



UPPSALA
UNIVERSITET

Kronisk smärta- snart ett minne blott?

Hannah Weman

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Mekanismerna bakom kronisk smärta och framtidens botemedel

Hannah Weman

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Smärtuppfattning är en förutsättning för att en skada ska kunna läka. Till följd av olika faktorer, så som nerv- och vävnadsskador, kan dock den akuta smärtfasen övergå till neuropatisk, alltså kronisk smärta. Trots att kronisk smärta är ett stort samhällsproblem, är det först under de senaste åren de bakomliggande molekylära mekanismerna som orsakar neuropatisk smärta har kartlagts. Det har bland annat kunna konstateras att inflammation är essentiellt för utvecklingen av kronisk smärta. Detta har medfört att mycket av forskningen inom detta område har ägnats åt utvecklingen av inhiberande substanser av pro-inflammatoriska molekyler, vilket har visats ha god effekt vid studier på försöksdjur.

Nya kunskaper gällande de mekanismer som ger upphov till kronisk smärta, har medfört utvecklingen av intressanta behandlingsformer. Bland annat har toxiner isolerats från både bakterier och ormar. Dessutom undersöks det om behandlingen med en genteknisk metod skulle kunna vara effektiv. Denna behandlingsform innefattar att mesenkymala stamceller har manipulerats till att uttrycka anti-inflammatoriska substanser.

Dessa metoder skulle potentiellt kunna hjälpa de 10 % av befolkningen som lider av kronisk smärta. Trots de goda resultaten gällande inhibering av inflammation och därmed initieringen av kronisk smärta, återstår det fortfarande forskning för att utvärdera lindringseffekten och utesluta möjligheten för farliga bieffekter.

Ordlista med förklaringar till förkortningar

TRP: Ofullständig receptorpotentialkanaler

ASIC: Syrakänsliga jonkanaler

Iba-1: Joniserat kalciumbindande adaptorprotein

GFAP: Gliafibrillärt surt protein

IL: Interleukin

TNF- α : tumörnekros faktor alpha

L3: Lumbarkota 3

L4: Lumbarkota 4

L5: Lumbarkota 5

PEA: *N*-palmitoyletanolamin. En fettsyreamid.

NMDA: *N*-metyl-D-aspartat-receptor

AMPA: α -amino-3-hydroxi-5-metylisoxazol-4-propansyra-receptor

DAAO: D-serin-degraderande D-aminosyraoxidas

D-AP5: En NMDA-receptorantagonist

Fluoroacetat: En gliainhiberande substans

α_5 -nAChR: α_5 nikotinsk acetylkolin-receptor

sMamb-1: syntetiskt mambalgin-1

BoNT/A: Botulinum-toxin A

CGRP: calcitonin gen-relaterad peptid

SP: Substans P

SV2: Synaptisk vesikelprotein 2

SNAP-25: Synaptosomal-associerat protein 25

SNARE: lösligt-*N*-etylmaleimid-känslighetsfaktorsfästande proteinreceptor

MSC: Mesenkymala stamceller

EGFP: Intensifierande grönfluorescerande protein

GDNF: Gliacellinjehärledd neurotrofisk faktor

Inledning

Nociceptiv uppfattning, eller smärtuppfattning, är viktigt för att kunna orsaka ett tillbakadragande beteende och därmed tillåta en skada att läka. Emellertid kan dock inflammation, olyckor och operationer leda till kronisk smärta. Kronisk smärta kan delas in i två kategorier; hyperalgesi och allodeni. Den förstnämnda innebär en ökad känslighet för ett smärtsamt stimuli, medan allodeni bidrar till smärta och obehagskänsla från ett stimuli som inte bör uppfattas som smärtsamt (Fitzpatrick & Mooney 2012). Enligt vårdguiden lider 10 % av Sveriges befolkning av kronisk smärta, där dessa utgör 60 % av långtidssjukskrivningarna. Därmed är utvecklingen av mer målspecifika behandlingsmetoder av intresse för individen, likväl som det är en viktig samhällsekonomisk fråga.

Opiater har använts som behandling av smärta sedan 1800-talet på grund av deras effektivitet. Dessvärre har opiatanvändningen negativa bieffekter, där bland annat analgetisk tolerans, hyperalgesi och drogmissbruk är vanligt förekommande hos patienter med långvarig smärtbehandling (Trang *et al.* 2015). Med betydande forskning har mekanismerna bakom kronisk smärta kartlagts i stor utsträckning, vilket har medfört att nya behandlingsmetoder är under utveckling.

Inflammation har visat sig vara en viktig orsak till utvecklingen av kronisk smärta, där två typer av gliaceller har demonstrerats vara särskilt viktiga; astrocyter och mikroglia (Romero-Sandoval *et al.* 2008). Därmed har forskning kring inhibering av gliacellers smärtinducerande aktivitet varit ett självklart område inom smärtforskningen och även fokus för denna uppsats. Vidare har andra mekanismer, så som smärtminne och specifika proteinsubenheter, visats vara väsentlig vad gäller kronisk smärta och ökad smärtekänslighet. Detta har medfört att mer specifika behandlingsmetoder är under utveckling, vilket har gett goda resultat i olika djurmodeller. Dock kvarstår frågan om dessa nya metoder skulle vara effektiva i behandlingen av kronisk smärta hos människor samt huruvida det framkommer potentiella bieffekter.

De behandlingsformer som är under utveckling omfattar behandling med två olika toxiner, vilka har isolerats från olika organismer; botulinum-toxin A (BoNT/A) från den grampositiva bakterien *Clostridium botulinum* och mambalgin från *Dendroaspis polyepis polyepis* (svart mamba) och *Dendroaspis angusticeps* (grön mamba). Utöver detta är även en genteknisk behandlingsform, vilken involverar manipulation av mesenkymala stamceller, under en framgångsskridande utveckling.

De stora framstegen inom både kartläggningen av mekanismerna bakom kronisk smärta och utvecklingen av mer nociceptiv-specifika behandlingsmetoder är väldigt lovande för framtiden. Detta då patienter som lever med olika former av kroniska smärtbesvär kan få en bättre tillvaro. Därför är syftet med detta arbete att få en inblick i uppkomsten av kronisk smärta samt hur lång forskningen har kommit i utvecklingen av botemedel.

