

Ilyas Albayrak,
Helsingin yliopisto
Lääketieteellinen tiedekunta, Fysiologian osasto

Mantelitumake neuropaattisen kivun säätelyssä

17.8.2016, Tutkielma
Tutkielman ohjaaja: Antti Pertovaara
Helsingin yliopisto, Lääketieteellinen tiedekunta
ilyas.albayrak@helsinki.fi

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Fysiologian osasto	
Tekijä – Författare – Author Ilyas Albayrak			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Mantelitimake neuropaattisen kivun säätelyssä			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year 17.8.2016	Sivumäärä - Sidoantal – N. of pages 26	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Tutkielmassa selvitettiin mantelitimakkeen osallisuutta neuropaattisen kivun säätelyssä sekä mantelitimakkeen patologisten muutosten aiheuttamaa laskevien kipua muuntelevien ratojen herkistymistä.</p> <p>Tutkielman kokeellisessa osassa selvitettiin aiheuttaako neuropaattiseen kiputilaan johtava hermovaurio mantelitimakkeessa oksidatiivista stressiä sekä TRPA1-reseptorin ilmentymistä, mikä johtaisi sentraaliseen sensitisaatioon. Neuropaattisen kivun mallina käytettiin SNI-tekniikalla (<i>spared nerve injury</i>) operoituja rottia, joiden mantelitimakkeeseen annosteltiin TRPA1-antagonistia. Lääkeaineen vaikutusta ja kipukäyttäytymisen muutosta tutkittiin ärsyttämällä koe-eläinten operoitua raajaa monofilamenteilla ja mittaamalla PWT-käyttäytymismallin (<i>paw withdrawal threshold</i>) mukaisia vasteita.</p> <p>Oikeaan mantelitimakkeeseen annosteltu TRPA1-antagonisti vähensi mekaanista hypersensitiviteettiä SNI-rotilla, mutta ei tuottanut muutosta terveillä yksilöillä. Tulos viittaa siihen että neuropaattinen kiputila aiheuttaa mantelitimakkeessa TRPA1:n ilmentymistä, mikä osallistuu mekaanisen hypersensitiviteetin muodostumiseen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Amygdala, neuralgia, TRPA1, central sensitization, descending pain control			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
2	Kirjallisuuskatsaus.....	2
2.1	Kipu ja nosiseptio	2
2.2	Neuropaattinen kipu	6
2.3	Neuropaattisen kiputilan patofysiologia.....	7
2.4	Nosiseptiivinen mantelitimake	12
3	Tutkimuksen tavoitteet.....	15
4	Aineisto ja menetelmät.....	15
4.1	Aineisto.....	16
4.2	Kokeellisen osion tutkimusmenetelmät.....	16
5	Tulokset.....	18
6	Pohdinta.....	19
	Lähdeluettelo.....	21

1 Johdanto

Neuropaattinen kipu on kiputila, joka aiheutuu somatosensoriseen järjestelmään kohdistuvasta vauriosta tai sairaudesta [2]. Anatomisesti vaurio voi affisoida perifeerisiä hermoja, selkäytimen takajuurta, takajuuren ganglioita tai keskushermostoa. Perifeerisessä hermostossa tapahtuvat vauriot aiheuttavat lisäksi muutoksia keskushermoston kivunaistintajärjestelmässä [1,4]. Neuropaattiselle kivulle on ominaista kroonistuminen ja kivun jatkuminen vaurion korjautumisen tai ärsykkeen loppumisen jälkeen [1,2,4].

Neuropaattisen kivun lääkehoito kohdistuu kivun lievittymiseen, koska lääkkeillä saavutetaan vain harvoin oireettomuus. Ongelmana on myös pitkäkestoisen kipulääkityksen tehon heikkeneminen ja haittavaikutusten lisääntyminen [2]. Neuropaattisen kivun hoidon kannalta olisi tärkeää löytää syy-seuraus-suhde kroonisen kiputilan kehittymiselle sekä löytää hoitomuoto kroonisen kiputilan ehkäisemiseksi.

Kipuaistimus eli nosiseptio koostuu haitallisen ärsykkeen aiheuttamasta sensoris-diskriminatiivisesta komponentista (sijainti, voimakkuus, kesto ja laatu) ja epämiellyttäväksi koetusta affektiivis-motivatiivisesta komponentista, mitkä integroituvat keskushermoston eri rakenteissa tietoisiksi kipukokemukseksi [1,4]. Limbiseen järjestelmään kuuluva manteliumake yhdistää sensorisiin ärsykkeisiin affektiivisen tunnekokemuksen, mikä kipuaistimuksen yhteydessä ohjaa kipua välttelevää käyttäytymistä ja pelkoa, jotka saavat yksilön karttamaan haitallista ärsykettä [27,28,29]. Manteliumake vaikuttaa myös tunneperäiseen oppimiseen, muistiin ja ehdollistumiseen sekä on tärkeässä osassa tunnehäiriöissä kuten ahdistuneisuudessa ja masennuksessa [27,28,29].

Manteliumakkeen sentraalinen tumake (CeA, nosiseptiivinen manteliumake) on tärkeässä osassa kivun prosessoinnissa sillä se vastaanottaa nosiseptiivisiä ja sensorisia signaaleja periferiasta, minkä takia sen uskotaan vaikuttavan kivun emotionaalisen osan kokemiseen ja integrointiin limbisessä järjestelmässä [27,28,29]. Manteliumakkeen CeA osallistuu lisäksi kivun säätelyyn ja kroonisen kivun muodostumiseen vaikuttamalla laskeviin kipua muunteleviin ratoihin antinosiseptiivisesti tai

pronosiseptiivisesti [27,28,29]. Kipututkimuksen ja uusien lääkehoitojen kannalta onkin ollut tärkeätä selvittää mitä mantelitimakkeessa tapahtuu neuropaattisissa kiputiloissa ja kuinka mantelitimakkeeseen vaikuttamalla voidaan lievittää erittäin hankalaksi koettua neuropaattista kipua.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kipu ja nosiseptio

Kipu on epämiellyttävä kokemus, joka liittyy kudonsvaurioon tai sen uhkaan tai jota kuvataan kudonsvaurion käsittein. Kipuaistimuksen tehtävä on varoittaa ja suojata elimistöä haitalliseksi koetuilta asioilta, niin että kivun voimakkuus on verrattavissa kudonsvaurion laajuuteen [1,2,4]. Kroonisella eli pitkäkestoisella kivulla tarkoitetaan yli 3 kuukautta kestänyttä kipua, joka kestollaan ylittää kudonsvaurion normaaliin paranemiseen tarvittavan ajan. Krooninen kipu voi siis olla todettavissa ilman meneillä olevaa kudonsvauriota, jolloin koettu epätarkoituksenmukainen kipu kadottaa suojelevan merkityksensä ja muodostaakin pääasiallisen taudinkuvan [1,2,4].

Kivun paradigman kannalta on tärkeä erottaa toisistaan aivokuorialueilla muodostuva tietoinen kipukokemus ja somatosensoriseen järjestelmään integroitunut tiedostamaton kipuaistimus eli nosiseptio. Nosiseptorit ovat perifeerisiä afferentteja hermoja, jotka tunnistavat kudostuhoa aiheuttavia mekaanisia, kemiallisia ja termaalisia ärsykeitä. Nosiseptorit kehittyvät hermostopienan kantasoluista ja erilaistuvat sensorisen neurogeneesin aikana glutamatergisiin tai peptidergisiin nosiseptoreihin. Nosiseptorit ovat pseudounipolaarisia ja niiden soomat sijaitsevat selkäydinhermon takajuuren hermosolmussa (*dorsal root ganglion*) tai kasvoilla trigeminaaligangliossa [3,4]. Nosiseptoreiden myeliinitupelliset A δ -afferentit välittävät nopean ja paikallistettavan kivun, kun taas ohuimmat myeliinitupettomat C-afferentit välittävät vaikeasti paikannettavaa hidasta kipua. Molemmat nosiseptorityypit sisältävät alapopulaatioita, joilla on erilaiset kynnyksarvot kivun eri ärsykeille. Suurin osa C-afferenteista on todettu olevan polymodaalisia eli reagoivan useille eri ärsyketyypeille. Näiden kahden nosiseptorilajien lisäksi on olemassa ”silentt”-nosiseptoreita, jotka muuttuvat kudonsvaurion ja tulehduksen yhteydessä herkiksi mekaaniselle ärsytykselle [3, 4].

