Terapija boli inhibitorima enzima kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaze II u modelu dijabetičke neuropatije

Jeličić Kadić, Antonia

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:870341

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Antonia Jeličić Kadić, dr. med.

TERAPIJA BOLI INHIBITORIMA ENZIMA KALCIJ/KALMODULIN-OVISNE PROTEIN KINAZE II U MODELU DIJABETIČKE NEUROPATIJE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2014.





Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za istraživanje boli na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je provedeno uz potporu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) broj 02.05./28.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Livia Puljak

ZAHVALE

Od srca se zahvaljujem svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju koji su mi pomogli u radu i usavršavanju.

Posebno hvala prof. Damiru Sapunaru na strpljenju i uvijek veselim odgovorima na moja brojna pitanja. Veliko hvala kolegi Matiji Boriću, mojoj „laboratorijskoj polovici“, bez tebe ništa ne bi bilo isto. Hvala Svjetlani Došenović na nesebičnoj pomoći i podršci.

Neizmjerno hvala mentorici, prof. Liviji Puljak, na stručnoj pomoći u izradi ove disertacije. Livia, hvala Vam za sve trenutke koje ste proveli sa mnom. Sigurna sam da ste najbolja šefica koju ću ikada imati. Hvala Vam na snazi, volji, upornosti i prijateljstvu. Hvala Vam što ste bili tu čak i kad mi je suze trebalo brisati.

Na kraju hvala mojoj velikoj obitelji, izvoru moje snage. Mami Nedjeljki i tati Anti hvala što su me napravili ovakvu kakva jesam i što mi uvijek u životu pomažu. Hvala sestrama Martini i Vinki i bratu Stjepanu što su me ohrabrivali i pomagali mi se podignuti kad bih pokleknula. Hvala mom zetu Dariju i nevjesti Milani što su bili uz mene za sve što mi je trebalo. Hvala mojim zvijezdama Luciji i Anti što postoje.

Hvala mom mužu Marku, mojoj životnoj polovici. Hvala što si izdržao.

1. SADRŽAJ

1. UVOD 7
1.1 Bol 7
1.1.1 Mehanizam nastanka i prijenosa boli 8
1.1.2 Eksperimentalni modeli neuropatske boli 10
1.2 Liječenje boli 11
1.2.1 Farmakološke metode liječenja boli 11
1.2.2 Nefarmakološke metode liječenja boli 16
1.3 Šećerna bolest 16
1.3.1 Šećerna bolest tipa 1 17
1.3.2 Komplikacije šećerne bolesti 19
1.4 Dijabetička neuropatija 20
1.5 Kinaze i nocicepcija 23
1.5.1 Protein kinaze i nocicepcija 23
1.5.2 Lipid kinaze i nocicepcija 24
1.6 Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza 24
1.6.1 Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza II 25
1.6.2 Struktura i regulacija enzimatske aktivnosti CaMKII 25
1.6.3 Funkcija CaMKII 27
1.7 CaMKII i bol 29
1.8 Inhibicija CaMKII kinaze i bol 30
1.9 CaMKII i dijabetička neuropatija 32
2. HIPOTEZA 33
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 34
4. METODE ISTRAŽIVANJA 35
4.1 Pokusne životinje 35
4.2 Postupci 36
4.2.1 CaMKII inhibitori 36
4.2.2 Intratekalna primjena 37
4.2.3 Intraganglijska primjena 38
4.2.4 Testiranje ponašanja 38
4.2.5 Priprema tkiva za imunofluorescenciju 39
4.2.6 Analiza slika i kvantifikacija 40
4.3 Statistički postupci 41
4.4 Etička pitanja 41

5. REZULTATI 42
5.1 Utjecaj intratekalnog ubrizgavanja inhibitora CaMKII i fiziološke otopine na bolno ponašanje štakora 42
5.2 Utjecaj intraganglijskog ubrizgavanja inhibitora CaMKII i fiziološke otopine na bolno ponašanje štakora 43
5.3 Izražaj CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine nakon intratekalne primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine 44
5.4 Izražaj CaMKII u spinalnom gangliju nakon intraganglijske primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine 46
6. RASPRAVA 50
7. ZAKLJUČCI 56
8. SAŽETAK 57
9. SUMMARY 58
10. LITERATURA 59
11. ŽIVOTOPIS 80

POPIS KRATICA I OZNAKA

ATP	adenozin-3-fosfat
CaMKII	kalcij/kalmodulin ovisna protein kinaza II
pCaMKIIα	fosforilirana kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II alfa
CaMKIIβ	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II beta
CaMKIIγ	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II gama
CaMKIIδ	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II delta
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat
CCI	kronična konstrikcijska ozljeda (engl. *chronic constriction injury*)
CDK	ciklin ovisna kinaza (engl. *cyclin dependant kinase*)
CDK5	ciklin ovisna kinaza 5
DM	šećerna bolest (diabetes mellitus)
DM1	šećerna bolest tip 1
DM2	šećerna bolest tip 2
DPN	dijabetička polineuropatija (engl. *diabetic polyneuropathy*)
DSPN	dijabetička senzomotorna polineuropatija (engl. *diabetic sensorimotor polyneuropathy*)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signaliziranjem (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)
HLA	humani leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen)*
IASP	Međunarodno udruženje za istraživanje boli (engl. *International Association for the Study of Pain*)

IDF	Međunarodna dijabetička federacija (engl. *International Diabetic Federation)*
PI 3-K	fosfoinozitid 3-kinaza
mAIP	miristoilirani inhibicijski peptid povezan s autokamtidom-2
MAPK	mitogenom-aktivirana protein kinaza
NC	živčana provodnost (engl. *nerve conduction*)
NSAIL	nesteroidni protuupalni lijekovi
NMDA	N-metil D-aspartat
SNL	podvezivanje spinalnog živca (engl. *spinal nerve ligation*)
PK	protein kinaza
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PSL	parcijalno podvezivanje živaca (engl. *partial sciatic nerve ligation*)
S1P	sfingozin-1-fosfat
STZ	streptozotocin
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)
TENS	transkutana električna stimulacija živca (engl. *Transcutaneous electrical nerve stimulation*)

1. UVOD

1.1 Bol

Prema definiciji Međunarodnog udruženja za istraživanje boli (engl. *International Association for the Study of Pain – IASP*) bol je neugodan osjetni i emocionalni doživljaj povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili opisan u okvirima takvog oštećenja (1).

Bol se može klasificirati na razne načine: prema lokaciji i trajanju kao brza „površinska“, spora „površinska“ i „duboka“ utrobna bol, zatim kao periferna ili distalna, a prema duljini trajanja može biti akutna ili kronična (2).

Akutna bol nastaje aktivacijom nociceptora i traje kratko, a opisuje se kao simptom koji upućuje na oštećenje tkiva ili bolest (2). IASP definira kroničnu bol kao bol bez vidljive biološke vrijednosti koja traje dulje od normalnog vremena ozdravljenja tkiva. Obično se uzima da je kronična bol ona koja traje dulje od 3 mjeseca (1). Kronična bol posljedica je sekundarnih promjena, trajnih patoloških poremećaja u detekciji i obradi signala za bol i ne mora biti izravno povezana s ozljedom ili bolesti (3). Značajke kronične boli su bolna preosjetljivost (fenomen hiperalgezije) i bol nakon podražaja koji u uobičajenim okolnostima ne uzrokuje bol (fenomen alodinije) (4).

Iz IASP-ove definicije boli jasno je da bol nije samo osjet, već i percepcija. Ljudi percipiraju bol na razne načine, a tri glavna načina su:

a) oštra, štipajuća ili ubodno sijekuća bol; točno lokalizirana i brzo prolazi,
b) žareća, pekuća bol; dugotrajnija i slabije lokalizirana, i
c) duboka probadajuće sijevajuća tupa i difuzna bol; bol iz organa i dubokih potkožnih tkiva.

Postojanje raznih klasifikacija boli može se objasniti postojanjem četiri komponente boli – nocicepcija, percepcija boli, osjećaj boli i ponašanje povezano s boli (2).

Nocicepcija je proces neuronskog kodiranja štetnog podražaja. Posljedice mogu biti autonomne (npr. povišeni arterijski tlak) ili promjene ponašanja (1). Percepcija boli većinom je posljedica djelovanja štetnog podražaja, kao što su ozljeda ili bolest (5). Bol, međutim,

može biti i posljedica oštećenja perifernog ili središnjeg živčanog sustava. Primjeri za to su dijabetička neuropatija, bol nakon ozljede kralježnice i bol tijekom moždanog udara (5).

Osjećaj boli je negativni odgovor na bolni podražaj, a može biti i odgovor na strah, anksioznost, stres, gubitak stvari, voljenih osoba, i slično (6).

Osnovni primjeri ponašanja povezanog s boli u ljudi su razne vrsta glasanja (kao što je „jao“) i grimasa lica. Osim toga osobe koje pate od boli češće pate od depresije i anksioznosti te češće osjećaju društvenu isključenost (7, 8).

1.1.1 Mehanizam nastanka i prijenosa boli

Prema mehanizmu nastanka bol se može podijeliti na nociceptivnu i neuropatsku (9). Nociceptivna bol nastaje zbog aktivacije nociceptora kao posljedice stvarnog ili prijetećeg oštećenja ne-živčanog tkiva. Ovaj termin osmišljen je kako bi se napravila jasna razlika u odnosu na neuropatsku bol. Naziv „nociceptivna bol“ koristi se za opisivanje boli tijekom koje je funkcija somatosenzornog živčanog sustava normalna, za razliku od patološke funkcije koja se može vidjeti tijekom neuropatske boli (1).

Neuropatska bol je bol nastala kao posljedica oštećenja ili bolesti somatosenzornog živčanog sustava. Neuropatska bol je klinički opis, a ne dijagnoza, koji zahtijeva dokazanu leziju ili bolest koja zadovoljava zadane neurološke dijagnostičke kriterije. Naziv „oštećenje“ koristi se kada dijagnostičke pretrage (npr. neurofiziologija, biopsija, laboratorijski testovi) otkrivaju nepravilnosti ili kada postoji očita trauma. Naziv „bolest“ obično se koristi kada je osnovni uzrok oštećenja poznat (npr. moždani udar, vaskulitis, šećerna bolest, genske abnormalnosti i sl.). Naziv „somatosenzorni“ odnosi se na informacije o tijelu, uključujući visceralne organe, a ne informacije o vanjskom svijetu (npr. vid, sluh i okus). Postojanost simptoma ili znakova samo po sebi ne opravdava korištenje naziva „neuropatski“. Neka oboljenja, kao što je trigeminalna neuralgija, trenutno su definirana njihovom kliničkom prezentacijom, a ne objektivnim dijagnostičkim testom. Postavljanje dijagnoze drugih bolesti, kao što je postherpetična neuralgija, temelji se na poznavanju povijesti bolesti. Prilikom istraživanja neuropatske boli dijagnostičke pretrage mogu dati neuvjerljive ili čak nedosljedne podatke. U

takvim slučajevima, klinička prosudba je potrebna kako bi se ukupni nalaz u bolesnika sažeo u jednu dijagnozu ili jezgrovitu skupinu dijagnoza (1).

Receptori koji registriraju štetne podražaje iz okolice nazivaju se nociceptorima i oni su prva crta obrane u održavanju tjelesnog integriteta pojedinca (10). Nociceptori se većinom nalaze na perifernim krajevima Aδ i C živčanih vlakana. Mehanička stimulacija kože podražuje mijelinizirana A-vlakna koja ne reagiraju na visoku i nisku temperaturu, dok C-polimodalna vlakna reagiraju na mehaničke, kemijske i toplinske podražaje (11).

Postoje tri vrste nociceptora: termalni, mehanički i tihi. Temperatura >45^{o}C i <5^{o}C aktivira termalne nociceptore, jaki pritisak na kožu aktivira mehaničke receptore, a tihi nociceptori ne aktiviraju se na bolni podražaj u fiziološkim uvjetima, no djelovanjem medijatora upale dolazi do njihove senzitizacije i aktivacije (11).

Nakon početnog štetnog podražaja nastaje proces upale tijekom kojega prostaglandini, tromboksan, leukotrieni, serotonin, histamin, bradikinin i druge tvari sinergističkim djelovanjem podražuju periferna aferentna vlakna koja čine glavni put prijenosa osjetnih informacija s periferije prema kralježničnoj moždini (10). Tijela perifernih aferentnih vlakana koja inerviraju tijelo i glavu smještena su u trigeminalnim i spinalnim ganglijima (12).

Nakon što se nociceptor podraži impuls se širi duž perifernog živčanog vlakna i završava u dorzalnom rogu kralježnične moždine gdje se impuls širi na interneurone i sekundarne neurone smještene u Rexedovim slojevima I i II i dio lamine V za vlakna iz unutarnjih organa (13).

Glavni ekscitacijski neurotransmiter primarnih aferentnih vlakana je glutamat koji aktivira postsinaptičke α-amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-propionat (AMPA) glutamatne receptore (14). Nocicepcijska vlakna izravno ili neizravno djeluju na tri vrste neurona dorzalnog roga: a) projekcijske sekundarne osjetne neurone, b) ekscitacijske interneurone (prenose informacije s osjetnih na projekcijske neurone) i c) inhibicijske neurone (nadziru tijek informacija od prvog do drugog neurona osjetnog puta za bol) (14).

Važna područja za nadzor štetnih podražaja su kora velikog mozga, središnja siva tvar mezencefalona (periakveduktalna siva tvar), locus ceruleus i retikularna formacija. Retikularna formacija važno je mjesto u facilitaciji ili inhibiciji percepcije boli (10).

Informacije o boli dalje putuju uzlaznim putovima do mozga, uključujući izravne projekcije u talamus (spinotalamički put), izravne projekcije u homeostatska područja medule i moždanog debla (spinobulbarni put) te moguće projekcije u hipotalamus i veliki mozak (spinohipotalamički put) (15). Projekcije neurona dorzalnog roga završavaju u raznim područjima mozga te uključuju motorne, afektivne, diskriminativne, autonomne, motivacijske i kognitivne aspekte bolnog ponašanja (3).

1.1.2 Eksperimentalni modeli neuropatske boli

Zbog etičkih zapreka vezanih za istraživanja o nastanku i terapiji boli, takva istraživanja se u predkliničkoj fazi rijetko provode na ljudima. Štakori su životinje koje se najčešće koriste kao model ljudskih bolesti, uključujući istraživanja neuropatske boli. Postoji nekoliko životinjskih modela neuropatske boli, koje podrazumijevaju izazivanje oštećenja dijela živčanog sustava, a mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine:

a) prema mjestu na kojem se izaziva oštećenje (dorzalni ili ventralni korijen, spinalni živac, spinalni ganglij ili periferni živci) i

b) prema vrsti ili tipu oštećenja (transekcija, krioneuroliza, podvezivanje, gnječenje, infiltracija tumorskim stanicama ili izazivanje upale).

Najčešće korišteni modeli neuropatske boli su:

a) parcijalno podvezivanje živaca (engl. *partial sciatic nerve ligation* – PSL) (16)
b) kronična konstrikcijska ozljeda (engl. *chronic constriction injury* – CCI) (17)
c) podvezivanje spinalnih živaca (engl. *spinal nerve ligation* – SNL) (18) i
d) model dijabetičke neuropatije (19).

Parcijalne ozljede živca čest su uzrok boli u ljudi. Štakorski model PSL provodi se jednostranim podvezivanjem 30-50% vlakana ishijadičnog živca. Nekoliko sati nakon zahvata štakori razvijaju pretjerano bolno ponašanje (16). Model CCI provodi se labavim podvezivanja ishijadičnog živca koncem od prirodnog resorptivnog materijala (engl. *catgut*) (17). Nedugo nakon zahvata može se dokazati postojanost spontane boli, hiperalgezije na

povišenu temperaturu i alodinije na sniženu temperaturu (17). SNL model uključuje podvezivanje i presijecanje L5 i L6 spinalnih živaca (18). Za istraživanje dijabetičke neuropatije postoji nekoliko modela. Najčešće korišteni su kemijski inducirana šećerna bolest kemikalijama koje uništavaju beta stanice gušterače kao što su streptozotocin i aloksan, prehranom inducirana šećerna bolest i *knock out* genetički modeli šećerne bolesti. Manifestacije dijabetičke neuropatske boli variraju od toplinske ili kemijske hiperalgezije, toplinske ili kemijske hipoalgezije, alodinije i spontane boli (19).

1.2 Liječenje boli

Bol se može liječiti farmakološkim i nefarmakološkim metodama (fizikalna terapija, transkutana električna stimulacija živca (TENS), laser, primjena topline ili hladnoće, psihološka terapija, relaksacija, kognitivno-biheviоralna terapija) (10).

1.2.1 Farmakološke metode liječenja boli

Glavna podjela farmakoloških metoda liječenja boli je prema mehanizmu djelovanja aktivne tvari pa tako postoje neopioidni analgetici i antipiretici gdje ubrajamo analgoantipiretike i nesteroidne protuupalne lijekove (NSAIL), zatim narkotični lijekovi (opijati i opioidi) te pomoćni lijekovi za liječenje boli (16).

Lijekovi slabijeg djelovanja (neopioidni analgetici) prvi su izbor za liječenje kronične boli. Tek kada njihov učinak nije zadovoljavajući uvodi se lijek jačeg djelovanja. Algoritme za liječenje boli preporučuje Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) (17).

1.2.1.1 Neopioidni analgetici i antipiretici

U skupinu neopioidnih analgetika i antipiretika pripadaju analgoantipiretici i NSAIL. Imaju isti mehanizam djelovanja i iste indikacije, ali različitu kemijsku strukutru. Antiagregacijski

učinak ovi lijekovi postižu inhibicijom ciklooksigenaze-1. Antipiretski, analgetski, protuupalni i protrombotički učinak postiže se inhibicijom ciklooksigenaze-2, dok inhibicija ciklooksigenaze-3 ima analgetski i antipiretski učinak. Glavna razlika između analgoantipiretika i NSAIL lijekova je to što analgoantipiretici nemaju antireumatski učinak (16).

U skupinu analgoantipiretika ubrajamo:

a) derivate anilina (paracetamol)
b) derivate salicilne kiseline (acetilsalicilna kiselina)
c) derivate pirazolona (metamizol i propifenazon) (10).

Paracetamol je centralni inhibitor ciklooksigenaze i također inhibira perifernu sintezu prostaglandina, a koristi se za liječenje srednje teške akutne ili kronične boli (22). Prednost mu je što se može primjenjivati oralnim, intravenskim ili rektalnim putem (23). Optimalna doza za odrasle je 1 g, a maksimalna dnevna doza je 4 g (22).

Acetilsalicilna kiselina uspješna je u liječenju glavobolje, zubobolje, bolova u mišićima, a male doze rabe se za prevenciju srčanog udara (10).

Pirazoloni imaju snažno analgetsko djelovanje, ali mogu izazvati oštećenje koštane srži i posljedične promjene krvne slike. Često se koriste u kombinaciji s drugim analgoantipireticima ili simpatomimeticima (10).

Skupina NSAIL ima protuupalno, antireumatsko, antipiretsko i analgetičko djelovanje. Iako NSAIL imaju visoku učinkovitost, njihova je primjena povezana s brojnim nuspojavama vezanim za promjene jetrene, bubrežne i kardiovaskularne funkcije te promjenama na koži i u probavnom sustavu (20). Nuspojave vezane za probavni sustav su najučestalije, a obuhvaćaju čitav spektar promjena, od dispepsije, osjećaja žarenja i pečenja, abdominalne boli pa sve do nastanka ulkusa s komplikacijama opasnim po život pacijenta (25). U skupinu NSAIL pripadaju:

a) diklofenak
b) indometacin i
c) oksikami (10).

Diklofenak je derivat octene kiseline i vrlo često se upotrebljava u terapiji mišićno-koštane boli, bilo oralnim ili lokalnim putem primjene (26).

Indometacin ima jaki protuupalni i antireumatski učinak i koristi se u liječenju boli kod bolesnika s reumatoidnim artritisom, spondiloartritisom, degenerativnim bolestima zglobova i uričnim artritisom (23).

U oksikame se ubrajaju piroksikam, ibuprofen, ketoprofen, naproksen i koksibi (10). Rezultati meta-analize o učinkovitosti piroksikama u usporedbi s ostalim NSAIL u liječenju mišićno-koštane boli pokazali su da piroksikam ima bolju učinkovitost, a gastrointestinalne nuspojave su sličnog intenziteta (ponekad i manje izražene) nego kod ostalih NSAIL (28).

1.2.1.2. Narkotični analgetici

Opioidi su često korišteni i učinkoviti analgetici. Koriste se preko 1 000 godina za liječenje boli, a u posljednjem stoljeću napravljen je veliki iskorak u razvijanju sintetskih opioida (29). Najčešće nuspojave opioidamogu se podijeliti u periferne (opstipacija, retencija mokraće, bronhospazam, osip) i centralne (mučnina, sedacija, depresija disanja, hipertenzija, mioza) a svi značajno utječu na kliničku korist lijekova i bolesnikovu kvalitetu života (30, 31). Bilo je mnogo bezuspješnih pokušaja u razvitku novih opioidnih lijekova; razlog tome je nepotpuno poznavanje uzroka razvoja tolerancije na analgetski učinak (32).