Mekanismer bakom akut smärta

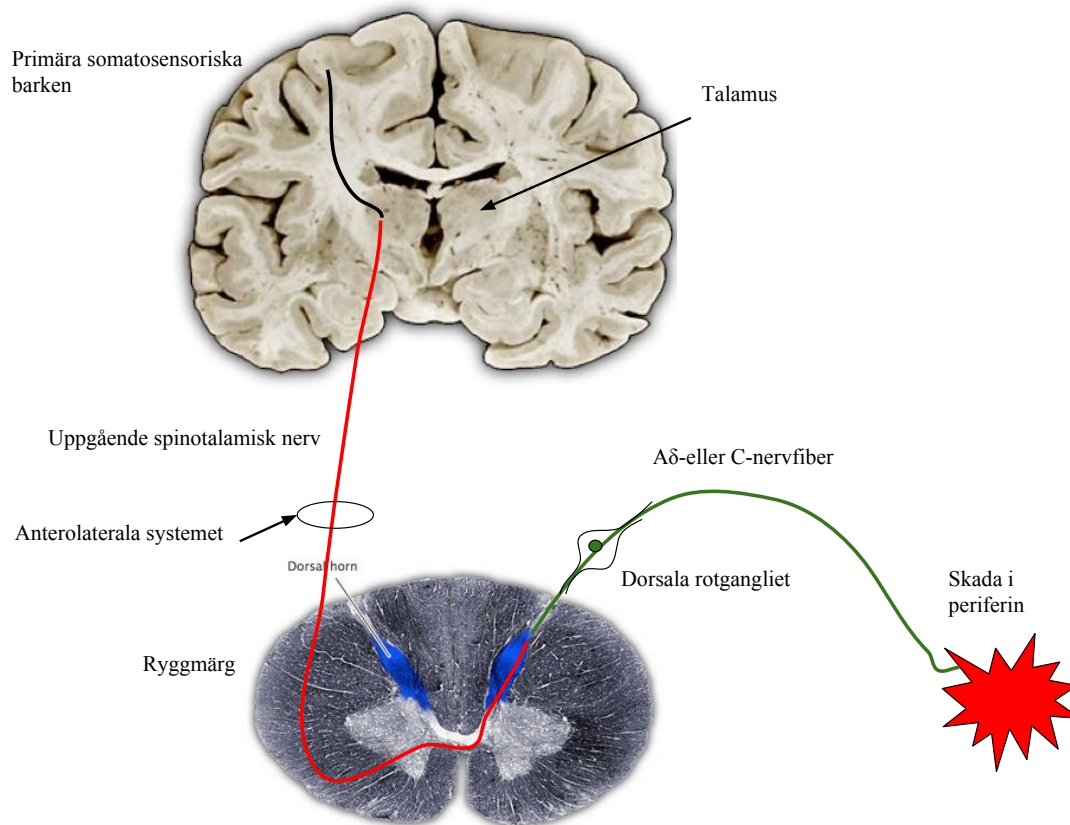
Nociceptiva nerver har så kallade fria nervändar, vilket innebär att de kan bli aktiverade av kemisk, mekanisk och temperaturberoende stimuli och därmed inte är specifika för en viss typ av stimuli (Fitzpatrick & Mooney 2012). Tidigare trodde forskare att smärta var ett resultat av överstimulerade känselnerv, vilka består av A β afferenta nervfibrer. Att nervfibrer är afferenta innebär att signalen transporteras från periferin till ryggmärgen och därefter, vidare till hjärnan för tolkning. Forskning har dock visat att den nociceptiva uppfattningen är beroende av två typer av nociceptiva nervfibrer; A δ och C afferenta nervfibrer (Todd *et al.* 2012).

A δ -och C-nervfibrer har olika funktioner för att uppfatta smärta, där aktiveringen av A δ -nervfibrer leder till uppfattningen av den första skarpa smärtan, medan C-nervfibrerna ansvarar för den något mildare, men långvariga smärtan. Denna skillnad beror på att C-nervfibrer, till skillnad mot A δ -nervfibrer, inte är myelinerade, vilket resulterar i en långsammare signaleringshastighet. Vidare har A δ delats in i två grupper beroende av vilken smärtinformation de förmedlar; Typ I A δ -nervfibrer och typ II A δ -nervfibrer. Typ I aktiveras av skadlig och intensiv mekanisk stimulering, medan typ II förmedlar information om höga temperaturer, där specificitetsskillnaderna beror på att respektive nervfibertyp har receptorer med olika tröskelvärden för de olika stimuli. Vidare aktiveras C-nervfibrer av alla former av nociceptiva stimuli, men även dessa har preferenser, där vissa aktiveras lättare av mekaniska, kemiska eller temperaturberoende stimuli. (Fitzpatrick & Mooney 2012)

Receptorerna som uttrycks av nervfibrerna tillhör ofullständig receptorpotential (TRP) -och syrakänsliga jonkanaler (ASIC)-familjen. TRP-proteiner bildar porer, vilka vid aktivering tillåter ett inflöde av Na⁺ och Ca²⁺. Vid tillräcklig stimuli leder detta flöde till att aktionspotential byggs upp och därmed signalöverföring. ASIC-proteiner återfinns endast i nerver i hjärt- och skelettmuskelvävnad. Därför är hypotesen att dessa proteiner är viktiga för att detektera pH-förändringarna i samband med otillräcklig blodförsörjning, så kallad ischemi, och vävnadsskador inom dessa områden (Fitzpatrick & Mooney 2012). Vid inflammation och ischemi minskar den extracellulära pH-nivån, vilket leder till aktivering av dessa receptorer och därmed uppstår smärta (Sluka & Gregory 2015).

Smärtsignalering från periferin till hjärnan

En smärtsignal transporteras från det smärtdrabbade området i periferin till de smärttolkande hjärnområdena i ett flertal steg. När ett A δ -eller C-nervfibrer har aktiverats, skickas signalen via det dorsala rotgangliet (DRG), till Lissauers område i det dorsala hornet i ryggmärgen. DRG är en "knöl" som kan ses intill ryggmärgen, vilket innehåller nervcellers cellkroppar. I Lissauers område sker en ny signalöverföring till uppgående spinotalamiska nerver (ascending spinothalamic nerves). De spinotalamiska nerverna korsar ryggmärgens mittlinje, där signalöverföringen sedan fortsätter till hjärnstammen och talamus genom den anterolaterala halvan av ryggmärgen. Detta innebär att smärtan från den högra sidan av kroppen processeras i den vänstra hjärnhalvan och vice versa. I talamus sker en ny signalöverföring i den ventrala posterolaterala (VPL) och ventrala mediolaterala (VPM) kärnorna, vilket är essentiellt för att sortera ut den viktiga informationen. Dessa signaler sänds vidare till den primära somatosensoriska hjärnbarken (Figur 1) och därefter till den sekundära somatosensoriska hjärnbarken. Båda dessa områden är lokaliserade i framkanten av parietalloben och är essentiella för tolkning av smärtsignaler. (Fitzpatrick & Mooney 2012)



Figur 1. Smärtsignaler från periferin till den primära somatosensoriska barken. När en skada sker i periferin aktiveras A δ -och C-nervfibrer, där signalen transporteras till det dorsala hornet via det dorsala rotgangliet. Här sker en signalöverföring, vilket resulterar i aktiveringen av uppgående spinothalamiska nerver. Dessa nerver passerar mittlinjen av ryggmärgen där signalen vidare passerar genom det anterolaterala systemet och slutar i ventrala posteriolaterala och ventrala mediolaterala thalamus (framgår ej i figuren). I thalamus sker en ny signalöverföring där nerverna slutar i den primära somatosensoriska barken i främre parietalloben för tolkning. Bilderna av hjärnan och ryggmärgen laddades ner från www.sylvius.sinauer.com/protected/ och har därefter bearbetats.

