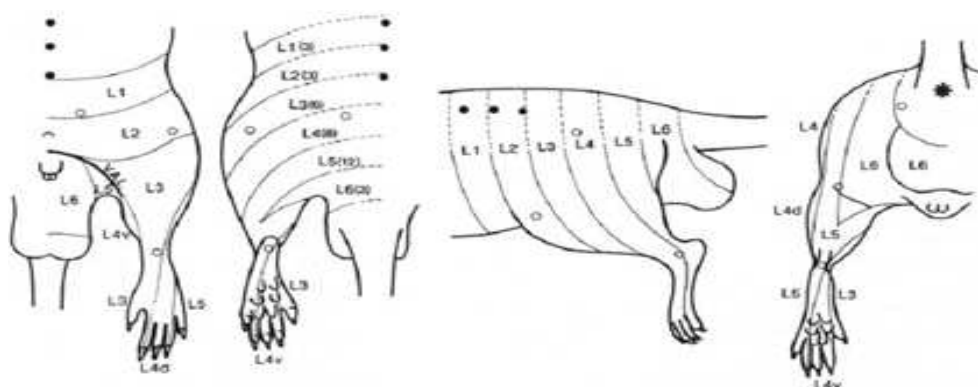
Područje kože inervirano živčanim vlaknima pojedinačnog dorzalnog korijena naziva se dermatom. Proučavanjem senzornih i refleksnih odgovora koji nastaju nakon ozljede dorzalnih korijena napravljena je mapa distribucije dermatoma [5]. Mape dermatoma su vrlo važan dijagnostički alat za lociranje mjesta ozljede jer pokazuju raspored pojedinačnih senzornih neurona u koži [5, 25]. Dermatomi su vrlo pravilno raspoređeni po tijelu, ali granice među njima nisu stroge. Naime, pojedinačni periferni živci daju aksone za nekoliko dorzalnih korijena što dovodi do preklapanja u područjima koja inerviraju isti segment. Ozljeda dorzalnog korijena često rezultira smanjenom osjetljivošću područja koje inervira taj živac. Nasuprot tome presijecanje distalnog dijela perifernog živca rezultira potpunim gubitkom senzornih receptora u području inervacije tog živca [5].

#### **1.3.5.1. Dermatomi štakora**

Koža šape štakora inervirana je n. saphenusom, tibialnim, suralnim i fibularnim (peronealnim) živcem. Poznato je da n. saphenus i n. ischiadicus djelomično inerviraju isto područje kože [26]. Poznavanje dermatoma u štakora osnova je za istraživanje osjetnih putova i somatotopske organizacije središnjeg živčanog sustava. Poznato je da se električnom stimulacijom aksona perifernih živaca posebice C-vlakana povećava vaskularna permeabilnost kože. Ovakva estravazacija plazme se može pratiti nakon intravenske injekcije Evansovog modrila. Područje estravazacije odgovara receptivnom polju stimuliranog živca, te se to područje smatra dermatomom stimuliranog spinalnog živca [25].

Koristeći ovu metodu određeni su dermatomi L1 do L6 spinalnih živaca u štakora (Slika 6.). Područje L1 dermatoma obuhvaća donji abdomen i trbuh, L2 donji abdomen, preponu i kranijalnu regiju stražnje šape, L3 područje od ventro-lateralne regije stražnje šape

do medijalne regije šape (uključujući 1. i 2. prst). L4 je podijeljen na dva različita dijela, jedan se proteže od lateralne strane stražnje noge do sredine i dorzalne regije šape (uključujući 2., 3. i 4. prst) i drugi koji se proteže od srednje do kaudalne regije bedra do sredine i ventralne regije šape (uključujući 2., 3. i 4. prst). Područje L5 dermatoma je kaudalna i lateralna regija šape (uključujući 4. i 5. prst), dok je L6 u kaudalnoj regiji šape i u skrotumu [25].



**Slika 6.** Dermatomi štakora

Koža stražnje šape štakora je inervirana živcima koji potječu od L2 do L6. Dermatoma je područje koje ima dorzalnu i ventralnu stranu te ventralno-aksijalnu liniju preko koje su dva daleka područja spojena. Tako je L2 dermatom spojen s L6 dermatomom u području donjeg trbuha i prepone. L2 dermatom inervira genitofemoralni živac, a L6 pudendalni živac. Nasuprot tome, raspored dermatoma unutar kaudalne strane stražnje noge je potpuno drugačiji. Sve granične linije potječu od ventralno-aksijalne linije iz tupog kuta. Tako je područje L6 dermatoma u sendviču između desne i lijeve strane L5 dermatoma [27].

Kako su A vlakna u osnovi raspoređena s C-vlaknima unutar istog segmenta, vjerojatno dermatomi A-vlakana nalikuju dermatomima C-vlakana. Područje koje inerviraju A-vlakna perifernih živaca je manje od područja inerviranog C-vlaknima, stoga će i dermatomi A-vlakana imati manje preklapanje [27].



#### 1.4. Denervacija kože

Imunohistokemijskim tehnikama je dokazano da veliki broj nemijeliniziranih živčanih vlakana prelazi dermalno-epidermalnu vezu i zalazi duboko u epidermis. Za epidermalna vlakna smatra se da su aferentna nociceptivna vlakna [28]. Neka od tih vlakana sadrže tvar P ili calcitonin gen-srodan peptid (eng. CGRP – calcitonin gene-related peptide). Ustanovljena su i navodna eferentna svojstva tih vlakana. Npr. denervacija kože može utjecati na regulaciju transkripcije faktora rasta preko bazalnih keratinocita. Drugi indirektni dokaz eferentne uloge je u CGRP pozitivnih vlakana koji u kontaktu s Langerhansovim stanicama u kulturi tkiva mijenjaju njihova antigen prezentirajuća svojstva [28].

Uobičajena pojava nakon prekida aferentne inervacije je nestanak epidermalnih živaca i stanjenje epidermisa [29, 30]. Nakon denervacije stanjenje epidermisa je različito na različitim područjima [30]. Za kompletnu denervaciju potrebno je 48 sati [30]. Denervacijom su oštećeni autonomni, osjetni i motorni živci. Gubitak autonomnih živaca koji inerviraju krvne žile utječe na protok krvi kroz epidermis. Sjajna i tanka koža u pacijenata s oštećenjima perifernih živaca ukazuje na smanjenju autonomnu regulaciju i oštećeni vaskularni protok [29]. Gubitak epidermalnih živaca je uočen u različitim tipovima neuropatija [30].

Osjetni živci prenose podražaje i utječu na održavanje i opstanak organa koje inerviraju. Smatra se da su njihovi nociceptori polimodalni. Tako npr. skup osjetnih živaca koji sadrži CGRP uzrokuju vazodilataciju nakon otpuštanja sa živčanih završetaka. Denervacija smanjuje broj Merkelovih stanica, mehanoreceptora kože. Također je ispitivano da li odnos osjetnih živaca i njihovih ciljnih organa utječe na stanjenje epidermisa. Keratinociti su glavni ciljni organ osjetnih živaca, ali i glavni izvor neurotropina, posebno faktora rasta. Promjene u keratinocitima utjecat će na produkciju faktora rasta i ultimativno na održavanje osjetnih živaca u epidermisu. Tako se u transgeničnih miševa čiji su keratinociti

proizvodili mnogo faktora rasta pokazala hiperinervacija epidermisa i hiperalgezija na bolne podražaje [30].

Koža koja je djelomično ili kompletno denervirana rezultat je ozljede živca praćena dezintegracijskim produktima degeneriranog aksona. Degenerirani akson djeluje na povećanje razine citokina i neurotropina koje luče ne-neuralne stanice poput glija stanica (Schwanove st.), fibroblasta, keratinocita i makrofaga. Ovakva kombinacija različitih potencijalnih bioaktivnih molekula može izazvati senzornu reakciju u neoštećenim živčanim završecima, direktno ili indirektno. Citokini i neurotropini mogu utjecati na elastičnost tkiva, na unutrašnju osjetljivost živčanih završetaka izazivajući fosforilaciju ili transdukciju molekula ili ionskih kanala. Neke od ovih molekula osjetni završeci mogu transportirati retrogradno gdje mogu dodatno djelovati na razini tijela stanice ili na njene terminale. I netaknuti, susjedni aksoni mogu biti zahvaćeni na ovaj način jer se njihova terminalna područja preklapaju. Susjedne ne-neuralne stanice i senzorni dijelovi organa mogu reagirati na denervaciju [7].

#### **1.4.1. Morfološke promjene na koži uslijed denervacije**

U bolesnika s različitim tipovima neuropatija količina epidermalnih živaca je smanjena [14]. Najčešće neuropatije su dijabetička, posttraumatska, toksična i kompresijska [15]. Bol koju ovi pacijenti osjećaju je peckajuća do žareća, a prati je uvijek hipersenzitivnost koja uključuje taktilnu alodiniju, hiperalgeziju i hiperpatiju.

Dijabetička neuropatija je najčešća kronična komplikacija koja se pojavljuje u pacijenata s dijabetesom. Ova neuropatija pogađa somatske i autonomne živce što dovodi do niza simptoma poput nedostatka osjetljivosti, paralize, kardiovaskularne, gastrointestinalne i genitourinarne disfunkcije [31]. Osnovne karakteristike ove neuropatije su smanjena osjetljivost na lagani dodir, temperaturu i bolni podražaj [32-34]. Broj i dužina epidermalnih živčanih vlakana je smanjena. Neka živčana vlakna završavaju slijepo u dermalnoj površini

bazalne membrane. Živci u subepidermalnom pleksusu su reducirani kao i vlakna sa CGRP i tvari P [3].