Opioidni sustav važan je u modulaciji bolnog ponašanja i antinocicepcije. Opioidni peptidi i njihovi receptori važni su u nocicepciji i povratnom emocionalnom reagiranju na bolne podražaje. Postoje najmanje tri različita opioidna receptora: mu (μ), delta (δ) i kapa (κ) (33). Najčešće korišteni opioidi djeluju na μ receptore, a osim analgetskog učinka dovode do euforije, respiracijske depresije, mučnine i povraćanja, smanjene pokretljivosti probavnih organa, tolerancije i ovisnosti (29). U tablici 1. prikazani su najčešće korišteni opioidni analgetici te njihovo doziranje.

Tablica 1. Opioidni analgetici (10)

Lijek	Aktivacija receptora	Jakost	Doza (mg)	Trajanje učinka (h)	Stalna infuzija
Morfin i njegovi derivati					
morfin	μ	1	2–5	4–6	0,7–2 mg/h
diamorfin	μ			4–6	
kodein	prodrug			4	
hidromorfon		5–10			
hidroksikodon					
oksikodon	μ, κ	2		4–6	
Sintetski opioidni analgetici					
metadon	μ	1,5		6–8	
mepiridin	μ, κ, δ	0,1	25–50	2–4	20–40 mg/h
fentanil		100		0,4–0,5	
tramadol	μ, κ, δ		50–100	6	0,2–0,3 mg/kg/h
nalbufin	miješani			5–6	
dihidrokodein	μ (slabo)			4	
Parcijalni agonisti-antagonisti					
pentazocin	miješani			2–4	
butorfanol			2	4–6	

1.2.1.3. Pomoćni lijekovi za liječenje boli

Pomoćni lijekovi za liječenje boli su antiepileptici, selektivni i neselektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina, blokatori natrijevih kanala, triciklički antidepresivi, antiaritmici, benzodiazepini, lokalni anestetici i kortikosteroidi (10).

Antiepileptici gabapentin i pregabalin preporučuju se kao lijek prvog izbora u liječenju neuropatske boli. Oni se vežu za α2δ1 podjedinicu kalcijevih kanala u brojnim područjima mozga i površinskoj lamini stražnjeg roga kralježnične moždine (34). Oba lijeka učinkovita su u liječenju postherpetične neuralgije i bolne periferne dijabetičke neuropatije, kao i boli koja nastaje kao posljedica aktivacije ili oštećenja središnjeg živčanog sustava. Dobro se podnose i slabo reagiraju s drugim lijekovima, a najčešće nuspojave su vrtoglavica i pospanost (35).

Triciklički antidepresivi i inhibitori ponovnog unosa serotonina također su lijekovi čija je uspješnost najbolja u liječenju neuropatske boli. Triciklički antidepresivi učinkoviti su u liječenju bolne periferne dijabetičke neuropatije, boli nakon ozljede živaca, postherpetične neuralgije i središnje boli nakon moždanog udara (36). Osim liječenja boli oni poboljšavaju raspoloženje bolesnika, stoga su lijek izbora u liječenju bolesnika s neuropatskom boli i depresijom (37). Glavne nuspojave tricikličkih antidepresiva su posljedica njihova anti-kolinergičnog i anti-histaminskog učinka, uključujući suhoću usta, opstipaciju i ortostatsku hipotenziju. Međutim, mogu utjecati i na kalijeve kanale i produžiti QT interval, što je posebno važno ako bolesnici boluju od ishemijske bolesti srca ili poremećaja ventrikularne provodljivosti. Zato je, kao preduvjet korištenju tricikličkih antidepresiva, obavezan nalaz elektrokardiografije (36). Inhibitori ponovnog unosa serotonina učinkoviti su u liječenju bolne periferne dijabetičke neuropatije (38). U usporedbi s tricikličkim antidepresivima bolesnici lakše podnose inhibitore ponovnog unosa serotonina jer nemaju anti-kolinerigične, anti-histaminske i anti-adrenergične nuspojave (39). Najčešće nuspojave su vezane uz probavni sustav (mučnina i povraćanje) (40).

1.2.2 Nefarmakološke metode liječenja boli

U nefarmakološke metode liječenja boli ubrajaju se:

a) edukacija (npr. metode hipnoze, tečajevi kognitivnog restrukturiranja)
b) TENS
c) fizikalna terapija
d) psihološke/psihijatrijske mjere (kognitivno-bihevioralna terapija) i
e) radioterapija (41).

Sustavni pregled o učinku edukacijskih mjera na bol u bolesnika s multiplom sklerozom pokazao je kako je najveće smanjenje boli postignuto kombinacijom hipnoze i kognitivnog restrukturiranja (42). U fizikalnu terapiju ubrajaju se intervencije koje koriste toplinu, hladnoću, vodu, tlak, elektromagnetsko zračenje, električnu struju te razne oblike kineziterapije. TENS je jedna od najčešće primjenjivanih analgetičkih metoda, međutim, način moduliranja boli kod ove terapije nije do kraja razjašnjen. Radi se o niskovoltažnoj stimulaciji frekvencijom 1–150 Hz jakosti 0–30 mA (10). Najviše dokaza o pozitivnom učinku psihološke terapije na bolno ponašanje ide u prilog kognitivno-bihevioralnoj terapiji (43).

1.3 Šećerna bolest

Šećerna bolest (diabetes mellitus, DM) skupina je metaboličkih bolesti karakterizirana hiperglikemijom koja nastaje zbog poremećaja u sekreciji i/ili djelovanju inzulina (44). Učestalost DM-a povećava se širom svijeta (45), a njegove komplikacije postale su značajnim uzrokom morbiditeta i mortaliteta u svijetu (46, 47).

Klinički se DM pojavljuje u 4 osnovna oblika koji se razlikuju prema svojoj etiologiji, terapijskom pristupu i prognozi (48). Prema klasifikaciji SZO iz 1999. godine razlikuju se:

a) tip 1 (ranije „inzulin ovisni“, DM1)
b) tip 2 (ranije “inzulin neovisni”, DM2)
c) drugi specifični tipovi i
d) trudnički DM (gestacijski) (38, 20).

Glavno obilježje DM1 je razaranje β-stanica gušterače i posljedični apsolutni nedostatak inzulina. Tip 1 se dijeli na dva podtipa; tip 1A – autoimuni i tip 1B – idiopatski. DM2 uzrokovan je inzulinskom rezistencijom i neodgovarajućim inzulinskim lučenjem (38, 20). U skupinu drugih specifičnih tipova ubrajaju se razna stanja i bolesti koji dovode do razvoja DM, kao što su genetski defekti funkcije β-stanica gušterače (npr. engl. *Maturity onset diabetes of the young*-MODY, autosomno dominantno nasljedni dijabetes s početkom u mladosti), genetski defekti djelovanja inzulina, bolesti egzokrinog dijela gušterače, endokrinopatije i sl (38, 20). Gestacijski DM je onaj koji se prvi put očituje ili dijagnosticira za vrijeme trudnoće (38, 20). DM se može pojaviti s karakterističnim simptomima kao što su prekomjerno mokrenje (poliurija), prekomjerno jedenje (polifagija) i pojačani osjećaj žeđi (polidipsija) (50).

Dijagnostički kriteriji DM prikazani su u tablici 2 (38, 20).

Tablica 2. Dijagnostički kriteriji DM prema SZO, 1999 (17)**.**

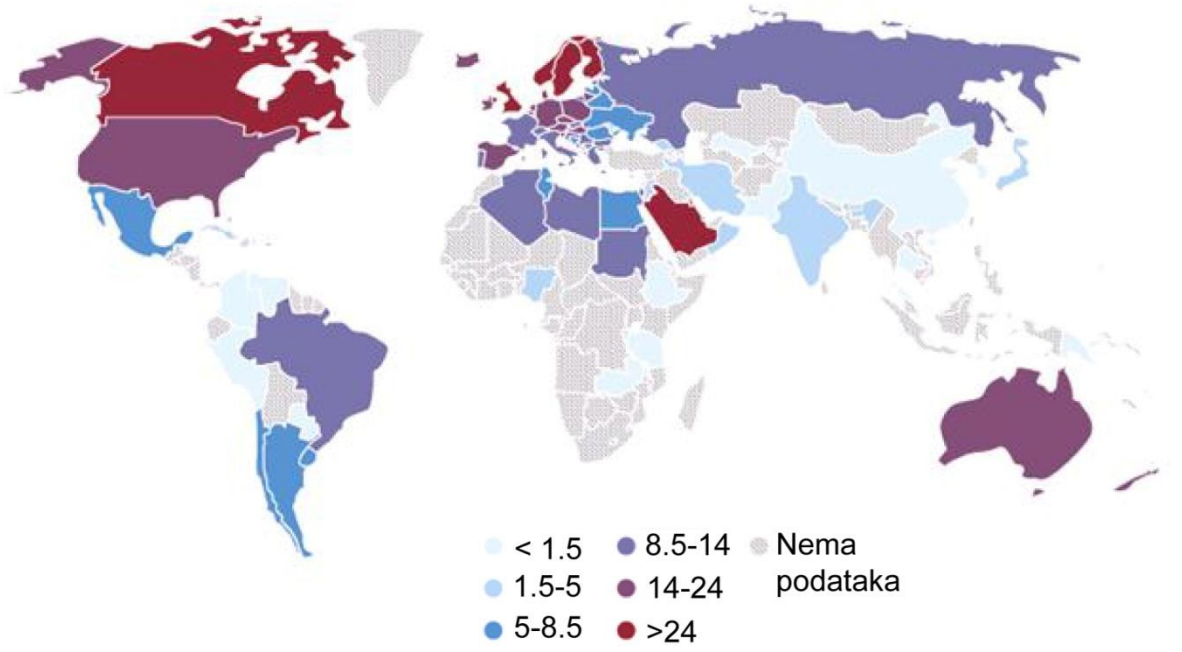
Glukoza (mmol/L)	**Krv**		**Plazma**	
	Venska	Kapilarna	Venska	Kapilarna
Natašte	≥6,1	≥6,1	≥7,0	≥7,0
Nakon 2 h tijekom testa opterećenja glukozom	≥10,0	≥11,1	≥11,1	≥12,2

1.3.1 Šećerna bolest tipa 1

DM1 je kronična bolest koja zahtjeva stalnu medicinsku skrb i edukaciju pacijenata kako bi se spriječile akutne komplikacije i umanjio rizik za nastanak kroničnih komplikacija (44). DM1 je kronična autoimuna bolest obilježena uništenjem β-stanica gušterače koje proizvode inzulin. (51). Iako je funkcija ostalih stanica Langerhansovih otočića u početku očuvana, manjak inzulina oštećuje i α-stanice koje proizvode glukagon (52).

DM1 je multifaktorijalna autoimuna bolest u kojoj se uz odgovarajuću genetsku predispoziciju pod utjecajem čimbenika iz okoline, pokrene autoimuni proces (53). Humani leukocitni antigeni (engl. *human leukocyte antigen – HLA*) najvažniji su antigeni u nasljeđivanju DM (54).

Žeđ, umor, pojačano mokrenje i gubitak težine ,bez obzira na apetit i uzimanje hrane, klasični su simptomi šećerne bolesti (51). Nekim bolesnicima, posebno djeci i adolescentima, prvi simptom bolesti može biti dijabetička ketoacidoza, drugi pak imaju hiperglikemiju koja može brzo napredovati te se u vrijeme stresa ili akutnih infekcija također manifestira ketoacidozom (44, 55). Incidencija DM1 je u porastu u svijetu, naročito u djece gdje se primijetio porast od 70% tijekom 15 godina (56). Prema podatcima Međunarodne dijabetičke federacije (engl. *International diabetes federation – IDF*) incidencija novo-dijagnosticiranih bolesnika u dobi od 0–14 godina na 100 000 stanovnika iznosi od 8,5–14 (57). Broj novo-dijagnosticiranih osoba s DM1 u drugim zemljama prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Broj novo-dijagnosticiranih osoba s DM-om tipa 1 (0–14 godina na 100 000 stanovnika) u 2013. godini prema IDF-u (57).

Liječenje DM-a temelji se na lijekovima, zdravoj prehrani, tjelovježbi i zdravom načinu života. U liječenju DM1 važna je i primjena inzulina (58).

1.3.2 Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije šećerne bolesti mogu biti akutne i kronične. U akutne komplikacije ubrajaju se:

a) hipoglikemija i hipoglikemijska koma
b) dijabetička ketoacidoza i dijabetička ketoacidotična koma
c) dijabetička hiperosmolarna neketotička koma i
d) laktacidotična koma (59).

Hipoglikemija je najčešća akutna komplikacija DM-a, a definirana je razinom glukoze u plazmi nižom od 3,88 mmol/L. Adrenergički (znojenje, tremor, tahikardija, anksioznost) i neuroglikopenijski (glavobolja, omaglica, stupor, koma i smrt) simptomi pojavljuju se kada je razina glukoze u plazmi niža od 2,5 mmol/L (60).

Dijabetička ketoacidoza je česta i ozbiljna akutna komplikacija dijabetesa te je važan uzrok smrtnosti. Nastaje zbog velikog manjka inzulina udruženog s porastom kontraregulacijskih hormona u bolesnika s DM1 (61). Klinički znakovi su: duboko, ubrzano, Kussmaulovo disanje uzrokovano acidozom, miris na aceton i bolovi u trbuhu popraćeni mučninom i povraćanjem (61).

Dijabetička hiperosmolarna neketotička koma najčešće nastaje nakon infekcije, akutnog vaskularnog incidenta ili primjene kortikosteroida. U kliničkoj slici dominira poliurija s posljedičnom jakom dehidracijom, polidipsijom, hiperglikemijom i visokom osmolalnosti plazme (62).

Laktacidotična koma javlja se u bolesnika koji uz DM boluju od bolesti u kojima je smanjena perfuzija tkiva s posljedičnom hipoksijom. Kliničkom slikom uz simptome osnovne bolesti dominiraju opća slabost, mučnina i povraćanje (62).

U kronične komplikacije DM-a ubrajaju se makrovaskularne i mikrovaskularne komplikacije (59). U makrovaskularne komplikacije ubrajaju se ishemična bolest srca, cerebrovaskularne i periferne vaskularne bolesti (59). U mikrovaskularne komplikacije ubrajaju se retinopatija, nefropatija i neuropatija (59).

Ishemična bolest srca javlja se u oko 10–20% oboljelih od DM-a, a posljedica je autonomne denervacije srca (63). Cerebrovaskularne bolesti čest su uzročnik morbiditeta i mortaliteta

oboljelih od DM. Relativni rizik za moždani udar u muškaraca s DM-om povećan je za 2,5–4,1 puta, a kod žena za 3,6–5,8 puta (64, 65). Oboljeli od DM-a imaju 2–4 puta veću incidenciju nastanka periferne vaskularne bolesti, a ona se povećava s godinama, trajanjem DM-a i postojanjem neuropatije (66).

Retinopatija je ozbiljna mikrovaskularna komplikacija DM-a i vodeći je uzrok sljepoće u osoba između 30 i 70 godina (67, 68), a obilježena je povećanom proliferacijom krvnih žila, vaskularnom okluzijom, angiogenezom, gubitkom pericita retinalnih kapilara, mikroaneurizmama i stanjivanjem kapilarne membrane (67).

Dijabetička nefropatija definira se kao progresivno smanjenje glomerularne filtracije, udruženo s proteinurijom i drugim komplikacijama dijabetesa (69). Dijabetička nefropatija napreduje do zadnjeg stadija bubrežnih bolesti obilježenog albuminurijom, mikroalbuminurijom i zatajenjem bubrežne funkcije. To napredovanje bolesti praćeno je hiperglikemijom, hipertenzijom i proteinurijom (70, 71).

Dijabetička neuropatija ozbiljna je komplikacija DM-a koja oštećuje autonomni i periferni živčani sustav (72). Neuropatija može biti asimptomatska, ali može se pojaviti i gubitak tetivnih refleksa te ozbiljna bol. Dijabetička neuropatija također uzrokuje inkontinenciju mokrenja, proljev ili opstipaciju te tako ozbiljno pogoršava kvalitetu života oboljelih od DM-a (72).

1.4 Dijabetička neuropatija

Dijabetička neuropatija je heterogena skupina bolesti koja obuhvaća širok spektar poremećaja i čiji je razvoj povezan sa DM (73). Neuropatija može biti senzorna ili motorna (74) te može zahvaćati primarno mala ili velika živčana vlakna (75). Oštećenje malih živčanih vlakana obično, ali ne i uvijek, prethodi oštećenju velikih živčanih vlakana i manifestira se prvo simptomima boli i hiperalgezije u području donjih ekstremiteta, a zatim i gubitkom toplinske osjetljivosti te osjetom žarenja i trnjenja (76). Oštećenje velikih vlakana obično se manifestira gubitkom osjeta vibracije, mišićnim slabljenjem te gubitkom tetivnih refleksa (73). Većina perifernih dijabetičkih neuropatija imaju kombinaciju oštećenja i malih i velikih živčanih vlakana (73).

Pretpostavlja se da veliku ulogu u nastanku dijabetičke neuropatije imaju metabolički, autoimuni i neurohormonalni poremećaji (73). Iako postoje dokazi o utjecaju navedenih poremećaja na nastanak dijabetičke neuropatije, glavna teorija nastanka dijabetičke teorije implicira hiperglikemiju kao primarni uzrok (77). Perzistentna hiperglikemija povećava poliolski put aktivacije s posljedičnim nakupljanjem sorbitola i fruktoze u neuronima, oštećujući ih tako još uvijek nepoznatim mehanizmom (73). Iako mehanizam oštećenja nije do kraja poznat, ovo nakupljanje smanjuje ulazak mio-inozitola u stanicu i inhibira Na^+/K^+ adenozin trifosfatazu, što rezultira nakupljanjem Na^+ u stanici, edemom, bubrenjem mijelina, prekidom aksoglijalne veze i živčanom degeneracijom (78).
Dijabetička neuropatija jedna je od najčešćih ranih komplikacija dijabetesa i pogađa oko 66% oboljelih od DM-a (79). Oštećenja živčanih vlakana u ranim stadijima dijabetesa mogu uzrokovati niz simptoma: od pretjeranog odgovora na bolni podražaj (hiperalgezija), pojave boli nakon podražaja koji obično ne nanosi bol (alodinija) pa sve do potpunog gubitka osjeta boli i temperature (80, 81).

Dijabetička neuropatija je najčešća komplikacija šećerne bolesti koja je povezana s boli. Klasificirana je u tri osnovne podskupine:

a) dijabetička polineuropatija (DPN),
b) fokalne i multifokalne neuropatije i
c) autonomne neuropatije (82).

Među navedenim oblicima najčešća je DPN, koja je odgovorna za 72% slučajeva dijabetičke neuropatije (82). DPN nadalje može biti akutna ili kronična. Kronična senzomotorna neuropatija najčešći je oblik DPN-a, a može biti bolna ili bezbolna s kompletnim ili djelomičnim gubitkom osjeta (82). Tipična dijabetička polineuropatija je kronična, simetrična, senzomotorna polineuropatija (DSPN) koja prvenstveno zahvaća najduže aksone koji primarno inerviraju stopala (83). Testiranje živčane provodljivosti (engl. *nerve conduction* – NC) rani je i pouzdan test za otkrivanje DSPN-a (84). Prema rezultatima ovoga testa i kliničkog pregleda DSPN se dijeli u četiri skupine (84):

a) **Subklinička DSPN.** Postojanost abnormalnog NC-a, ali bez znakova ili simptoma DSPN-a.

b) **Moguća DSPN.** Simptomi i znaci mogu biti: smanjena senzitizacija, pozitivni neurološki senzorički simptomi (trnci tijekom spavanja, osjećaj bockanja, žarenja i bolnog svrbeža) predominantno na nožnim prstima, stopalu i nogama.

c) **Vjerojatna DSPN.** Postojanje kombinacije najmanje dva od navedenih simptoma i znakova neuropatije: neuropatski simptomi, smanjena periferna senzitizacija, nepravilan i smanjen refleks Ahilove tetive.

d) **Potvrđena DSPN.** Postojanost abnormalnog NC-a i simptoma ili znakova DSPN-a.

Ne postoji točan podatak o prevalenciji boli u bolesnika sa DSPN-om, ali se smatra da taj postotak može biti i do 25% (85). Najčešći simptomi su simetrični i distalno ograničeni, često povezani s noćnim pogoršanjima, a pacijenti ih često opisuju kao bockanje, trnjenje, bolni svrbež, oštra bol kao udar električni struje i žarenje (86) s postojanjem hiperalgezije i alodinije (85). Simptomi su često povezani s kliničkim znakovima akutne bolne DPN iako mogu postojati simptomi bez kliničkih znakova bolesti (73). DSPN uzrokuje nastanak ulkusa na stopalima, razvoj dijabetičkog stopala i posljedičnu amputaciju udova (73).

U dostupnoj literaturi nema mnogo istraživanja kojima bi se mogao utvrditi utjecaj boli na psihološko stanje bolesnika s DM-om. Poznato je da se depresija pojavljuje dva puta češće u bolesnika s DM-om nego u općoj populaciji (7). Depresija i kronična bol imaju zajedničku patofiziologiju i ta se dva simptoma često dijagnosticiraju istim bolesnicima (8). DM značajno utječe na ponašanje bolesnika i njihovo psihološko stanje. Psihosocijalni čimbenici povezani su s gotovo svim oblicima liječenja DM-a (87) i važan su prediktor smrtnosti u oboljelih od DM-a, važniji od mnogih kliničkih i fizioloških čimbenika (88). U usporedbi s općom populacijom, oboljeli od DM-a češće pate od depresije, ali priroda te povezanosti nije razjašnjena i povezana je s povećanim rizikom smrtnosti. Smatra se da depresiju dijabetičara može uzrokovati psihološki stres zbog specifične dijagnostike i liječenja ili može biti posljedica metaboličkih poremećaja (7, 89).