Kipuaisti koostuu neljästä fysiologisesta tapahtumasta: transduktiosta, transmissiosta ja modulaatiosta sekä näiden tapahtumien integraatiosta tietoisuuteen.

Transduktiossa nosiseptoreiden solukalvoreseptoreihin vaikuttava haitallinen ärsyke muuttuu nosiseptorin kalvojäännitemuutosten kautta aktiopotentiaaleiksi. Peptidergisten nosiseptoreiden kipuaistimusta tunnistamassa oleviin solukalvoreseptoreihin lukeutuu TRP-perheen (*transient receptor potential*) ionikanavareseptoreita, jotka stimuloituvat kynnsarvon ylittävästä haitalliseksi koetusta mekaanisesta, kemiallisesta tai termalisestä ärsykkeestä [4]. TRP-perheeseen kuuluva TRPA1-ionikanavareseptori (*transient receptor potential ankyrin 1*) on Ca^{2+} :ia, Na^+ :ia ja K^+ :ia läpäisevä epäselektiivinen kationikanava, joka tunnistaa haitalliseksi koettuja kemiallisia ärsykeitä, joita ovat esim. sinappiöljy, kanelialdehydi, formaliini ja reaktiiviset happiradikaalit (ROS, *reactive oxygen species*) [34]. TRPA1 osallistuu myös mekaanisen kivuliaan ärsykeen tunnistamiseen; TRPA1-reseptorin salpaus vähentää haitallisen mekaanisen stimulaation aiheuttamaa vastetta nosiseptoreissa [34].

Transmissiossa nosiseptoreista lähtöisin oleva perifeerinen signaali kulkee selkäytimen takasarven toiseen asteen neuroneille glutamatergisten ja peptinergisten (substanssi P, CGRP) synapsien avulla. Lisäksi selkäytimen takasarven eksitatoriset ja inhibitoriset interneuronit moduloivat nosiseptiivisen viestin kulkeutumista toisen asteen neuroneihin [3,4]. Selkäytimen takasarven projisoituvien nosiseptoreiden proksimaalisissa hermopäätteissä on lisäksi TRPA1-reseptoreita, joiden aktivaatio (esim. reaktiivisten happiradikaalien kautta) tehostaa selkäytimen interneuronien glutamatergista signaalinvälitystä [34, 35].

Selkäytimen takasarven toisen asteen neuronit risteävät selkäytimen kontralateraalille puolelle ja nousevat selkäytimen anterolateraalista järjestelmää (spinotalaminen ja spinoretikulaarinen rata) pitkin talamuksen tumakkeisiin ja ydinjatkeeseen [3,4]. Talamuksessa kolmannen asteen neuronit kuljettavat nosiseptiivisen signaalin etuaivokuorelle ja somatosensoriselle aivokuorelle (S1- ja S2-isoaivokuorialue), jotka käsittelevät kipuaistimuksen sensoris-diskriminatiivisen komponentin [3,4]. Osa toisen asteen neuroneista vie nosiseptiivisen signaalin ydinjatkeen *nucleus parabrachialis*, josta nosiseptiivinen signaali viedään kolmannen asteen neuronien välityksellä manteliumakkeen sentraaliseen tumakkeeseen (CeA). Manteliumake saa

nosiseptiivistä tietoa myös aivokuoren kautta kiertäviltä reiteiltä mm. isoavokuoren aivosaaarekkeesta (*insula*) ja pihtipoimun etuosasta (*anterior cingulate cortex*), jotka osallistuvat kipuaistimuksen affektiivis-motivionaalisen komponentin käsittelyyn. Manteliumakkeen ja isoavojen vuorovaikutus on kaksisuuntainen, joten manteliumake puolestaan muokkaa isoavojen kipuaistimukseen liittyvien alueiden vasteita. Nosiseptiivinen signaali kulkee myös muihin limbisen järjestelmän osiin, missä signaali integroidaan muistiin, emootioihin ja oppimiseen. Lopullinen kipukokemus muodostuu aivokuorialueilla, jotka muodostavat reaktion ja käyttäytymismallin haitalliselle ärsykkeelle [3,4,27].

2.11 Laskevat kipua muuntelevat radat

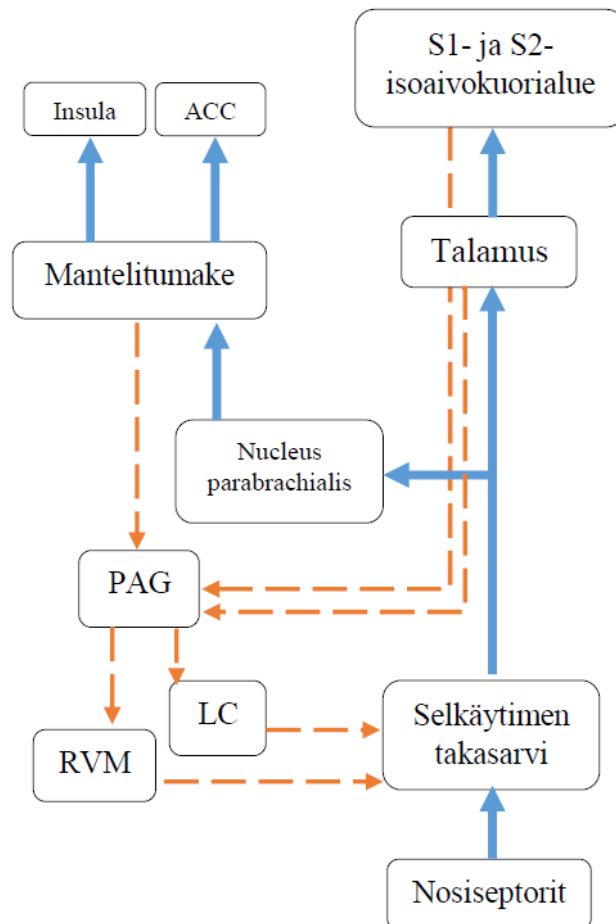
Nosiseptiivisen signaalin transmissioon ja modulaatioon vaikuttavat spesifiset aivorungon rakenteet, jotka voivat laskevien kipua muuntelevien ratojen vaikutuksesta tehostaa tai vaimentaa selkäytimen takasarven afferentteja hermoja ja interneuroneita. Laskevat kipua muuntelevat radat ovat lähtöisin pääosin keskiaivoharmaasta (PAG, *periaqueductal grey*), rostroventromediaalisesta ydinjatkoksesta (RVM, *rostral ventromedial medulla*) ja sinitumakkeesta (LC, *locus coeruleus*) [3,4,5,21,24], mutta näiden ohella on useita muitakin kivun laskevaan säätelyyn osallistuvia aivorakenteita kuten manteliumake ja hypotalamus.

PAG ja RVM saavat nosiseptiivisiä signaaleja selkäytimen toisen asteen neuroneilta sekä integroituneita signaaleja isoavokuorelta, talamuksesta, hypotalamuksesta ja manteliumakkeelta [3,4,5,6,21,24]. PAG:n neuronit kulkevat RVM:n tumakkeisiin (*nucleus raphe magnus* ja *nucleus reticularis paragigantocellularis*), jossa ne aktivoivat tai inhiboivat kyseisten tumakkeiden kipua muuntelevien solujen toimintaa. RVM:n kipua muunteleviin soluihin kuuluu serotonergisia ja ei-serotonergisia soluja, joista viimeksi mainitut jaotellaan ON- ja OFF-soluihin. ON-solut tehostavat ja OFF-solut vaimentavat nosiseptiivistä transmissiota selkäytimen takasarvessa. RVM:n vaikutus voi olla kipua lievittävä eli analgeettinen tai kipuaistimusta tehostava eli pronosiseptiivinen riippuen mm. selkäytimen takasarvessa aktivoitavasta 5-HT-reseptorista [3,4,5,6,21,24].

Aivosillan sinitumake sekä sen lähetyvillä olevat noradrenergiset A5- ja A7-tumakkeet ovat yhteydessä PAG-RVM-akseliin sekä hypotalamukseen ja manteliumakkeeseen.

Sinitumakkeen noradrenergiset radat kulkevat selkäytimen takasarveen, jossa ne inhiboivat nosiseptiivistä signalointia vaikuttamalla nosiseptoreiden sentraalisen terminaalin α_2 -adrenoseptoreihin [3,4,5,21,24].