Idiopatska bolna senzorna neuropatija je poremećaj okarakteriziran ukočenošću, žarećom boli, parastezom, alodinijom u stopalima, a sve je povezano s gubitkom senzornih neurona u koži. Za ovu i slične neuropatije smatra se da su aksonalne senzorne polineuropatije uglavnom uzrokovane oštećenjima na vlaknima malog promjera. Međutim, dokazano je da je senzorna neuropatija malih vlakana samo najranija manifestacija nespecifičnih aksonalnih neuropatija, te da obično progredira na velika, jako mijelizirana osjetna i motorna vlakna. Kod pacijenta u kojih su oštećena i senzorna vlakna velikog promjera simptomi duže traju, a bolest se produžuje [35].

Nedavna istraživanja su pokazala da proinflamatorne tvari poput citokina mogu izazvati ne samo upalnu nego i neuropatsku bol. Tako je dokazano da tumorski faktor nekroze izaziva degeneraciju aksona, demijelinizaciju i termalnu hiperalgeziju [36]. Smanjena inervacija kože u epidermalnim i subepidermalnim regijama je pronađena kod Raynandovog fenomena kao i u pacijenta sa sistemskom sklerozom [3].

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj djelomične denervacije na stanjenje epidermisa šape štakora, utvrditi je li je epidermalno stanjenje jednako na različitim područjima šape, te povezati nastale promjene s ponašanjem životinja. U istraživanju su korištena dva eksperimentalna modela koja izazivaju djelomičnu denervaciju: L5 i L6 spinalno podvezivanje živca, SNL model (eng. spinal nerve ligation) i model kronične konstriksijske ozljede, CCI model (eng. chronic constriction injury). Dosadašnja slična istraživanja denerviranog epidermisa su uglavnom koristila eksperimentalne modele koji izazivaju kompletnu denervaciju epidermisa. U ovom magistarskom radu usporedili smo morfološke promjene na koži, stupanj inervacije epidermisa prije i nakon denervacije, promjene ponašanja životinja u ovisnosti o primjenjenom eksperimentalnom modelu (SNL i CCI), te ovisnost denervacije o dermatomima plantarne površine šape štakora.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi:

1. utjecaj djelomične denervacije na stanjenje epidermisa šape štakora ovisno o primijenjenom eksperimentalnom modelu
2. regionalne razlike u stanjenju epidermisa
3. stupanj inervacije epidermisa prije i nakon denervacije
4. povezanost između promjena u debljini epidermisa s hiperalgezijskim oblikom ponašanja životinja

### **3. TVORIVA I POSTUPCI**

#### **3.1. Eksperimentalne životinje**

U istraživanju su se upotrijebili štakori soja Sprague-Dowley (SD) iz Nastambe za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu i to mužjaci težine od 150 do 250 g (N=88). Metodom slučajnog izbora životinje su podijeljene u 5 skupina uključujući dvije pokusne (SNL i CCI), dvije lažno pokusne (eng. sham SNL i sham CCI) i kontrolnu skupinu. Za vrijeme izvođenja pokusa životinje su se čuvale u priručnoj Nastambi za eksperimentalne životinje Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju (MEF Split).

#### **3.2. Eksperimentalni modeli izazivanja neuropatske boli**

Za operativni zahvat životinje su se anestetizirale intraperitonealnom injekcijom thiopentala (20 mg/kg). Metoda kronične konstriksijske ozljede ishijadičnog živca provela se prema opisu originalne metode [11], a to znači postavljanjem četiri lagano pritegnute ligature oko ishijadičnog živca (4-0 chromic gut). Metoda SNL (podvezivanje spinalnih živaca) provela se također u skladu s originalnim opisom metode [13]. Nakon prikaza paravertebralne regije uklonio se šesti lumbalni transverzalni nastavak. Peti i šesti spinalni živac (L5 i L6) podvezali su se svilenim koncem (6-0) i presjekli distalno od ligature.

SNL lažna pokusna skupina životinja bila je podvrgnuta identičnom postupku osim što L5 i L6 živci nisu bili podvezani ni presječeni. U modelu kronične konstriksijske ozljede upotrijebila se lažna pokusna skupina u kojoj se samo prikazao ishijadični živac. Korištenjem lažnih pokusnih skupina isključila se mogućnost nastanka očekivane promjene kao posljedice operativnog zahvata, a ne samog presijecanja (SNL) ili podvezivanja (CCI) živca. Skupina kontrolnih životinja podvrgnuta je anesteziji, a duž paravertebralne regije napravio se rez identičan onom u pokusnoj i lažnoj pokusnoj skupini. Postojanje kirurškog reza omogućilo je

potpuno slijepo testiranje životinja. Osoba koja je izvodila testiranje nije bila upoznata s primijenjenim kirurškim zahvatom.

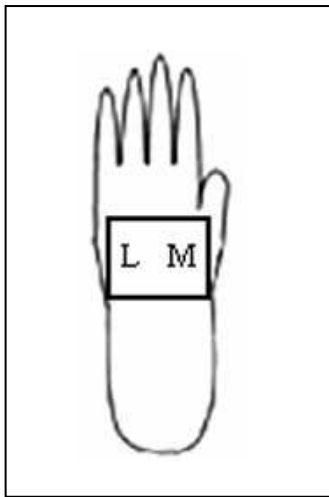
### **3.3. Ispitivanje ponašanja**

Za potrebe ispitivanja ponašanja životinje su bile smještene u plastičnim kavezima veličine 10×25×30 cm. Prije testiranja životinje su se privikavale na okolinu u kojoj se provelo ispitivanje. Kavezi su postavljeni na stolić čija je gornja ploha zamijenjena metalnom mrežom (3×3 mm) kako bi se omogućio pristup plantarnoj površini šape. Štakori su testirani jedan dan prije te trećeg, sedmog i dvanaestog dana nakon operativnog zahvata. Ponašanje je testirano na obje stražnje šape u odgovarajućim intervalima. Podraživanje šape provodilo se 22g iglom. Glavni kriterij za potvrdu razvoja neuropatske boli u životinja bila je reakcija hiperalgezije. Pozitivnim hiperalgezijskim odgovorom smatra se produljeno vrijeme uzmarka (>1 s), lizanje šape i vokalizacija. Testiranje se provelo u skladu s našim nedavno objavljenim radom u kojem se definira način testiranja [37].

### **3.4. Histološke metode**

Nakon testiranja ponašanja životinje su se žrtvovala 2 tjedna nakon operacije. Dio životinja iz pokusnih i kontrolnih skupina održavao se živima kako bi se histološka analiza provela nakon pet tjedana od operativnog zahvata

Materijal se pripremio ovisno o histološkoj metodi. Istraživanje se provelo na parafinskim histološkim rezovima (8 µm). Tkivo kože plantarne površine šape uzeto je prema shemi na slici 7.



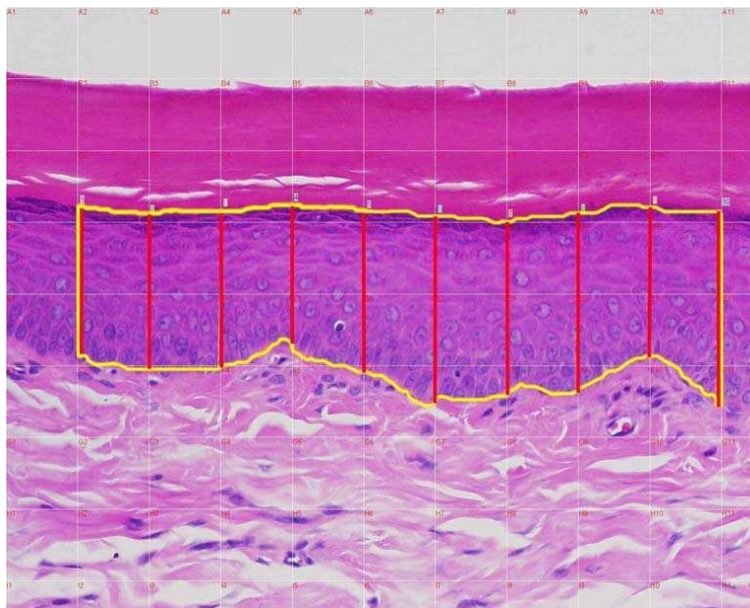
**Slika 7.** Shema plantarne površine šape. Označena površina pokazuje dio plantarne površine kože koji je uzet za histološka i morfometrijska ispitivanja. Debljina i površina kože je promatrana u odnosu na lateralnu (L) i medijalnu (M) stranu šape.

Za klasične histološke metode bojanja koža se fiksirala tijekom 24 sata u 4% paraformaldehydu te potom isprala u 0,1M fosfatnom puferu. Kako bi koža ostala zategnuta i ravna tijekom procesa fiksacije pričvrstili smo je tankim metalnim iglama na parafinsku ploču. Koristeći uzlazni niz koncentracija alkohola i ksilola materijal se dehidrirao te uklopio u parafin na 56° C. Komadići tkiva uklopljeni u parafin serijski su se izrezali na rezove debljine 8  $\mu$ m i prebacili na predmetna stakalca obrađena 0,01% vodenom otopinom poly-L-lizina. Preparati su bojani hemalaun-eozinom. Materijal za imunofluorescenciju inkubirao se primarnim antitijelom za PGP 9.5 (eng. Protein gene product 9.5) te vizualizirao kitom za sekundarnu detekciju. Histološka analiza kože provedena je slijepo.

### **3.5. Morfometrija**

Za usporedbu stanjena debljine epidermisa obrađeno je tkivo plantarne površine šape štakora. Uzorci tkiva uklopljeni su u parafin na prethodno opisani način s tim da se vodilo računa o orijentaciji uklapanja tkiva, odnosno lateralnoj i medijalnoj strani šape. Iz pojedinog uzorka tkiva uzet je uzorak kože debljine 8 $\mu$ m, te je svaki peti bojan hemalaun-eozinom.