För de smärtsignaler som slutar i hjärnstammen, sker nya signalöverföringar, vilka slutar i den retikulära formationen, superior colliculus, periaqueductal gray (PAG), hypotalamus samt amygdala. Dessutom går signaler till främre cingulum och insula via mittlinjen av thalamus (Fitzpatrick & Mooney 2012). Dessa signalvägar ger upphov till en komplex uppfattning av smärta, vilket inducerar både emotionella och rörelsemässiga responser. De mer specifika funktionerna av respektive område gällande känsel- och smärtuppfattningen är beskriven i Tabell 1.

Tabell 1. Områden involverade i uppfattningen av smärta

Område	Funktion
Ventrala posteriolaterala talamus	Får inkommande smärtsignaler från kroppen via hjärnstammen.
Ventrala mediolaterala talamus	Får inkommande smärtsignaler från ansiktet via hjärnstammen.
Primära somatosensoriska barken	Processerar känselinformation från kroppsytan, bindvävad, muskler och leder via talamus. Är lokaliserad i främre parietalloben.
Sekundära somatosensoriska barken	Processerar känselinformation från den primära somatosensoriska hjärnbarken. Är lokaliserad i parietalloben intill den primära somatosensoriska barken.
Retikulära formationen	Lokaliserad i hjärnstammen. De primära funktionerna involverar kontroll av respirationen, hjärtslagshastigheten, hållning och medvetandet.
Superior colliculus	Lokaliserad i mitthjärnan och är viktig för orienterade rörelser av ögonen samt huvudet.
Periaqueductal gray	En region av hjärnstammen som är involverad i smärtkontroll.
Främre cingulum-barken	Ett område runt corpus callosum, vilken är viktig i emotionella rörelsefunktioner. Är en del av det limbiska systemet.
Insula	Är en del av det limbiska systemet, lokaliserad i sidofåran. Denna kärna är viktig för kognitivt och emotionellt besluttande.
Amygdala	Ett kärnkomplex lokaliserat i temporalloben, vilken är viktig i det limbiska systemet. Dess största funktion involverar autonomiskt, känslomässigt samt sexuellt beteende.

Källa: Fitzpatrick & Mooney (2012)

Sambandet mellan inflammation och kronisk smärta

Inflammation är viktigt för att initiera läkningsprocesser till följd av infektioner, vävnadsskador och trauman. Dock som resultat av positiva återkopplings-mekanismer, kan inflammation leda till vävnadsskador, organsvikt (Castellheim *et al.* 2009) samt kronisk smärta (Griffis *et al.* 2011). Detta då olika cytoplasmakomponenter, vilka frisätts som en konsekvens av ovannämnda faktorer, aktiverar immunceller som ingår i det medfödda immunsystemet (Griffis *et al.* 2011). Utöver detta, har det upptäckts att icke-signalerande

nervceller, så kallade gliaceller, är viktiga för att upprätthålla både inflammation och smärta. Detta har inneburit att forskning har ägnats åt utvecklingen av substanser som inhiberar gliacellers smärtaktivering.

Gliacellers inflytande på kronisk smärta

Gliaceller är essentiella för strukturellt stöd, skydd och näring för nervceller i både det centrala samt perifera nervsystemet. Utöver detta är dessa celler viktiga för utvecklingen av hjärn- och blodbarriären (Watkins *et al.* 2007). Mika *et al.* (2010) kunde dessutom påvisa att gliaceller orsakar kronisk smärta genom att syntetisera och utsöndra pro-inflammatoriska cytokiner till följd av nerv- och vävnadsskador. Dessa pro-inflammatoriska cytokiner omfattar interleukiner (IL) och tumörnekros faktor alpha (TNF- α) (Kadetoff *et al.* 2012) och orsakar smärta genom att aktivera A δ - och C-nervfibrerna (Mika *et al.* 2010).

Romero-Sandoval *et al.* (2008) utförde ett experiment där två typer av gliaceller; astrocyter och mikroglia användes som utgångspunkt för att undersöka om det finns ett samband mellan inflammation och smärta, där hypotesen var att båda celltyperna har ett starkt inflytande i både akutkirurgisk samt kronisk smärta. I experimentet användes immunohistokemi, där fluorescerande antikroppar som binder till joniserat kalciumbindande adaptorprotein (Iba-1) och gliafibrillärt surt protein (GFAP) användes. Genom mätningen av Iba-1 kunde nivåerna av mikroglia mätas, medan GFAP indikerade nivåerna av astrocyter. Detta då dessa proteiner är lokaliserade i respektive celltyps membran. Nivåerna av gliacellerna mättes i ryggmärgssegmenten L3 och L5 (lumbarregionen, kota 3 & 5) den första, fjärde samt sjunde dagen efter att råttor genomgått en baktass-operation. Operationen i baktassen resulterade i att smärtsignalerna från periferin slutade i L5-segmentet och mätningen av gliacellerna i L3 utfördes för att kunna påvisa om dessa celler verkar lokalt eller ej. Utöver operationen utfördes smärtekänslighetsstudier parallellt med astrocyt- och mikrogliamätningarna, vilket medförde att smärtnivån kunde jämföras med inflammationsnivån.