Eläinmalleissa on osoitettu että jatkuva ja pitkäkestoinen nosiseptio muovaa laskevien kipua muuntelevien ratojen toimintaa, mikä voi aiheuttaa hyperalgesiaa (lisääntynyt herkkyys kivulle tai kivun tehostuminen) ja allodyniaa (normaalisti kivuttoman ärsykkeen tuottama kipu) [3,4,5,6]. Hyperalgesiaa pystytään vähentämään neuropaattisen kivun eläinmalleissa stimuloimalla ventraalista PAG:ia tai S1- aivokuorialuetta, mikä osittain perustuu RVM:n 5-HT_{1A}-autoreseptoreita ilmentävien serotonergisten solujen ja niistä laskevien serotonergisten ratojen toimintaan [3,4,5,6,21,24].



Kuva 1: Nousevia ja laskevia kipuaistimukseen osallistuvia yhteyksiä.
 ACC=anterior cingulate cortex, LC=locus coeruleus,
 PAG=periaqueductal grey, RVM=rostral ventrolateral medulla

2.2 Neuropaattinen kipu

Neuropaattinen kipu eli hermovauriokipu on kiputila, joka aiheutuu somatosensorisen järjestelmän hermoratoihin kohdistuvasta vauriosta tai sairaudesta [2]. Neuropaattinen kipu voi olla perifeeristä (esim. diabeettinen neuropatia) tai sentraalista, jolloin vaurio tai sairaus kohdistuu selkäytimen takajuureen, takajuuren ganglioihin tai keskushermostoon (esim. aivoverenkiertohäiriöiden jälkeiset kiputilat). Neuropatian anatominen jako on kuitenkin epätarkka sillä perifeerinen neuropatia tuottaa myös muutoksia keskushermoston kipua aistivissa järjestelmissä, kuten esimerkiksi postherpeettisessä neuralgiassa ja amputaation jälkeisessä aavesäryssä. Tavallisia neuropaattisia kiputiloja ovat selkärankasairauksien aiheuttamat kivuliaat hermojuurikivut, hermovammojen jälkitilat, kivuliaat polyneuropatiat, vyöruusun jälkisärky ja aivoverenkiertohäiriöiden jälkeiset kiputilat [1,2,4,7].

Neuropaattisissa kiputiloissa kliininen oirekuva voi koostua eri komponenteista, jotka vaihtelevat potilaan ja kiputilan mukaan. Yleisiä kipukomponentteja ovat jatkuva spontaanisti ilmenevä kipu, poltemainen kipu ja sähköiskumaiset kiputuikkaukset. Tuntoratojen vaurioituminen ja vaurion aiheuttamat plastiset hermostomuutokset saavat aikaan lisäksi tuntoaistijärjestelmän toiminnan poikkeavuuksia, kuten kipuherkkyuden lisääntymistä eli hyperalgesiaa ja allodyniaa, jossa kivuton ärsyke esim. kevyt kosketus aiheuttaa kiputunteuksen. Lisäksi potilaalla voi esiintyä parestesioita ja dysestesioita sekä poikkeavaa kutinaa. Hermokudosvaurion sijainnista ja laajuudesta riippuen voi ilmetä myös lihasheikkoutta, kömpelyyttä, vapinaa, lihaskrampeja ja autonomisen hermoston oireita (verenkierron, lämpötilan ja hikoilun muutokset). Kuten muissakin kroonisissa kiputiloissa, myös vaikeassa neuropaattisessa kivussa esiintyy elämänlaatua heikentäviä psyykkisiä ja kognitiivisia oireita, kuten masennusta, ahdistuneisuutta, unettomuutta, ärtyneisyyttä ja keskittymisvaikeutta, jotka voivat johtaa sosiaaliseen eristäytymiseen ja työkyvyn menetykseen [1,2,4].

Keskeisten oireiden perusteella, neuropaattisen kivun esiintyvyydeksi on arvioitu 6–8 % [1,2]. Neuropaattisen kivun kriteereinä ovat kivun looginen neuroanatominen sijainti ja kliinisessä tutkimuksessa todettu tuntoaistin poikkeavuus. Neuropaattinen kiputila voi ilmoittaa meneillään olevasta, osittain syynmukaisella hoidolla korjattavissa olevasta, hermokudosvauriosta (esim. välilevytyrän aikana), jolloin hermotuppea hermottavat hermosäikeet (*nervi nervorum*) aktivoituvat. Jos syynmukainen hoito ei toteudu, voi

vaurio edetä ja johtaa pysyviin muutoksiin hermostossa, mitkä mahdollistavat kivun kroonistumisen ja kivun jatkumisen vaurion korjautumisen tai ärsykkeen loppumisen jälkeen. Tämän seurauksena neuropaattisen kivun suojaava tai varoittava funktio katoaa. [1,2,4,7].

Neuropaattisen kivun lääkehoito koostuu ensisijaisesti gabapentinoideista (gabapentiini, pregabaliini), trisyklisistä masennuslääkkeistä (amitriptyliini, nortriptyliini) ja SNRI-lääkkeistä (duloksetiini, venlafaksiini). Muita lääkevaihtoehtoja ovat tramadoli sekä perifeeriseen neuropaattiseen kipuun käytetyt kapsaisiini-laastarit ja lidokaiinivoiteet. Trigeminusneuralgian ensisijaisia lääkkeitä ovat puolestaan epilepsialääkkeinä käytetyt karbamatsepiini ja okskarbatsepiini. Trisyklisten masennuslääkkeiden, SNRI-lääkkeiden ja tramadolin vaikutus perustuu aivorungon laskevien inhibitoristen ratojen tehostamiseen. Gabapentinoidit ja muut epilepsialääkkeet puolestaan salpaavat hermosolukalvojen natrium- tai kalsiumkanavia ja estävät aktiopotentiaalin syntymistä. Lääkehoitoa vaikeuttavat runsaat haittavaikutukset sekä lääkkeiden heikko teho; useimmiten oireita saadaan lievitettyä vain osittain [1,2,4,7].

2.3 Neuropaattisen kiputilan patofysiologia

Neuropaattisen patofysiologian ymmärrys perustuu lähes yksinomaan koe-eläimillä (tyypillisesti rotilla ja hiirillä) tuotettuihin neuropaattisen kivun malleihin. Neuropaattisen kiputilan muodostumisen tärkeinä mekanismeina ovat afferenttien nosiseptorien herkistyminen (perifeerinen sensitisaatio) ja selkäytimen takasarven hermosolujen hypereksitaatio (sentraalinen sensitisaatio). Neuropaattisen kivun kroonistuminen ja pysyvän kiputilan muodostuminen perustuu pääasiassa patologisella tavalla kehittyvään hermoston plastisuuteen, jossa hermosoluissa tapahtuu rakenteellisia ja funktionaalisia muutoksia, mitkä uudelleenjärjestävät hermoverkostoja ja lisäävät nosiseptiiviseksi koetun impulssin muodostusta sekä vaimentavat inhibitorisia mekanismeja [1,3,4,5,9].

Hermoston plastisuus sisältää useita mekanismeja, jolla hermosolujen välistä glutamatergistä signalointia muutetaan esim. lisäämällä/vähentämällä välittäjäaineiden presynaptista erittymistä tai lisäämällä/vähentämällä postsynaptisten AMPA-reseptorien

määrää. Tunnetuin näistä mekanismeista on pitkäaikainen potentiaatio (LTP, *long-term potentiation*) sekä pitkäaikainen vaimentuminen (LTD, *long-term depression*).

LTP:ssä voimakas tai pitkäkestoinen postsynaptinen AMPA-reseptorien aktivaatio johtaa postsynaptisten NMDA-reseptorien aktivaatioon ja solunsisäisen kalsiumin kasvuun, mitkä aktivoivat Ca^{2+} -välitteisiä proteiinikinaaseja (CaMKII, PKC), jotka lisäävät AMPA-reseptorien määrää ja niiden herkkyyttä. Lisäksi postsynaptinen hermosolu erittää NO:ia, joka retrogradisen signaloinnin avulla tehostaa presynaptisen solun glutamaattieritystä. LTP:n myöhemmässä vaiheessa samat proteiinikinaasin aktivoivat myös geenien säätelytekijöitä, jotka saavat aikaan hermosolun morfologisia muutoksia. LTP:n vastakohtana on synapsin tehokkuutta vähentävä LTD, joka on mekanismiltaan päinvastainen LTP:hen [3,8,9,20].