Presjeci su gledani svjetlosnim mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokio, Japan). Rezovi su potom snimljeni digitalnom kamerom (DP11, Olympus) s 20× povećanjem i obrađeni sustavom za analizu digitalne fotografije (DP Soft, Olympus). Svaka fotografija je kalibrirana radi usklađenosti s računalnim programom i obrađena na način da je na nju ugrađen sloj s mrežom (eng. grid) (Slika 8). Koristeći mrežu izmjerili smo debljinu epidermisa na dva načina. Odabrana je duljina epidermisa od 100  $\mu\text{m}$ . Za prvo mjerenje svakih 10  $\mu\text{m}$  mjerena je vertikalna udaljenost dviju točaka koje predstavljaju debljinu epidermisa. Debljina epidermisa je definirana kao vertikalna udaljenost između epidermo-dermalne granice i vrha zrnatog sloja. Iz dobivenih deset vrijednosti izračunata je srednja vrijednost debljine epidermisa tog presjeka. Drugo mjerenje izvršeno je tako da su se povezale sve obilježene i izmjerene točke iz prethodnog mjerenja te se dobila površina presjeka epidermisa. Površina presjeka epidermisa mjerena je da bismo preciznije odredili nastalo stanjenje epidermisa. Dobiveni podatci za površinu presjeka koristili su se za usporedbu i određivanje promjena u debljini epidermisa različitih eksperimentalnih modela.



**Slika 8.** Prikaz načina mjerenja debljine i površine presjeka epidermisa.



### **3.6. Imunofluorescencijske metode**

Za postupak imunofluorescencije korišteni su smrznuti slobodno plutajući rezovi (engl. free floating) kože debljine 30  $\mu\text{m}$ . Rezovi su fiksirani i inkubirani zečjim primarnim antitijelom za PGP 9.5 (1:2500, Chemicon International, Temecula, CA, USA) na sobnoj temperaturi 24 sata. Nakon toga, rezovi su isprani u otopini fosfatnog pufera (PBS) i inkubirani s fluorescencijskim sekundarnim protutijelom (FITC, Donkey Anti-rabbit, Jackson) sat vremena u tami. Nakon ponovnog ispiranja u PBS, rezovi su se postavili na predmetno stakalce te prekrili pokrovnim stakalcem. Presjeci su gledani konfokalnim mikroskopom Olympus BX51, a potom slikani kamerom SPOT Insight.

### **3.7. Statistika**

Podaci su obrađeni programom Excel 2000 (Microsoft, SAD) i Statistica 6.0 (StatSoft, SAD). Sve kontinuirane varijable (težina, debljina epidermisa, prag boli) izrazili su se srednjim vrijednostima i standardnom devijacijom. Prag boli među skupinama usporedio se neparametrijskim inačicama ANOVE za zavisne uzorke, dok su se ostali parametri usporedili Bonferroni testom. Prilikom interpretacije parametara dobivenih statističkom analizom koristila se 95% razina značajnosti.

## 4. REZULTATI

### 4.1. SNL i CCI model izazivaju smanjenje debljine epidermisa kože

Da bismo odredili postoji li razlika u debljini epidermisa šape štakora nakon denervacije, usporedili smo rezultate dobivene primjenom CCI i SNL eksperimentalnih modela. Odredili smo kolika je ta promjena u jednog i drugog modela te ih usporedili međusobno te s kontrolnom i lažno pokusnim skupinama životinja.

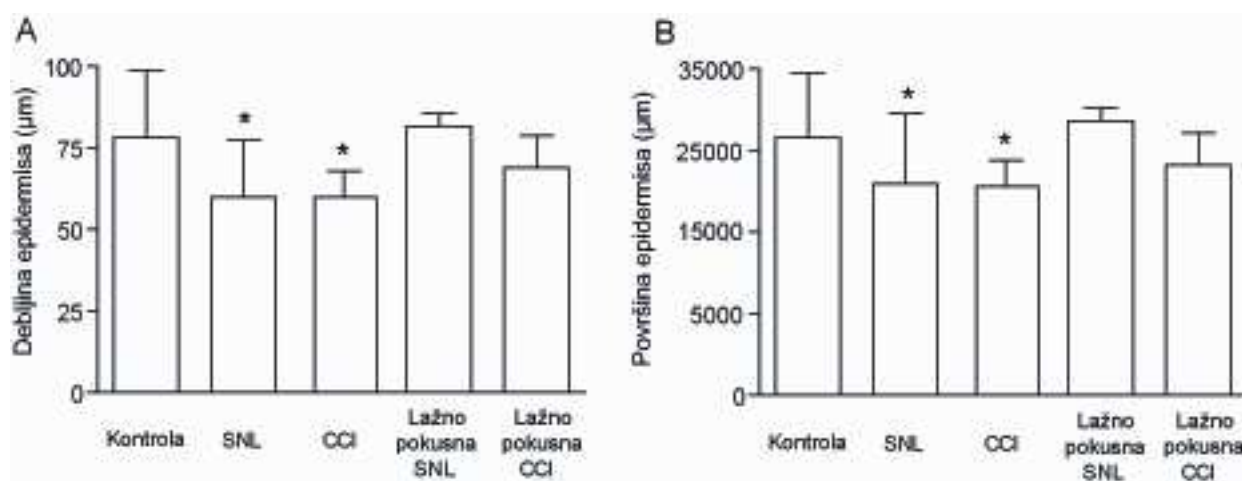
Prvi pokus uključivao je analizu područja cijele šape (Slika 9A). Usporedbom dobivenih rezultata potvrdili smo postojanje statistički značajnih razlika u debljini epidermisa (Anova,  $p < 0,0001$ ). Post hoc testovima pokazali smo da je epidermis u eksperimentalnim skupinama (SNL i CCI) tanji nego u kontrolnim i lažno pokusnim skupinama životinja.

Srednja vrijednost i standardna devijacija debljine epidermisa u SNL skupini iznosi  $60 \mu\text{m} \pm 17,3 \mu\text{m}$ . Dobivene vrijednosti ukazuju da se epidermis stanjio što smo i potvrdili usporedbom sa epidermalnom debljinom kontrolne ( $78,2 \mu\text{m} \pm 20,5 \mu\text{m}$ ) i lažno pokusne skupine ( $81,5 \mu\text{m} \pm 4,1 \mu\text{m}$ ). Analiza je pokazala statistički značajnu razliku, ( $p < 0,001$ , Bonferroni post hoc test) (Slika 9A).

I drugi primijenjeni kirurški model, CCI model ( $59,8 \mu\text{m} \pm 8,1 \mu\text{m}$ ) je pokazao statički značajno stanjenje epidermisa ( $p < 0,001$ , Bonferroni post hoc test) u odnosu na kontrolnu ( $78,2 \mu\text{m} \pm 20,5 \mu\text{m}$ ) i lažno pokusnu skupinu ( $68,9 \mu\text{m} \pm 9,9 \mu\text{m}$ ) (Slika 9A).

Oba eksperimentalna modela pokazuju značajno epidermalno stanjenje, ali međusobna usporedba njihovog učinka na denervaciju nije pokazala statistički značajnu razliku ( $p > 0,05$ ) (Slika 9A).

Da bismo preciznije odredili stanjenje epidermisa mjerili smo površine presjeka epidermisa prije i nakon denervacije (Slika 9B). Ovi podatci su potvrdili prethodne rezultate i nisu odstupali od podataka o debljini epidermisa. Podatci za srednju vrijednost površine i standardnu devijaciju za SNL skupinu su  $22140 \mu\text{m} \pm 8095 \mu\text{m}$ , a za CCI skupinu  $22000 \mu\text{m} \pm 3912 \mu\text{m}$  što se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ) od podataka za kontrolnu skupinu ( $26640 \mu\text{m} \pm 8184 \mu\text{m}$ ) (Slika 9B).



**Slika 9.** Grafički prikaz debljine i površine epidermisa u svim eksperimentalnim skupinama.

Legenda: SNL = podvezivanje spinalnih živaca; CCI = kronična konstriksijska ozljeda; \* predstavlja značajnu razliku od vrijednosti za kontrolnu skupinu

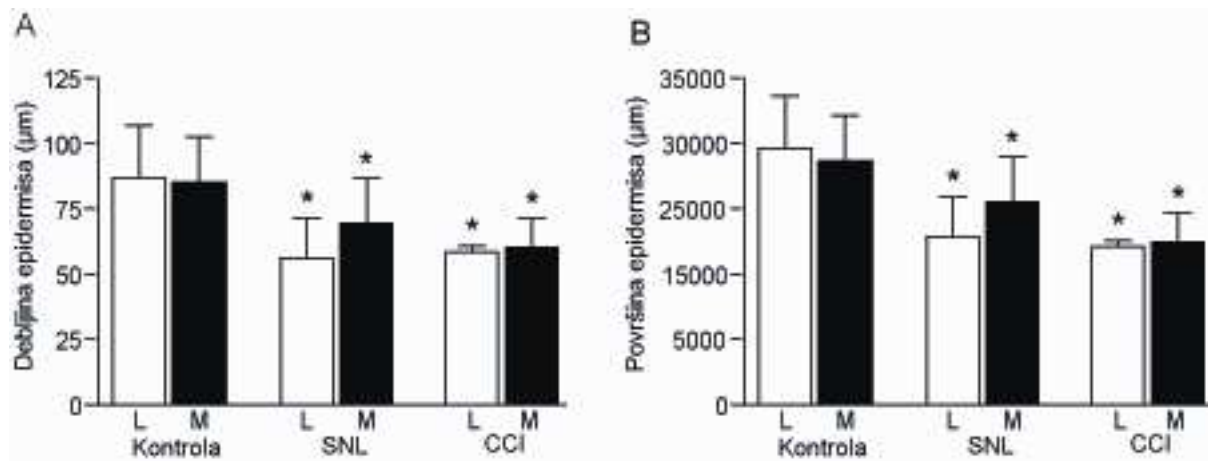
#### **4.2. Lateralna strana šape pokazala je veće stanjenje epidermisa u odnosu na medijalnu stranu**

U drugom pokusu smo istražili je li stanjenje epidermisa jednako na lateralnoj i medijalnoj strani šape (Slika 10A). Naime, cijela plantarna površina šape inervirana je n. ischiadicusom, medijalna strana n. saphenusom, lateralna n. suralisom, a između je područje inervacije n. tibialisa. Područja pojedine inervacije nisu strogo odijeljena te dolazi do preklapanja aksonskih završetaka. Uspoređivanjem promjena u debljini epidermisa lateralne i medijalne strane šape, na lateralnoj strani utvrđeno je veće stanjenje epidermisa (ANOVA, main effect  $p < 0,0001$ ).