Iako je provedeno mnogo istraživanja kako bi se utvrdila etiologija i odgovarajuća terapija boli u bolesnika s dijabetičkom neuropatijom do sada nije pronađen zadovoljavajući lijek (90).

1.5 Kinaze i nocicepcija

Kinaze su enzimi čija je funkcija fosforilacija odnosno prijenos fosfatne skupine s visoko energetskog donora, kao što je adenozin-3-fosfat (ATP) na supstrat (91). Opisano je preko 500 različitih kinaza u ljudskom organizmu (91).

1.5.1 Protein kinaze i nocicepcija

Protein kinaze (PK) fosforiliraju serinske, treoninske, tirozinske ili histidinske ostatke na proteinu. Njih je do sada najviše poznato i najčešće su istraživane kinaze (91). Tu se ubraja skupina ciklin-ovisnih kinaza (CDK), mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) i kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII).

CDK su skupina prolin-usmjerenih serin/treonin specifičnih protein kinaza koji imaju dvije podjedinice: katalitičku i regulacijsku (92). Važne su za kontrolu G1 faze stanične proliferacije eukariotskih stanica (93), a promjene u funkciji ovih kinaza mogu dovesti do razvoja neoplazmi (92). Ciklin-ovisna kinaza 5 (CDK5) važna je u nocicepciji (94). CDK5 nalazi se u postmitotskim neuronima i važna je u migraciji neurona, otpuštanju neurotransmitera, neuronskoj plastičnosti, memoriji, učenju, ovisnosti i apoptozi (95).

MAPK su serin/treonin specifične kinaze koje reguliraju brojne stanične aktivnosti kao što su mitoza, diferencijacija i apoptoza (96). Tri glavna pripadnika ove skupine su kinaza regulirana izvanstaničnim signaliziranjem (engl. *extracellular signal-regulated kinase* – ERK) uključujući i ERK1/2, p38 (uključujući p38α, p38β, p38γ, i p38δ) te c-Jun N-terminalna kinaza (JNK, uključujući JNK1, JNK2, i JNK3). Ozljeda perifernog živca (engl. *spinal nerve ligation – SNL*) uzrokuje aktivaciju MAPK kinaza u glijalnim stanicama kralježnične moždine (97-100).

Protein kinaza A (PKA) skupina je enzima čije djelovanje ovisi o razini cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) unutar stanice (101). Djelovanje PKA nije do kraja istraženo. Poznato je međutim da je RIIβ podjedinica PK dominantno izražena u nociceptivnim neuronima i može

imati ulogu u njihovoj aktivaciji (102). Intratekalna primjena agonista andenozin 2A receptora ublažuje neuropatsku alodiniju djelujući na PKA i protein kinazu C (PKC) (103).

1.5.2 Lipid kinaze i nocicepcija

Fosfoinozitid 3-kinaze (PI 3-K) pripadaju skupini lipid kinaza koje kataliziraju dodatak fosfatne skupine na mjesto 3 inozitolnog prstena fosfoinozitida (104). Novija istraživanja ukazuju na povezanost mutacije PI 3-K i toplinske osjetljivosti (105), centralne senzitizacije i hiperalgezije (106).
Sfingozin kinaze također pripadaju skupini lipid kinaza, a njihova je funkcija pretvaranje sfingozina u sfingozin-1-fosfat (S1P) (107). S1P je multifunkcijski enzim koji u perifernom živčanom sustavu djelujući na S1P1 i S1P3 receptore može povećati osjetljivost na različite bolne podražaje ili uzrokovati spontanu bol (107). Dokazano je da intraplantarna injekcija S1P uzrokuje perifernu osjetljivost i hiperalgeziju aktivirajući S1P receptore (108).

1.6 Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza

Koncentracija slobodnog unutarstaničnog kalcija precizno je regulirana različitim vrstama ionskih kanala, membranskih izmjenjivača i crpki smještenih na staničnoj membrani i unutarstaničnim skladištima kalcija (npr. endoplazmatski retikulum i mitohondriji) (109). Iako unutarstanično povećanje kalcija dovodi do stanične smrti, ono je najčešće kratkotrajno i prolazno. Te razlike u amplitudi, frekvenciji i lokaciji kalcija mogu kodirati razne poruke koje se mogu dešifrirati putem različitih enzima koji vežu kalcij među kojima je i kalmodulin (110). Kompleks kalcij-kalmodulin veže brojne ciljne proteine među kojima je i obitelj serin/treonin protein kinaza (kalcij-kalmodulin ovisne protein kinaze – CaMK) (110). Najvažnije CaMK su CaMKI, CaMKII i CaMKIV, a zadužene su za fosforilaciju (110).

1.6.1 Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza II

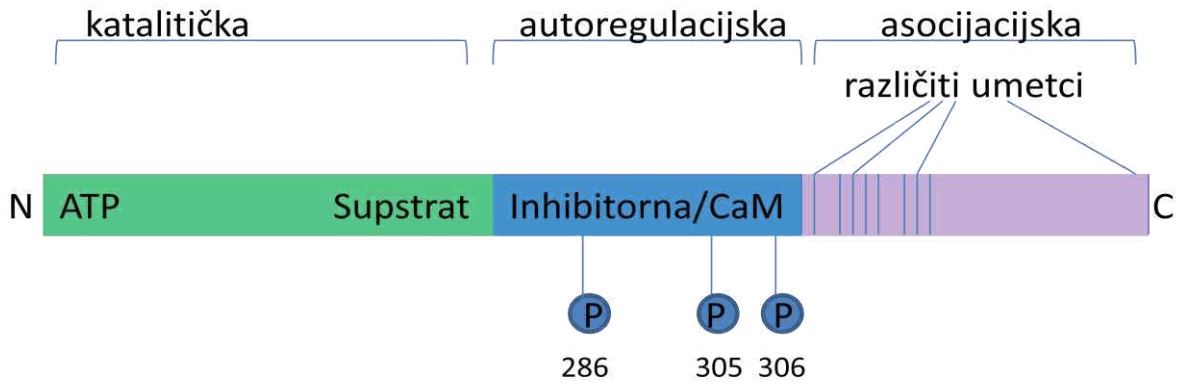
Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza II (CaMKII) je serin/treonin kinaza koja regulira mnoge fiziološke procese koji su posredovani kalcijem (111). CaMKII je jako izražena u neuronima i utječe na većinu neuronalnih funkcija uključujući izražaj gena, sintezu i egzocitozu neurotransmitera, funkciju ionskih kanala i signalizaciju (112-114).

1.6.2 Struktura i regulacija enzimatske aktivnosti CaMKII

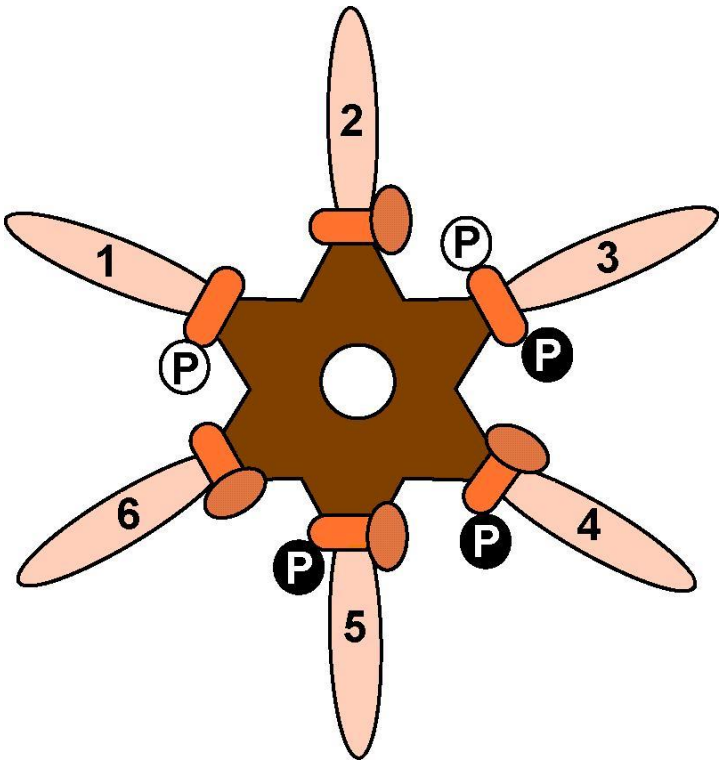
CaMKII je protein veličine 550-650 kD (115). Iako postoji oko 40-ak izoformi CaMKII (116) u sisavaca su najvažnije četiri – alfa, beta, gama i delta, kodirane s četiri različita, ali međusobno srodna gena α, β, γ i δ (112). Izoforme su različito raspoređene u živčanom sustavu pa se tako izoforme α i β primarno nalaze u središnjem živčanom sustavu, dok se izoforme γ i δ mogu naći u svim tkivima (117). CaMKII γ i δ dominantno se nalaze u srcu i važne su za normalnu srčanu funkciju (118, 119). U štakora CaMKII je najzastupljeniji protein u telencefalonu (120). Glavna CaMKII izoforma, pCaMKIIα, nalazi se zajedno sa mu opioidnim receptorima u različitim regijama živčanog sustava u kojima se obrađuje osjet boli, uključujući i površinske slojeve kralježnične moždine i spinalne ganglije (121).

Najviše CaMKII ima u hipokampusu, gdje čini 2% ukupne proteinske mase, a najmanje u striatumu gdje čini do 0.7% ukupne proteinske mase (120). CaMKII formira trodimenzionalni zupčanik izgrađen od 8–12 monomera povezanih C krajem (111, 122). Svaki monomer čine (od N do C kraja) katalitička domena s ATP-om i mjestom za vezanje supstrata, autoregulacijska (inhibicijska) domena s pseudosupstrat regijom i veznim mjestom za kalmodulin te asocijacijska domena (123). Slika 2 prikazuje shematski izgled CaMKII (112, 124).

A



B



Slika 2. A Shematski prikaz CaMKII monomera. Označeni su N kraj katalitičke domene i C kraj asocijacijske domene. Autoregulacijska domena (inhibicijska) nalazi se između katalitičke i asocijacijske domene i funkcionalno je podijeljena u dvije regije; vezno mjesto za kalmodulin (CaM) i pseudosupstrat regiju. **B** Prostorni izgled enzima vidljiv elektronskim mikroskopom: heksamerni prsten u kojem asocijacijske domene oblikuju središte, a katalitičke domene se pružaju prema vani (zbog jednostavnosti, prikazan je samo jedan prsten) (110). Legenda: ATP=adenozin-3-fosfat, CaM=kalcij-kalmodulin kompleks, P=fosfatna skupina.

Kada CaMKII nije aktivirana, inhibicijska domena blokira katalitičku domenu blokirajući tako vezanje supstrata. U prisustvu Ca^{2+}, Ca^{2+}/kalmodulin kompleks se može vezati za CaMKII i aktivirati je. Vezanje Ca^{2+}/kalmodulin kompleksa uzrokuje središnju interakciju između ostataka na C i N krajevima kalmodulina i aminokiselinama Leu299 i Leu308 na CaMKII (125). Kada je CaMKII aktivirana, konformacijska promjena uzrokuje otpuštanje inhibicijske domene s katalitičke i tako omogućava prijenos fosfatne skupine s ATP-a na supstrat. Trajni aktivacijski signal može inducirati autofosforilaciju enzima omogućavajući tako aktivnost enzima čak i kada aktivacijski signal prestane. Autofosoforilacija CaMKII može biti ovisna ili neovisna o kalciju. Simultano vezanje Ca^{2+}/kalmodulin kompleksa u jednom holoenzimu rezultira trans-autofosforilacijom aminokiseline Thr286 u inhibicijskoj domeni (126, 127). U ovom modelu aktivacije, autofosforilacija je jako osjetljiva na promjene unutarstanične razine kalcija (128). Kalcij-neovisna autofosforilacija CaMKII može se odvijati pomoću dva mehanizma. Prvo, spora autofosforilacija na aminokiselini Thr306 blokira daljnje vezanje Ca^{2+}/kalmodulin kompleksa, i tako CaMKII može ostati „zaključana“ dok se ovi ostatci ne defosforiliraju (129, 130). Drugo, nakon inicijalne autofosforilacije na aminokiselini Thr286, otpuštanje Ca^{2+}/kalmodulin kompleksa uzrokuje naglu autonomnu autofosforilaciju na aminokiselinama Thr305, Thr306 te Ser314 (131, 132).

Kada CaMKII nije autofosforilirana, enzim otpušta kompleks Ca^{2+}/kalmodulin i inaktivira se kada razina unutarstaničnog kalcija dođe na normalnu razinu. Međutim, kada je autofosforilirana, CaMKII čvrsto veže za sebe kompleks Ca^{2+}/kalmodulin i ostaje aktivna čak i onda kada se razina unutarstaničnog kalcija smanji na normalnu razinu (118, 133).

Brza autofosforilacija CaMKII može pretvoriti prolazna povećanja koncentracije kalcija u stanici u promjenu aktivnosti i fosforilaciju ciljnih proteina (134).

1.6.3 Funkcija CaMKII

Poznata je uloga CaMKII u dugoročnoj potencijaciji važnoj za pohranu novih informacija u formi dugoročnog pamćenja (135). Indukcija dugoročne potencijacije u CA1 regiji hipokampusa zahtijeva relativno visoke razine kompleksa Ca^{2+}/kalmodulin (136).

N-metil D-aspartat (NMDA) glutaminski receptori ključne su molekule u dugoročnoj potencijaciji, a CaMKII je važan medijator u ranoj fazi izražaja dugoročne potencijacije i

stvaranja memorije (137). Ulazak kalcija kroz NMDA receptore tijekom dugoročne potencijacije aktivira CaMKII i pospješuje sinaptički učinak dovodeći do nastanka sinaptičke plastičnosti (138), a inhibicija postsinaptičke CaMKII dovodi do prekida dugoročne potencijacije (139). NMDA receptori sastoje se od dvije obvezatne GluN1 podjedinice i dvije dodatne podjedinice GluN2 (GluN2A i GluN2B) i GluN3 koje tim receptorima daju određena svojstva (140). Sposobnost GluN2B podjedinice NMDA receptora je posredovanje čvrste veze između kalcija i CaMKII, održavanje aktivnosti CaMKII i započinjanje fosforilacije koja podržava sinaptičko jačanje (140).

U istraživanjima pozitivnog učinka rivastigmina na pamćenje u Alzheimerovoj bolesti pokazano je kako je taj učinak povezan s obnavljanjem dugoročne potencijacije u CA1 regiji hipokampusa i razini CaMKII (141). Daljnjim istraživanjem pokazano je da je stimulacija CaMKII presudna za poboljšanje memorije uzrokovane rivastigminom (141).

Autofosforilacija CAMKII reagira s fosforilacijom sintaksina 1A, a ta je reakcija važna za mehanizam egzocitoze (142). Autofosforilacija alfa izoforme CaMKII važna je i u formiranju memorije, a sve više se uključuje u istraživanjima o nastanku i razvoj ovisnosti (143). Osim toga, istraživanja na mutiranim miševima pokazala su važnost pCaMKIIα u prostornom učenju (144).

CaMKII je fizički i funkcionalno vezana za homeostazu kalcija u srčanom mišiću. Ona je kolokalizirana s L-tipom kalcijevih kanala u kardiomiocitima (145). Izoforme CaMKII također sudjeluju u regulaciji kalcij-ATP-aze u sarkoplazmatskom retikulumu (SR) fosforilirajući fosfolamban (146), u fosforilaciji rijanoidnog receptora u SR i u prepisivanju gena (147).

Nastanak srčanog zatajenja kod ljudi povezan je s povišenim izražajem i aktivnosti CaMKII (148-150). CaMKIIδ-trangenični miševi imaju nepravilne akcijske potencijale i posljedično razvijaju ventrikularne aritmije (151). Suprotno tome, transgenični CaMKII inhibicijski miševi ili CaMKII *knock out* miševi imaju manju stopu komplikacija (kao što su srčano zatajenje, srčano preopterećenje i aritmije) nakon srčanog udara (152-154).

1.7 CaMKII i bol

CaMKII je važna u regulaciji prolaska kalcija kroz membranu dendrita (155). Ulazak kalcija kroz kalcijeve kanale na nociceptivnim neuronima spinalnog ganglija rezultira aktivacijom CaMKII (155). CaMKII ima veliku važnost u procesu započinjanja i razvitka neuropatske boli (156), a aktivacija CaMKII ovisna je o utoku kalcija kroz NMDA receptore (156). Eshete i suradnici istraživanjem provedenim na osjetnim neuronima potvrdili su da CaMKII djeluje kao detektor učestalosti podražaja neurona i da pamti podražaj i nakon što je završio (157). Dugotrajna aktivacija CaMKII dovodi do kronične središnje neuropatske boli, mehanizmima koji objedinuju pretjeranu podražljivost velike skupine neurona kralježnične moždine (158).

Pretpostavlja se da, fosfolirajući proteine ili receptore, pCaMKIIα ima važnu ulogu u nocicepciji prilikom periferne upale (155). Presijecanje ili pritisak kralježnične moždine ozljeda je koja za posljedicu ima stanične promjene i promjene u ponašanju. Garraway i suradnici pokazali su da 1 h, 24 h i 7 dana nakon takve ozljede dolazi do smanjenja izražaja pCaMKIIα, što je bilo povezano s promjenama u ponašanju (159).

CaMKII je izražena i u parabrahijalnim jezgrama, ciljnom mjestu nociceptivnih neurona lamine I kralježnične moždine (160). Nociceptivni podražaji aktiviraju kolecistokininski put od parabrahijalnih jezgara do ventromedijalnog hipotalamusa i mogu biti važni za odgovor na oštećenje tkiva, a važna molekula tog puta je CaMKII (160).

Neuropatska hiperalgezija inducirana kapsaicinom u štakora povezana je s povećanom autofosforilacijom CaMKII u kralježničnoj moždini (161, 162). Autofosforilirana CaMKII u postsinaptičkom zgusnuću zajedničko je obilježje glutamatnih sinapsi, čime potencijalno pridonosi održavanju sinaptičke učinkovitosti. Nadalje, čini se da je pCaMKIIα različito regulirana između primarnih aferentnih sinapsi, što možda odražava različitu osjetljivost na sinaptičku plastičnost između tih aferentnih neurona (163). Nakon akutne stimulacije stražnje šape kapsaicinom imunoreaktivnost pCaMKII smanjena je na postsinaptičkim ne-peptidergičnim primarnim aferentnim C-vlaknima (164).

Istraživanje na transgeničnim miševima pokazuje da je promjena u izražaju CaMKII u upalnoj boli povezana s nastankom alodinije (165). Ta promjena mogla bi biti povezana s promjenama u hipokampalnoj hem-oksigenazi 2 (165), također važnoj u dugoročnoj potencijaciji (166).

U Laboratoriju za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu već je istraživana uloga CaMKII u nastanku boli. Dokazano je smanjenje izražaja pCaMKIIα u osjetnim neuronima spinalnih ganglija u štakorskom modelu neuropatske boli inducirane SNL ozljedom (167). Također je dokazano povećanje izražaja CaMKII u spinalnom gangliju u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1 u razdoblju od 2 tjedna i 2 mjeseca nakon indukcije (168) i kralježničnoj moždini 6 i 12 mjeseci nakon indukcije dijabetesa (169). CaMKII bi stoga mogla biti potencijalna nova farmakološka meta za liječenje neuropatske boli.

Promjene u izražaju CaMKII u spinalnim ganglijima povezane su s taktilnom alodinijom, pojavom bolnih reakcija nakon podražaja koji obično ne izaziva bol, u modelima neuropatske boli izazvane ozljedama perifernog živca (170-172). Pretpostavlja se da je to posljedica djelovanja CaMKII na aktivaciju citosolne fosfolipaze A2 za koju je dokazna povezanost s nastankom taktilne alodinije nakon SNL ozljede (170). CaMKII ima važnu ulogu i u nastanku visceralne preosjetljivosti u modelu visceralne boli (171).

1.8 Inhibicija CaMKII kinaze i bol

Najbolje istraženi inhibitor i najčešće korišteni inhibitor u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima CaMKII je KN-93 (173). KN-93 kompetitivno se natječe s kompleksom Ca^{2+}/kalmodulin u vezanju na CaMKII. Inhibicijski peptid povezan s autokamtidom-2 (engl. *myristoylated autocamtide-2-related inhibitory peptide* – AIP) izumljen je s ciljem da blokirajući CaMKII djeluje na dugoročnu potencijaciju (174), a njegov miristoilirani oblik (mAIP) lakše prolazi kroz staničnu membranu (175). Osim u istraživanjima o utjecaju CaMKII inhibitora na bol, oni se koriste i u istraživanjima liječenja srčanih aritmija i zatajenja srca (175) i toleranciji analgetskih učinaka morfina (176).

Pokazano je da ubrizgavanje AIP-a prije ponavljajućih podražaja koji izazivaju refleksnu potencijaciju umanjuje njihov učinak, čime je dokazano da je CaMKII povezana s nastankom spinalnog refleksa, mehanizma važnog za nastanak hiperalgezije i alodinije (177).

Akutno liječenje CaMKII inhibitorom umanjuje termalnu hiperalgeziju i mehaničku alodiniju izazvanu SNL-om (178). Taj učinak traje 2–4 h nakon primjene KN-93, dok primjena

njegovog inaktivnog analoga KN92 ne pokazuje nikakav učinak (178). Primjena CaMKII ne umanjuje imunoreaktivnost totalne CaMKII, ali umanjuje imunoreaktivnost pCaMKIIα (178).