Funktionaalisten muutosten lisäksi hermoston plastisuus ilmentyy myös rakenteellisina muutoksina kuten synaptisten yhteyksien tiheyksien muutoksena, aksonien degeneraationa tai regeneraationa, neuroomien muodostumisena, hermosolujen degeneraationa ja gliasolujen lisääntymisenä [20].

2.31 Perifeerinen sensitisaatio

Perifeerisessä sensitisaatiossa jatkuva kivulias ärsyke, hermovaurio tai hermosolua affisioiva sairaus johtaa nosiseptoreiden, tulehdussolujen ja muiden non-neuronaalisten solujen aktivaatioon, mitkä erittävät lukuisia proinflammatorisia ja proalgeettisia välittäjäaineita (serotoniini, histamiini, glutamaatti, ATP, adensiini, substanssi P, CGRP, bradykiniini, eikosanoidit, prostaglandiinit, tromboksaanit, leukotrieenit, endokannabinoidit, NGF, TNF- α , IL-1 β , proteaasit ja protonit). Nämä välittäjäaineet saavat aikaan nosiseptoreissa solunsisäisiä muutoksia, mitkä aktivoivat ”*silent*”-nosiseptoreita ja herkistävät muita nosiseptoreita siten, että niiden aktivaatioon tarvittava kynnysarvo laskee, ärsykkeen tuottama vaste tehostuu, laukaisutaajuus kasvaa ja reseptiivinen kenttä laajenee [3,8,9]. Nosiseptorien herkistymisessä havaitaan etenkin natrium- ja kalsiumkanavien yli-ilmenemistä ja ionivirtojen lisääntymistä, mikä suosii liiallista ja ektooppista signaalin transduktiota [3,8,9].

Inflammatorinen tila johtaa lisäksi ROS:ien muodostumiseen ja TRPA1:n aktivoitumiseen, mikä puolestaan johtaa substanssi P:n ja CGRP:n erityksen kautta neurogeeniseen inflammaatioon, jossa havaitaan verisuonten dilataatiota ja kudosturvotusta. Lisäksi tulehdussolujen erittämä TNF α lisää eksitatoristen TRPA1-reseptorien ilmentymistä nosiseptoreissa ja TRPA1-salpauksen on osoitettu vähentävän hyperalgesiaa perifeerisessä neuropatiassa [34,36]. Sensitisaation patologiset muutokset heijastuvat myös non-nosiseptiivisiin A β -hermosyihin, joiden herkistymisen uskotaan vaikuttavat allodynian muodostumiseen [3,8,9]. Vaurioituneiden hermojen lähetyvillä olevissa terveissä hermosoluissa on havaittu TRPA1-mRNA:n lisääntymistä [34], mikä voi olla yksi allodyniaan johtavista tapahtumista.

Hermovaurio tai hermosairaus voi johtaa myös hermosolujen atrofisiin muutoksiin, mikä voi vaurion tyypistä riippuen aiheuttaa tuntuuutoksia tai paradoksaalista hyperalgesiaa. Perifeerinen sensitisaatio voi päättyä, jos inflammaatio ja korjausprosessit loppuvat. Puutteellinen korjautuminen, käynnissä oleva sairaus tai jatkuva stimulaatio johtavat pysyvän sensitisaation muodostumiseen. [3,8,9].

2.32 Sentraalinen sensitisaatio

Sentraalisessa sensitisaatiossa keskushermoston kipuaistimusta välittävät radat herkistyvät periferiasta saapuville nosiseptiivisille signaaleille, mikä voidaan parhaiten huomata selkäytimen takasarvessa. Sentraalisen sensitisaation yhtenä päällimmäisenä patofysiologisenä mekanismina on pre- ja postsynaptinen fasilitaatio, jossa voimakas tai jatkuva perifeeristen nosiseptorien aktivoituminen ja välittäjäaineiden vapautuminen (glutamaatti, substanssi P, CGRP, ATP) johtaa selkäytimen takasarven toiseen asteen hermosolujen NMDA-reseptorien aktivoitumiseen ja LTP:n muodostumiseen. Tämä puolestaan johtaa toiseen asteen neuronien kynnysarvon madaltumiseen, vasteen tehostumiseen ja reseptiivisen kentän laajentumiseen [3,8,9,11]. Perifeerisen hermovaurion aiheuttamaa sentraalista sensitisaatiota ilmenee selkäytimen lisäksi manteliumakkeessa, pihtipoimun etuosassa, aivosarekkeessa, aivojuoviossa (*striatum*), talamuksessa, hypotalamuksessa, keskiaivoharmaassa, sinitumakkeessa sekä rostroventromediaalisessa ydinjatkoksesta [3,8,9,24]

Sentraaliseen sensitisaatioon myötävaikuttaa myös laskevien ratojen noradrenergisen inhibition vähentyminen, laskevan serotonergisen järjestelmän muuttuminen kipua tehostavaksi, pronosiseptisten ON-solujen toiminnan lisääntyminen sekä selkäytimen takasarven inhibitoristen GABA- ja glysiini-välitteisten interneuronien inhibitio (disinhibitio) [3,8,9]. Selkäytimen takasarven toiseen asteen neuroneihin projisoituvien nosiseptoreiden TRPA1-reseptoreiden yliekspression tiedetään osallistuvan kipuaistimuksen sentraaliseen herkistymiseen useissa patologisen kivun eläinmalleissa, kuten neuropaattisessa kivussa [37]. TRPA1-antagonistin intratekaalinen annostelu vähentää neuropaattisen kivun eläinmalleissa mekaanista hyperalgesiaa, mutta se ei kuitenkaan aiheuta kipuaistimuksen muutosta terveillä koe-eläimillä [35]. TRPA1-geenin *gain-of-function*-mutaation on todettu myös aiheuttavan harvinaista periytyvää FEPS-kipuoireyhtymää [37]. Lisäksi selkäyttimeen annosteltu TRPA1-antagonisti vähensi RVM:n hypereksitaation tuottamaa ja laskevien kipua muuntelevien ratojen välittämää hypersensitiviteettiä, mikä osoittaa, että laskevien kipua muuntelevien ratojen kipua tehostavat muutokset aiheutuvat osaksi selkäytimen TRPA1-reseptoreiden vaikutuksesta [35]. Hypoteettisena selitysmallina tälle löydökselle on, että patologisissa kipumalleissa selkäyttimeen kehittyy oksidatiivisen stressin tila, joka ylläpitää TRPA1-reseptorien välityksellä sentraalista herkistymistä.

Sentraalista sensitisatiota ovat aiheuttamassa myös keskushermoston gliasolujen ja hermosolujen väliset vuorovaikutukset, mitkä muovaavat synapsien toimintaa sekä vaikuttavat patologisen kiputilan muodostukseen ja ylläpitoon. Gliasolujen, kuten mikroglia-solujen ja astrosyyttien, erittämät sytokiinit ja kemokiinit voivat saattaa hermoston pro-inflammatoriseen tilaan, joka aiheuttaa hermosolujen hypereksitabiliteettia [3,8,9].

Mikroglia-solut ovat luuytimen hematopoiettisista kantasoluista peräisin olevia makrofagien kaltaisia hermotukisoluja, jotka osallistuvat selkäytimen harmaassa aineessa solujätteiden fagosytoosiin sekä tarvittaessa useiden eri välittäjäaineiden eritykseen. Mikroglia-solut osallistuvat kroonisten kiputilojen kehittymiseen ja ylläpitoon; perifeerisessä hermovauriossa mikroglialit kerääntyvät vaurioituneen hermon sentraalisen hermopäätteen ympärille selkäytimen takasarveen ja erittävät proinflammatorisia sytokiineja (IL-1 β , IL-6, TNF- α) ja BDNF:iä, jotka herkistävät

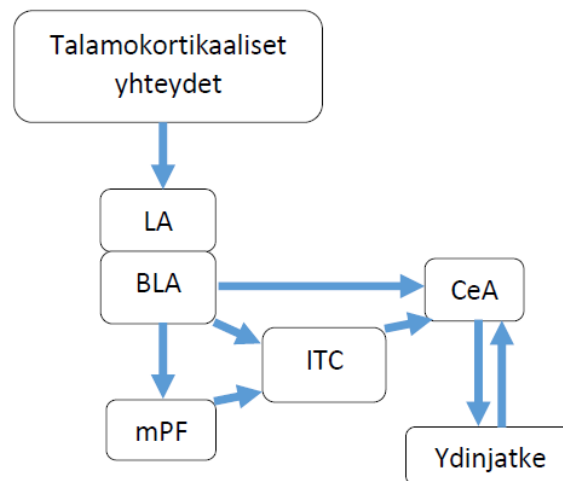
selkäytimen takasarven toiseen asteen hermosoluja nosiseptoreista ja tuntoaistimusta välittävistä hermosyistä tuleville viesteille sekä heikentävät selkäytimen interneuronien inhibitorista vaikutusta [3,8,10,12,13,19]. On myös mahdollista että mikroglia-solujen tuottamat ROS:it osallistuvat TRPA1-välitteiseen herkistymiseen.