T-testom je utvrđena statistički značajna razlika u epidermalnom stanjenju lateralne i medijalne strane SNL skupine ( $55,6 \mu\text{m} \pm 15,6 \mu\text{m}$  vs  $69,4 \mu\text{m} \pm 17,2 \mu\text{m}$ ). Taj rezultat potvrdili smo i usporedbom lateralnog područja u SNL životinja s istim područjem u kontrolnoj skupini,  $p < 0,001$ . Međutim, epidermalna debljina lateralne i medijalne strane šape u CCI skupini nije pokazala statistički značajnu razliku ( $58,6 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$  vs  $60,2 \mu\text{m} \pm 11,2 \mu\text{m}$ ,  $p > 0,05$ ) (Slika 10A).

Uspoređujući podatke za površinu presjeka lateralne i medijalne strane, utvrdili smo statistički značajnu razliku samo na lateralnoj strani SNL skupine životinja ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $21230 \mu\text{m} \pm 10050 \mu\text{m}$  vs  $29520 \mu\text{m} \pm 7916 \mu\text{m}$ ). Statistički značajna razlika nije utvrđena između lateralne i medijalne strane SNL skupine ( $p > 0,05$ ) (Slika 10B).

Dobiveni podatci za stanjenje epidermisa i površinu presjeka lateralne i medijalne strane CCI skupine životinja nisu pokazali statistički značajnu razliku (Slike 10A i B).



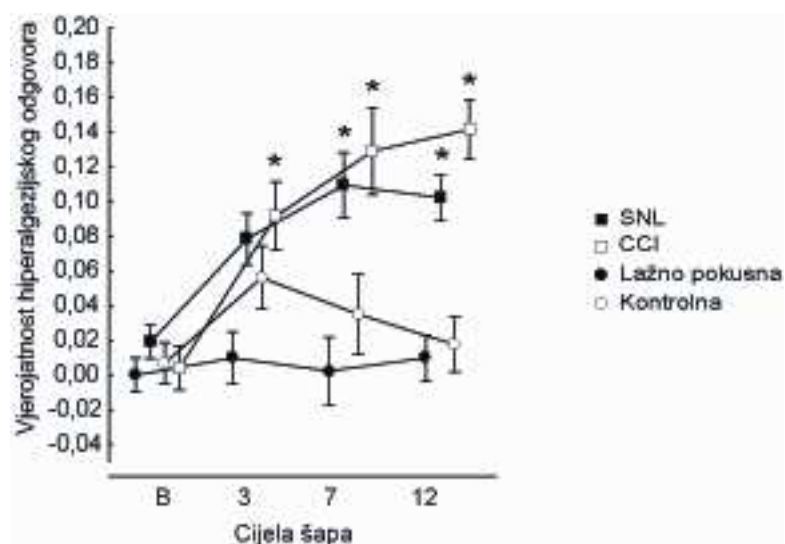
**Slika 10.** Grafički prikaz promjene debljine i površine epidermisa na lateralnoj i medijalnoj strani svih eksperimentalnih skupina.

Legenda: L= lateralno; M=medijalno; SNL = podvezivanje spinalnih živaca;

CCI = kronična konstriksijska ozljeda; \* predstavlja značajnu razliku od vrijednosti za kontrolnu skupinu

### **4.3. Odnos debljine kože i ponašanja životinja**

Ispitivanjem ponašanja životinja utvrdili smo postoji li povezanost između promjena u debljini kože i razvoja neuropatske boli. Postojanje hiperalgezijske reakcije uzeli smo kao dokaz razvoja neuropatske boli. Uspoređeni su podatci za četiri skupine životinja: kontrolnu, lažno pokusnu, SNL i CCI skupinu. Životinje smo testirali prije operativnog zahvata te 3., 7. i 12. dan nakon operativnog zahvata. Vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora pokazala se jako slična u preoperativnom razdoblju za sve četiri skupine, za razliku od postoperativnog razdoblja u kojem postoji statistički značajna razlika u vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora za denervirane životinje (ANOVA; main effect  $F=3.79$ ,  $p=0.045$ ). Kako je vrijeme ispitivanja odmicalo, podatci za SNL i CCI skupinu su pokazali linearan rast u hiperalgezijskom odgovoru, dok su kontrolna i lažno pokusna skupina ostale na nivou preoperativnog dana. U CCI skupini vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora je statistički značajno rasla u cijelom postoperativnom razdoblju. Post hoc testovi su pokazali da u SNL skupini postoji statistički značajno povećanje u vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora samo 7. i 12. dan (Slika 11).

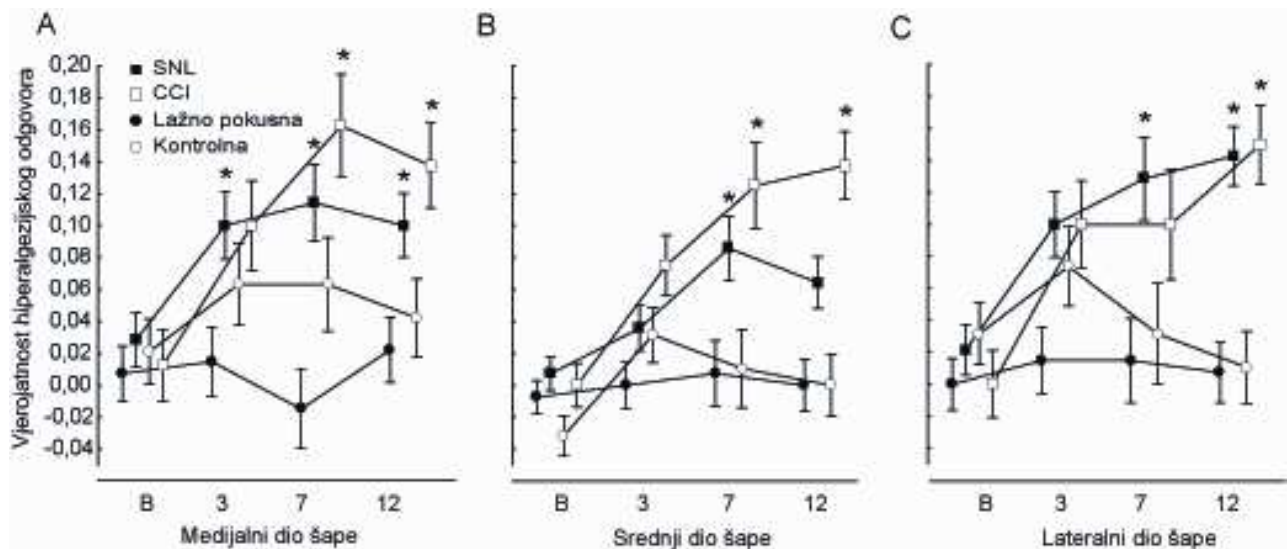


**Slika 11.** Vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora u SNL, CCI, lažno pokusnoj i pokusnoj skupini za cijelu šapu

Legenda: B = preoperativni dan; 3 = treći postoperativni dan; 7 = sedmi postoperativni dan; 12 = dvanaesti postoperativni dan; SNL = podvezivanje spinalnih živaca; CCI = kronična konstriksijska ozljeda; \* predstavlja značajnu razliku od preoperativne kontrolne vrijednosti. Razlike su dobivene ANOVA testom i Bonferroni post hoc testom. Stupci pogreške pokazuju 95% interval pouzdanosti.

Da bismo utvrdili razliku u vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u srednjem, lateralnom i medijalnom dijelu denervirane šape, testirali smo ta područja zasebno (Slika 12 A, B, C). Rezultati su pokazali povećanu vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora u svim testiranim područjima šape u SNL i CCI skupine životinja u odnosu na ista područja u kontrolnoj i lažno pokusnoj skupini životinja. U SNL skupini povećani hiperalgezijski odgovor u sva tri postoperativna dana je pronađen samo na srednjem dijelu šape (Slika 12B), dok je na lateralnoj strani isto uočeno zadnja dva postoperativna dana, (Slika 11C), a na medijalnoj strani tek u zadnjem postoperativnom danu (Slika 12A). Kod CCI skupine je također uočena nejednakost hiperalgezijskih odgovora ovisno o postoperativnim danima. U

medijalnom i srednjem dijelu šape statistički značajna vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora je uočena u zadnja dva postoperativna dana (Slike 12A, B). Na lateralnoj strani povećani hiperalgezijski odgovor se dogodio tek u zadnjem 12. postoperativnom danu (Slika 12C).