När det gäller korrelationen mellan smärt- och inflammationsnivån, kunde ett signifikant samband mellan mängden GFAP och Iba-1 med smärtuppfattningen hos mössen påvisas. Bland annat när det inte uppstod skillnad mellan den opererade och den icke-opererade sidan smärtmässigt, kunde inte heller en skillnad detekteras mellan nivåerna av GFAP och Iba-1 inom dessa områden. Detta ledde till konstaterandet att dessa gliaceller är viktiga för att upprätthålla inflammation och därmed smärta. (Romero-Sandoval *et al.* 2008)

Immunohistokemi-testerna av Iba-1 visade att mikroglia inducerar en kraftigare akut smärta, men att dessa celler även är viktiga för kronisk smärta. Dessutom indikerade resultatet att mikroglia kan ge upphov till smärta på en icke-lokal nivå. Dessa slutsatser stöds av ett experiment utfört av Tawfik *et al.* (2007), som visade på samma resultat vad gäller mängden mikroglia efter inducerad smärta. Vad gäller immunohistokemi-mätningarna av GFAP, föreslår resultatet att astrocyter inte är viktiga för den akuta smärtfasen, men viktigare än mikroglia vad gäller kronisk smärta. Dessutom kunde inga förhöjda nivåer av GFAP ses i L3 och därmed kan det antas att astrocyter endast är viktiga för kronisk smärta på lokal nivå (Romero-Sandoval *et al.* 2008).

Endogena lipidmediatorer är viktiga för att inhibera inflammation

Endogena lipidmediatorer, har som funktion att inhibera inflammation (Piomelli & Sasso 2014). Studier har visat att en utav dessa lipidmediatorer, fettsyreamiden *N*-palmitoyletanolamin (PEA), är särskilt viktig för inflammatorisk homeostas genom autoreglering av aktiveringen av glia- och mastceller. Det har vidare visats att mängden PEA

ökar i ryggmärgen och i de hjärnområden som är involverade i smärtuppfattningen vid kronisk smärta, vilket ytterligare styrker betydelsen av denna lipid (Skaper *et al.* 2014).

Vid framställning av PEA som oralt läkemedel, har effekterna inte varit särskilt goda, vilket troligtvis beror på den stora och vattenolösliga lipidstrukturen av PEA (Skaper *et al.* 2014). Impellizzeri *et al.* (2014) lyckades dock mikronisera och ultramikronisera PEA, vilket gav mycket bra effekt jämförelsevis med icke-mikroniserad PEA vid karragenan-inducerad inflammation. Karragenan är en grupp av polysackarider som utvinns av röda alger, vilken har bevisats inducera inflammation vid injicering (Tobacman 2001). Vid mikronisering finfördelas partiklar till mindre beståndsdelar, vilket bidrar till lättare läkemedelsupptagning (Impellizzeri *et al.* 2014). Därutöver blandades PEA-partiklarna med luteolin, vilket minskar inflammation genom att inhibera mikroglia-syntetiserad interleukin-6 (IL-6) (Jang *et al.* 2008). Denna teknik testas nu även för att se vilken effekt PEA kan ha för neuro-degenererande, -kognitiva samt -psykologiska sjukdomar (Salim *et al.* 2014).

Kronisk smärta induceras av smärtminne i det dorsala hornet

En ökad mängd av *N*-metyl-D-aspartat (NMDA)-receptorer i det dorsala hornet i ryggmärgen har visats ha en betydande roll i utvecklingen av kronisk smärta (Latremoliere & Woolf 2009). Glutamat binder till både NMDA och α -amino-3-hydroxi-5-metylisoxazol-4-propansyra (AMPA)-receptorer, vilka då naturligtvis finns i samma system som glutamat. Denna viktiga neurotransmittor är en excitatorisk signalmolekyl som är involverad i ett flertal neurologiska system, så som minnesbildning, synsignalering, inlärning, fysiologiska regleringar och nervkommunikation. Vad gäller smärtsignalering är glutamat en av de viktigaste neurotransmittorerna då signalmolekylen syntetiseras och utsöndras av C- och A δ -nervfibrerna i det dorsala hornet som ett resultat av ett smärtstimuli i periferin. När signaleringen ökar till följd av ett stimuli i periferin, ökar mängden glutamat i den synaptiska klyftan i ryggmärgen. Bindningen av glutamat till NMDA-receptorn leder till att en blockerande Mg²⁺-plugg avlägsnas, vilket bidrar till ett inflöde av Ca²⁺ och därmed en ny aktionspotential om tröskelvärdet nås. Avlägsnandet av Mg²⁺ inducerar även exocytos av lagrade AMPA-receptorer till cellmembranet, vilket medför att antalet glutamat-receptorer ökar. Detta innebär att vid nästa perifera signal, kommer en mindre mängd glutamat krävas för att inducera en smärtsignal och därmed kommer ett stimuli att uppfattas som mer smärtsam (allodeni). (Fitzpatrick & Mooney 2012)

D-serin binder till NMDA-receptorer och är viktig för kronisk smärta

Det är känt att D-serin binder som en ko-agonist till NMDA-receptorer genom bindning till receptorns stryknin-okänsliga glycin-bindingsområde (strychnine-insensitive glycine-binding-site) (Schell *et al.* 1995), där bindningen leder till en ökad glutamat-affinitet och alltså en förstärkt smärtförmåelse. En ko-agonist är en molekyl som vid bindning till en receptor ökar affiniteten mellan receptorn och dess naturliga bindningssubstans. Det vill säga, ko-agonisten i sig själv aktiverar inte receptorn.

D-serin utsöndras av astrocyter som följd av vävnads- och nervskador (Schell *et al.* 1995). Detta bidrog till att Lefèvre *et al.* (2015), utförde ett experiment för att se hur stort inflytande denna aminosyra har i smärtsignalering. I experimentet utsattes råttor för en operation, varpå de delades in i tre grupper som behandlades med antingen NMDA-receptorantagonisten D-AP5, gliacell-inhiberande fluoroacetat eller D-serin-degraderande D-aminosyraoxidas (DAAO). Effekten av respektive behandling jämfördes med obehandlade individer (Lefèvre *et al.* 2015).