Pozitivan učinak KN-93 također je dokazan u hiperalgeziji induciranoj opioidom (179). KN-93 u dozi od 45 nmol ubrizgan intratekalno u potpunosti umanjuje opioidom induciranu hiperalgeziju i alodiniju (179). U tom istraživanju Chen i suradnici pokazali su da je KN-93 umanjio imunoreaktivnost pCaMKIIα u površinskoj lamini kralježnične moždine u usporedbi sa životinjama koje su primale fiziološku otopinu (179).

Djelovanje KN-93 na nocicepciju dokazao je i Damaj sa suradnicima (180-182). Povećanje razine unutarstaničnog kalcija rezultira aktivacijom sekundarnih glasnika ovisnih o kalciju u kralježničnoj moždini, a stimulacija nikotinom dovodi do aktivacije CaMKII i nastanka nikotinske analgezije (180). Akutna primjena KN-93 intratekalnim putem umanjuje antinocicepciju induciranu nikotinom (181), ali ne umanjuje osjetljivost na termalne podražaje (182).

Dugoročna potencijacija inducirana stimulacijom niskim frekvencijama na C-vlakna zdravih životinja dovodi do aktivacije neurokinina 1 i NMDA receptora, povećanja razine unutarstaničnog kalcija i aktivacije fosfolipaze C i CaMKII. Ovaj mehanizam dovodi do nastanka hiperalgezije u životinja i ljudi (183). Primjena KN-93 u potpunosti poništava hiperalgeziju u svih životinja čija su C vlakna stimulirana niskim frekvencijama (183). Indukcija dugoročne potencijacije, istraživana na nociceptivnim neuronima lamina I – IV može se blokirati primjenom AIP-a (184).

CaMKII igra važnu ulogu u aktivaciji fosforiliranog CREB proteina, važnog u nastanku upalne boli inducirane kapsaicinom (185). Intratekalna primjena KN-93 značajno umanjuje broj odgovora spinalnih neurona, hiperalgeziju i alodiniju (161, 185, 186).

Intratekalna primjena CaMKII inhibitora prije i poslije indukcije upalne boli umanjuje termalnu hiperalgeziju i mehaničku alodiniju (187) te neuropatsku bol induciranu prekidanjem donjeg alveolarnog živca u miševa (188). Primjena CaMKII inhibitora sprječava razvoj i izražaj taktilne alodinije nakon ozljede živaca (170) te umanjuje istu ukoliko je došlo do njenog razvoja (170, 172, 189).

Iako je učinkovitost inhibitora na bolno ponašanje dokazana, potencijalni pozitivan učinak CaMKII inhibitora na bol u dijabetičkoj neuropatiji do sada nije istražen.

1.9 CaMKII i dijabetička neuropatija

Sva do sada objavljena istraživanja o povezanosti CaMKII i dijabetičke neuropatije provedena su u Laboratoriju za istraživanje boli Medicinskog fakulteta u Splitu.

Ferhatović i suradnici utvrdili su da je indukcija DM1 uzrokovala povećanje izražaja ukupne CaMKII i njene alfa izoforme što je odgovaralo karakterističnim promjenama u percepciji boli. Povećanje izražaja tCaMKII u DM1 životinja u odnosu na kontrolnu skupinu nastalo je uslijed povećanja njenoga izražaja u srednje velikim neuronima i u malim neuronima koji sudjeluju u procesu prijenosa osjeta boli iz periferije u središnji živčani sustav. Promjena izražaja drugih izoformi nije utvrđena (168).

Indukcija DM2 u štakora nije uzrokovala promjene u bolnom ponašanju u usporedbi s kontrolnim životinjama kao ni promjene u izražaju ukupne CaMKII i njenih izoformi neovisno o veličini analiziranih neurona (168). Značajna razlika između DM1 i DM2 životinja bila je u razini glukoze u plazmi (168).

Spolne razlike u bolnom ponašanju dijabetičkih životinja nisu uočene (190). Izražaj CaMKII povećao se u oba spola nakon indukcije DM1. Međutim, u dijabetičnih ženki, izražaj tCaMKII povećao se samo u velikim neuronima. Ove razlike vjerojatno su posljedica statistički značajne razlike u razini hiperglikemije između spolova (190).

U istraživanjima dugoročnog djelovanja CaMKII u dijabetičkoj neuropatiji Borić i suradnici utvrdili su povećanje izražaja ukupne CaMKII i njene alfa izoforme 6 i 12 mjeseci nakon indukcije DM1 (169). Značajno smanjenje izražaja alfa i beta izoformi CaMKII uočeno je 6 mjeseci nakon indukcije DM1 dok je nakon 12 mjeseci došlo do smanjenja gama i delta izoformi CaMKII (191). Analiza izražaja CaMKII prema veličini neurona pokazala je smanjenje izražaja CaMKII samo u malim neuronima (191).

2. HIPOTEZA

Učinkovitost inhibitora CaMKII u smanjenju bolnog ponašanja dokazana je u različitim modelima boli, ali ne i u štakorskom modelu dijabetičke neuropatije. Poznato je da je izražaj CaMKII povećan u spinalnim ganglijima i dorzalnom rogu kralježnične moždine u štakorskom modelu dijabetičke neuropatije. Nije poznato smanjuje li intratekalna ili intraganglijska primjena inhibitora CaMKII pretjerano bolno ponašanje u štakorskom modelu dijabetesa tip 1. Hipoteza ovog istraživanja stoga glasi:

Intratekalna i intraganglijska primjena CaMKII inhibitora umanjit će bolno ponašanje u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja su:

1. Utvrditi utjecaj intratekalne i intraganglijske primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine na bolno ponašanje u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1.
2. Utvrditi izražaj CaMKII u kralježničnoj moždini nakon intratekalne primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine.
3. Utvrditi izražaj CaMKII u neuronima spinalnog ganglija nakon primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine, te utvrditi veličinu stanica u kojima je došlo do promjene izražaja CaMKII.

4. METODE ISTRAŽIVANJA

4.1 Pokusne životinje

U pokusu su korišteni štakori muškog spola, soja Sprague-Dawley (mase 160–200 g). Pokusne životinje nabavljene su iz Nastambe za male pokusne životinje Sveučilišta u Splitu, gdje se uzgajaju pod kontroliranim uvjetima. Indukcija dijabetesa tipa 1 štakorima provedena je intraperitonealnim ubrizgavanjem streptozotocina (STZ) otopljenog u svježe pripremljenom citratnom puferu (pH=4,5) u dozi od 55 mg/kg. STZ je toksičan za beta stanice gušterače (192).

Štakori su se hranili *ad libitum* uobičajenom prehranom za pokusne štakore koja se sastoji od 27% proteina, 9% masti i 64% ugljikohidrata (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija).

Životinje smo po skupinama smjestili u plastične kaveze, s podlogom od piljevine i kukuruzne stelje u omjeru 3:1, i uzgajali 2 tjedna. Navedeno vrijeme dovoljno je za razvoj bolnog ponašanja u STZ modelu DM u štakora (168). Za provjeru uspješnosti indukcije dijabetesa, četiri dana nakon indukcije štakorima je izmjerena koncentracija glukoze u plazmi (168). U daljnja istraživanja uključeni su štakori kojima je izmjerena koncentracija glukoze u plazmi bila ≥16,67 mmol/L. Krv za određivanje koncentracije glukoze u plazmi štakora uzimanje iz repne vene, a mjerenje je obavljeno One Touch Vita glukometrom (LifeScan, High Wycombe, Velika Britanija).

Kriteriji uključenja štakora u istraživanje bili su:

- odsustvo bolnog ponašanja na početku istraživanja,
- glukoza u plazmi ≥16,67 mmol/L 4 dana nakon indukcije DM i
- razvoj pretjerano bolnog ponašanja 14 dana nakon indukcije DM.

Kriteriji isključenja štakora u studiju bili su:

- postojanost pretjeranog bolnog ponašanja na početku istraživanja,
- glukoza u plazmi ≤16,67 mmol/L 4 dana nakon STZ nakon indukcije DM,
- odsustvo pretjeranog bolnog ponašanja 14 dana nakon indukcije DM,

- oštećenje živca ili ganglija tijekom operacije i
- smrt životinje.

Veličina uzorka izračunata je temeljem prijašnjeg istraživanja o izražaju CaMKII u štakorskom modelu dijabetesa tip 1. Izračunom je dobiveno da uz alfa=0,05 uz statističku snagu od 90% potrebno je najmanje 5 štakora u svakoj skupini. Na početku istraživanja uključen je veći broj štakora kako bi nakon primjene kriterija uključenja i isključenja životinja u istraživanje u svakoj skupini ostalo najmanje 5 štakora.

Životinje su podijeljene u dvije skupine ovisno o načinu primjene inhibitora, bilo intratekalno ili intraganglijski. Nadalje, u intratekalnom i intragangijskom pokusu životinje su nasumično raspoređene u 3 dodatne skupine: životinje kojima će se ubrizgati fiziološka otopina, životinje kojima će se ubrizgati KN-93 te skupina životinja kojima će se ubrizgati mAIP. Kako studija ima dva načina primjene inhibitora i 3 različite otopine za ubrizgavanje, studija ukupno ima 6 skupina štakora.

Intratekalna primjena inhibitora CaMKII i fiziološke otopine uključivala je 3 skupine:

a) štakori kojima je ubrizgana fiziološka otopina (n=7)
b) štakori kojima je ubrizgan KN-93 (n=7)
c) štakori kojima je ubrizgan mAIP (n=6)

Intraganglijska primjena inhibitora CaMKII i fiziološke otopine uključivala je 3 skupine:

a) štakori kojima je ubrizgana fiziološka otopina (n=8)
b) štakori kojima je ubrizgan KN-93 (n=8)
c) štakori kojima je ubrizgan mAIP (n=9)

4.2 Postupci

4.2.1 CaMKII inhibitori

Dva tjedna nakon indukcije dijabetesa štakorima koji su razvili pretjerano bolno ponašanje ubrizgani su CaMKII inhibitori. U istraživanju su korištena dva inhibitora CaMKII: KN-93 (422711, Merck Millipore, Nottingham, Velika Britanija) i mAIP (189482, Merck Millipore,

Nottingham, Velika Britanija). U istraživanjima povezanosti boli i povišenog izražaja CaMKII, KN-93 i mAIP su do sada najčešće korišteni inhibitori. Mehanizam inhibicije KN-93 i mAIP je različit. KN-93 se izvanstanično natječe s kalmodulinom u aktiviranju CaMKII, dok se mAIP veže na aktivno mjesto. KN-93 također djeluje i na kalijeve i kalcijeve naponske kanale, ali ne djeluje na katalitičku aktivnost cAMP, PKC i Ca^{2+} fosfodiesteraze (173). KN-93 zamijenio je do tada korišteni KN-62. Djelovanje obaju temelji se na natjecanju s kalcij-kalmodulinom, ali ne i s ATP-om. Ovakva inhibicija naziva se „ATP ne-kompetitivna“ ili „alosterička“. KN-62 nije izravni antagonist kalmodulina jer se on veže na holoenzim i djeluje na mogućnost vezanja kalcij-kalmodulina, ali se ne veže izravno na kalmodulin (193). Otkriće inhibicijskog segmenta pCaMKIIα dovelo je do otkrića inhibicijskog peptida (AIP) koji se veže za kalmodulin podjedinicu (174). N-kraj ovog peptida sadržava autofosforilacijsko mjesto za supstrat kao što je autokamid-2 i autokamid-3 i zamjenu fosforilacije aminokiseline treonin u alanin (194).

mAIP inačica je AIP-a kojemu je povećana stanična propusnost i on djeluje unutarstanično. mAIP također je specifičan inhibitor CaMKII koji ne djeluje na cAMP, PKA, PKC ni CaMKIV. Učinak pojedinih CaMKII inhibitora na ponašanje povezano s boli može se u potpunosti ispitati samo uspoređujući oba inhibitora.

4.2.2 Intratekalna primjena

CaMKII inhibitori KN-93 u dozi 50 nmol/L po štakoru i mAIP u dozi od 10 μmol/L, ubrizgani su intratekalnim putem u volumenu od 5 μL. Kontrolnim štakorima je intratekalno ubrizgana fiziološka otopina u volumenu od 5 μL (195). Intratekalna primjena već je opisana u literaturi (195). Životinje se prvo uspavaju pomoću izoflurana, a zatim se perkutanim putem uz pomoć Hamiltonove igle ulazi u subarahnoidalni prostor u području 5-6 intervertebralnog prostora. Znak dobrog apliciranja je lateralni trzaj repa štakora. Postupak je trajao najdulje 15 minuta. Postupak je uvijek obavljala ista osoba.

4.2.3 Intraganglijska primjena

CaMKII inhibitori KN-93 i mAIP ubrizgani su u L5 spinalni ganglij jer se u njemu nalaze tijela većine neurona koji inerviraju šapu štakora na kojoj se provode testiranja ponašanja. Za intraganglijsku primjenu upotrjebljeni su 1 mmol/L KN-93, 10 μM mAIP i fiziološka otopina, u volumenu od 3 μL (196). Intraganglijska primjena već je opisana u literaturi (12, 196) i sama po sebi, prema dosadašnjim istraživanjima, ne uzrokuje promjene u ponašanju štakora (197, 198). Postupak je trajao najdulje 25 minuta. Inhibitori su se uvijek davali samo u desni L5 ganglij, dok je lijevi ganglij bio kontrolni (ne-ubrizgani). Štakori su uspavani, uzduž leđa je napravljen rez na koži te su paravertebralni mišići lagano pomaknuti kako bi se lakše odstranio poprečni nastavak kralješka. Nakon toga je spinalni ganglij lako dostupan. Nakon intraganglijskog ubrizgavanja rana je sašivena po slojevima. Postupak je uvijek obavljala ista osoba.

4.2.4 Testiranje ponašanja

Ponašanje štakora karakteristično za bol kod dijabetičkih štakora testirano je serijom testova za mjerenje reakcija na mehaničke i termalne podražaje u različitim pokusnim skupinama tijekom vremena.

Za testiranje utjecaja primjene CaMKII inhibitora ili fiziološke otopine, testiranje štakora je provedeno 2 i 24 h nakon intratekalne i intraganglijske injekcije. Vrijeme testiranja izabrano je na temelju prijašnjih istraživanja. Izabrani testovi relevantni su u kliničkoj praksi za neuropatsku bol ljudi. Tijekom testiranja štakori su smješteni na mrežastu površinu (otvori mreže su veličine 3x3 mm), a svaki štakor se nalazio u posebnoj plastičnoj kutiji (10x25x30 cm). Testiranje je uključivalo podražaj plantarne kože obje stražnje šape u štakora čiji su osjetni neuroni smješteni u L4 i L5 spinalnom gangliju. Osoba koja je obavljala testiranje ponašanja povezanog s boli nije znala što je životinji prethodno ubrizgano.

4.2.4.1 Testiranje hladnoćom

Kapljica acetona nanesena je na srednju plantarnu površinu šape i mjerenje broj pozitivnih odgovora (broj uzmicanja šape) prilikom tri uzastopne primjene acetona vremenski odvojene minimalno 30 s.

4.2.4.2 Testiranje toplinom

Za testiranje toplinom korišten je kontinuirani izvor topline iz standardiziranog uređaja za toplinske podražaje (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, SAD). Štakori su postavljeni na metalnu podlogu koja se zagrijavala do maksimalne temperature od 50^{o}C. Mjereno je vrijeme i temperatura pri kojoj je štakor počeo lizati stražnju šapu.

4.2.4.3 Testiranje tupom iglom – složeni hiperalgezijski odgovor

Vrhom anestezijske igle debljine 0,64 mm (22 G) podražena je plantarna strana šape, dovoljnom snagom da udubi kožu, a da je ne ozlijedi. U ovom testu mjeren je broj pozitivnih i hiperalergezijskih odgovora prilikom deset uzastopnih uboda igle vremenski odvojenih najmanje 2 s. Promatrana je reakcija uzmicanja, kao i složeni hiperalgezijski odgovor, koji uključuje dugotrajno držanje šape u zraku, lizanje šape, čuvanje šape i vokalizaciju.

4.2.4.4 Von Freyeva vlakna

Von Freyevim vlaknima (North Coast Medical Inc., Gilroy, CA, SAD) šape životinja su testirane na način da je vlakno dovedeno u kontakt sa šapom. Kontakti su se održavali s pritiskom dovoljno velikim da se vlakno savije. Vlakna su korištena od najslabijeg do najjačeg kako bi se odredio prag kod kojeg životinja uzmiče šapu u 50% pokušaja.

4.2.5 Priprema tkiva za imunofluorescenciju

Na kraju pokusa štakori su anestezirani 5% izofluranom u struji zraka (Forane, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Velika Britanija) te perfundirani kroz uzlaznu aortu preko lijeve klijetke s 300 mL fiziološke otopine i Zambonijevog fiksativa (4% paraformaldehid i

0,19% pikrinska kiselina u 0,1M fosfatnom puferu – PBS) pH 7,4. Desni i lijevi L5 spinalni gangliji pažljivo su izvađeni i fiksirani preko noći u Zambonijevu fiksativu, isprani u PBS-u, a zatim krioprotektirani preko noći u otopini 30% saharoze, zamrznuti i rezani na kriotomu pri temperaturi od -22^{o}C na rezove debljine 7 μm. Prilikom pripreme tkiva obilježena je strana na kojoj se nalazio lijevi (kontrolni) L5 spinalni ganglij. Kralježnična moždina (L3-L5) štakora iz intratekalnog pokusa fiksirana je 48 h u Zambonijevu fiksativu, ispirana 24 h u PBS-u, a zatim krioprotektirana preko noći u otopini 30% saharoze, zamrznuta i izrezana na kriotomu pri temperature od -22^{o}C na rezove debljine 8 μm.

Imunofluorescentnim metodama analizirana je ukupna CaMKII (tCaMKII) i njena fosforilirana alfa izoforma CaMKII (pCaMKIIα). Primarna poliklonska protutijela za analizu tCaMKII (sc-9035, lot# F0304, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD, razrjeđenja 1:100) i pCaMKIIα (sc-12886-R, lot# K2305, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD, razrjeđenja 1:100) proizvedena su u kuniću. Za sekundarnu detekciju tCaMKII i pCaMKIIα koristio se Rhodamin red X-conjugated (Donkey Anti-rabbit IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch, lot# 106114, razrjeđenja 1:300).

4.2.6 Analiza slika i kvantifikacija

Svaki četvrti rez spinalnog ganglija proučen je mikroskopom (BX61, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografiran pomoću hlađene digitalne kamere (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) pri istom povećanju (10x za i.t. pokus te 40x za i.g pokus) i pri istoj vremenskoj ekspoziciji za svako pojedino bojenje. Za intratekalni pokus slike su analizirane kao monokromatske mikrofotografije (2040x1536 piksela, 12 bitova) u računalnom programu Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, SAD). Fluorescencija izražaja CaMKII mjerena je uzduž linije od centralnog kanala do ulaska spinalnog ganglija (Metamorph Line scan function, 15 piksela). Slojevi kralježnične moždine definirani su prema dostupnoj literaturi (199).

Za intraganglijski pokus mikrofotografije su analizirane pomoću programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Na svakoj mikrofotografiji mjeren je intenzitet fluorescencije i površina svakog pojedinog neurona. Analizirani su samo neuroni s jasno izraženim jezgrama, a najmanji broj analiziranih neurona po životinji iznosio je 150. Neuroni spinalnog ganglija kategorizirani su u tri veličine; mali ($d \leq 30$ μm), srednji ($30\mu m \leq d \leq 40\mu m$) i veliki neuroni ($d \geq 40$ μm). Promjer neurona izračunat je pomoću formule: (duljina + širina)/2.

4.3 Statistički postupci

Normalnost distribucije testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Normalno distribuirani podatci analizirani su parametrijskim t-testom. Podatci koji nisu imali normalnu distribuciju analizirani su Mann-Whitneyevim testom. Za usporedbu izražaja CaMKII u kralježničnoj moždini između kontrolnih i dijabetičkih skupina neurona korištena je analiza varijance (ANOVA) za procjenu glavnog učinka, a razlike među skupinama utvrđene su i Newman-Keulsovim *post hoc* testom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (M±SD). Napravljena je analiza prema protokolu. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p<0,05$. Za statističku obradu korišten je računalni program Statistica 7,0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD).

4.4 Etička pitanja

Svi eksperimentalni postupci i protokoli napravljeni su prema IASP-ovim uputama za etičko istraživanje eksperimentalne boli u životinja pri svijesti. Istraživanje je provedeno u okviru projekta za koji postoji suglasnost Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu (Klasa 003-08/10-03/0011, Ur.br.: 2181-198-04-10-0008). Istraživanja su provedena na način da se izbjegne nepotrebna bol i neugoda životinja, prema preporuci američke Nacionalne akademije znanstvenih instituta za istraživanja na životinjama u sljedećim dokumentima: Politika javnog zdravstva o humanoj brizi i korištenju laboratorijskih životinja (engl. *Public Health Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*) i Vodič za brigu o laboratorijskim životinjama i njihovo korištenje (engl. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996*).