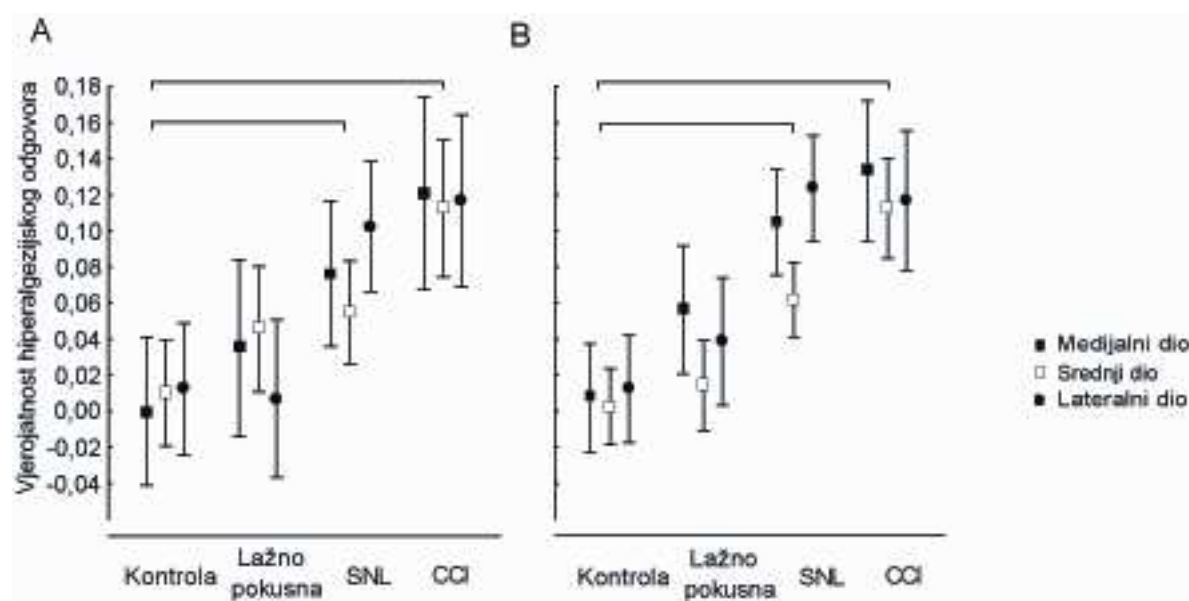
**Slika 12.** Vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora u (A) medijalnom, (B) srednjem i (C) lateralnom dijelu šape.

Legenda: B = preoperativni dan; 3 = treći postoperativni dan; 7 = sedmi postoperativni dan; 12 = dvanaesti postoperativni dan; SNL = podvezivanje spinalnih živaca; CCI = kronična konstriksijska ozljeda; \* predstavlja značajnu razliku od preoperativne kontrolne vrijednosti. Razlike su dobivene ANOVA testom i Bonferroni post hoc testom. Stupci pogreške pokazuju 95% interval pouzdanosti.

Ovakvi rezultati ukazuju da vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora na različitim područjima šape ovisi o postoperativnom danu. Stoga da bismo ipak procijenili različitost vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora testiranih područja, uzeli smo srednju vrijednost sva tri postoperativna dana za pojedina područja i usporedili je s vrijednosti vjerojatnosti



hiperalgezijskog odgovora preoperativnog dana (Slika 13A). Da bismo usporedili rezultate postoperativnog testiranja, vrijednosti preoperativne vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora nismo uključili u analizu (Slika 13B). Nije pronađena statistički značajna razlika između medijalne, srednje i lateralne strane šape ni u SNL ni CCI skupini. Usporedbom operiranih i neoperiranih životinja je pronađena statistički značajna razlika ( $p=0.045$ ) (Slike 13A i B).



**Slika 13.** Prosječna vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora; usporedba između medijalne, srednje i lateralne strane kod svih grupa (SNL, CCI, kontrolna i lažno pokusna).

(A) Usporedba prosječne vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora preoperativnog i postoperativnog razdoblja. Vrijednosti za prosječne vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora izračunate su kao razlika  $\Delta D - \Delta L$  koja predstavlja učinak ozljede na desnoj strani (D) u usporedbi s lijevom (L) izražen u postocima, i izračunava se kao  $100 \times [(\text{prosječna vjerojatnost postoperativnog hiperalgezijskog odgovora na desnoj strani, } V) - (\text{prosječna vjerojatnost preoperativnog hiperalgezijskog odgovora na desnoj strani, } V)] - 100 \times [(\text{prosječna vjerojatnost postoperativnog hiperalgezijskog odgovora na lijevoj strani, } V) -$

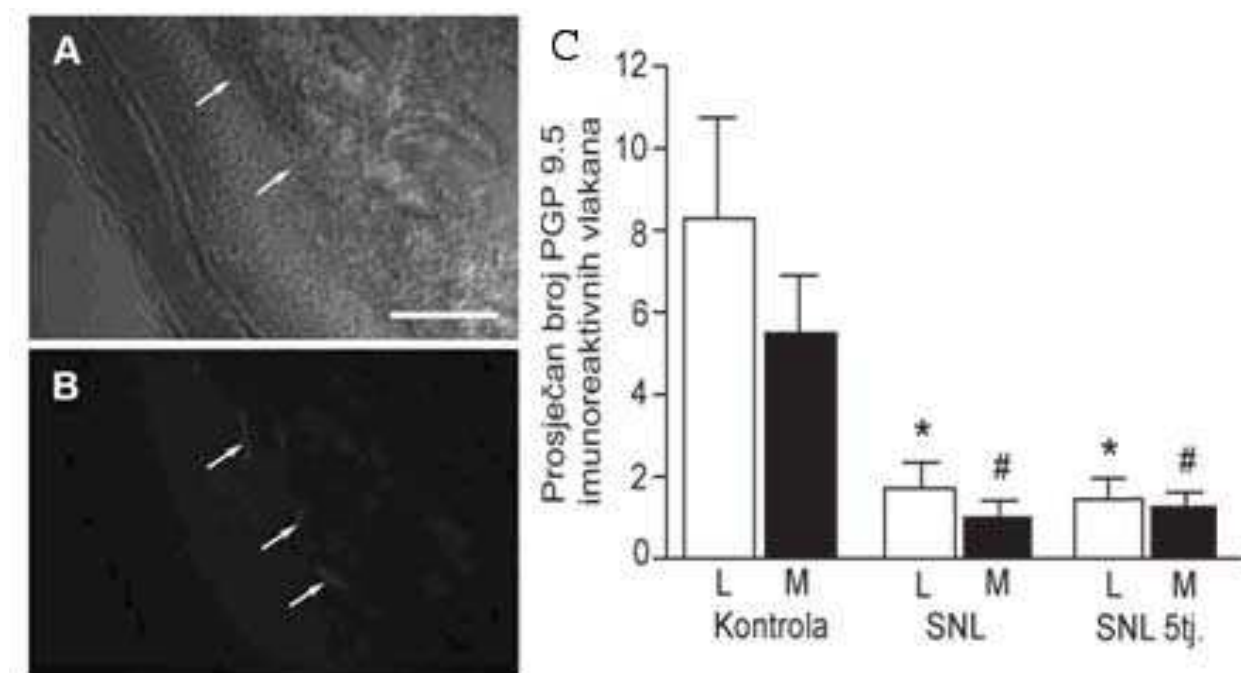
(prosječna vjerojatnost preoperativnog hiperalgezijskog odgovora na lijevoj strani,  $V$ ), gdje je  $V$  vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora.

**(B)** Prikaz prosječne vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora u postoperativnom razdoblju. Vrijednosti za prosječne vjerojatnosti hiperalgezijskog odgovora izračunate su kao razlika  $psD - psL$  koja predstavlja postoperativnu asimetriju i izračunava se kao  $100 \times [(prosječna vjerojatnost postoperativnog hiperalgezijskog odgovora na desnoj strani,  $V$ ) - (prosječna vjerojatnost postoperativnog hiperalgezijskog odgovora na lijevoj strani,  $V$ )]$ , gdje je  $V$  vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora.

Legenda: SNL = podvezivanje spinalnih živaca; CCI = kronična konstriksijska ozljeda; \* predstavlja značajnu razliku od preoperativne kontrolne vrijednosti. Zgrade predstavljaju značajnu razliku od vrijednosti za kontrolnu skupinu. Razlike su dobivene ANOVA testom i Bonferroni post hoc testom. Stupci pogreške pokazuju 95% interval pouzdanosti.

#### 4.4. PGP/9.5 imunoreaktivna vlakna u koži

PGP/9.5 imunoreaktivna vlakna pronađena su u dermisu i epidermisu svih ispitivanih skupina. Za ovo istraživanje mjerena je gustoća PGP/9.5 imunoreaktivnih vlakana u dermalnom sloju odmah ispod bazalne membrane (Slike 14A i B). Vrlo sitna, fina vlakna uočena su da izlaze iz subepidermalnog plexusa preko bazalne membrane u epidermalne slojeve, no ova vlakna nisu bila uključena u analizu. U kontrolnoj skupini gustoća živčanih vlakana je bila značajno veća na lateralnoj strani u odnosu na medijalnu stranu. U denerviranoj koži, na lateralnoj strani SNL skupine uočen je značajan pad u gustoći (79,5%,  $p < 0,01$ ) odnosno broju vlakana u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (17 vs 83). Na medijalnoj strani SNL skupine gustoća se smanjila za 82% što je također statistički značajno (10 vs 55,  $p < 0,01$ ). Uspoređujući gustoću vlakana u SNL skupini i SNL 5 tj. skupini, nismo pronašli statistički značajnu razliku ( $p > 0,05$ ) ni na lateralnoj ni medijalnoj strani šape (Slika 14C).