Selkäytimen aktivoituneiden mikroglia-solujen määrä laskee noin viikon kuluttua hermovauriosta, mikä antaa aiheen olettaa, että mikroglia-solut toimivat sentraalisen sensitisaation aloitusvaiheessa. Mikroglia-soluja inhihoivan minosykliinin onkin osoitettu ehkäisevän patologisen kiputilan käynnistymistä, mutta ei vaikuttavan olemassa olevan allodynian tai hyperalgesian vaimentamiseen [3,8,10,12,13,19]. Pitkäkestoinen opioidien käyttö aktivoi myös TLR4-reseptorivälitteisesti mikroglia-solujen NLRP3-inflammasomeja, joiden tuottama IL-1 β paradoksaalisesti tehostaa neuropaattista kipua eläinmalleissa [18]

Gliasoluihin kuuluvat astrocyytit ovat puolestaan tiiviissä kontaktissa hermosolujen kanssa ja muovaavat synaptista transmissiota astrocyytti-hermosolu-interaktioiden avulla. Astrocyytit muodostavat keskenään aukkoliitosten avulla monimutkikkaita verkostoja, jotka välittävät Ca²⁺-aaltoja ja metaboliitteja sekä osallistuvat solunulkoisen K-ionitasapainon muodostamiseen. Astrocyyttien muita hermostoa tukevia tehtäviä ovat solunulkoisen ionitasapainon säätely, glutamaatin ja GABA:n takaisinotto, veri-aivoesteen muodostaminen, vapaiden radikaalien neutralointi ja glia-arven muodostaminen vaurioissa [14, 22,23]. Astrocyytit aktivoituvat hermovaurion jälkeen selkäytimen takasarveen vapautuneista välittäjäaineista ja erittävät glutamaattia, ATP:tä ja proinflammatorisia välittäjäaineita (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1), mitkä lisäävät nosiseptoreiden glutamaattieritystä, tehostavat postsynaptisia AMPA- ja NMDA-reseptoreita, vähentävät inhibitoristen interneuronien vaikutusta, heikentävät astrocyyteissä glutamaatin takaisinottoa ja tehostavat astrocyyttien aukkoliitosten välillä tapahtuvaa kalsium-välitteistä aktivaatiota, mitkä kaikki yhdessä johtavat kiputilan tehostumiseen [3,14,15,16,22,23]. Astrocyyttien TRPA1-reseptorien on osoitettu osallistuvan NDMA-välitteisen LTP:n kehittymiseen, mikä voisi selittää TRPA1:n tärkeyttä sentraalisen herkistymisen muodostumisessa [34]. Astrocyytit aktivoituvat hermovauriossa mikroglia-soluja hitaammin, mutta aktivoitunut tila voi kestää jopa kuukausia, jonka takia voi olla mahdollista että astrocyytit osallistuvat enemmänkin sentraalisen sensitisaation ylläpitoon [14,15,16,22,23].

2.4 Nosiseptiivinen mantelitumake

Limbiseen järjestelmään kuuluva mantelitumake sijaitsee syvällä molemmissa inferomediaalisissa ohimolohkoissa ja koostuu yli kymmenestä morfologisesti ja toiminnallisesti erilaisesta tumakkeesta. Mantelitumake osallistuu negatiivisten tunteiden prosessointiin ja niiden aiheuttamien käyttäytymisvasteiden kuten pelon, masennuksen ja ahdistuksen, säätelyyn [27,28,29]. Mantelitumake vastaanottaa selkäytimestä ja aivorungosta saapuvia nosiseptiivisiä signaaleja sekä talamuksen ja aivokuoren kautta saapuvia polymodaalisia signaaleja, joiden takia mantelitumakkeen uskotaan vaikuttavan kivun ja negatiivisten tunteiden integrointiin limbisessä järjestelmässä [27,28,29].



Kuva 2: Mantelitumakkeen yhteydet. LA=lateraalinen tumake, BLA=basolateraalinen tumake, CeA=sentraalinen tumake, ITC=intercalated cell mass, mPFC=medial prefrontal cortex

Mantelitumakkeen lateraalinen (LA) ja basolateraalinen tumake (BLA) vastaanottavat polymodaalisia sensorisia ja nosiseptiivisiä signaaleja talamuksesta ja aivokuorialueilta (*insula, anterior cingulate cortex, medial prefrontal cortex*). LA-BLA-järjestelmän uskotaan integroivan sensoriseen kipuaistimukseen positiivisen tai negatiivisen emotionaalisen komponentin, mikä johtaisi käyttäytymisen ja tunnemuistin muutoksiin. LA-BLA-järjestelmä välittää talamokortikaalisista yhteyksistä saapuneen informaation mantelitumakkeen sentraaliseen tumakkeeseen (CeA) joko eksitatoristen yhteyksien kautta tai inhiboimalla tumakkeiden välissä olevia inhibitorisia GABAnergisiä interneuroneita (ITC, *intercalated cell mass*).

CeA:n laterokapsulaarinen osa (CeLC) vastaanottaa myös suoraan nosiseptiivisiä signaaleja selkäytimen takasarven hermosoluilta nucleus parabrachialiksen kautta. BLA:lla on lisäksi yhteyksiä mediaalisen prefrontaalikorteksin (mPFC) *principal*-neuroneihin, jotka voivat säädellä ITC:n interneuroneita. [26,27]. Manteliumakkeen CeA osallistuu kivun säätelyyn inhiboimalla ja eksitoimalla ydinjatkeen laskevia kipua sääteleviä ratoja, johtuen joko antinosiseptioon tai pronosiseptioon [27,28,29]. CeA osallistuu lisäksi autonomisten vasteiden ja käyttäytymisvasteiden välittämiseen ydinjatkeeseen [27].

2.41 Manteliumake ja krooninen kipu

Kroonisten kiputilojen on todettu aiheuttavan manteliumakkeessa neuroplastisia muutoksia kuten tausta-aktiivisuuden ja ärsykeriippuvaisten vasteiden tehostumista; neuropaattinen kipu herkistää pääasiassa CeA-neuroneita ja niveltulehdukseen liittyvä kipu BLA- ja CeLC-neuroneita [27]. Neuropaattiseen kipuun liittyvät pitkäkestoiset neuroplastiset muutokset havaittiin kuitenkin vain oikeanpuoleisessa manteliumakkeessa (kipuun liittyvä lateralisaatio). Oikeanpuoleisen manteliumakkeen onkin osoitettu liittyvän pitkään jatkuviin kiputiloihin ja sensitisaatioon [27,28,29].

Neuropaattisen kivun aiheuttama manteliumakkeen eksitatoristen ja inhibitoristen hermosoluverkostojen epätasapaino havaitaan *parabrachial nucleuksen* ja manteliumakkeen CeLC-neuronien signaalinvälityksen tehostumisena sekä manteliumakkeen LA-BLA- ja BLA-CeLC-synapsien aktiivisuuden lisääntymisenä [27]. Hyperaktiivisuuden voi aiheuttaa inhibitoristen järjestelmien häiriö; neuropaattisen kivun on osoitettu johtavan ITC:n interneuronien häiriön kautta CeA:n ja CeLC:n hyperaktiivisuuteen sekä mPFC:n vaimentamiseen [27]. mPFC:n vaimentuminen puolestaan johtaa kognitiivisiin puutoksiin ja ylläpitää manteliumakkeen hyperaktiivista tilaa [27]. Pitkäkestoinen neuropaattinen kiputila aiheuttaa masennuksen kaltaista käyttäytymistä eläinmalleissa, mikä on ollut yhteydessä manteliumakkeen BLA:n ja CeA:n hermosolujen proliferaatioon sekä kyseisten tumakkeiden tilavuuksien kasvuun [33].