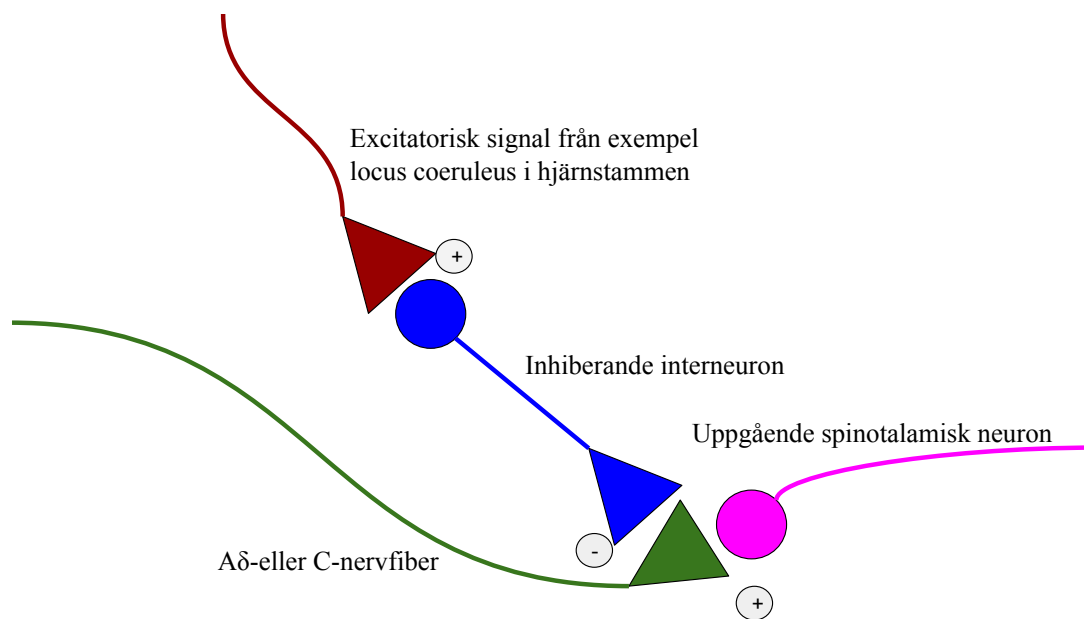
Behandlingen med D-AP5 påverkade inte smärtsignaleringen signifikant, vilket antyder att NMDA-receptorn kanske ändå inte är essentiell för smärtuppfattningen (Lefèvre *et al.* 2015). Vidare analys visade även att behandlingen med glia-inhiberande fluoroacetat inte påverkade smärtuppfattningen hos råttorna signifikant. Att gliacellers verkan inte skulle vara viktig för aktiveringen av NMDA-receptorn stämmer inte överens med ett experiment utfört av Niesters & Dahan (2012), där den glia-inhiberande molekyl ketamin visade lovande resultat i behandlingen av kronisk smärta. Däremot när det D-serin-degraderande DAAO användes som behandling, kunde en påvisad minskning av smärta detekteras (Lefèvre *et al.* 2015). Slutligen injicerades fluoroacetat-behandlade råttor med D-serin för att undersöka hur viktig denna molekyl är i akut smärta. Resultatet visade att ingen ökad akut smärta efter injiceringen och därmed kan det antas att främst mängden glutamat är viktig för att inducera akut smärta (Lefèvre *et al.* 2015).

Behandling av kronisk smärta

Upptäckten att inflammation är viktigt för att initiera kronisk smärta har medfört att nya former av behandlingsmetoder som dämpar inflammation studeras närmare. Dessa metoder involverar bland annat användningen av nikotin, toxiner från ormar och bakterier samt genmanipulation av mesenkymala stamceller. Resultaten vad gäller inhibering av inflammation och smärta har varit goda vid samtliga experiment. Dock är metoderna nya, vilket innebär att det återstår forskning gällande potentiella bieffekter, där det bland annat inte är känt huruvida ormtoxinerna kan passera blod- och hjärnbarriären och i så fall, vilka effekter det får (Diochot *et al.* 2015).

Nikotinreceptorer är möjliga mål för framtida behandling av kronisk smärta och inflammation

Den nikotin-bindande α_5 nikotinsk acetylkolin-receptorn (α_5 -nAChR) har visat sig vara ett potentiellt läkemedelsmål för behandling av kronisk smärta (Bagdas *et al.* 2015). Subenheten α_5 är en homomer som kan bilda komplex med α - och β -subenheter och därmed forma nACh-receptorer. Tills nu har 12 olika subenheter (α_{2-10} och β_{2-4}) kartlagts i däggdjur (Gotti *et al.* 2009). Den viktiga α_5 -subenheten är uttryckt i olika smärtsignaleringsvägar inom både det perifera och centrala nervsystemet, vilket bland annat inkluderar de postsynaptiska autonoma och somatiska motorneuronerna, gliaceller (Khan *et al.* 2003) samt locus coeruleus (Léna *et al.* 1999). Locus coeruleus är en kärna belägen i hjärnstammen och har bevisats vara viktig för inhiberingen av smärtsignaler från det dorsala hornet till hjärnan. Detta genom att denna kärna sänder stimulerande signaler till signalinhiberande interneuroner i det dorsala hornet, vilka i sin tur, inhiberar signalöverföringen mellan A δ - och C-nervfibrerna och de spinothalamiska neuronerna (Figur 2). Vidare innebär utbredningen av denna subenhet är viktig för att upprätthålla rörelseförmåga och inflammationsinducering (Fitzpatrick & Mooney 2012, White & Hall 2012).



Figur 2. Smärtsignalöverföring i Lissauers område i det dorsala hornet i ryggmärgen. Vid ett smärtsamt stimuli i periferin aktiveras A δ -och C-nervfibrer, vilka i sin tur aktiverar de uppgående spinothalamiska neuronerna. Hjärnan kan inhibera smärtsignalerna redan i det dorsala hornet genom att stimulera interneuronerna, vilka inhiberar signalöverföringen mellan A δ -samt C-nervfibrer och de uppgående spinothalamiska neuronerna. Baserad på Fitzpatrick & Mooney (2012).

I ett experiment utfört av Bagdas *et al.* (2015), undersöktes funktionen av α_5 i akut och kronisk smärta, samt vid inflammation i möss med α_5 -mutation jämfört med vildtypen. Funktionen av α_5 vid inflammation och akut samt kronisk undersöktes genom att lägga ett snitt vid ischiasnerven strax under höftbenen, samt genom att injicera karragenan. Som nämnt tidigare, inducerar karragenan en kort och lokal inflammation vid injiceringsområdet.

Resultaten från detta experiment visade att möss som saknade α_5 -subenheten upplevde mindre kronisk smärta, utan att rörelse eller den mekaniska- och värme-beroende känslan påverkades, vilket innebär att riktad behandling mot denna subenhet skulle kunna vara effektiv. Dessutom var inflammationen reducerad i dessa möss jämfört med vildtypen och därmed är slutsatsen att α_5 -nAChR var viktig för att upprätthålla inflammation. Dock kunde ingen skillnad ses vad gäller akut smärta och därmed visar experimentet att α_5 -nAChR är viktig för kronisk smärta, men inte i den akuta fasen. (Bagdas *et al.* 2015)

Vidare behandlades både vildtypsmössen och de muterade mössen med nikotin efter ingreppet, vilket ledde till reducerad smärta och inflammation hos vildtypen, men inte hos mössen med α_5 -mutation (Bagdas *et al.* 2015). Detta innebär att nikotinpreparat med α_5 -subenheten som läkemedelsmål är en viktig framtida kandidat inom smärt- och inflammationsbehandling.