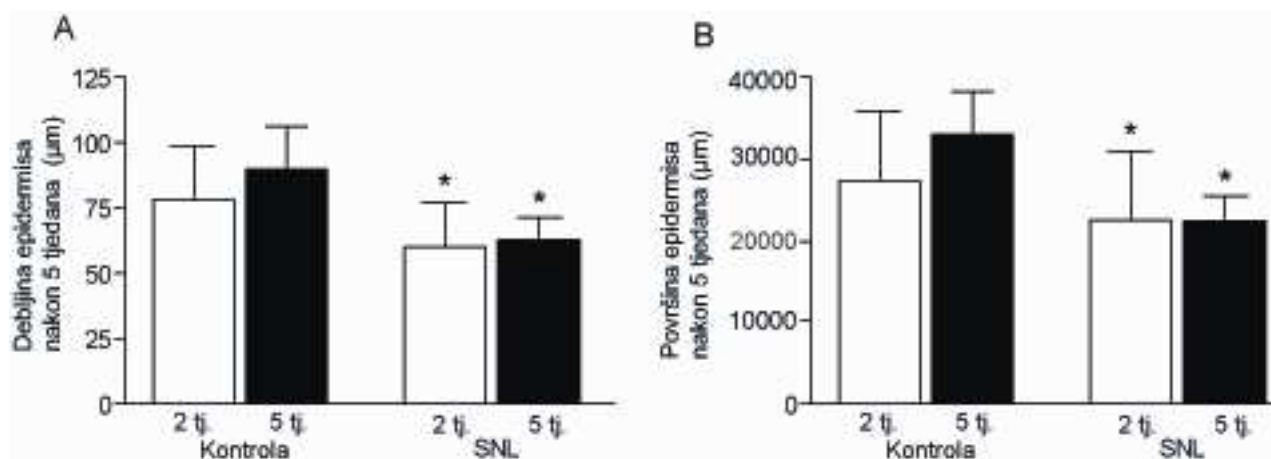


**Slika 14.** Diferencijalna interferencija (eng. differential interference contrast - DIC) (A) i fluorescencijski prikaz (B) uzdužnog presjeka kože debljine 25  $\mu\text{m}$  kontrolne skupine. (C) graf prikazuje odnos PGP 9.5 imunoreaktivnih živčanih vlakana na lateralnoj i medijalnoj strani u kontrolnoj skupini i SNL 2 i 5 tjedana nakon operacije

#### 4.5. Pet tjedana nakon denervacije

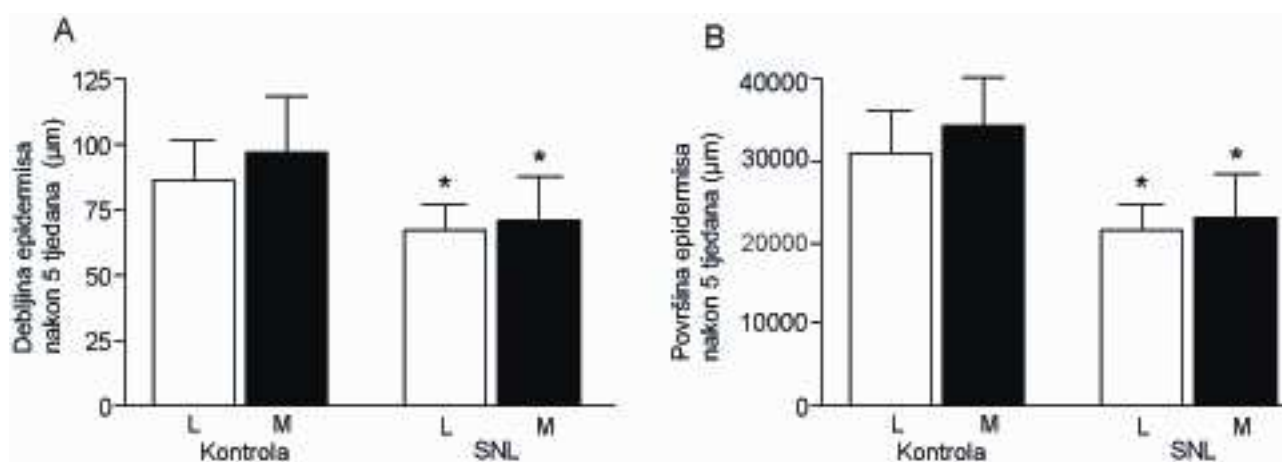
Pet tjedana nakon podvezivanja spinalnog živca, ispitali smo debljinu i površinu presjeka epidermisa (Slike 15A i B). Kako smo već pokazali da se epidermis stanjuje nakon denervacije, usporedili smo debljinu epidermisa starog 5 tjedana i kontrolnog epidermisa. Ova istraživanja radili smo samo za SNL skupinu, s obzirom da su slična rađena na CCI modelima.

Usporedbom rezultata u epidermalnom stanjenju i površini presjeka epidermisa za kontrolnu, lažno pokusnu i SNL skupinu nakon 5 tjedana od operacije dobili smo statistički značajnu razliku,  $p < 0,0001$  (Slika 15 i Slika 16). Tako je srednja vrijednost i standardna devijacija za epidermalnu debljinu nakon 5 tjedana za SNL model iznosila  $62,6 \mu\text{m} \pm 8,6 \mu\text{m}$ , a za površinu  $21930 \mu\text{m} \pm 3191 \mu\text{m}$  (Slike 14A i B). Obje vrijednosti se statistički značajno razlikuju od podataka za kontrolnu skupinu, ( $78,2 \mu\text{m} \pm 20,5 \mu\text{m}$  vs  $31960 \mu\text{m} \pm 5954 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike između kože stare 2 i 5 tjedana ( $60 \mu\text{m} \pm 17,3 \mu\text{m}$  vs  $62,6 \mu\text{m} \pm 8,6 \mu\text{m}$  i  $22140 \mu\text{m} \pm 8095 \mu\text{m}$  vs  $21930 \mu\text{m} \pm 3191 \mu\text{m}$ ,  $p > 0,05$ ). Izraženo stanjenje epidermisa i smanjenje površine presjeka epidermisa u SNL štakora pet tjedana nakon operacije, uočeno je na lateralnoj strani ( $65,2 \mu\text{m} \pm 9,8 \mu\text{m}$  vs  $86,6 \mu\text{m} \pm 14,5 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ) (Slike 16A i B).



**Slika 15.** Grafički prikaz usporedbe debljine epidermisa i površine kontrolne i SNL skupine 2 i 5 tjedana nakon denervacije.

Legenda: SNL = podvezivanje spinalnih živaca; \* predstavlja značajnu razliku od vrijednosti za kontrolnu skupinu



**Slika 16.** Grafički prikaz usporedbe debljine epidermisa i površine kontrolne i SNL skupine na lateralnoj i medijalnoj strani nakon perioda od 5 tjedana reinervacije.

Legenda: SNL = podvezivanje spinalnih živaca; L = lateralno; M = medijalno; \* predstavlja značajnu razliku od vrijednosti za kontrolnu skupinu

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Denervirana koža nastala primjenom SNL i CCI modela uzrokuje smanjenje debljine epidermisa

U ovom istraživanju potvrđeno je da denervacija izazvana SNL i CCI eksperimentalnim modelima izaziva morfološke promjene na koži šape štakora (Slika 9.). Gubitak epidermalnih vlakana i stanjenje epidermisa su nepobitno dokaz denervacije kože. Ovo istraživanje potvrdilo je i jedno i drugo gore navedeno. U istraživanju za mjerenje debljine epidermisa nismo obuhvatili sve slojeve epidermisa. Na plantarnoj površini šape štakora postoje različita histološka područja. Jedno od tih histoloških područja su i tri para kvržica. Kod uzimanja uzoraka kože šape štakora za analizu vodilo se računa da zahvaćeno područje nije područje kvržice. Mjereći područje blizu ili samo područje kvržice, koje je zadebljano, moglo je doći do pogrešnih rezultata. Ako je područje kvržice ipak bilo zahvaćeno, ona je ostajala medijalno. Provodeći pilot studiju za ovaj rad, prilikom postavljanja uzorka kože na parafin, uočili smo da ona može ostati neravna i naborana što bi svakako otežalo analizu i mjerenje debljine epidermisa. Stoga smo uzorke kože tijekom procesa fiksiranja pričvrstili tankim metalnim iglama za parafinsku ploču da bi ostala ravna i zategnuta. Mjerila se debljina, odnosno stanjenje svih slojeva epidermisa osim rožnatog sloja (stratum corneum).

Usporedbom sa kontrolnom i lažno pokusnom skupinom životinja utvrdili smo denervaciju kože izazvanu SNL i CCI modelom (Slika 9A). SNL denervirana koža pokazala je stanjenje epidermisa za 23,32%, a CCI modela 23,49%. Ovo istraživanje nije pokazalo statistički značajnu razliku u stupnju denervacije između ova dva modela. Potvrđena je hipoteza da ozljeda perifernog živca uzrokovana djelomičnom denervacijom izaziva promjenu na koži na sličan način kao i potpuna denervacija [28-30]. Ove studije koristile su potpuno

klasično presijecanje ishijadičnog živca (aksotomija), dok smo mi primijenili dva potpuno različita eksperimentalna modela, CCI i SNL model. Statistički značajno smanjenje debljine epidermisa pokazali smo prateći denervaciju u periodu od 2 i 5 tjedana (Slika 15.). Značajno stanjenje epidermisa uočeno je na lateralnoj strani u štakora skupine SNL nakon 5 tjedana.