Useissa kroonisissa kiputiloissa esiintyvän kipuun liittyvän käyttäytymisen on osoitettu lievittyvän eläinmalleissa kun manteliumakkeesta lähteviä laskevia signaaleja on

vaimennettu vähentämällä manteliumakkeen aktiviteettia, joko kirurgisesti tai farmakologisesti [27]. Esimerkiksi manteliumakkeen CeA:n vaimentaminen GABA_A-agonistilla (muskimoli) vähensi hyperalgesiaa ja kipukäyttäytymistä kroonisen kivun eläinmalleissa. Vastaavasti CeA:n GABAergisen inhibition vaimentaminen (disinhibitio) johti neuropaattisen kivun kaltaiseen ahdistuneisuuteen eläinmalleissa [27, 38]. Glutamaatin NMDA- ja metabotrooppisen tyyppi 1-reseptorien antagonistit puolestaan ovat vähentäneet aversiokäyttäytymistä ja hypersensitiviteettiä neuropaattisen kivun eläinmalleissa [27,28,29]. Vastaavasti manteliumakkeen aktiivisuutta lisäämällä saadaan voimistettua kipuun liittyvää käyttäytymistä eläinmalleissa [27].

Manteliumakkeen BLA:n kemiallinen tuhoaminen ennen neuropaattisen kivun muodostumista (SNI-neuropatiamallissa) esti koe-eläimillä mekaanisen allodynian kehittymistä ja vähensi hyperalgesiaa, kun taas CeA:n tuhoaminen ennen neuropaattisen kivun muodostumista ei vaikuttanut kroonisen kivun kehittymiseen [39]. BLA:n kemiallinen tuhoaminen neuropaattisen kivun muodostumisen jälkeen ei kuitenkaan vähentänyt kipukäyttäytymistä, jonka takia BLA näyttää olevan tärkeässä osassa kroonisen kivun muodostumisen alkuvaiheessa.

Manteliumakkeen glutamaatti-pitoisuuksien tiedetään säätelevän neuropaattista hypersensitiviteettiä vaikuttamalla laskevien kipua muuntelevien ratojen serotonergisiin ratoihin [32]. Matala annos manteliumakkeen CeA:han annosteltua glutamaattia lisää neuropaattista hypersensitiviteettiä, joka pystytään kumoamaan selkäytimen 5-HT₃-reseptorien inhibiittorilla. Vastaavasti suuri annos glutamaattia vähentää neuropaattista hypersensitiviteettiä, joka pystytään kumoamaan selkäytimen 5-HT_{1A}-reseptoreita inhiboimalla [32]. Glutamaatin molemmat vaikutukset pystyttiin lisäksi inhiboimaan ydinjatkoksen serotonergiseen raphe-tumakkeeseen annostellulla 5-HT_{1A}-autoreseptorin agonistilla. Nämä tulokset viittaavat siihen että manteliumakkeen CeA:n glutamaatilla on inhibitorinen tai eksitatorinen vaikutus laskeviin kipua muunteleviin ratoihin, mikä lisäksi välittyy ydinjatkoksesta selkäyttimeen laskevien serotonergisten yhteyksien kautta [32].

TRP-ionikanavareseptoriperheeseen kuuluvien TRPC4- ja TRPC5-reseptorien salpaus mantelimumakkeessa vähentää kivun sensorisen ja affektiivisen komponentin ilmentymistä neuropaattisen kivun eläinmallissa, mutta ei vaikuttanut terveissä yksilöissä kipukäyttäytymiseen [17]. Tulos viittaa siihen että hermovaurio johtaisi mantelimumakkeen toiminnallisiin muutoksiin ja TRPC4/C5-reseptorien ilmentymiseen, mikä myötävaikuttaa kroonisen neuropaattisen kivun kehittymiseen

Mantelimumakkeessa on havaittavissa myös astroosyyttien lisääntymistä neuropaattisen kivun eläinmalleissa [30,31], mikä voi kertoa siitä että mantelimumakkeen neuroplastisuuteen ja krooniseen kipuun liittyy lisäksi gliasolujen ja neuronien välisiä vuorovaikutuksia. Tätä tukee myös tutkimus, jossa mantelimumakkeen CeA:n mikroglia-solujen supressiolla saatiin vähennettyä ahdistuneisuuden kaltaista käyttäytymistä ja hypersensitiviteettiä neuropaattisen kivun eläinmallissa [25].

3 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää ilmentääkö mantelimumakkeen sentraalinen tumake ääreishermovaurion jälkeen TRPA1-reseptoreita, jotka olisivat myötävaikuttamassa laskevien hermoratojen välityksellä kiputunnon herkistymiseen ja neuropaattisen kivun lisääntymiseen.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Aineisto

Kirjallisuuskatsauksen pohjana käytettiin PubMed- ja Ovid Medline-tietokannan tieteellisiä artikkeleja, mitkä käsittelevät neuropaattista kipua, perifeeristä ja sentraalista sensitisaatiota, mantelimumakkeen nosiseptiivisiä ominaisuuksia ja TRPA1-reseptoreita. Tutkielman kirjallisuuskatsausta varten tutustuttiin neuropaattisen kivun fysiologiaan ja mantelimumakkeen tehtäviin kirjallisuuden avulla. Katsauksen pohjana ollut kirjallisuus on kokonaisuudessaan lähdeluettelo-osiossa.

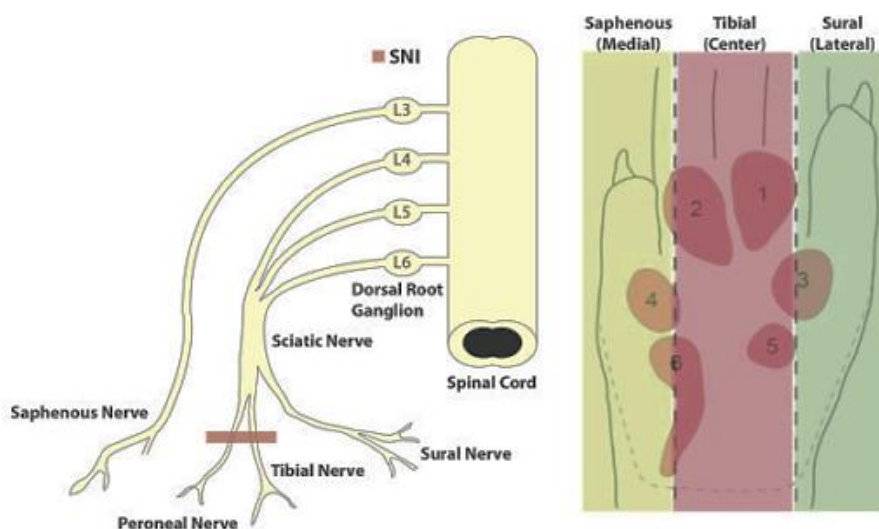
4.2 Kokeellisen osion tutkimusmenetelmät

Kokeellisen osion toteuttamiseksi oli Etelä-Suomen aluehallintovirasto myöntänyt hankeluvan, jonka numero on ESAVI/7863/04.10.07/2013 ja kokeet suoritettiin Euroopan Unionin direktiivin 2010/63/EU mukaisesti. Mantelitulmakkeen vaikutusta neuropaattisen kivun säätelyssä tutkittiin SNI-neuropatiamallissa (*spared nerve injury*) Hannover Wistar-rotilla (Envigo, Horst, Alankomaat).

Koe-eläimille annosteltiin päälakeen aiemmin asetetun metallisen ohjauskanyylin kautta TRPA1-antagonistina toimivaa Chembridge-5861528:ia (CHEM) oikeanpuoleisen mantelitulmakkeen CeA:han tai kontrolliannostelupaikkana käytettyyn oikeanpuoleiseen sisäkoteloon (*capsula interna*).

Neuropaattiseen kiputilaan johtava hermovaurio aiheutettiin sitomalla sidelangalla koe-eläimen vasemman takajalan iskiashermon *n. tibialis* ja *n. peroneus communis*-haarat (kuva 3), kun koe-eläin oli pentobarbitaalilla aikaansaadussa nukutuksessa.

Sidotuista hermohaaroista leikattiin distaalisesti noin 2mm:n pala, mikä estää hermojen uudelleenyhdistymisen. Iskiashermon *n. suralis*-haara jätetään leikkauksen yhteydessä koskemattomaksi. Saman leikkauksen yhteydessä asennettiin nukutuksen aikana koe-eläimelle kalloaukileen kautta metallinen ohjauskannula lääkeaineiden mikroinjektioita varten oikeanpuoleiseen mantelitulmakkeeseen tai kontrolli-injektiopaikkana käytettyyn oikeanpuoleiseen sisäkoteloon. Ohjauskannula kiinnitettiin kalloon kahden ruuvin ja hammassementin avulla.