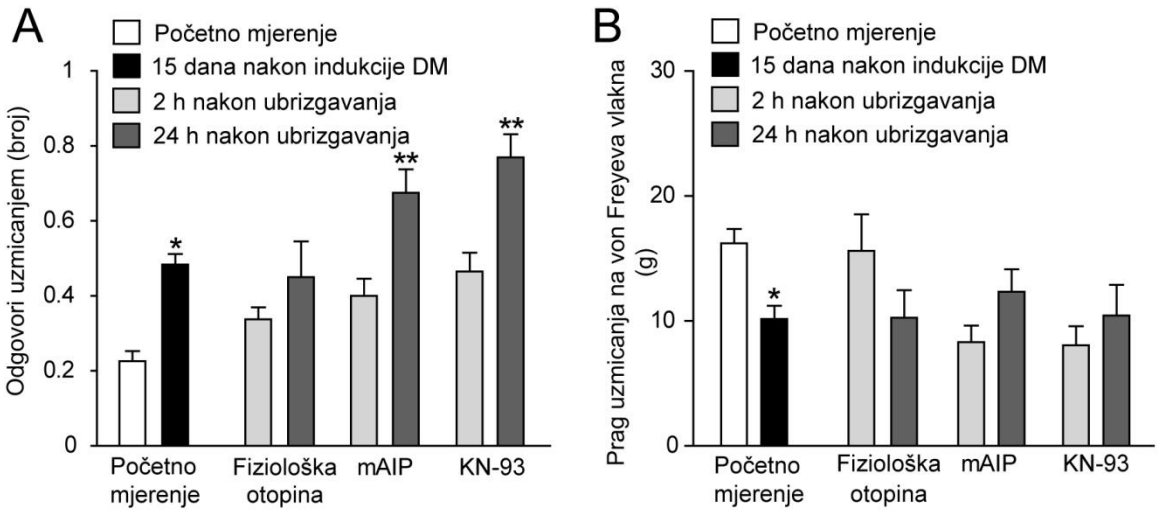
5. REZULTATI

5.1 Utjecaj intratekalnog ubrizgavanja inhibitora CaMKII i fiziološke otopine na bolno ponašanje štakora

DM1 životinje nisu razvile povećanu osjetljivost na toplinske podražaje. Stopa uzmicanja šapa nakon podražaja tupom iglom značajno se povećala u štakora 15 dana nakon indukcije DM u usporedbi s štakorima kojima je ubrizgana fiziološka otopina ($p<0,001$), (Slika 3A). Mehanička alodinija testirana je von Freyevim vlaknima.

Indukciju dijabetesa pratilo je smanjenje praga uzmicanja u DM1 životinja dva tjedna nakon indukcije DM ($p<0,001$, t-test) (Slika 3B). Dva sata nakon primjene inhibitora ili fiziološke otopine nije bilo značajne razlike među skupinama u stopi odgovora na mehanički podražaj tupom iglom, promjeni praga uzmicanja prilikom testiranja von Freyevim vlaknima niti promjena u ponašanju nakon termalnih podražaja (Slika 3A, 3B).

Inhibitori CaMKII, KN-93 ($p<0,001$) i mAIP ($p=0,043$) značajno su povećali stopu pozitivnih odgovora na podražaj tupom iglom 24 sata nakon ubrizgavanja u usporedbi sa životinjama kojima je ubrizgana fiziološka otopina (Mann-Withney test, $p=0,082$) (Slika 3A). Nije bilo značajnih promjena 24 sata nakon u testovima termalnim podražajima i testu s von Freyevim vlaknima (podatci nisu prikazani) (Slika 3A, 3B).



Slika 3. Promjene u ponašanju dijabetičkih štakora nakon intratekalne primjene fiziološke otopine, KN-93 i mAIP. Odgovori na mehaničke podražaje (A) i von Freyeva vlakna (B).
* statistički značajno u usporedbi sa životinjama na početku pokusa,
** statistički značajno u usporedbi sa životinjama kojima je ubrizgana fiziološka otopina.

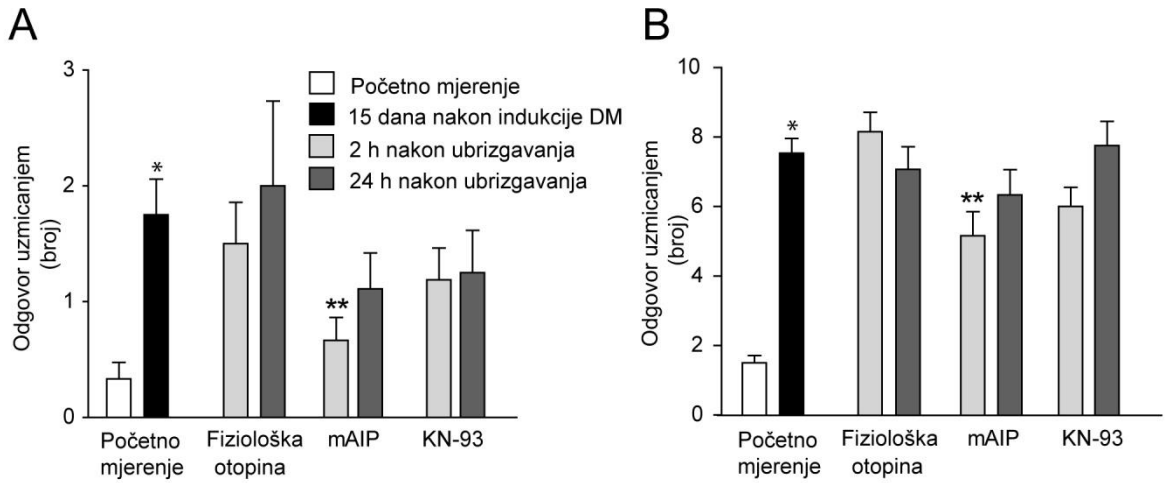
5.2 Utjecaj intraganglijskog ubrizgavanja inhibitora CaMKII i fiziološke otopine na bolno ponašanje štakora

Uspoređujući s početnim ponašanjem, životinje su razvile povećanu osjetljivost na hladne (t-test, p<0,001) i mehaničke podražaje (t-test, p<0,001) dva tjedna nakon indukcije (Slika 4A, 4B). Životinje, međutim, nisu razvile povećanu osjetljivost na podražaj toplinom ni promjene u pragu osjetljivosti von Freyevih vlakana (podatci nisu prikazani).

Intraganglijska primjena mAIP 2 h nakon ubrizgavanja značajno je smanjila osjetljivost na hladne podražaje (1,75±0,30) u usporedbi sa životinjama prije ubrizgavanja (0,67±0,20) (t-test, p=0,009) (Slika 4A). Nije bilo značajne promjene u osjetljivosti na hladne podražaje 2 h nakon primjene KN-93 (t-test, p=0,213) i fiziološke otopine (t-test, p=0,614) (Slika 4A). Dvadeset i četiri sata nakon ubrizgavanja inhibitora i fiziološke otopine nije bilo značajne razlike u osjetljivosti na hladne podražaje (Slika 4A).

Intraganglijska primjena mAIP značajno je smanjila stopu uzmicanja šapa na podražaj tupom iglom 2 h nakon primjene (t-test, p=0,004), ali ne i nakon 24 h (t-test, p=0,153) (Slika 4B).

Ubrizgavanje KN-93 također je smanjilo stopu uzmicanja šapa na podražaj tupom iglom, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno (t-test, p=0,061). Ubrizgavanje fiziološke otopine nije značajno promijenilo stopu uzmicanja na podražaj tupom iglom (Slika 4B). Uspoređujući s ponašanjem štakora prije primjene inhibitora CaMKII i fiziološke otopine, nije bilo značajne razlike u osjetljivosti na mehaničke podražaje 24 h nakon primjene mAIP, KN-93 ni fiziološke otopine (Slika 4B).



Slika 4. Promjene u ponašanju dijabetičkih štakora nakon intraganglijske primjene fiziološke otopine, KN-93 i mAIP. Osjetljivost na hladne (A) i mehaničke podražaje (B).

* statistički značajno u usporedbi sa životinjama na početku pokusa,

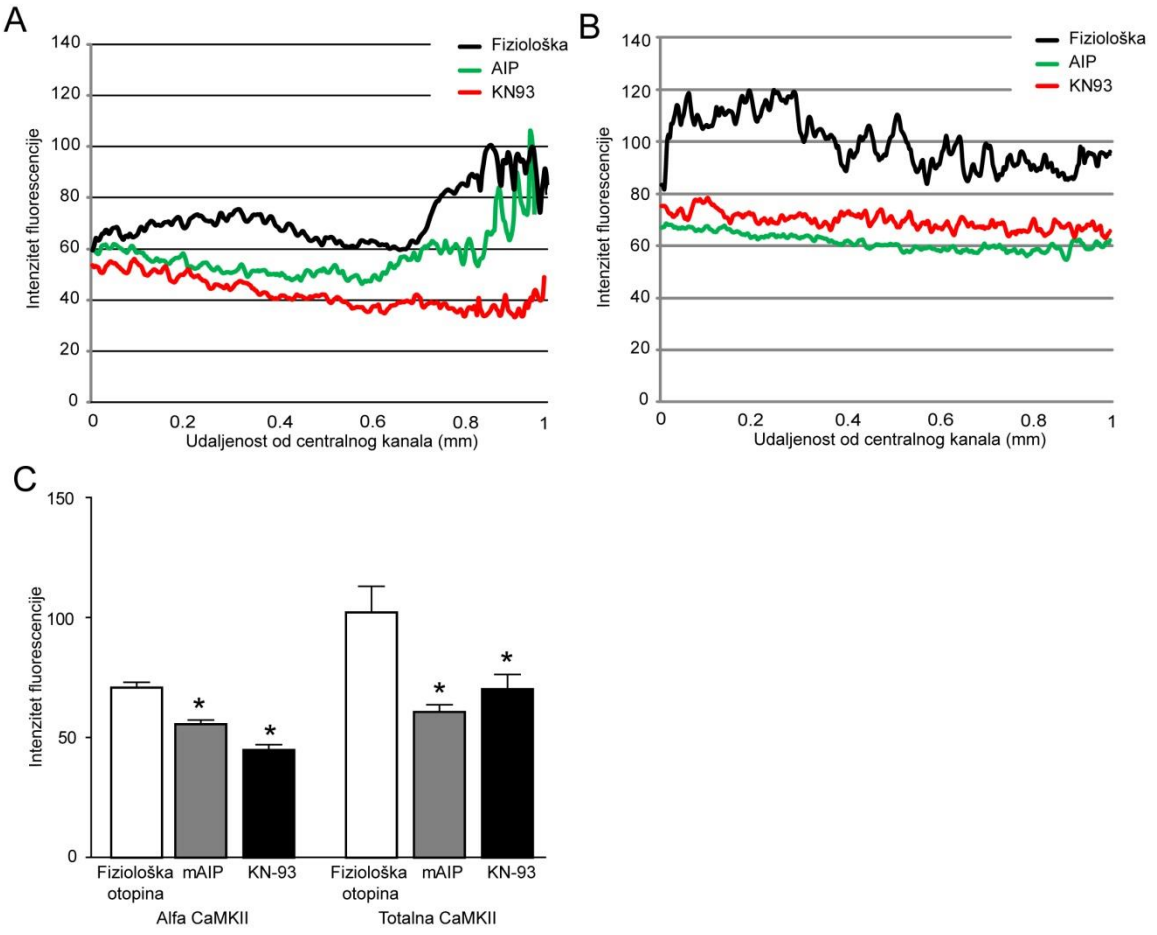
** statistički značajno u usporedbi sa životinjama kojima je ubrizgana fiziološka otopina.

5.3 Izražaj CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine nakon intratekalne primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine

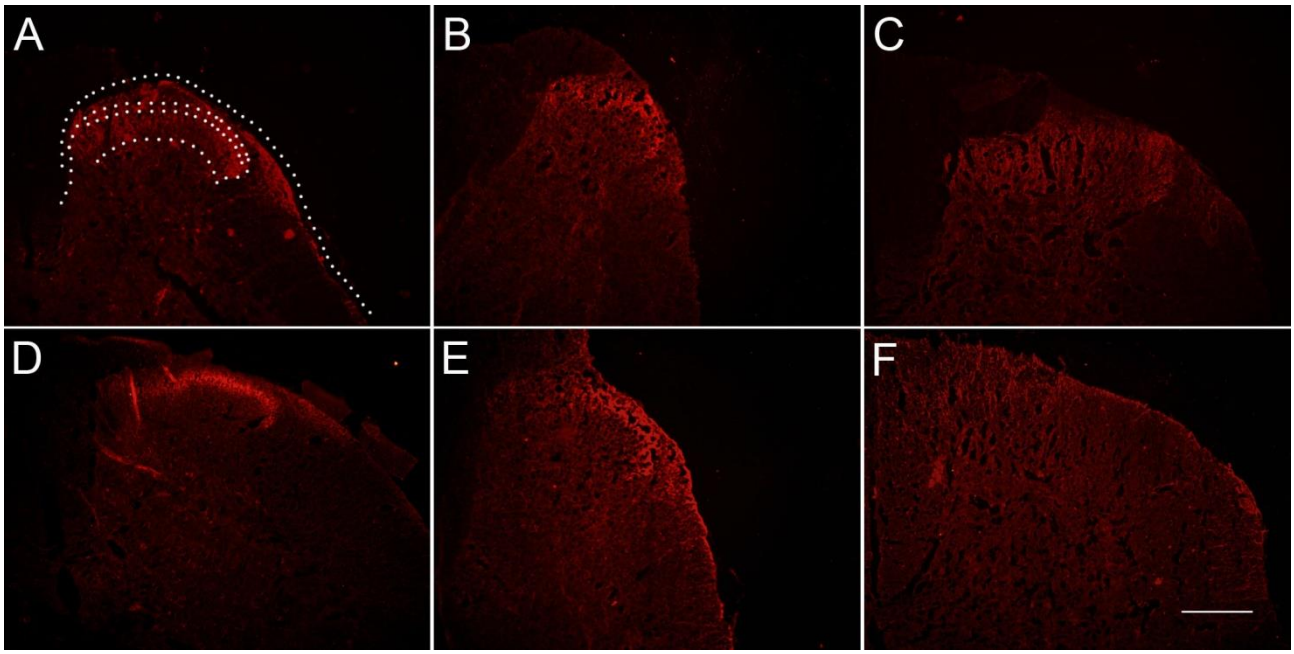
Analiza imunofluorescencije CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine pokazala je povećan izražaj tCaMKII i njene fosforilirane alfa izoforme u skupini štakora kojima je ubrizgana fiziološka otopina (F=12,54, df=2, ANOVA). Značajno smanjene izražaja tCaMKII uočeno je nakon intratekalne primjene mAIP-a (p<0,001, ANOVA) i KN-93 (p<0,001, ANOVA) u usporedbi s izražajem u životinja s ubrizganom fiziološkom otopinom (Slika 5 A-C).

Izražaj aktivnosti pCaMKIIα također je statistički značajno smanjen (F=32,52, df=2, ANOVA) nakon primjene mAIP (p<0,001, ANOVA) i KN-93 (p<0,001, ANOVA) u usporedbi s izražajem u životinja s ubrizganom fiziološkom otopinom (Slika 5C).

U skupini životinja kojima je ubrizgana fiziološka otopina uočen je obrazac imunoreaktivnosti pCaMKIIα u laminama I-III. Ubrizgavanje mAIP djelomice je poništilo ovaj obrazac, dok je on bio potpuno poništen nakon primjene KN-93 (Slika 6 A-F).



Slika 5. Izražaj tCaMKII i pCAMKIIα u dorzalnom rogu kralježnične moždine nakon intratekalne primjene fiziološke otopine, mAIP i KN-93. Izražaj pCAMKIIα (A) i tCAMKII (B) prikazan je uzduž linije od centralnog kanala do ulaska stražnjeg korjena u dorzalni rog kralježnične moždine (A i B) te kao zbrojni rezultat (C). Podatci su prikazani kao AS±SD.
* statistički značajno u usporedbi sa životinjama kojima je ubrizgana fiziološka otopina.



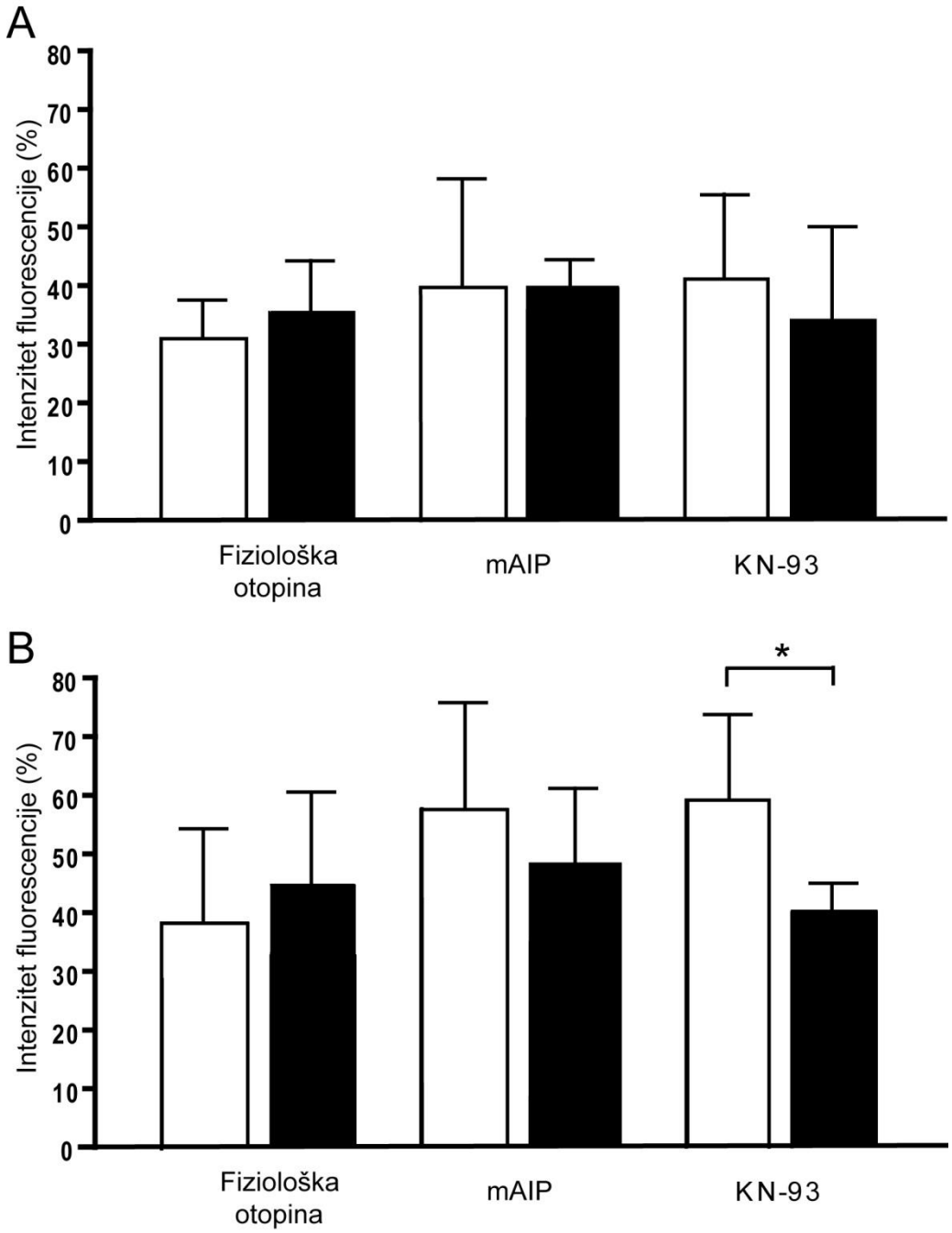
Slika 6. Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojanja tCaMKII nakon ubrizgavanja fiziološke otopine (A), mAIP (B) i KN-93 (C) te za pCAMKIIα nakon ubrizgavanja fiziološke otopine (D), mAIP (E) i KN-93 (F). Povećanje: 10x. Mjerilo je dugo 100 μm i odnosi se na sve slike.

5.4 Izražaj CaMKII u spinalnom gangliju nakon intraganglijske primjene CaMKII inhibitora i fiziološke otopine

Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju tCaMKII uspoređujući lijevi (kontrolni) ganglij s desnim (ubrizganim) spinalnim ganglijem nakon primjene fiziološke otopine (p=0,699, t-test), KN-93 (p=0,490, t-test) i mAIP(p=0,986, t-test) (Slika 7A, Slika 8 A-F). Značajno smanjenje izražaja pCaMKIIα uočeno je nakon primjene KN-93 (p=0,032) ali ne nakon primjene mAIP (p=0,531, t-test) i fiziološke otopine (p=0,572, t-test) (Slika 7B, Slika 9 A-F).