## 5.2. Uslijed denervacije kože epidermalna vlakna nestaju

Dosadašnja istraživanja pokazala su da 2 dana nakon denervacije kože sva epidermalna vlakna nestaju. Nakon 4 dana dolazi do značajnog smanjenja debljine epidermisa za 30-40%. Degeneracija epidermalnih vlakana je vrlo brz proces koji započne 24 sata nakon operativnog zahvata, a nakon 48 sati je završen. Nije do kraja razjašnjeno je li epidermalno stanjenje direktno ili indirektno povezano s degeneracijom vlakana [38].

Živčani završeci u epidermisu svakako sudjeluju u prenošenju osjetnih podražaja. Epidermalna vlakna su nemijelinizirana, dijametra 1-2  $\mu\text{m}$  i mogu se vidjeti samo elektronskim mikroskopom i to posebnim mikroskopskim tehnikama [29]. Da bi se bolje upoznala epidermalna vlakna, mnogi istraživači koristili su različite markere živčanih vlakana poput CGRP (engl. Calcitonin regene-related protein) i tvari P [39], a posebno PGP 9.5 (protein gene 9.5) [28, 29, 40]. U ovom istraživanju PGP 9.5 je korišten kao neuronalni marker, jer je u usporedbi s drugim neuronalnim markerima pokazao visoku osjetljivost za fina nemijelinizirana vlakna koja završavaju u epidermisu [41, 42]. Naši rezultati pokazali su izrazito smanjenje epidermalnih vlakana u denerviranoj koži u odnosu na kontrolnu. Usporedbom broja PGP(+) epidermalnih vlakana prije i nakon denervacije ustanovili smo da PGP(+) imunoreaktivna vlakna nakon operativnog zahvata nestaju iz epidermisa (Slika 14.). U normalnom, zdravom epidermisu na lateralnoj strani smo pronašli više PGP imunoreaktivnih vlakana nego na medijalnoj. Dva tjedna nakon denervacije, primjenom SNL modela, na obje strane se broj PGP(+) vlakana smanjio, ali u nešto većem postotku na lateralnoj strani. Taj podatak je u korelaciji s većim stanjenjem epidermisa na lateralnoj strani.

Nakon 5 tjedana PGP(+) vlakna su se pojavila, ali u mnogo manjem broju. Lateralna strana je bila bogatija PGP(+) vlaknima u odnosu na medijalnu stranu. Gubitak PGP imunoreaktivnih vlakana je u skladu s utvrđenim epidermalnim stanjenjem. Ovakav rezultat je potvrdio da period od pet tjedana pripada razdoblju denervacije kože što je bitno budući da se



u tom periodu vrše ispitivanja ponašanja životinja. Uporaba PGP-imunocitokemijskih tehnika omogućuje potpuno novi pristup i pogled na epidermalnu inervaciju te raspored i broj osjetnih živaca [30].

### **5.3. Epidermalno stanjenje je izraženije na lateralnoj nego na medijalnoj strani šape**

Epidermalno stanjenje na različitim područjima šape štakora (peta, centar šape, područje kvržice) proučavali su mnogi autori [28-30]. Mi smo u ovom radu istražili razliku u stupnju epidermalnog stanjenja i smanjenja površine epidermisa nakon denervacije na lateralnoj i medijalnoj strani šape nakon primjene CCI i SNL modela (Slika 9.). Uporabom CCI modela nije utvrđena statistički značajna razlika u epidermalnoj debljini lateralne i medijalne strane, dok je SNL denervirana koža pokazala izraženo epidermalno stanjenje na lateralnoj strani šape. Očito postoje različiti mehanizmi kojima inervacija kože utječe na epidermis. Cijelu šapu inervira n. ischiadicus, medijalnu n. saphenus (dermatom L3), a lateralnu n. suralis (dermatom L5) [27]. Različito epidermalno stanjenje ukazuje da je sama inervacija možda ovisna i o nekim drugim faktorima, poput različitih molekula kao što su neuropeptidi i neurotransmiteri [43]. Senzorna vlakna sigurno direktno utječu na debljinu epidermisa [40].

#### 5.4. Hiperalghezija kao odgovor na denervaciju kože

Klinički simptomi razvoja neuropatske boli osim spontane boli [9] su hiperalghezija i alodinija [44, 45]. Do nedavno smatralo se da patofiziologija neuropatske boli postoji samo na mjestu ozljede živca [46, 47]. Vrlo važan aspekt razvoja neuropatske boli je nastanak hiperalghezije na području denervacije. Postoji nekoliko mehanizama koji objašnjavaju nastanak hiperalghezije [44]. To su centralna ili periferna senzitivizacija, ali i interakcija između ozlijeđenih i neozlijeđenih perifernih vlakana [43]. Neki istraživači su pokazali da nakon primjene SNL animalnog modela nestaju znakovi neuropatske boli [20, 48]. Oni su zaključili da nastanak i postojanje mehaničke hiperalghezije ovisi o impulsima neozlijeđenih vlakana. Za razliku od njih, drugi su na modificiranom SNL modelu pokazali da mehanička hiperalghezija može nastati i u odsutnosti ozlijeđenih vlakana [43].

U ovom radu proučavana je učestalost hiperalghezijskog odgovora prije i nakon primjene SNL i CCI modela na tri različita područja šape. Slična istraživanja proveli su Koltzenburg et al., 1994. Oni su na miševima pokazali različite načine nastanka hiperalghezije nakon CCI i SNL lezije. Naši rezultati pokazali su povećanu vjerojatnost hiperalghezijskog odgovora u oba modela za vrijeme postoperativnog razdoblja. Koristeći srednje vjerojatnosti hiperalghezijskog odgovora statistički značajnu razliku dobili smo samo uspoređujući vrijednosti hiperalghezijskog odgovora za postoperativne dane. Testirajući različita područja šape (medijalni, srednji i lateralni dio), nismo pronašli statistički značajnu razliku. Autonomne raspodijele dermatoma na šapi štakora nema. L3, L4 i L5 spinalni živci inerviraju medijalnu, srednju i lateralnu stranu šape. Sigurno dolazi do preklapanja osjetnih vlakana iz L3, L4 i L5 dermatoma [26, 27]. Nastala hiperalghezija je rezultat periferne interakcije između neozlijeđenih (L4) i degeneriranih (L5 i L6 kod SNL modela) osjetnih vlakana.

Svi eksperimentalni modeli periferne ozljede živca koji se rabe u istraživanjima patofizioloških mehanizama neuropatske boli izazivaju određeni stupanj denervacije. Uspješnost modela ovisi o ispitivanju osjeta boli upravo u području denervacije te je stoga važno znati stupanj denervacije unutar toga područja.

Pretpostavka ovoga istraživanja je bila da će morfološke promjene u koži biti različite u ovisnosti o primijenjenom eksperimentalnom modelu neuropatske boli i u ovisnosti o dermatomima plantarne površine šape. Razina neuropatske boli koju životinje razviju nakon primjene pojedinog modela ovisi o stupnju denervacije.

Djelomična denervacija kože uzrokuje epidermalno stanjenje na sličan način kao i kompletna denervacija. U ovom istraživanju potvrđeno je da djelomična denervacija nastala primjenom SNL i CCI modela izaziva stanjenje epidermisa i smanjenje površine presjeka epidermisa. Uspoređujući različita područja šape, utvrdili smo da je epidermalno stanjenje najizraženije na lateralnoj strani šape. Promjene u debljini epidermisa utječu i na ponašanje životinja. Denervacija kože uzrokuje povećanu vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora pri testiranju ponašanja životinja, ali razlike u hiperalgezijskom odgovoru pri testiranju različitih dijelova šape štakora nema.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Djelomična denervacija uzrokovana SNL i CCI eksperimentalnim modelima uzrokuje stanjenje epidermisa i smanjenje površine presjeka epidermisa
2. Epidermalno stanjenje je izraženije na lateralnoj nego na medijalnoj strani šape štakora
3. Denervacija kože povećava vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora prilikom testiranja ponašanja životinja
4. Nisu uočene razlike u hiperalgezijskom odgovoru pri testiranju različitih dijelova šape štakora

## 7. SAŽETAK

Usljed kompletne denervacije kože dolazi do stanjenja epidermisa. Međutim, nije posve jasno da li slične promjene može izazvati djelomična denervacija kože.

U ovom radu, istražili smo utjecaj djelomične denervacije na stanjenje epidermisa šape štakora, utvrdili da li je epidermalno stanjenje jednako na različitim područjima šape, te povezali nastale promjene s ponašanjem životinja. U istraživanju su korištena dva eksperimentalna modela koja izazivaju djelomičnu denervaciju: spinalno podvezivanje živca, SNL model (eng. spinal nerve ligation) i model kronične konstriksijske ozljede, CCI model (eng. chronic constriction injury). Promjene u debljini epidermisa mjerene su za cijelu šapu i za pojedina područja šape (medijalni, srednji i lateralni dio). Stanjenje epidermisa je bilo statistički značajno u oba primijenjena modela: u SNL modelu ( $60 \pm 17.3 \mu\text{m}$ ) i u CCI modelu ( $59.8 \pm 8.1 \mu\text{m}$ ) nasuprot kontrolne skupine ( $78.2 \pm 20.5 \mu\text{m}$ ). Najizraženije stanjenje je uočeno na lateralnoj strani u SNL skupini ( $55.6 \pm 15.5 \mu\text{m}$  vs.  $86.9 \pm 20.1 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ). Obe skupine životinja, SNL i CCI, su pokazale povećanu vjerojatnost hiperalgezijskog odgovora za vrijeme cijelog postoperativnog razdoblja, dok statistički značajne razlike nije bilo između pojedinih testiranih područja šape.