Kuva 3: *Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. Duraku LS et Al.*

SNI-leikkauksen ja aivokannulan asennuksen jälkeen koe-eläimille annettiin leikkauksen jälkeisen kivun estämiseksi buprenorfiinia kahden vuorokauden ajan. Koe-eläinten annettiin viikon ajan toipua leikkauksesta ja totuttautua ympäristöön ja tutkijoihin (habituatio), minkä jälkeen allodynian ja hyperalgesian kaltaista hypersensitiviteettiä ilmentävät koe-eläimet valittiin tutkimukseen. Lisäksi tutkimusta varten luotiin valeoperoitu koe-eläinryhmä, jossa iskiashermo paljastettiin ilman hermovauriota ja joille myös asennettiin mikroinjektioita varten ohjauskannula oikeanpuoleiseen mantelimumakkeeseen.

Ennen kipukäyttäytymisen arviointia, koe-eläinten annettiin habituoitua koeolosuhteisiin tunnin ajan. Kipukäyttäytymisen mallina käytettiin PWT-mallia (paw withdrawal threshold), jossa ihon sensitiviteettiä mitattiin ärsyttämällä operoidun tai vale-operoidun takajalan plantaaripuolella *n. suralixen* hermottamaa lateraalista osaa 1-15g:n monofilamenteilla kunnes koe-eläin nosti kivuliaan raajan pois ärsykkeestä. Allodyniaa kuvastivat etenkin 1-2g:n monofilamenteilla saatavat vasteet, jotka eivät operoimattomissa koe-eläimissä tyypillisesti aiheuta jalan poisvetoheijastetta. Jokaisella käytetyistä monofilamenttivoimakkuuksista ärsytettiin jalkapohjaa toistuvasti viisi kertaa ja laskettiin prosentteina, kuinka monta kertaa kullakin ärsykevoimakkuudella monofilamentti aiheutti poisvetoheijasteen. Jos monofilamentti aiheutti poisvetoheijasteen jokaiselle viidelle ärsytykselle, oli vasteen suuruus 100 % ja jos taas monofilamentti aiheutti vasteen esimerkiksi kolme kertaa, oli vasteen suuruus 60 %.

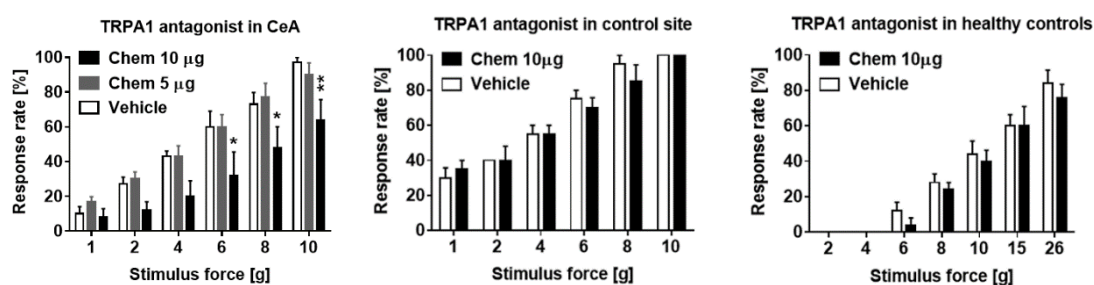
Kokeen lopuksi koe-eläimet lopetettiin pentobarbitaalilla, jonka jälkeen aivot fiksoitiin 10 %:lla formaliinilla. Aivoista tehtiin koronaalitason mikrotomileikkeitä, joista varmistettiin kanyylin oikea sijainti mantelimumakkeessa tai kontrolli-injektiopaikassa (sisäkotelo).

Tulosten tilastollinen analyysi tehtiin käyttäen kaksisuuntaista varianssianalyysia. *Post hoc* testinä käytettiin Tukeyn testiä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana oli $P < 0.05$.

5 Tulokset

Oikean mantelimumakkeen CeA:han annosteltu CHEM vähensi annosriippuvaisesti (5-10 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$) mekaanista hypersensitiviteettiä SNI-operoidussa vasemmassa takajalassa verrattuna kontrolliaineeseen, jona toimi tutkittavan lääkeaineen liuottimena käytetty yhdiste (lääkeainevaikutus kaksisuuntaisessa varianssianalyysissa; $F_{2, 84} = 18.6$, $P < 0.0001$; kuva 4). Maksimaalinen vaikutus havaittiin 30min jälkeen lääkeaineen annostelusta. CHEM:lla saatu vaikutus kyettiin toistamaan myös toisenlaisen rakenteen omaavalla TRPA1-antagonistilla (lääkeaine A-967079 annoksin 5-10 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$; lääkeainevaikutus kaksisuuntaisessa varianssianalyysissa: $F_{2, 90} = 46.7$, $P < 0.0001$). CHEM:lla ei ollut merkittävää vaikutusta neuropaattiseen hypersensitiivisyyteen, jos CHEM annosteltiin SNI-rottien aivoissa kontrolli-injektiopaikkana käytettyyn oikeaan sisäkoteloon (lääkeainevaikutus kaksisuuntaisessa varianssianalyysissa: $F_{1, 36} = 0.286$, $P = 0.6$; kuva 4). Terveillä koe-eläimillä CHEM ei vaikuttanut mekaaniseen sensitiivisyyteen (lääkeainevaikutus kaksisuuntaisessa varianssianalyysissa: $F_{1, 48} = 1.29$, $P = 0.26$; kuva 4). Tutkittavat lääkeaineet eivät aiheuttaneet havaittavia sivuvaikutuksia missään koeryhmässä.

Tämän tutkielman kokeellisen osan ulkopuolella tehdyissä kokeissa CeA:han annostelluilla antioksidanteilla (TEMPOL ja PBN) saatiin myös merkitsevästi vähennettyä hypersensitiviteettiä SNI-rotilla.



Kuva 4: TRPA1-antagonistin (Chembridge-5861528) vaikutus kipukäyttäytymiseen. TRPA1-antagonisti annettu SNI-rotan oikeaan mantelimumakkeeseen (vas.) tai oikeaan kontrolli-injektiopaikkana käytettyyn oikeaan sisäkoteloon (kesk.), tai terveen rotan oikeaan mantelimumakkeeseen (oik.). Y-akseli näyttää vasemman jalan poisvetoheijasteen taajuuden, kun jalkaa ärsytetty toistuvasti viisi kertaa X-akselin osoittamalla ärsykevoimakkuudella. Mitä suurempi taajuus, sitä hypersensitiivisempi vaste. Pylväät näyttävät keskiarvon ja sen keskivirheen ($n=5-6$ /ryhmä). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (referenssi: vehicle/kontrolliaine; Tukeyn testi).

6 Pohdinta

Oikean mantelimumakkeen CeA:n TRPA1-reseptoreiden salpaus vähensi annosriippuvaisesti hypersensitiviteettiä neuropaattisessa kipumallissa, mutta ei vaikuttanut terveissä koe-eläimissä. Kokeellisen osion tulokset viittaavat siihen että neuropaattinen kiputila aiheuttaa mantelimumakkeessa TRPA1-reseptorien ilmentymisen ja endogeenisen TRPA1-agonistin tuotannon, jotka yhdessä myötävaikuttavat neuropaattisen kiputilan ylläpitoon. Mantelimumakkeessa muodostuva proanalgeettinen vaikutus puolestaan välittyy laskevien kipua muuntelevien ratojen kautta selkäytimen takasarveen.

Aiemmin on osoitettu, että nosiseptoreiden lisääntynyt aktiivisuus aiheuttaa oksidatiivista stressiä selkäytimen takasarvessa [40], minkä vuoksi on aiheellista olettaa, että oksidatiivista stressiä ilmenee myös mantelimumakkeessa hermovaurion aikaansaamien lisääntyneiden kipuviestien seurauksena. Hypoteesia tukee mantelimumakkeeseen annosteltujen antioksidanttien neuropaattista hypersensitiviteettiä vähentävä vaikutus.

Tutkielman pääasiallisena hypoteesina onkin, että neuropaattinen kiputila johtaa mantelimumakkeeseen tulevien nosiseptiivisten signaalien lisääntymisen kautta mantelimumakkeen oksidatiiviseen stressiin, jonka seurauksena syntyneet reaktiiviset happiradikaalit osallistuvat TRPA1-välitteisesti sentraalisen sensitisaaation muodostumiseen ja kroonisen neuropaattisen kiputilan ylläpitoon.