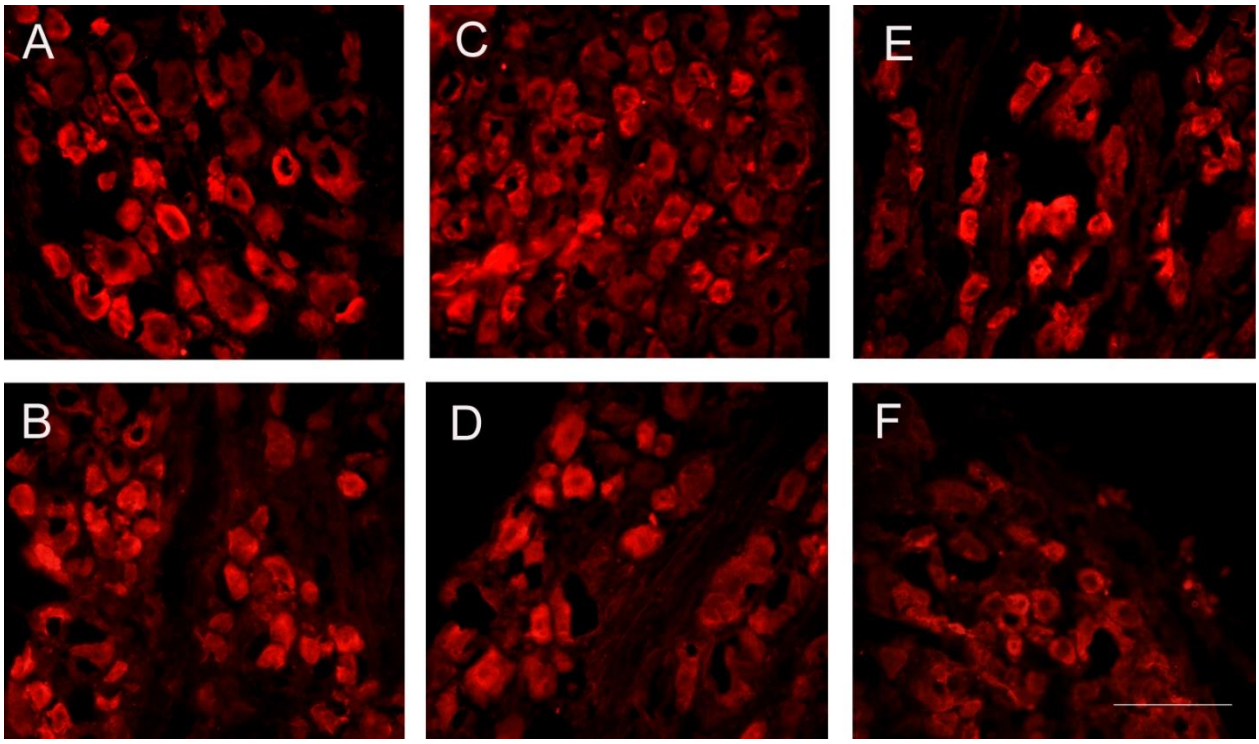
Daljnja analiza izražaja tCaMKII i pCaMKIIα učinjena je s obzirom na veličinu neurona. Prijašnja istraživanja pokazala su najveći izražaj CaMKII u neuronima malog promjera (155) koji sudjeluju u procesu prijenosa osjeta boli iz periferije u središnji živčani sustav (167). Nakon primjene mAIP KN-93 i fiziološke otopine, izražaj tCaMKII bio je isti u svim neuronima, bez obzira na veličinu (podatci nisu prikazani). Izražaj pCaMKIIα značajno je

smanjen nakon primjene KN-93 u malim (p=0,032, t-test) i srednje velikim neuronima (p=0,001, t-test), ali ne i u velikim neuronima.

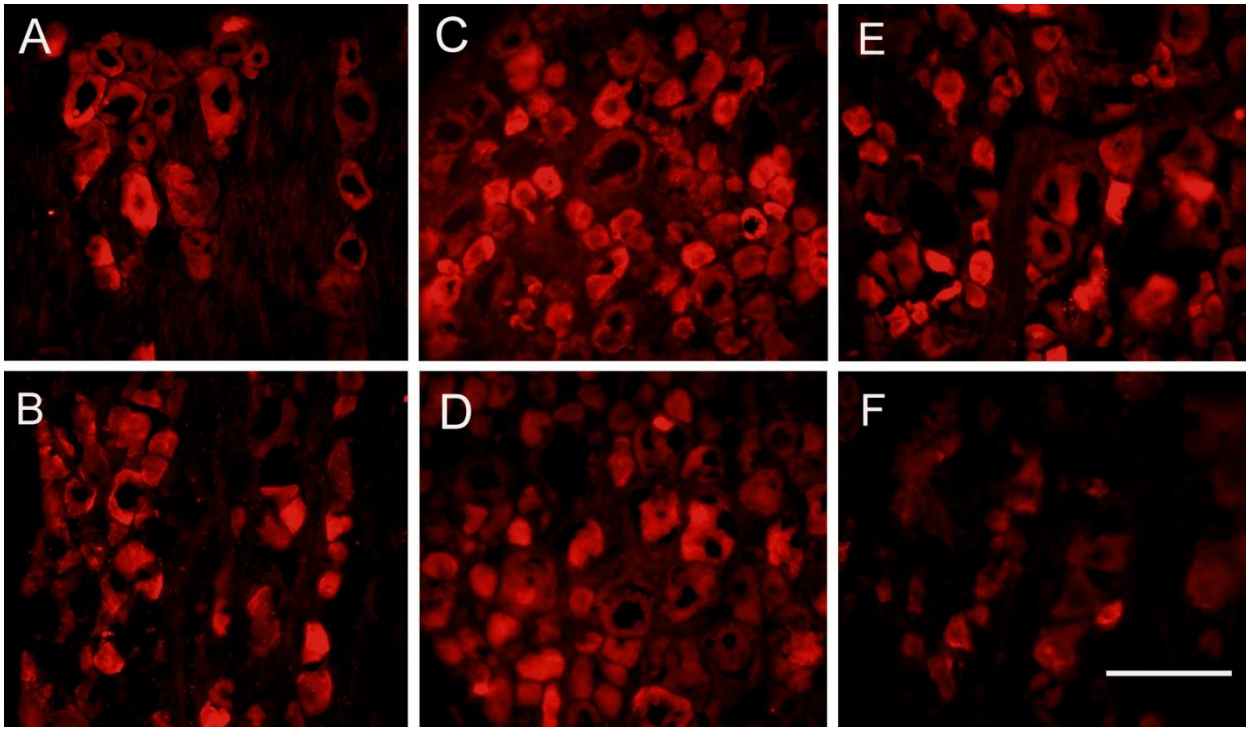


Slika 7. Utjecaj intraganglijske injekcije fiziološke otopine, mAIP i KN-93 na izražaj tCaMKII (A) i pCaMKIIα u dijabetičkih štakora. Bijeli stupci predstavljaju rezultate lijevog spinalnog ganglija (kontrolnog), a crne desnog (u koji je ubrizgan inhibitor). Podatci su prikazani kao AS±SD.

* statistički značajno u usporedbi lijevim (kontrolnim) ganglijem.



Slika 8. Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojanja tCaMKII u lijevom (kontrolnom gangliju) nakon ubrizgavanja fiziološke otopine (A), mAIP (C) i KN-93 (E) i u desnom kojemu je ubrizgana fiziološka otopina (B), mAIP (D) i KN-93 (F). Povećanje: 40x. Mjerilo je dugo 100 μm i odnosi se na sve slike.



Slika 9. Reprezentativni primjer imunofluorescencijskog bojanja pCAMKIIα u lijevom (kontrolnom gangliju) nakon ubrizgavanja fiziološke otopine (A), mAIP (C) i KN-93 (E) i u desnom kojemu je ubrizgana fiziološka otopina (B), mAIP (D) i KN-93 (F). Povećanje: 40x. Mjerilo je dugo 100 μm i odnosi se na sve slike.

6. RASPRAVA

Intratekalna primjena inhibitora CaMKII povećala je stopu odgovora na mehaničke podražaje tupom iglom 24 h nakon primjene te je značajno smanjila izražaj tCaMKII i pCaMKIIα, dok je intraganglijska primjena mAIP-a dovela do značajnog smanjenja osjetljivosti na hladne podražaje i na podražaj tupom iglom 2 h nakon primjene. Intratekalna primjena dvaju inhibitora CaMKII značajno je smanjila imunofluorescenciju tCaMKII i njene fosforilirane alfa izoforme. Intratekalna primjena mAIP i KN-93 nije utjecala na osjetljivost na hladne i tople podražaje. Oba inhibitora CaMKII povećala su stopu odgovora na mehaničke podražaje tupom iglom 24 h nakon primjene, ali ta razlika nije primijećena u testu von Freyevim vlaknima.

Intratekalna primjena inhibitora CaMKII korištena je u terapiji različitih modela boli u glodavaca. Neke od tih studija istraživale su liječenje inhibitorima CaMKII prije indukcije neuropatske boli (engl. *pretreatment*) (200-202), drugim studijama je prvo dokazano postojanje ponašanja karakterističnog za bol, a zatim su primijenjeni inhibitori (engl. *posttreatment*) (178, 182), dok su neki autori istraživali kombinaciju liječenja inhibitorima prije i nakon indukcije neuropatske boli (156, 170, 178, 187, 189). Liječenje prije indukcije boli može biti uspješno u nekim modelima boli, kao što je upalna bol. Takve vrste boli mogu se predvidjeti u određenim kliničkim okolnostima, a preventivna analgezija tada može imati koristi; najbolji primjer za to je postoperativna bol. Za model dijabetičke neuropatije preventivna analgezija nije opcija jer se kao komplikacija dijabetesa neuropatija pojavljuje tek nakon nekog vremena od nastanka bolesti (203).

Hasegawa i suradnici istraživali su učinak inhibicije CaMKII u SNL modelu boli koristeći intratekalnu primjenu KN-93 (10 nmol/10 μl) prije i poslije indukcije boli. Lijek je bio ubrizgan intratekalnim kateterom jednom dnevno od dana 0 do dana 6, a mjereni su prag podražaja šape 21 – 24 h nakon primjene KN-93. Osim primjene KN-93 prije indukcije boli ova skupina istraživača također je proučavala učinak primjene jedne doze KN-93 sedmog dana nakon indukcije boli na alodiniju, a prag podražaja šape mjeren je neposredno prije i nakon ubrizgavanja KN-93. Istraživanje je pokazalo da primjena KN-93 prije indukcije boli umanjuje taktilnu alodiniju treći i sedmi dan nakon indukcije, a primjena KN-93 nakon indukcije boli umanjuje taktilnu alodiniju 7 dana nakon ozljede u usporedbi s ponašanjem prije indukcije boli (170).

U modelu boli izazvane u miševa pomoću tvari P i formalinom, aktivacija CaMKIIα zamijećena je u lamini I i II dorzalnog roga kralježnične moždine. Obje studije primjenjivale su KN-93 prije indukcije boli (204, 205). U modelu boli izazvanom pomoću tvari P životinjama je ubrizgan KN-93 20 minuta prije indukcije boli (205). U modelu boli izazvane formalinom KN-93 je ubrizgan u dozi od 1, 5 i 20 μg također 20 minuta prije indukcije boli, ali samo se doza od 20 μg pokazala učinkovitom (204). U obje studije je inhibicija CaMKII intratekalnim putem dovela do smanjenja pretjeranog bolnog ponašanja. Međutim, ponašanje povezano s boli nije istraživano korištenjem štetnih podražaja. Umjesto toga, miševi su bili postavljeni u posude za promatranje te je zabilježeno vrijeme koje su proveli ližući, treskajući ili grizući šapu u koju je ubrizgana tvar P ili formalin (204, 205). Prema tome, može se reći da su obje studije prikazale samo smanjenje spontanog bolnog ponašanja. Učinkovitost KN-93 ovisnog o dozi na ublažavanje termalne hiperalgezije prikazano je i u drugim modelima neuropatske boli inducirane pomoću tvari P (206).

Studija Dai i suradnika prikazala je različite rezultate primjene KN-93 prije i nakon indukcije boli kroničnom konstrikcijskom ozljedom. Za intratekalnu primjenu KN-93 (0,25 mg/ml) korištena je osmotska pumpa. Sedmodnevna osmotska pumpa korištena je u istraživanju primjene KN-93 poslije indukcije boli, a 14-dnevna pumpa korištena je za istraživanje primjene KN-93 prije indukcije boli (1 μl/h). Termalna hiperalgezija analizirana je mjerenjem vremena latencije na toplinsko zračenje, a mehanička alodinija mjerena je von Freyevim vlaknima (156). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da primjena KN-93 prije, ali ne i poslije indukcije boli, umanjuje pretjerano bolno ponašanje u štakorskom modelu kronične konstrikcijske ozljede (156).

U istom istraživanju analiziran je učinak inhibicije CaMKII u boli induciranoj formalinom. KN-93 se u ovom slučaju ubrizgavao intratekalnim putem 30 minuta prije intraplantarne injekcije formalina. U ovom dijelu istraživanja autori nisu upotrebljavali termalni i mehanički podražaj za analizu bolnog ponašanja, već su samo promatrali treskanje i lizanje ozlijeđene šape. Ove promjene promatrane su u dvije faze: primarna faza koja je trajala 0 – 5 minuta nakon ubrizgavanja te sekundarna faza u trajanju 15–60 minuta nakon ubrizgavanja. Primjena KN-93 značajno je umanjila treskanje i lizanje ozlijeđene šape tijekom sekundarne faze (156).

Analizirajući termalnu hiperalgeziju i mehaničku alodiniju Chen i suradnici istraživali su učinak KN-93 na inhibiciju CaMKII aktivnosti u modelu SNL boli kod miševa. KN-93 (15-45 mmol/5 μl) ubrizgan je intratekalnim putem nakon podvezivanja L5/L6 spinalnog živca.

Mehanička alodinija mjerena je von Freyevim vlaknima 0; 0,5; 2; 4; 8 i 24 h nakon ubrizgavanja KN-93, a termalna hiperalgezija mjerena je korištenjem izvora toplinskog zračenja. Pet dana nakon SNL-a, a 2 h prije testiranja bolnog ponašanja ubrizgao se KN-93, rezultati su pokazali da primjena KN-93 umanjuje nastalu mehaničku alodiniju i termalnu hiperalgeziju. Ovaj rezultat promjene ponašanja karakterističnog za bol bio je ovisan o dozi, učinkovitost je bila dokazana samo nakon primjene visoke doze KN-93 (35–45 nmol), ali ne i nakon primjene najniže doze KN-93 (15 nmol). Osim toga, rezultati ovog istraživanja pokazali su da antialodinijsko i antihiperalgezijsko djelovanje KN-93 počinje 30 min nakon ubrizgavanja s vrškom djelovanja nakon 2 h (178). Ista skupina istraživača koristeći istu metodologiju analizirala je o dozi ovisne promjene u termalnoj hiperalgeziji i mehaničkoj alodiniji nakon intratekalne primjene KN-93 u modelu upalne boli. Rezultati tog istraživanja pokazali su da djelovanje KN-93 počinje nakon 30 minuta i traje od 2 do 4 h (187).

Rezultati navedenih istraživanja potvrđuju hipotezu da je CaMKII važna za pretjerano bolno ponašanje u različitim modelima neuropatske boli. Međutim, metodologija i modeli boli korišteni u tim istraživanjima u mnogočemu se razlikuju. Različiti protokoli liječenja inhibitorima CaMKII prije i poslije indukcije boli, različito vrijeme testiranja bolnog ponašanja kao i razlike u statističkoj analizi bolnog ponašanje zahtijevaju daljnja istraživanja o farmakološkom učinku inhibitora CaMKII na smanjenje pretjeranog bolnog ponašanja.

Većina istraživanja nije promatrala učinak CaMKII inhibitora tijekom vremena. Istraživanja koja su testirala trajanje učinka inhibitora CaMKII na bolno ponašanje pokazala su da je učinak kratkotrajan i da traje svega nekoliko sati (178).

Inhibitor KN-93 bio je mnogo učinkovitiji od mAIP u smanjenju izražaja pCaMKIIα nakon intratekalne primjene, što može biti posljedica različitog djelovanja inhibitora. Nasuprot tome, KN-93 je bio manje učinkovit na smanjenje izražaja tCaMKII što bi moglo ovisiti o mehanizmima indukcije transkripcije gena CaMKII.

Rezultati intratekalne primjene inhibitora ukazuju na složenu ulogu CaMKII u dijabetičkoj neuropatiji i da smanjenje izražaja CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine u ovom tipu neuropatske boli može biti odgovorno za pretjerano bolno ponašanje. Smanjenje izražaja CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine također je povezano s pretjeranim bolnim ponašanjem i prethodno je opisano u modelu boli nastale podvezivanjem živca (167).

Rezultati našeg istraživanja intratekalne primjene inhibitora CaMKII i fiziološke otopine u suprotnosti su s rezultatima ostalih studija. Postoji nekoliko molekularnih mehanizama koji bi mogli objasniti rezultate ove studije. Povećanje CaMKII i njene fosforilacije moglo bi duže ili kraće zaštitno djelovati u različitim aspektima boli. Također, povećanje CaMKII i njene fosforilacije može biti samo jedan mehanizam u nastanku boli dijabetičkih štakora. Točna regulacija unutarstanične razine kalcija važna je za stanični rast i signalizaciju (207). Ashpole i suradnici pokazali su da korištenje CaMKII inhibitora izaziva apoptozu u staničnoj kulturi kortikalnih neurona 4 h nakon inhibicije (207). Osim toga, inhibicija CaMKII povećala je broj akcijskih potencijala sugerirajući povećanje neuronske podražljivosti (207). Ta studija pokazala je također da inhibicija CaMKII u kombinaciji s povišenom razinom glutamata izaziva smrt neurona (207).

Točan mehanizam djelovanja CaMKII u nocicepciji nije do kraja istražen. Istraživanja na različitim malignim bolestima pokazala su da enzim CaMKII može imati ulogu u procesu apoptoze (208), što bi značilo da bi inhibitori CaMKII mogli imati suprotan učinak. Međutim, ovakva istraživanja nisu provedena na živčanom tkivu. Pretpostavlja se da CaMKII sudjeluje u presinaptičkoj kontroli otpuštanja glutamata (209) i u brzoj sinaptičkoj inhibiciji posredovanoj GABA A receptorima (210). Ove studije međutim nisu istraživale povezanost tih promjena s bolnim ponašanjem.

Većina istraživanja *in vivo* primjene inhibitora CaMKII koristila je opću anesteziju izofluranom. Izofluran iz tijela štakora izlazi u dvije faze; brza faza traje 7-9 minuta, a spora faza 110-115 minuta i smatra se da ne utječe na testiranje bolnog ponašanja 2 h nakon anestezije (211).

Prethodna istraživanja o utjecaju inhibitora CaMKII na bolno ponašanje koristila su uglavnom toplinski podražaj radijacijskom toplinom ili mehanički podražaj von Freyevim vlaknima. U istraživanju utjecaja inhibitora CaMKII u ovom su istraživanju korišteni testovi na temelju njihove važnosti u kliničkoj primjeni dijagnosticiranja dijabetičke neuropatije (212). Ovo bi se trebalo uzeti u obzir u budućim istraživanjima budući da farmakološke tvari mogu djelovati sukladno specifičnom osjetnom modalitetu, dajući drugačije rezultate u različitim testovima ponašanja. Na primjer, u modelu boli induciranom oksaliplatinom akutno djelovanje intratekalne primjene KN-93 značajno je umanjilo mehaničku alodiniju testiranu von Freyevim vlaknima, ali nije utjecalo na smanjenje preosjetljivosti na hladno u testu acetonom (213).

Uzimajući u obzir ove rezultate i rezultate drugih istraživanja koja pokazuju da primjena KN-93 u blizini kralježnične moždine 7 dana nakon ozljede kroničnom konstrikcijom nije dovela do smanjenja alodinije moglo bi se zaključiti da u neuropatskoj boli CaMKII ima ulogu u spinalnom gangliju, a ne kralježničnoj moždini (156).

Cilj istraživanja intraganglijske primjene inhibitora bio je utvrditi može li izravna primjena CaMKII inhibitora u spinalni ganglij ublažiti pretjerano bolno ponašanje u štakorskom modelu dijabetesa tip 1. Ublažavanje pretjeranog bolnog ponašanja bilo je sukladno specifičnom osjetnom modalitetu uz smanjenje izražaja pCaMKIIα. Smanjenje izražaja pCaMKIIα primijećeno je u malim i srednje velikim neuronima nakon primjene KN-93.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako dva inhibitora CaMKII, sa različitim mehanizmom djelovanja, mogu ublažiti pretjerano bolno ponašanje sukladno specifičnom osjetnom modalitetu. KN-93 kompetitivno se natječe s kalmodulinom za regulacijsko mjesto na CaMKII (173). mAIP je visoko specifičan inhibitor CaMKII na kojeg ne djeluje kompleks kalcij/kalmodulin i koji slobodno prolazi kroz membranu te se veže na aktivno mjesto na CaMKII inhibirajući tako i njenu autofosforilaciju (214). mAIP se veže na aktivno mjesto na CaMKII (214) i blokira o kalciju ovisnu i o kalciju neovisnu aktivaciju CaMKII (137). KN-93 blokira aktivaciju CaMKII, ali ne i njenu autonomnu aktivnost (173). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je inhibicija aktivnosti/fosforilacije CaMKII učinkovitija u liječenju pretjeranog bolnog ponašanja u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1, i da je ovo možebitni razlog slabije djelotvornosti KN-93 od mAIP.

Istraživanja koja koriste intraganglijsku primjenu farmakološki aktivnih tvari veoma su rijetka u temeljnim istraživanjima o boli. Predloženo je da izravna i selektivna primjena lijekova u spinalni ganglij može ograničiti utjecaj lijekova na druge populacije neurona i da može biti osnova za razvoj novih terapija (13). Dokazano je da izravna primjena lijekova u spinalni ganglij sama po sebi ne utječe na bolno ponašanje štakora (13, 196, 198). U usporedbi s intraganglijskom primjenom, intratekalna primjena inhibitora CaMKII korištena je u terapiji različitih modela boli. Rezultati tih istraživanja ukazuju na povezanost CaMKII i abnormalne nocicepcije u neuropatiji.