Ovo istraživanje potvrdilo je da parcijalna denervacija izaziva epidermalno stanjenje šape štakora na sličan način kao i kompletna denervacija, ali nisu uočene regionalne razlike u hiperalgezijskom odgovoru pri testiranju različitih dijelova šape.

## 8. SUMMARY

Total denervation of the skin induces regional differences in epidermal thinning. However, it is not clear whether similar differences could be induced by partial denervation of the paw.

We investigated relation between changes in epidermal thickness and hyperalgesic behavioral responses in different areas of the rat glabrous skin. Partial denervation was produced using two experimental models of neuropathic pain injury: spinal nerve ligation (SNL) and chronic constriction injury (CCI). The epidermal thickness of denervated epidermis was evaluated in the entire paw and from the medial and lateral regions of the paw. Behavioral response was examined by mechanical stimulation of the medial, middle and lateral sides of the paw. The reduction of epidermal thickness was significant in both models: in SNL model ( $60 \pm 17.3 \mu\text{m}$ ) and in CCI model ( $59.8 \pm 8.10 \mu\text{m}$ ) vs control group ( $78.2 \pm 20.5 \mu\text{m}$ ). The most obvious thinning was observed in lateral region of SNL group ( $55.6 \pm 15.5 \mu\text{m}$  vs.  $86.9 \pm 20.1 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ). Both, SNL and CCI operated animals showed the increase in hyperalgesic response during the whole postoperative period without regional differences between testing regions.

This study suggest that partial denervation induces epidermal thinning similarly as total denervation of the rat hind paw, but there are no differences in pain-related behavior when testing different sites of paw.

## 9. LITERATURA

1. Bannister IH. Integumental system. U: Williams PL, urednik. Grays anatomy. New York: Churchill Livingstone; 1995.
2. Junqueira LC., Carneiro, J., O.Kelly, R. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1999.
3. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 1996;47(4):1042-8.
4. Krmpotić-Nemanić J., Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada, Zagreb; 2004.
5. Gardner E, Martin, J., Jessell, M. The bodily senses; 2000.
6. Judaš M., I. K. Temelji neuroznanosti. Zagreb: MD; 1997.
7. Devor M. Neuropathic pain: what do we do with all these theories? *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45(9):1121-7.
8. Dubner R, Gold M. The neurobiology of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(14):7627-30.
9. Woolf CJ. Somatic pain - pathogenesis and prevention. *British Journal of anaesthesia* 1995.:169-176.
10. Loeser JD. PAIN THEORIES. U: Loeser JD, urednik. Bonicas management of pain: Lippincott Williams and wilkins; 2001.
11. Bennett GJ., Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33(1):87-107.
12. 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(2):205-18.
13. 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.



14. Lin YW, Tseng TJ, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous nerve terminal degeneration in painful mononeuropathy. *Experimental Neurology* 2001;170(2):290-6.
15. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000;87(2):149-58.
16. Hogan Q. Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med* 2002;27(4):385-401.
17. Okamoto K, Martin D., Schmelzer J., Mitsui Y., Low P. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Experimental Neurology* 2001.;169:386-391.
18. Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, et al. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp Neurol* 2004;188(1):149-60.
19. Dowdall T, Robinson I., Meert T. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacology, Biochemistry and behavior* 2004.:93-105.
20. Yoon YW, Na HS, Chung JM. Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. *Pain* 1996;64(1):27-36.
21. 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(6):419-27.
22. Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec* 1986;215(1):71-81.
23. Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1991;114(1):82-103.
24. Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 1999;157(2):289-304.
25. Takahashi Y, Nakajima Y. Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. *Pain* 1996;67(1):197-202.

26. Wiesenfeld-Hallin Z. Partially overlapping territories of nerves to hindlimb foot skin demonstrated by plasma extravasation to antidromic C-fiber stimulation in the rat. *Neuroscience Letters* 1988;84(3):261-5.
27. Takahashi Y, Nakajima Y, Sakamoto T. Dermatome mapping in the rat hindlimb by electrical stimulation of the spinal nerves. [erratum appears in *Neurosci Lett* 1994 Jul 4;175(1-2):175]. *Neuroscience Letters* 1994;168(1-2):85-8.
28. Hsieh ST, Choi S, Lin WM, Chang YC, McArthur JC, Griffin JW. Epidermal denervation and its effects on keratinocytes and Langerhans cells. *Journal of Neurocytology* 1996;25(9):513-24.
29. Huang IT, Lin WM, Shun CT, Hsieh ST. Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience* 1999;94(3):965-73.
30. Chiang HY, Huang IT, Chen WP, Chien HF, Shun CT, Chang YC, et al. Regional difference in epidermal thinning after skin denervation. *Experimental Neurology* 1998;154(1):137-45.
31. Pitre DA, Seifert JL, Bauer JA. Perineurium inflammation and altered connexin isoform expression in a rat model of diabetes related peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 2001;303(1):67-71.
32. Zanone MM, Catalfamo E, Pietropaolo SL, Rabbone I, Sacchetti C, Cerutti F, et al. Glutamic acid decarboxylase and ICA512/IA-2 autoantibodies as disease markers and relationship to residual beta-cell function and glycemic control in young type 1 diabetic patients. *Metabolism* 2003;52(1):25-9.
33. Zanone MM, Favaro E, Catalfamo E, Quadri R, Sacchetti C, Cerutti F, et al. Autonomic function and autoantibodies to autonomic nervous tissues at follow-up in a cohort of young patients with type 1 diabetes. Effects of serum from diabetic patients on human adrenergic cells. *J Neuroimmunol* 2003;139(1-2):66-75.

34. Pertovaara A, Wei H. Peripheral effects of morphine in neuropathic rats: role of sympathetic postganglionic nerve fibers. *Eur J Pharmacol* 2001;429(1-3):139-45.
35. Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, et al. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(1):56-62.
36. Sommer C, Marziniak M, Myers RR. The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. *Pain* 1998;74(1):83-91.
37. Hogan Q, Sapunar D, Modric-Jednacak K, McCallum JB. Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 2004;101(2):476-87.
38. Hsieh ST, Lin WM. Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J Invest Dermatol* 1999;113(4):579-86.
39. Katsuno M, Aihara M, Kojima M, Osuna H, Hosoi J, Nakamura M, et al. Neuropeptides concentrations in the skin of a murine (NC/Nga mice) model of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2003;33(1):55-65.
40. Li Y, Hsieh ST, Chien HF, Zhang X, McArthur JC, Griffin JW. Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Experimental Neurology* 1997;147(2):452-62.
41. Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 1983;278(1-2):224-8.
42. Ohsawa M, Narita M, Mizoguchi H, Cheng E, Tseng LF. Reduced hyperalgesia induced by nerve injury, but not by inflammation in mice lacking protein kinase C gamma isoform. *Eur J Pharmacol* 2001;429(1-3):157-60.
43. Li Y, Dorsi MJ, Meyer RA, Belzberg AJ. Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain* 2000;85(3):493-502.

44. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 2005;72(5):359-71.
45. Xie W, Strong JA, Meij JT, Zhang JM, Yu L. Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger. *Pain* 2005;116(3):243-56.
46. Devor M, Seltzer Z., editor. *Pathology of damaged nerves in relation to chronic pain*. 4th edition ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999.
47. Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. [Review] [44 refs]. *Pain* 1999;Suppl 6:S27-35.
48. Sheen K, Chung JM. Signs of neuropathic pain depend on signals from injured nerve fibers in a rat model. *Brain Research* 1993;610(1):62-8.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ivana Dujmović, prof.**

**Datum rođenja:** 13. prosinca 1972.

**Mjesto rođenja:** Split, Hrvatska

**Adresa:** Gašpina mlinica 59A, 21 210 Solin, Hrvatska

**Kontakti:**

Tel.: 021 / 210-338

Mob.: 091 / 54 77 044, 095 / 905 73 08

e-mail: ivanad@net4u.hr

**Bračno stanje:**

- Udata, majka petogodišnjeg dječaka

**Obrazovanje:**

- 1987.- 1991. Kemijski školski centar, Split
- 1991.-1998.  
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu  
Smjer Biologija - Kemija  
\* položen državni ispit
- 2001.-2003.  
Poslijediplomski znanstveni studij u Splitu  
Temeljne i kliničke medicinske znanosti  
Smjer: Klinička fiziologija
- sudjelovanje na znanstvenom skupu "The Second European-American Intensive Course in Clinical And Forensic Genetics", Dubrovnik, Hrvatska, rujan 3-14, 2001.

**Akademski naslovi:**

- 1998.: profesor biologije i kemije  
Diplomski rad: "Standardizacija metode za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peptid sintetaza", mentor: prof. dr. sc. Maja Pavela-Vrančić

**Radno iskustvo:**

- 1998. – 2003.  
OŠ "Ante Anđelinović", Sućuraj, o. Hvar
- 2003.-2005.  
OŠ "prof. Filip Lukas"Kaštel Stari

- 2004.-  
OŠ"Kman-Kocunar", Šplit
- 2005.-  
OŠ"Split 3", Splt

**Ostale aktivnosti:**

- 2002.: -  
Vanjski suradnik u Centru za socijalnu skrb, Split  
Voditelj nadzora pojačane brige nad roditeljskom skrbi i maloljetničkom delikvencijom
- 2006.-  
Voditelj županijskog vijeća iz kemije Splitsko-dalmatinske županije
- 2006.-  
Voditelj i edukator školskih preventivnih programa, OŠ"Kman-Kocunar", Šplit

**Strani jezik:**

Engleski jezik- aktivno znanje

**Ostalo:**

- Rad u Microsoft Office ( Word, Excel )
- Služenje Internetom
- Izrada Web stranica