Möjlighet att bota inflammation och akut och kronisk smärta med mambagift

Mambalginer, vilka har isolerats från svart (*Dendroaspis polyepis polyepis*) och grön mamba (*Dendroaspis angusticeps*), och visats ha mycket god effekt vid behandling av inflammation samt akut och kronisk smärta (Diochot *et al.* 2015). Dessa toxiner är peptider som består av 57 aminosyror och verkar genom att inhibera ASIC-kanaler (Diochot *et al.* 2012). Som nämnt tidigare, har ASIC-kanalerna en roll i detektering av pH-förändringar i skelett- och hjärtmuskelvävnad (Fitzpatrick & Mooney 2012) och inflammation leder till sänkt pH-nivå, vilket i sin tur, leder till aktivering av dessa receptorkanaler (Sluka & Gregory 2015).

Hos gnagare har fyra olika subenheter som utgör ASIC-kanalerna identifierats; ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 och ASIC4, där alla subenheter förutom den sistnämnda har detekterats i det centrala nervsystemet (Lin *et al.* 2015). Mambalgin har visats inhibera ASIC1b-innehållande ASIC-kanaler i nociceptorer och därmed minskat inflammation samt akut smärta. Dessutom visade ett experiment utfört av Diochot *et al.* (2012) att toxinet kan injiceras både lokalt och centralt för att uppnå minskad inflammation. Med dessa goda resultat, ville forskarna förstå mambalginernas smärtstillande effekt samt verkningsmekanismer.

I experimentet utfört av Diochot *et al.* (2015), isolerades mambalgin-1 och -3 från *D. polyepis polyepis* och *D. angusticeps*. Utöver detta framställdes mambalgin-1 syntetiskt (sMamb-1) för att avgöra om denna förening hade samma effekt som isolatet. Två typer av experimentdjur skapades; ASIC1a- och ASIC2-knockout-möss. Dessa möss och även vildtypen injicerades med karragenan för att ge upphov till inflammation, varefter något av mambalginpreparaten, morfin eller en bärarlösning injicerades två timmar senare. Resultatet visade att mössen blev mer stimulikänsliga efter injiceringen av karragenan, och att denna effekt minskade vid injicering av samtliga mambalginer. (Diochot *et al.* 2015)

Vidare undersöktes den akuta smärtan vid 43°C och vid mekaniskt stimuli. Här sågs det att effekten på mössens allodeni var beroende av koncentrationen mambalgin, där EC₅₀: 12,7 pmol/mus var den optimala koncentrationen. EC₅₀ är den koncentration av ett läkemedel som krävs för att producera 50 % av den maximala responsen (Rang *et al.* 2016). Dessutom utfördes ett experiment på kronisk smärta, där småsnitt las runt ischiasnerven och mambalginbehandlingen påbörjades två veckor efter denna operation. Även vid detta experiment visades det att smärtan samt inflammationen minskade drastiskt vid injicering av respektive mambalgin. Vid jämförelse av mambalgin-1 och morfin, fann forskarna att dessa preparat har liknade effekt för smärtlindring. Därefter undersöktes det även om mambalginerna hade någon effekt på rörelsemönstret. Detta kunde inte påvisas och därmed uppvisar mambalginerna inte ha någon specificitet för motorneuronerna. Slutligen undersöktes det närmare vilket specificitet respektive mambalgin har för de olika ASIC-subenheterna. Effekten av mambalgin i ASIC1a-knockout-mössen var betydligt lägre än vildtypen, vilket inte gällde för ASIC2-knockout-mössen. Från detta resultat injicerades vildtypsmöss med ett ASIC1b-antisense-RNA, vilket ledde till en förlängd smärtekänslighet, även efter mambalginbehandling. Detta resultat innebär att mambalginerna har specificitet för ASIC1-subenheterna (Diochot *et al.* 2015).

Slutsatsen från detta experiment är att mambalginer är väldigt effektiva som behandling av inflammation samt akut och kronisk smärta. Eftersom mambalginerna varken påverkade känslan eller rörelsemönstret, bör detta toxin vara specifikt för de nociceptiva nerverna (Diochot *et al.* 2015). Utöver detta visade även resultatet att det syntetiskt framställda sMamb-1 var lika effektivt som isolaten och därmed är det lovande för en framtida kostnadseffektiv framställning av detta smärtinhiberande preparat.

Botulinum-toxin A är effektiv i behandlingen av kronisk huvudvärk

Botulinum-toxin A (BoNT/A), vilket är mer känt under dess kommersiella namn, Botox, har uppvisat goda resultat vid behandling av olika former av smärta, så som kronisk huvudvärk och trigeminusneuralgi (Zhang *et al.* 2014). BoNT/A produceras naturligt av den grampositiva bakterien *Clostridium botulinum* och kan orsaka stelkramp om bakterien kommer i kontakt med ett öppet sår. I ett flertal år har BoNT/A använts för att underlätta för

patienter som lider av patologisk muskelhyperaktivitet. Detta sedan toxinet verkar genom att blockera frisättningen av acetylkolin från motorneuronsterminalen till muskelfibrerna, vilket medför att muskelparalys uppstår (Books 1954). Därutöver har det framkommit att BoNT/A även kan blockera signalöverföringen mellan synapser som inte involverar acetylkolin (Popoff & Poulain 2010). En hypotes framförd av Edvison *et al.* (2010) föreslår att BoNT/A inhiberar frisättningen av kalcitonin gen-relaterad peptid (CGRP) samt substans P (SP) från nociceptiva nerver, vilket då medför att smärtsignaleringen inhiberas.

BoNT/A inhiberar signalöverföringen i ett flertal steg; Först genom interaktioner med gangliosider, synaptisk vesikelprotein 2 (SV2) och synaptotagmin, induceras endocytos av BoNT/A. Väl inne i cellen klyver BoNT/A synaptosomal-associerat protein 25 (SNAP-25), vilket medför att lösligt-N-etylmalimid-känslighetsfaktorsfästade proteinreceptor (SNARE)-proteinkomplexet inte kan bildas. Detta i sin tur medför att det inte kan ske en frisättning av neurotransmittorer och därmed, kan ingen signalöverföring ske. (Pantano & Montecucco 2014)

I ett experiment utfört av Zhang *et al.* (2014), behandlades patienter som lider av trigeminusneuralgi med BoNT/A. Denna sjukdom beror av kompression av nervens ursprung i hjärnbryggan (Zhang *et al.* 2014) till följd av tuggning, tal, tandborstning och ansiktsberöring (Headache Classification Subcommittee of the International Headache society 2004). Därmed leder trigeminusneuralgi till korta, men intensiva smärtperioder i ansiktet. Resultatet visade att en behandling med BoNT/A minskade smärtanfallen avsevärt, där effekten från endast en injicering varade över åtta veckor för samtliga behandlade (Zhang *et al.* 2014). Detta är lovande inför framtiden vad gäller behandling av kronisk huvudvärk och trigeminusneuralgi.