Mantelimumakkeen oksidatiivisen stressin ja TRPA1-reseptorien ilmentyminen on tutkielmassa osoitettu epäsuorasti farmakologisilla menetelmillä, minkä vuoksi jatkossa hypoteesin tarkennusta varten voitaisiin tehdä immunohistokemiallisia tunnistuksia (ROS:ien ja TRPA1:n tunnistus, ROS:ien aiheuttamien vaikutusten tunnistus, antioksidanttien tunnistus) ja molekyylibiologisia mittauksia (Western Blot, qPCR). Selvitettäväksi jää vielä ilmentyykö mantelimumakkeen TRPA1-reseptorit hermosoluissa vai gliasoluissa sekä mikä gliasolujen rooli on TRPA1-agonistien tuotannossa.

Kokeellisen osan rajoitteina ovat SNI-neuropatiamallin toistettavuus sekä PWT-käyttäytymismallin spesifisyys (ilmaiseeko poisvetorefleksi aina nosiseptiota, kivun laadun epäselvyys), sensitiivisyys (kuinka tarkasti kiputilan muutokset ilmenevät

poisvetorefleksissä), toistettavuus (kokeen tekninen suoritus, ärsytyksen tarkka sijainti, tutkijan kokemus) ja korrelaatio ihmisellä. Kliinisesti olisi myös tärkeää löytää keino kohdistaa mahdollisten uusien analgeettisten lääkeaineiden farmakologinen vaikutus mantelitumakkeeseen.

Mantelitumakkeen tärkeä ja moniosainen rooli kroonisen kivun kehittymisessä lupaa kuitenkin uusia mahdollisuuksia kivunhallinnan kehityksessä, kroonisen kivun ehkäisyssä ja kivun fysiologian tutkimuksessa.

Lähdeluettelo

- [1] Haanpää M, Hagelberg N, Hannonen P, Liira H, Pohjolainen T. Kroonisen kivun hoito-opas. Suomen Kivuntutkimusyhdistys ry 2013
- [2] Kipu (online). Käypä hoito –suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Anestesiologiyhdistyksen ja Suomen Yleislääketieteen yhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2015 (viitattu 6.6.2016).
- [3] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009 Oct 16;139(2):267-284.
- [4] Kalso E, Haanpää M, Vainio A (toim.) Kipu. Kustannus Oy Duodecim 2009
- [5] Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive & Palliative Care* 2014 Jun;8(2):143-151.
- [6] Bourbia N. Central nucleus of the amygdala in descending control of pain-related behavior. 2015-08-11.
- [7] Haanpää M. Neuropaattisen kivun hoito-opas. Suomen Kivuntutkimusyhdistys ry 2011
- [8] Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 2014 Feb 5;348:f7656.
- [9] Ray AL. Neuroplasticity, Sensitization, and Pain. In: Deer RT, Leong SM, Buvanendran A, Gordin V, Kim SP, Panchal JS, et al, editors. *Comprehensive Treatment of Chronic Pain by Medical, Interventional, and Integrative Approaches: The AMERICAN ACADEMY OF PAIN MEDICINE Textbook on Patient Management* New York, NY: Springer New York; 2013. p. 759-768.
- [10] Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1-32.
- [11] Woolf CJ. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3 Suppl):S2-15. doi:10.1016/j.pain.2010.09.030.
- [12] Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain* 2007 Feb;11(2):223-230.
- [13] Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 2010 print;16(11):1267-1276.
- [14] Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 2010;7(4):338-353.
- [15] Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R. Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J Neurosci* 2008 Oct 15;28(42):10482-10495.
- [16] Hald A. Spinal Astroglia in Pain Models: Cause and Effects. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(5):609-619.
- [17] Wei H, Sagalajev B, Yuzer MA, Koivisto A, Pertovaara A. Regulation of neuropathic pain behavior by amygdaloid TRPC4/C5 channels. *Neurosci Lett* 2015 Nov 3;608:12-17.
- [18] Grace PM, Strand KA, Galer EL, Urban DJ, Wang X, Baratta MV, et al. Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 May 31.

- [19] Zhuo M, Wu G, Wu LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain* 2011 Jul 30;4:31-6606-4-31.
- [20] Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 2010 print;16(11):1258-1266.
- [21] Boadas-Vaello P, Castany S, Homs J, Alvarez-Perez B, Deulofeu M, Verdu E. Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. *Spinal Cord* 2016 print;54(5):330-340.
- [22] Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 2010 Oct;7(4):482-493.
- [23] Nakagawa T, Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *Journal of Pharmacological Sciences* 2010;114(4):347-353.
- [24] Jaggi AS, Singh N. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Res* 2011 Mar 24;1381:187-201.
- [25] Sawada A, Niiyama Y, Ataka K, Nagaishi K, Yamakage M, Fujimiya M. Suppression of bone marrow-derived microglia in the amygdala improves anxiety-like behavior induced by chronic partial sciatic nerve ligation in mice. *Pain* 2014 Sep;155(9):1762-1772.
- [26] Sah P, Faber ESL, Armentia LD, Power J. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev* 2003 07/01;83(3):803-834.
- [27] Neugebauer V. Amygdala pain mechanisms. *Handb Exp Pharmacol* 2015;227:261-284.
- [28] Neugebauer V, Galhardo V, Maione S, Mackey SC. Forebrain pain mechanisms. *Brain Res Rev* 2009 Apr;60(1):226-242.
- [29] Veinante P, Yalcin I, Barrot M. The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *J Mol Psychiatry* 2013 Jun 5;1(1):9-9256-1-9. eCollection 2013.
- [30] Marcello L, Cavaliere C, Colangelo AM, Bianco MR, Cirillo G, Alberghina L, et al. Remodelling of supraspinal neuroglial network in neuropathic pain is featured by a reactive gliosis of the nociceptive amygdala. *European Journal of Pain* 2013 Jul;17(6):799-810.
- [31] John CS, Sypek EI, Carlezon WA, Cohen BM, Ongur D, Bechtholt AJ. Blockade of the GLT-1 Transporter in the Central Nucleus of the Amygdala Induces both Anxiety and Depressive-Like Symptoms. *Neuropsychopharmacology* 2015 Jun;40(7):1700-1708.
- [32] Sagalajev B, Bourbia N, Beloushko E, Wei H, Pertovaara A. Bidirectional amygdaloid control of neuropathic hypersensitivity mediated by descending serotonergic pathways acting on spinal 5-HT₃ and 5-HT_{1A} receptors. *Behav Brain Res* 2015 Apr 1;282:14-24.
- [33] Goncalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, Pego JM, Bessa JM, Pertovaara A, et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol* 2008 Sep;213(1):48-56.
- [34] Koivisto A, Pertovaara A. Chapter 9 - Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Antagonists for Pain Relief A2 - Szallasi, Arpad. *TRP Channels as Therapeutic Targets* Boston: Academic Press; 2015. p. 145-162.
- [35] Wei H, Koivisto A, Saarnilehto M, Chapman H, Kuokkanen K, Hao B, et al. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. *Pain* 2011 Mar;152(3):582-591.

- [36] Meng J, Wang J, Steinhoff M, Dolly JO. TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18 α 1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Scientific Reports* 2016 02/18;6:21226.
- [37] Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, et al. A Gain-of-Function Mutation in TRPA1 Causes Familial Episodic Pain Syndrome. *Neuron* 2016/06;66(5):671-680.
- [38] Jiang H, Fang D, Kong LY, Jin ZR, Cai J, Kang XJ, et al. Sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala via the decreased GABAergic inhibition contributes to the development of neuropathic pain-related anxiety-like behaviors in rats. *Mol Brain* 2014 Oct 4;7:72-014-0072-z.
- [39] Li Z, Wang J, Chen L, Zhang M, Wan Y. Basolateral amygdala lesion inhibits the development of pain chronicity in neuropathic pain rats. *PLoS One* 2013 Aug 5;8(8):e70921.
- [40] Schwartz ES, Lee I, Chung K, Chung JM. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 2008 Sep 15;138(3):514-24.

Kuva 3: Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury. Duraku LS, Hossaini M, Hoendervangers S, Falke LL, Kambiz S, Mudera VC, Holstege JC, Walbeehm ET, Ruigrok TJ - *Mol Pain* (2012)