Povećani izražaj CaMKII u spinalnim ganglijima u muških dijabetičkih štakora kod kojih je DM induciran STZ-om mogući je patofiziološki mehanizam bolne osjetljivosti u dijabetičkoj neuropatiji (168, 190). Iako novija istraživanja pokazuju da muškarci i žene drugačije

doživljavaju dijabetes (215), istraživanja o razlikama u ponašanju povezanim s boli temeljenim na spolnom dimorfizmu, rijetko se provode. Ferhatović i suradnici nisu pronašli spolni dimorfizam u nociceptivnim disfunkcijama štakorskog modela dijabetesa tipa 1 iako su ženke imale višu razinu glukoze u plazmi (190). Promjene u izražaju CaMKII u spinalnim ganglijima odgovaraju promjenama u bolnoj osjetljivosti i razvoju mehaničke i termalne hiperalgezije u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1 (168). Životinjski model DM2, induciran kombinacijom manjih doza STZ i prehrane bogate masnim kiselinama, nije razvio pretjerano bolno ponašanje niti su te životinje imale povećani izražaj CAMKII. Ova dva životinjska modela dijabetesa imala su značajne razlike u razini glukoze u plazmi (168).

Kako bi se istražilo bolno ponašanje sukladno specifičnom osjetnom modalitetu u ovom istraživanju korišten je cijeli niz testova ponašanja, testiranje hladnim i toplim podražajem i dva testa mehaničkim podražajima. Nije rijetkost susresti rezultate analize ponašanja koja pokazuje specifični osjetni modalitet. Moguće objašnjenje je da eksperimentalna manipulacija utječe na specifični stanični fenotip odgovoran za osjetni modalitet.

Stanični mehanizam nastanka hiperalgezije i alodinije u neuropatskoj boli još je nepoznat. Predloženo je da remodeliranje ionskih kanala može povećati osjetljivost neurona i tako dovesti do razvoja neuropatskih simptoma (216, 217). Poremećena homeostaza kalcija također sudjeluje u patofiziologiji dijabetičke neuropatije (218). Patofiziološka važnost promjena struje kalcija, s povećanjem stanične podražljivosti i aksonskim promjenama, opisana je u spinalnim ganglijima dijabetičkih štakora (219-221). Preopterećenje stanice s kalcijem može dovesti do povećanog izražaja CaMKII u primarnim aferentnim neuronima i pretjeranog okidanja neurona u spinalnom gangliju (222).

Od svih izoformi CaMKII, pCaMKIIα najviše ima u neuronima (223). Ovo istraživanje pokazalo ja da intraganglijska primjena inhibitora CaMKII uzrokuje smanjenje fluorescencije CaMKII u ubrizganom spinalnom gangliju, dajući tako dokaz da je pCaMKIIα važna u nocicepciji različitih modela boli. Smanjenje izražaja pCaMKIIα uočeno je samo u malim i srednje velikim neuronima. Mali i srednje veliki neuroni dovode podražaje od C i Aδ vlakana, odgovornih za prijenos bolnih podražaja (224).

7. ZAKLJUČCI

1. Intratekalna primjena inhibitora CaMKII, mAIP i KN-93, povećala je osjetljivost na mehaničke podražaje, dok je intraganglijska primjena mAIP smanjila osjetljivost na hladne i mehaničke podražaje.

2. Intratekalna primjena inhibitora CaMKII, mAIP i KN-93, smanjila je izražaj ukupne CaMKII i njene fosforilirane alfa izoforme u dorzalnom rogu kralježnične moždine.

3. Intraganglijska primjena KN-93 smanjila je izražaj fosforilirane CaMKIIα izoforme u malim i srednje velikim neuronima spinalnog ganglija.

8. SAŽETAK

Uvod: Terapija kronične boli u bolesnika s dijabetičkom neuropatijom vrlo je zahtjevna, a odgovor na postojeće načine liječenja često nije zadovoljavajući. Kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII) uključena je u razvoj dijabetičke neuropatije. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj intratekalne i intraganglijske primjene inhibitora CaMKII i fiziološke otopine na bolno ponašanje u štakorskom modelu dijabetesa tipa 1.

Metode: Dijabetes je induciran Sprague-Dawley štakorima intraperitonealnom injekcijom streptozotocina (55mg/kg). Dva tjedna nakon indukcije dijabetesa štakorima su ubrizgana dva inhibitora CaMKII, KN-93 i mAIP, ili fiziološka otopina izravno u L5 spinalni gangliji ili u subarahnoidalni prostor kroz 5-6 intervertebralni prostor. Testiranje ponašanja karakterističnog za bol provedeno je prije indukcije dijabetesa, 15. dan pokusa te 2h i 24h nakon injekcije. Koristeći imunofluorescenciju analiziran je izražaj ukupne CaMKII i njene alfa izoforme u kralježničnoj moždini i spinalnim ganglijima nakon ubrizgavanja inhibitora CaMKII i fiziološke otopine.

Rezultati: Intratekalna primjena mAIP i KN-93 značajno je smanjila izražaj ukupne CaMKII i njene alfa izoforme u dorzalnom rogu kralježnične moždine te značajno povećala osjetljivost na mehaničke podražaje 24h nakon injekcije. Intraganglijska primjena KN-93 umanjila je izražaj pCaMKIIα u spinalnom gangliju, dok ta promjena nije uočena u izražaju ukupne CaMKII. Primjena mAIP značajno je smanjila osjetljivost na hladne i mehaničke podražaje 2h nakon injekcije.

Zaključak: Ovo istraživanje pokazalo je da intratekalna i intraganglijska primjena inhibitora CaMKII smanjuje izražaj CaMKII u dorzalnom rogu kralježnične moždine i spinalnog ganglija, ali je utjecaj na bolno ponašanje kod ova dva inhibitora bio drugačiji. CaMKII inhibitori mogu biti potencijalne farmakološke tvari, ako se ubrizgaju u spinalni ganglij i trebali bi se dalje istraživati u smislu liječenja simptoma dijabetičke neuropatije.

9. SUMMARY

Intrathecal and intraganglionic injection of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors as potential treatment of diabetic neuropathy

The aim of this study was to test whether intrathecal (i.t.) and intraganglionic (i.g.) injection of CaMKII inhibitors may alleviate pain-related behavior in diabetic rats. Two weeks after diabetes induction myristoylated-AIP (mAIP), KN-93, or saline were injected directly into the right L5 dorsal root ganglion (DRG) or into the subarachnoid space through 5-6th lumbar interspace. Behavioral testing was performed before induction of diabetes, the day preceding the injection, as well as 2 h and 24 h after the i.t. or i.g. injection. The expression of total CaMKII and its alpha isoform in dorsal horn and DRG neurons was analyzed using immunofluorescence. Intrathecal injection of mAIP and KN-93 resulted in significant decrease in expression of total CaMKII and CaMKIIα in dorsal horn and significantly increased sensitivity to a mechanical stimulus 24 h after i.t. injection. After i.g. injection the expression of CaMKIIα was significantly reduced in DRG neurons. Significant reduction in hypersensitivity to cold and mechanical stimuli was observed 2 h after i.g. injection of mAIP, but not after KN-93. This study provides evidence that CaMKII inhibitors may be potential pharmacological agents if injected directly into DRG and should be further explored for treatment of diabetic neuropathy symptoms.

10. **LITERATURA**

1. IASP. International Association for the Study of Pain Taxonomy. Dostupno na: http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/default.htm. 2014.

2. Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. Lancet 1999;353:1607-9.

3. Sapunar D, Puljak, L. Neurobiologija boli. In: Jukić M, Majerić Kogler V., Fingler M., editor. Bol-uzroci i liječenje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.6.

4. 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;3:226.

5. Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. Lancet 1999;353:1607-9.

6. Cassel EJ. The nature of suffering and the goals of medicine. N Engl J Med 1982;306:639-45.

7. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes - A meta-analysis. Diabetes Care 2001;24:1069-78.

8. Robinson MJ, Edwards SE, Iyengar S, Bymaster F, Clark M, Katon W. Depression and pain. Front Biosci 2009;14:5031-51.

9. Schott G. Pain. In: Clarke C, et al, editors. Neurology: a Queen Square textbook. 1 ed: Wiley-Blackwell; 2009.847-70.

10. Jukic M, Majeric Kogler V, Fingler M. Bol - uzroci i liječenje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.1-4.

11. Craig AD. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. Annu Rev Neurosci 2003;26:1-30.

12. Sapunar D, Kostic S, Banozic A, Puljak L. Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain. J Pain Res 2012;5:31-8.

13. Kostic S, Puljak L, Sapunar D. Attenuation of pain-related behaviour evoked by carrageenan injection through blockade of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors. Eur J Pain 2013;17:493-504.

14. Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. Neuron 2005;47:787-93.

15. Dostrovsky JO. Role of thalamus in pain. Prog Brain Res 2000;129:245-57.

16. 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.

17. 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.

18. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 1992;50:355-63.

19. Gao F, Zheng ZM. Animal models of diabetic neuropathic pain. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2014;122:100-6.

20. Puljak L, Sapunar D. Rječnik boli: Laboratorij za istraživanje boli; 2010.

21. Svjetska zdravstvena organizacija. Ljestvica boli. WHO Pain Ladder. Dostupno na: http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/2011.

22. Bannwarth B, Pehourcq F. [Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues]. Drugs 2003;63 Spec No 2:5-13.

23. Clissold SP. Paracetamol and phenacetin. Drugs 1986;32 Suppl 4:46-59.

24. Aronson JK. Meyler's Side Effects of Analgesics and Anti-Inflammatory Drugs. Amsterdam: Elsevier; 2009.1–500.

25. Scarpignato C, Hunt RH. Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: clinical picture, pathogenesis, and prevention. Gastroenterol Clin North Am 2010;39:433-64.

26. McCarberg BH, Argoff CE. Topical diclofenac epolamine patch 1.3% for treatment of acute pain caused by soft tissue injury. Int J Clin Pract 2010;64:1546-53.

27. Vrhovac B i sur. Farmakoterapijski priručnik, 5 izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2007.

28. Richy F, Scarpignato C, Lanas A, Reginster JY. Efficacy and safety of piroxicam revisited. A global meta-analysis of randomised clinical trials. Pharmacol Res 2009;60:254-63.

29. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology 2011;115:1363-81.

30. Ahlbeck K. Opioids: a two-faced Janus. Curr Med Res Opin 2011;27:439-48.

31. McNicol E, Horowicz-Mehler N, Fisk RA, Bennett K, Gialeli-Goudas M, Chew PW, i sur. Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: a systematic review. J Pain 2003;4:231-56.

32. Ballantyne JC, Mao J. Opioid therapy for chronic pain. N Engl J Med 2003;349:1943-53.

33. Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, i sur. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. Pharmacol Rev 1996;48:567-92.

34. Stahl SM. Anticonvulsants and the relief of chronic pain: pregabalin and gabapentin as alpha(2)delta ligands at voltage-gated calcium channels. J Clin Psychiatry 2004;65:596-7.

35. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, i sur. Advances in neuropathic pain - Diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. Archives of Neurology 2003;60:1524-34.

36. Dharmshaktu P, Tayal V, Kalra BS. Efficacy of antidepressants as analgesics: a review. J Clin Pharmacol 2012;52:6-17.

37. Max MB, Culnane M, Schafer SC, Gracely RH, Walther DJ, Smoller B, i sur. Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. Neurology 1987;37:589-96.

38. Stahl SM, Grady MM, Moret C, Briley M. SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants. CNS Spectr 2005;10:732-47.

39. McIntyre RS, Panjwani ZD, Nguyen HT, Woldeyohannes HO, Alsuwaidan M, Soczynska JK, i sur. The hepatic safety profile of duloxetine: a review. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2008;4:281-5.

40. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, i sur. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. Pain 2007;132:237-51.

41. Berman BM, Bausell RB. The use of non-pharmacological therapies by pain specialists. Pain 2000;85:313-5.

42. Jawahar R, Oh U, Yang S, Lapane K. Alternative Approaches: A Systematic Review of Non-Pharmacological Treatments for Non-Spastic and Non-Trigeminal Pain in Patients with Multiple Sclerosis. Eur J Phys Rehabil Med 2014.

43. Titler MG, Rakel BA. Nonpharmacologic treatment of pain. Crit Care Nurs Clin North Am 2001;13:221-32.

44. Standards of medical care in diabetes--2013. Diabetes Care 2013;36 Suppl 1:S11-66.

45. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 1998;21:1414-31.

46. Forbes JM, Soldatos G, Thomas MC. Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? Clin Biochem Rev 2005;26:123-34.

47. Jang C, Lim JH, Park CW, Cho YJ. Regulator of Calcineurin 1 Isoform 4 (RCAN1.4) Is Overexpressed in the Glomeruli of Diabetic Mice. Korean J Physiol Pharmacol 2011;15:299-305.

48. Metelko Z, Pavlic-Renar I, Poljicanin T, Szirovitza L, Turek S. Prevalence of diabetes mellitus in Croatia. Diabetes Res Clin Pract 2008;81:263-7.

49. World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who_ncd_ncs_99.2.pdf. 1999.

50. Spruce MC, Potter J, Coppini DV. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. Diabet Med 2003;20:88-98.

51. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Nature 2010;464:1293-300.

52. Taborsky GJ, Jr., Ahren B, Havel PJ. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes. Diabetes 1998;47:995-1005.

53. Castano L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. Annu Rev Immunol 1990;8:647-79.

54. Zoka A, Muzes G, Somogyi A, Varga T, Szeman B, Al-Aissa Z, i sur. Altered immune regulation in type 1 diabetes. Clin Dev Immunol 2013;2013:254874.

55. American diabetes association (ADA) DnhmmeacAGABp.

56. Weigmann B, Franke RK, Daniel C. Immunotherapy in autoimmune type 1 diabetes. Rev Diabet Stud 2012;9:68-81.

57. International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas. Sixth edition. 2013.

58. Maahs DM, Rewers M. Editorial: Mortality and renal disease in type 1 diabetes mellitus--progress made, more to be done. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:3757-9.

59. Dubravko Petrač i suradnici. Interna medicina. Medicinska naklada 2009:371-82.

60. Hepburn DA, Deary IJ, Frier BM, Patrick AW, Quinn JD, Fisher BM. Symptoms of acute insulin-induced hypoglycemia in humans with and without IDDM. Factor-analysis approach. Diabetes Care 1991;14:949-57.

61. Barski L, Kezerle L, Zeller L, Zektser M, Jotkowitz A. New approaches to the use of insulin in patients with diabetic ketoacidosis. Eur J Intern Med 2013;24:213-6.

62. Chaithongdi N, Subauste JS, Koch CA, Geraci SA. Diagnosis and management of hyperglycemic emergencies. Hormones (Athens) 2011;10:250-60.

63. Hu G, Jousilahti P, Qiao Q, Katoh S, Tuomilehto J. Sex differences in cardiovascular and total mortality among diabetic and non-diabetic individuals with or without history of myocardial infarction. Diabetologia 2005;48:856-61.

64. Stegmayr B, Asplund K. Diabetes as a risk factor for stroke. A population perspective. Diabetologia 1995;38:1061-8.

65. Mankovsky BN, Ziegler D. Stroke in patients with diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev 2004;20:268-87.

66. Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. Diabetologia 1988;31:16-23.

67. Chen M, Curtis TM, Stitt AW. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. Curr Med Chem 2013;20:3234-40.

68. Frank RN. Diabetic retinopathy. N Engl J Med 2004;350:48-58.

69. O'Connor AS, Schelling JR. Diabetes and the kidney. Am J Kidney Dis 2005;46:766-73.

70. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. Diabetologia 2001;44:1957-72.

71. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. Eur J Clin Invest 2004;34:785-96.

72. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. Korean J Physiol Pharmacol 2014;18:1-14.

73. Vinik AI, Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. Med Clin North Am 2004;88:947-99, xi.

74. Thomas PK. The peripheral nervous system as a target for toxic substances. Acta Neurol Scand Suppl 1984;100:21-6.

75. Brown MJ, Asbury AK. Diabetic neuropathy. Ann Neurol 1984;15:2-12.

76. Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB. Diabetic neuropathies. Diabetes Care 1992;15:1926-75.

77. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. Diabetes Metab Rev 1988;4:437-51.

78. Zochodne DW, Ho LT. Normal blood flow but lower oxygen tension in diabetes of young rats: microenvironment and the influence of sympathectomy. Can J Physiol Pharmacol 1992;70:651-9.

79. Gooch C, Podwall D. The diabetic neuropathies. Neurologist 2004;10:311-22.

80. Jakobsen J. Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1979;42:509-18.

81. Khan GM, Chen SR, Pan HL. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. Neuroscience 2002;114:291-9.

82. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, i sur. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. Diabetes Care 2005;28:956-62.

83. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, i sur. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. Neurology 1993;43:817-24.

84. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, i sur. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. Diabetes Care;33:2285-93.

85. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. Diabetes Care 2004;27:1458-86.

86. England JD, Gronseth GS, Franklin G, Miller RG, Asbury AK, Carter GT, i sur. Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. Neurology 2005;64:199-207.

87. Delamater AM, Jacobson AM, Anderson B, Cox D, Fisher L, Lustman P, i sur. Psychosocial therapies in diabetes - Report of the psychosocial therapies working group. Diabetes Care 2001;24:1286-92.

88. Davis WK, Hess GE, Hiss RG. Psychosocial Correlates of Survival in Diabetes. Diabetes Care 1988;11:538-45.

89. Engum A. The role of depression and anxiety in onset of diabetes in a large population-based study. J Psychosom Res 2007;62:31-8.

90. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, i sur. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Prog Neurobiol 2003;69:229-85.

91. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. Science 2002;298:1912-34.

92. Canavese M, Santo L, Raje N. Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. Cancer Biol Ther 2013;13:451-7.

93. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. Nat Rev Mol Cell Biol 2013;14:518-28.

94. Pareek TK, Kulkarni AB. Cdk5: a new player in pain signaling. Cell Cycle 2006;5:585-8.

95. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:749-59.

96. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, i sur. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 2001;22:153-83.

97. Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. Glia 2004;45:89-95.

98. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. Pain 2005;114:149-59.

99. Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, i sur. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. J Neurosci 2006;26:3551-60.

100. Ma W, Quirion R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. Pain 2002;99:175-84.

101. Hallows KR, Alzamora R, Li H, Gong F, Smolak C, Neumann D, i sur. AMP-activated protein kinase inhibits alkaline pH- and PKA-induced apical vacuolar H+-ATPase accumulation in epididymal clear cells. Am J Physiol Cell Physiol 2009;296:C672-81.

102. Isensee J, Diskar M, Waldherr S, Buschow R, Hasenauer J, Prinz A, i sur. Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. J Cell Sci 2014;127:216-29.

103. Loram LC, Taylor FR, Strand KA, Harrison JA, Rzasalynn R, Sholar P, i sur. Intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists reversed neuropathic allodynia through protein kinase (PK)A/PKC signaling. Brain Behav Immun;33:112-22.

104. Rameh LE, Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. J Biol Chem 1999;274:8347-50.

105. Neely GG, Rao S, Costigan M, Mair N, Racz I, Milinkeviciute G, i sur. Construction of a global pain systems network highlights phospholipid signaling as a regulator of heat nociception. PLoS Genet;8:e1003071.

106. Duan B, Liu DS, Huang Y, Zeng WZ, Wang X, Yu H, i sur. PI3-kinase/Akt pathway-regulated membrane insertion of acid-sensing ion channel 1a underlies BDNF-induced pain hypersensitivity. J Neurosci;32:6351-63.

107. Selley DE, Welch SP, Sim-Selley LJ. Sphingosine lysolipids in the CNS: endogenous cannabinoid antagonists or a parallel pain modulatory system? Life Sci 2013;93:187-93.

108. Finley A, Chen Z, Esposito E, Cuzzocrea S, Sabbadini R, Salvemini D. Sphingosine 1-phosphate mediates hyperalgesia via a neutrophil-dependent mechanism. PLoS One 2013;8:e55255.

109. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. Science 2000;287:1604-5.

110. Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. Cell Calcium 2011;50:1-8.

111. Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. Journal of Biological Chemistry 1989;264:17907-12.

112. Colbran RJ, Brown AM. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. Curr Opin Neurobiol 2004;14:318-27.

113. Zhang XF, Zhu CZ, Thimmapaya R, Choi WS, Honore P, Scott VE, i sur. Differential action potentials and firing patterns in injured and uninjured small dorsal root ganglion neurons after nerve injury. Brain Res 2004;1009:147-58.

114. Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. Adv Drug Deliv Rev 2003;55:949-65.

115. Kanaseki T, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T. Structural features of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. J Cell Biol 1991;115:1049-60.

116. Tombes RM, Faison MO, Turbeville JM. Organization and evolution of multifunctional Ca(2+)/CaM-dependent protein kinase genes. Gene 2003;322:17-31.

117. Stratton MM, Chao LH, Schulman H, Kuriyan J. Structural studies on the regulation of Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II. Curr Opin Struct Biol;23:292-301.

118. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. Science 1992;256:1199-202.

119. Gray CB, Heller Brown J. CaMKIIdelta subtypes: localization and function. Front Pharmacol 2014;5:15.

120. Erondu NE, Kennedy MB. Regional distribution of type II Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. J Neurosci 1985;5:3270-7.

121. Bruggemann I, Schulz S, Wiborny D, Hollt V. Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions. Brain Research Molecular Brain Research 2000;85:239-50.

122. Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK. Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. J Biol Chem 2000;275:14354-9.

123. Zhang T, Brown JH. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res 2004;63:476-86.

124. Anderson ME. Pathways for CaMKII activation in disease. Heart Rhythm 2011;8:1501-3.

125. Meador WE, Means AR, Quiocho FA. Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. Science 1993;262:1718-21.

126. Hanson PI, Meyer T, Stryer L, Schulman H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. Neuron 1994;12:943-56.

127. Bradshaw JM, Hudmon A, Schulman H. Chemical quenched flow kinetic studies indicate an intraholoenzyme autophosphorylation mechanism for Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Biol Chem 2002;277:20991-8.