Bota kronisk smärta genom genetiskt manipulerade mesenkymala stamceller

Ett experiment utfört av Yu *et al.* (2015) visade goda förutsättningar för möjligheten att behandla patienter som lider av kronisk smärta genom att injicera det dorsala rotgangliet (DRG) med genetiskt manipulerade mesenkymala stamceller. Detta för att kunna generera en ”biologisk pump” av anti-nociceptivbehandling. Att dessa celler injicerades i DRG beror på att tidigare experiment visat att DRG-injiceringen är säkrare vad gäller vävnadsskador samt att behandlingen varit effektivt i fråga om påverkningen av smärtsignaleringen (Fischer *et al.* 2011). I experimentet utvanns mesenkymala stamceller (MSC) från ryggmärgen av möss, varefter de manipulerades genom integrering av plasmider innehållande intensifierande grönfluorescerande protein (EGFP) och/eller gliacellinjehärledd neurotrofisk faktor (GDNF). EGFP användes för att kunna detektera de mesenkymala cellerna efter injiceringen, medan GDNF har en smärtlindrande effekt och således användes för att undersöka huruvida smärtuppfattningen förändrades efter operationen. Framställningen av dessa cellformer resulterade i två former av MSC; EGFP/GDNF-MSC samt EGFP-MSC. Möss blev vidare opererade för att generera perifera nervskador, varefter de manipulerade MSC injicerades i DRG i L4 och L5 (lumbarregionen, kota 4 & 5) (Yu *et al.* 2015).

Några veckor efter operationerna utfördes immunobaserade test för att detektera sekretionen av EGFP och GDNF samt stimuli-tester för att undersöka om smärtuppfattningen förändrades hos mössen. Med hjälp av immunohistokemi (IHC) kunde EGFP detekteras, vilket visade att insättningen av de mesenkymala cellerna var lyckad. Vad gäller de immunobaserade proverna, visade ELISA-prover att sekretionen av GDNF var väldigt effektiv, vilket demonstrerar att denna metod kan tänkas användas som framtidens behandlingsform av kronisk smärta. Dessutom visade dessa metoder att MSC kunde överleva i DRG i ungefär tre

veckor innan de förstördes. Möjliga förklaringar till förstörelsen kan vara oxidativ stress, kemokiner, proapoptotiska faktorer och inflammatoriska responser till följd av nervskadorna (Yu *et al.* 2015).

Slutligen vad gäller smärtuppfattningen, visade resultatet att mössen som blivit injicerade med EGFP/GDNF-MSK upplevde en kraftigt reducerad smärta jämfört med de EGFP-MSK-injicerade mössen. Därför öppnar detta experiment upp för möjligheten att även sätta in gener för uttryck av andra anti-nociceptiva molekyler. Dessa skulle kunna inkludera beta-endorfiner, anti-inflammatoriska peptider och lösliga receptorer anpassade till olika former av kronisk smärta. Tidigare experiment utfört av Garcia *et al.* (2010) och Torsvik *et al.* (2010) visade dock att det kan ske utveckling av tumörer vid behandlingsområdet. Detta kunde inte påvisas i detta experiment, men däremot bildades MSK-knölar hos vissa individer (Yu *et al.* 2015).

Diskussion

Upptäckterna av de mekanismer som ligger till grund för kronisk smärta har bidragit till att nya möjliga behandlingsmetoder med mer specificitet och mindre bieffekter är under utveckling. Den främsta anledningen till att kronisk smärta uppstår är utvecklingen av inflammation till följd av trauman och nerv- och vävnadsskador, där olika immunceller samt gliaceller blir aktiverade (Mika *et al.* 2010). Med dessa resultat, har inhiberingen av gliaceller varit ett självklart forskningsområde. Det går dock att ifrågasätta huruvida inhibering av dessa cellers funktion är en bra idé, då gliaceller uppfyller en sådan viktig funktion för nervsystemet vad gäller strukturellt stöd och skydd och näring för nervceller i både det perifera och centrala nervsystemet (Watkins *et al.* 2007). Därmed är den bästa lösningen att forskningen gällande inhibering av dessa gliaceller är fokuserad på målinriktade läkemedel mot de pro-inflammatoriska molekyler som utsöndras av gliacellerna, alternativt de molekyler som binder och aktiverar A δ - och C-fibrerna. En särskild fördel kan ses med att rikta in sig på inhibering av de pro-inflammatoriska molekyler, då detta skulle förhindra fortsatt vävnadsförstörelse och därmed skulle cirkeln av de positiva feedback-mekanismerna brytas.

Vid inhiberingen av gliacellers C- och A δ -fiberaktiverande molekyler, visade Lefèvre *et al.* (2015) att inhibering av NMDA-receptor-ko-agonisten D-serin genom behandling med DAAO är effektiv vid behandling av neuropatisk smärta. Sedan DAAO endast inaktiverar en molekyl som utsöndras av astrocyter (Schell *et al.* 2015) är denna behandlingsmetod mycket lovande vad gäller specificitet, bieffekter samt toleransutveckling. Detta då användningen inte skulle leda till direkta skador av astrocyter och därmed skulle inte dess viktiga funktioner för nervsystemet förstöras. Samtidigt verkar inte DAAO direkt på NMDA-receptorn och därför finns det inte en risk att det kommer uppstå strukturelländringar av dessa receptorer, vilket då möjligen hade kunnat leda till läkemedelstolernas. Därutöver har den endogena lipidmediatorn PEA upptäckts reglera aktiveringen av glia- och masceller (Skaper *et al.* 2014). Eftersom att PEA produceras naturligt i kroppen, är det möjligt att risken för toxiska effekter minskar, vilket är att föredra. Dessutom är nivåerna av denna lipid i smärtrelaterade områden i hjärnan vid inflammation och smärta (Skaper *et al.* 2014), antagligen inte några negativa bieffekter på hjärnvävnaden med denna behandlingsform.

Kunskapen om de molekylära mekanismer som sker för att inducera smärta, har även lett till att alternativa behandlingsformer undersöks. Dock har många av dessa metoder inte undersökts på människor och det återstår mycket forskning innan det kan konstateras om dessa behandlingsformer har god effekt och om det kan förekomma potentiella bieffekter hos

människor. De behandlingar som har tagits upp i detta arbete och är potentiella i framtidens behandling av kronisk smärta är mambalginer, nikotin, BoNT/A och mer gentekniska metoder, så som mutationer av mesenkymala stamceller.