128. Bradshaw JM, Kubota Y, Meyer T, Schulman H. An ultrasensitive Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II-protein phosphatase 1 switch facilitates specificity in postsynaptic calcium signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:10512-7.

129. Colbran RJ. Inactivation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation. J Biol Chem 1993;268:7163-70.

130. Hanson PI, Schulman H. Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. J Biol Chem 1992;267:17216-24.

131. Patton BL, Miller SG, Kennedy MB. Activation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase by Ca2+/calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine within the calmodulin-binding domain. J Biol Chem 1990;265:11204-12.

132. Hashimoto Y, Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Autophosphorylation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. Effects on total and Ca2+-independent activities and kinetic parameters. J Biol Chem 1987;262:8051-5.

133. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem J 2002;364:593-611.

134. Hook SS, Means AR. Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:471-505.

135. Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E. Increased phosphorylation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation. J Biol Chem 1995;270:6119-24.

136. Zhong L, Gerges NZ. Neurogranin targets calmodulin and lowers the threshold for the induction of long-term potentiation. PLoS One 2012;7:e41275.

137. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat Rev Neurosci 2002;3:175-90.

138. Shonesy BC, Jalan-Sakrikar N, Cavener VS, Colbran RJ. CaMKII: A Molecular Substrate for Synaptic Plasticity and Memory. Prog Mol Biol Transl Sci 2014;122:61-87.

139. Otmakhov N, Griffith LC, Lisman JE. Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. J Neurosci 1997;17:5357-65.

140. Shipton OA, Paulsen O. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2014;369:20130163.

141. Moriguchi S, Tagashira H, Sasaki Y, Yeh JZ, Sakagami H, Narahashi T, i sur. CaMKII activity is essential for improvement of memory-related behaviors by chronic rivastigmine treatment. J Neurochem 2014;128:927-37.

142. Ohyama A, Hosaka K, Komiya Y, Akagawa K, Yamauchi E, Taniguchi H, i sur. Regulation of exocytosis through Ca2+/ATP-dependent binding of autophosphorylated Ca2+/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A. J Neurosci 2002;22:3342-51.

143. Easton AC, Lucchesi W, Mizuno K, Fernandes C, Schumann G, Giese KP, i sur. alphaCaMKII autophosphorylation controls the establishment of alcohol-induced conditioned place preference in mice. Behav Brain Res 2013;252:72-6.

144. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. Science 1992;257:206-11.

145. Wu Y, MacMillan LB, McNeill RB, Colbran RJ, Anderson ME. CaM kinase augments cardiac L-type Ca2+ current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. Am J Physiol 1999;276:H2168-78.

146. Ji Y, Li B, Reed TD, Lorenz JN, Kaetzel MA, Dedman JR. Targeted inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17. J Biol Chem 2003;278:25063-71.

147. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. J Biol Chem 1995;270:2074-81.

148. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in heart failure. Circ Res 2005;97:1314-22.

149. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res 1999;84:713-21.

150. Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. Cardiovasc Res 1999;42:254-61.

151. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca2+ handling: reduced SR Ca2+ load and activated SR Ca2+ release. Circ Res 2003;92:904-11.

152. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, i sur. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:2342-7.

153. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, i sur. Requirement for Ca2+/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. J Clin Invest 2009;119:1230-40.

154. Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, i sur. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. Nat Med 2005;11:409-17.

155. Carlton SM, Hargett GL. Stereological analysis of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II alpha -containing dorsal root ganglion neurons in the rat: colocalization with isolectin Griffonia simplicifolia, calcitonin gene-related peptide, or vanilloid receptor 1. Journal of Comparative Neurology 2002;448:102-10.

156. Dai Y, Wang H, Ogawa A, Yamanaka H, Obata K, Tokunaga A, i sur. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in the spinal cord contributes to neuropathic pain in a rat model of mononeuropathy. Eur J Neurosci 2005;21:2467-74.

157. Eshete F, Fields RD. Spike frequency decoding and autonomous activation of Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons. J Neurosci 2001;21:6694-705.

158. Crown ED, Gwak YS, Ye Z, Yu Tan H, Johnson KM, Xu GY, i sur. Calcium/calmodulin dependent kinase II contributes to persistent central neuropathic pain following spinal cord injury. Pain 2012;153:710-21.

159. Garraway SM, Turtle JD, Huie JR, Lee KH, Hook MA, Woller SA, i sur. Intermittent noxious stimulation following spinal cord contusion injury impairs locomotor recovery and reduces spinal brain-derived neurotrophic factor-tropomyosin-receptor kinase signaling in adult rats. Neuroscience 2011;199:86-102.

160. Hermanson O, Larhammar D, Blomqvist A. Preprocholecystokinin mRNA-expressing neurons in the rat parabrachial nucleus: subnuclear localization, efferent projection, and expression of nociceptive-related intracellular signaling substances. J Comp Neurol 1998;400:255-70.

161. Fang L, Wu J, Lin Q, Willis WD. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. Journal of Neuroscience 2002;22:4196-204.

162. Garry EM, Moss A, Delaney A, O'Neill F, Blakemore J, Bowen J, i sur. Neuropathic sensitization of behavioral reflexes and spinal NMDA receptor/CaM kinase II interactions are disrupted in PSD-95 mutant mice. Curr Biol 2003;13:321-8.

163. Larson MA, Weber A, Weber AT, McDonald TL. Differential expression and secretion of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells stimulated with prolactin or lipopolysaccharide. Vet Immunol Immunopathol 2005;107:255-64.

164. Larsson M, Broman J. Pathway-specific bidirectional regulation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II at spinal nociceptive synapses after acute noxious stimulation. J Neurosci 2006;26:4198-205.

165. Liang DY, Li X, Clark JD. Formalin-induced spinal cord calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha expression is modulated by heme oxygenase in mice. Neurosci Lett 2004;360:61-4.

166. Hawkins RD, Zhuo M, Arancio O. Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. J Neurobiol 1994;25:652-65.

167. Kojundzic SL, Puljak L, Hogan Q, Sapunar D. Depression of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons after spinal nerve ligation. J Comp Neurol 2010;518:64-74.

168. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Kurir TT, Novak A, Vrdoljak L, i sur. Expression of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Pain-Related Behavior in Rat Models of Type 1 and Type 2 Diabetes. Anesth Analg 2013;116:712-21.

169. Boric M, Jelicic Kadic A, Ferhatovic L, Sapunar D, Puljak L. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal horn neurons in long-term diabetes. Neuroreport 2013;In press.

170. Hasegawa S, Kohro Y, Tsuda M, Inoue K. Activation of cytosolic phospholipase A2 in dorsal root ganglion neurons by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II after peripheral nerve injury. Mol Pain 2009;5:22.

171. Qin HY, Luo JL, Qi SD, Xu HX, Sung JJ, Bian ZX. Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon. Eur J Pharmacol 2010;647:75-83.

172. Kawano T, Zoga V, Gemes G, McCallum JB, Wu HE, Pravdic D, i sur. Suppressed Ca2+/CaM/CaMKII-dependent K(ATP) channel activity in primary afferent neurons mediates hyperalgesia after axotomy. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:8725-30.

173. Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, i sur. The newly synthesized selective Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. Biochem Biophys Res Commun 1991;181:968-75.

174. Payne ME, Fong YL, Ono T, Colbran RJ, Kemp BE, Soderling TR, i sur. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Characterization of distinct calmodulin binding and inhibitory domains. J Biol Chem 1988;263:7190-5.

175. Pellicena P, Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. Front Pharmacol 2014;5:21.

176. Fan GH, Wang LZ, Qiu HC, Ma L, Pei G. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. Mol Pharmacol 1999;56:39-45.

177. Chen GD, Peng ML, Wang PY, Lee SD, Chang HM, Pan SF, i sur. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates NO-elicited PKG activation to participate in spinal reflex potentiation in anesthetized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008;294:R487-93.

178. Chen Y, Luo F, Yang C, Kirkmire CM, Wang ZJ. Acute inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II reverses experimental neuropathic pain in mice. J Pharmacol Exp Ther 2009;330:650-9.

179. Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II alpha is required for the initiation and maintenance of opioid-induced hyperalgesia. J Neurosci 2010;30:38-46.

180. Damaj MI. Nicotinic regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation in the spinal cord. J Pharmacol Exp Ther 2007;320:244-9.

181. Damaj MI. The involvement of spinal Ca(2+)/calmodulin-protein kinase II in nicotine-induced antinociception in mice. Eur J Pharmacol 2000;404:103-10.

182. Damaj MI. Behavioral modulation of neuronal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity: differential effects on nicotine-induced spinal and supraspinal antinociception in mice. Biochem Pharmacol 2007;74:1247-52.

183. Drdla R, Sandkuhler J. Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. Mol Pain 2008;4:18.

184. Pedersen LM, Lien GF, Bollerud I, Gjerstad J. Induction of long-term potentiation in single nociceptive dorsal horn neurons is blocked by the CaMKII inhibitor AIP. Brain Res 2005;1041:66-71.

185. Fang L, Wu J, Zhang X, Lin Q, Willis WD. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II regulates the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element-binding protein of spinal cord in rats following noxious stimulation. Neurosci Lett 2005;374:1-4.

186. Larrucea C, Castro P, Sepulveda FJ, Wandersleben G, Roa J, Aguayo LG. Sustained increase of Ca+2 oscillations after chronic TRPV1 receptor activation with capsaicin in cultured spinal neurons. Brain Res 2008;1218:70-6.

187. Luo F, Yang C, Chen Y, Shukla P, Tang L, Wang LX, i sur. Reversal of chronic inflammatory pain by acute inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Pharmacol Exp Ther 2008;325:267-75.

188. Ogawa A, Dai Y, Yamanaka H, Iwata K, Niwa H, Noguchi K. Ca(2+)/calmodulin-protein kinase IIalpha in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to neuropathic pain following inferior alveolar nerve transection. Exp Neurol 2005;192:310-9.

189. Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka T, Watanabe M, Yamamoto T, Ito S. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. Neuropharmacology 2011;60:609-16.

190. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. Sex differences in pain-related behavior and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglia of rats with diabetes type 1 and type 2. Acta Histochem 2013;115:496-504.

191. Ferhatovic L, Jelicic Kadic A, Boric M, Puljak L. Changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in dorsal root ganglia during maturation in long-term diabetes. Histol Histopathol.

192. Weir GC, Clore ET, Zmachinski CJ, Bonner-Weir S. Islet secretion in a new experimental model for non-insulin-dependent diabetes. Diabetes 1981;30:590-5.

193. Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazi ne, a specific inhibitor of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Biol Chem 1990;265:4315-20.

194. Hanson PI, Kapiloff MS, Lou LL, Rosenfeld MG, Schulman H. Expression of a multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. Neuron 1989;3:59-70.

195. Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. Eur J Pharmacol 1980;67:313-6.

196. Puljak L, Kojundzic SL, Hogan QH, Sapunar D. Targeted delivery of pharmacological agents into rat dorsal root ganglion. J Neurosci Methods 2009;177:1021-6.

197. Puljak L, Kojundzic SL, Hogan QH, Sapunar D. Lidocaine injection into the rat dorsal root ganglion causes neuroinflammation. Anesth Analg 2009;108:1021-6.

198. Fischer G, Kostic S, Nakai H, Park F, Sapunar D, Yu H, i sur. Direct injection into the dorsal root ganglion: technical, behavioral, and histological observations. J Neurosci Methods 2011;199:43-55.

199. Atlas SC. Rat Spinal Cord Sections. Dostupno na: http://www.christopherreeve.org/site/c.ddJFKRNoFiG/b.4819993/k.4888/Spinal_Cord_Atlas__Rat_Spinal_Cord.htm. 2014.

200. Choi S-S, Seo Y-J, Kwon M-S, Shim E-J, Lee J-Y, Ham Y-O, i sur. Increase of phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II in several brain regions by substance P administered intrathecally in mice. Brain Research Bulletin 2005;65:375-81.

201. Choi S-S, Seo Y-J, Shim E-J, Kwon M-S, Lee J-Y, Ham Y-O, i sur. Involvement of phosphorylated Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and phosphorylated extracellular signal-regulated protein in the mouse formalin pain model. Brain Research 2006;1108:28-38.

202. Nakayama T, Naono R, Ikeda T, Nishimori T. NMDA and AMPA receptors contribute to the maintenance of substance P-induced thermal hyperalgesia. Neuroscience Research 2010;67:18-24.

203. Pop-Busui R, Roberts L, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC, Feldman EL. The management of diabetic neuropathy in CKD. Am J Kidney Dis;55:365-85.

204. Choi SS, Seo YJ, Kwon MS, Shim EJ, Lee JY, Ham YO, i sur. Increase of phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II in several brain regions by substance P administered intrathecally in mice. Brain Research Bulletin 2005;65:375-81.

205. Choi SS, Seo YJ, Shim EJ, Kwon MS, Lee JY, Ham YO, i sur. Involvement of phosphorylated Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and phosphorylated

extracellular signal-regulated protein in the mouse formalin pain model. Brain Research 2006;1108:28-38.

206. Nakayama T, Naono R, Ikeda T, Nishimori T. NMDA and AMPA receptors contribute to the maintenance of substance P-induced thermal hyperalgesia. Neurosci Res 2010;67:18-24.

207. Ashpole NM, Song W, Brustovetsky T, Engleman EA, Brustovetsky N, Cummins TR, i sur. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) inhibition induces neurotoxicity via dysregulation of glutamate/calcium signaling and hyperexcitability. J Biol Chem 2012;287:8495-506.

208. Zhu LJ, Klutho PJ, Scott JA, Xie L, Luczak ED, Dibbern ME, i sur. Oxidative activation of the Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates vascular smooth muscle migration and apoptosis. Vascul Pharmacol;60:75-83.

209. Paes-de-Carvalho R, Dias BV, Martins RA, Pereira MR, Portugal CC, Lanfredi C. Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Neurochem Int 2005;46:441-51.

210. Houston CM, Hosie AM, Smart TG. Distinct regulation of beta2 and beta3 subunit-containing cerebellar synaptic GABAA receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurosci 2008;28:7574-84.

211. Chen M, Olsen JI, Stolk JA, Schweizer MP, Sha M, Ueda I. An in vivo 19F NMR study of isoflurane elimination as a function of age in rat brain. NMR Biomed 1992;5:121-6.

212. Lindblom U, Verrillo RT. Sensory functions in chronic neuralgia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1979;42:422-35.

213. Shirahama M, Ushio S, Egashira N, Yamamoto S, Sada H, Masuguchi K, i sur. Inhibition of Ca2+/Calmodulin-dependent protein kinase II reverses oxaliplatin-induced mechanical allodynia in Rats. Mol Pain 2012;8:26.

214. Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem Biophys Res Commun 1995;212:806-12.

215. Legato MJ, Gelzer A, Goland R, Ebner SA, Rajan S, Villagra V, i sur. Gender-specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. Gender Medicine 2006;3:131-58.

216. Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. Life Sci 2004;74:2605-10.

217. Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. Pain 1993;52:259-85.

218. Biessels G, Gispen WH. The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: significance in diabetic neuropathy. Life Sci 1996;59:379-87.

219. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes 2002;51:819-24.

220. Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, Mancuso S, Joksovic PM, Rosenberg ER, i sur. Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. J Neurosci 2007;27:3305-16.

221. Hall KE, Liu J, Sima AA, Wiley JW. Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. J Neurophysiol 2001;86:760-70.

222. Coultrap SJ, Bayer KU. CaMKII regulation in information processing and storage. Trends Neurosci 2012;35:607-18.

223. Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. Brain Res Bull 2011;85:2-8.

224. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception [Review]. Nature 2001;413:203-10.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: **Antonia Jeličić Kadić, dr. med.**

Adresa: Jure Kaštelana 11, Dugi Rat, Hrvatska

Telefon: 00385-21-557-801

e-mail: antonia.jelicic@mefst.hr

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 26. svibnja, 1986., Metković

Matični broj znanstvenika: 339060

SAŽETAK

- Iskustvo u bazičnim i kliničkim medicinskim istraživanjima
- Pouzdana, marljiva i odgovorna osoba
- Profesionalni cilj: daljnja edukacija i napredovanje u struci

ŠKOLOVANJE

Datum	2012. – danas
Mjesto	Split, Šoltanska 2
Ustanova	Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet
Zvanje	Student poslijediplomskog studija TRIBE
Datum	2005. – 2011.
Mjesto	Split, Šoltanska 2
Ustanova	Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet
Zvanje	Doktor medicine
Datum	2001. – 2005.
Mjesto	Split, Vukovarska 44
Ustanova	Zdravstvena škola
Zvanje	Medicinska sestra

RADNO ISKUSTVO

Datumi	Siječanj 2013. – danas
Ustanova zaposlenja	Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet
Naziv radnog mjesta	Asistent
Funkcija	Asistent
Područje rada	Medicina

Datumi	Siječanj 2012. – siječanj 2013.
Ustanova zaposlenja	KBC Split
Naziv radnog mjesta	Pripravnik
Funkcija	Usavršavanje kliničkih medicinskih vještina
Područje rada	Medicina

STRANI JEZICI

Hrvatski (materinji jezik)
Engleski
Talijanski

VOLONTERSKO ISKUSTVO

- 2011. –

Član dobrovoljnog vatrogasnog društva“Dalmacija“, Dugi Rat (organiziranje tečaja o pružanju prve pomoći, član tima za tehničke intervencije)

- 2012.

Laboratorij za istraživanje boli, Sveučilšte u Splitu, Medicinski fakultetu

EDUKACIJA

- „Kako napisati znanstveno-stručni rad: od ideje do publikacije", 13. srpnja 2012., Split, Hrvatska
- „Vještina medicinske edukacije i znanstvenog rada“, 6. – 8. prosinca, 2012., Split, Hrvatska
- Peti hrvatski Cochrane simpozij, 20. travnja 2013., Split, Hrvatska
- Scandinavian Association for the Study of Pain 2013, Meeting, 13. – 15. lipnja, 2013., Helsinki, Finska
- Summer school of scientific communication, 14. – 18. srpnja 2013., Split, Hrvatska
- 4th RECOOP TriNet Meeting, 10. – 13. listopada 2013., Split, Hrvatska

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Testiranje ponašanja povezano s boli, imunohistokemija, indukcija dijabetesa, Western blot, samostalno perkutano intratekalno injiciranje terapije, perfuzijska fiksacija, analiziranje i obrada slika fluorescentnog mikroskopa.
Poznavanje računalnih programa Microsoft Windows, Microsoft Office, End Note, Photoshop, MetaMorph, ImageJ, GraphPad i CellA.

PUBLIKACIJE

1. **Jelicic Kadic A**, Boric M, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. The effects of intraganglionic injection of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors on pain-related behavior in diabetic neuropathy. Neuroscience. 2013;256:302-308.
2. **Jelicic Kadic A**, Boric M, Ferhatovic L, Banozic A, Sapunar D, Puljak L. Intrathecal inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in diabetic neuropathy adversely affects painrelated behavior. Neuroscience Letters. 2013;554:126-130
3. Ferhatovic L, **Jelicic Kadic A**, Boric M, Puljak L. Changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in dorsal root ganglia during maturation in long-term diabetes. Histology and Histopathology. 2014;29:649-58.
4. Boric M, Skopljanac I, Ferhatovic L, **Jelicic Kadic A**, Banozic A, Puljak L. Reduced epidermal thickness, nerve degeneration and increased pain-related behavior in rats with diabetes type 1 and 2. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2013;53:33-40.
5. Boric M, **Jelicic Kadic A**, Ferhatovic L, Sapunar D, Puljak L. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal horn neurons in long-term diabetes. NeuroReport. 2013;4;24:992-6.
6. **Jelicic Kadic A,** Boric M, Vidak M, Ferhatovic L, Puljak L. Changes in epidermal thickness and cutaneous innervation in long-term diabetes. Journal of Tissue Viability. 2014;23:7-12.
7. **Jelicic Kadic A,** Zanic M, Skaricic N, Marusic A. WHO essential medicines concept and national basic list in universal coverage health care system: Is more better for Croatia? Poslan u *European Journal of Clinical Pharmacology.*

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. **Jelicic Kadic A**, Boric M, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. The effects of intraganglionic injection of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors on pain-related behavior in diabetic neuropathy. Usmena prezentacija. 4th RECOOP TriNet Meeting. Split, Hrvatska. 10 – 13. listopada 2013.
2. **Jelicic Kadic A**, Boric M, Ferhatovic L, Banozic A, Sapunar D, Puljak L. Intrathecal inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in diabetic neuropathy adversely affects pain-related behavior. Usmena prezentacija. 4th RECOOP TriNet Meeting. Split, Hrvatska. 10 – 13. listopada 2013.
3. Ferhatovic L, **Jelicic Kadic A**, Boric M, Puljak L. Changes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in

dorsal root ganglia during maturation in long-term diabetes. Poster prezentacija. Scandinavian Association for the Study of Pain 2013, Meeting. Helsinki, Finska. 13 – 15. lipnja 2013.

4. **Jelicic Kadic A**, Boric M, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. Intrathecal and intraganglionic injection of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors as a potential treatment of neuropathic pain-related behavior. Poster prezentacija. "Application of biomaterials in vivo imaginig in stem cell research". Zagreb, Hrvatska, 27 – 29. ožujka 2014.

NAGRADE

Scandinavian Association for the Study of Pain 2013 Meeting, 13. – 15. lipnja. 2013., Helsinki, Finska – Nagrada za izvrsnu poster – prezentaciju.

OSTALE AKTIVNOSTI

Recenzent za časopise:

- Journal of Pain Research
- Patient Preference and Adherence