Vad gäller mambalginer visade Diochot *et al.* (2015) att dessa peptider varken påverkar känslan eller rörelsemönstret och därför bör detta toxin vara specifikt för de nociceptiva nerverna. Utöver detta visade även resultatet att det syntetiskt framställda sMamb-1 var lika effektivt som isolaten och därmed är det lovande för en framtida kostnadseffektiv framställning av detta smärtinhiberande preparat. Detta läkemedelsområde kan uppfattas som optimalt. Dock som nyligen nämnt, har inga kliniska studier på människor påbörjats inom detta område och därmed är det lite för tidigt att förutse om denna metod kommer att användas inom behandling av smärta och inflammation i framtiden. Bland annat bör det undersökas huruvida mambalginerna kan passera blod- och hjärnbarriären och om så är fallet, om dessa toxiner kan orsaka hjärnvävnadsskador. Utöver mambalginer, har ett spindeltoxinet psalmotoxin 1 (PcTx1) isolerats, vilket har bevisats ha en god analgetisk effekt genom att binda som antagonist till ASIC1a- samt ASIC1a/ASIC2b-innehållande kanaler (Escoubas *et al.* 2000). Detta innebär att det finns möjlighet till ett flertal alternativ vad gäller smärtbehandling, samt att dessa upptäckter har lett till en ökad förståelse för vikten av ASIC-medierad smärta.

När det gäller behandling av kronisk smärta med nikotin, bör vissa faktorer beaktas. Även om resultaten av nikotin som smärtbehandling har varit goda (Bagdas *et al.* 2015), kan det inte undvikas att nAChR även existerar i det postsynaptiska autonoma nervsystemet, i nervändarna av α -neuroner (motorneuroner) (Khan *et al.* 2003) samt i belöningssystemet, vilket innebär att behandling med nikotin kan påverka rörelseförmågan och dessutom kan göra patienten beroende av läkemedlet. Därmed kan det anses att ett flertal av de andra potentiella behandlingsformerna som beskrivs i detta arbete är mer lovande som framtida läkemedel.

Det krävs endast en injicering av BoNT/A för att uppnå komplett smärtfrihet i längre än åtta veckor hos patienter som lider av trigeminusneuralgi (Zhang *et al.* 2014). Detta innebär att patienter som lider av vissa kroniska smärtbesvär kan botas väldigt enkelt med ett litet ingrepp, vilket inte kommer kräva alltför frekvent behandling. Dessutom kan inte detta toxin passera genom hjärn- och blodbarriären, vilket innebär att denna behandlingsform inte kan påverka hjärnvävnaden negativt. Problemet som dock kan ses med denna behandlingsform är att botulinum-toxiner omfattar de mest potenta toxinerna och därmed kan vara dödligt vid intravenös injicering av en för hög dos (Hanna 2013). Detta då toxinet förhindrar utsöndringen av acetylkolin från nervändarna av α -neuroner till skelettmuskulaturen (Books 1954), vilket i värsta fall kan leda till att andningen upphör. Därför bör dosering användas med största försiktighet.

Slutligen har en metod involverande genetisk manipulation av mesenkymala celler (MSC), visats ha en god effekt vid behandling av kronisk smärta hos möss (Yu *et al.* 2015). Detta är väldigt lovande inför framtida behandlingar av kronisk smärta, där andra smärtinhiberande komponenter än GDNF skulle kunna användas för att få en målinriktad och lokal behandling av kronisk smärta. Dessa skulle kunna inkludera beta-endorfiner, anti-inflammatoriska peptider och lösliga receptorer, anpassade efter olika former av kronisk smärta (Yu *et al.* 2015). Däremot kan det ske utveckling av tumörer vid behandlingsområdet vid användandet av denna metod (Garcia *et al.* 2010, Torsvik *et al.* 2010). Detta kunde inte påvisas i experimentet utfört av Yu *et al.* (2015), men däremot bildades MSC-knölar hos vissa

individer, vilket naturligtvis är en stark indikator på att fortsatt forskning gällande cellcykeln och -delningen av MSC krävs innan denna behandlingsform börjar testas kliniskt på människor. En annan viktig aspekt som visades i detta experiment var att MSC kunde överleva i DRG i ungefär tre veckor innan cellerna förstördes. Möjliga förklaringar till förstörelsen kan vara oxidativ stress, kemokiner, proapoptotiska faktorer och inflammatoriska responser till följd av nervskadorna. Därmed för att möjliggöra denna behandlingsform hos människor, kommer antagligen de mesenkymala cellerna behöva tas från patientens egen ryggmärg samt att de därefter ska manipuleras och injiceras i DRG. Detta kommer att kräva kirurgiska ingrepp och om denna behandling kommer att krävas var tredje vecka, kan det antas att denna behandlingsmetod kommer att vara alltför omständlig jämfört med de andra metoderna.

Framstegen inom kartläggningen av mekanismerna som ligger till grund för kronisk smärta samt utvecklingen av de potentiella behandlingsmetoderna är ett oerhört viktigt steg för att kunna göra tillvaron mycket bättre för människor som lider av dessa besvär. Forskningen har kommit långt och det kommer bli intressant att följa resultaten som följer de möjliga framtida kliniska undersökningarna.

Tack

Jag vill främst tacka min handledare Anna Rosling och mina återkopplare Luc Lennman och Lina Hansson för de konstruktiva förslag som bidragit till att jag kan stoltsera med detta arbete. Jag vill även tacka Kim Frieberg och Michelle Vahlström för att även om det inte var er skyldighet, har ni noga läst alla mina utkast och bidragit med förbättringsförslag. Slutligen vill jag tacka mina stackars föräldrar, Jan och Eveline Weman, för att ni har läst igenom mina texter och gett förslag på formuleringsförbättringar. Tack.

Referenser

- Brooks, V.B. 1954. The action of botulinum toxin on motor nerve filaments. *Journal of Physiology*, **123**: 501-515
- Castellheim, A *et al.* 2009. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology*, **69**: 479-491
- Diochot, S *et al.* 2012. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature*, **490**: 552-555
- Diochot, S *et al.* 2015. Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, doi 10.1097/j.pain.0000000000000397
- Edvison, L *et al.* 2010. Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: Problems and pitfalls from 30 years of experiment and novel future approaches. *Cephalalgia*, **30**: 761-766
- Escoubas, P *et al.* 2000. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of protongated Na⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 25116-25121
- Fitzpatrick, D & Mooney, R.D. 2012. Pain. Purves, D, Augustine, G.J, Fitzpatrick, D, Hall, W.C, LaMantia, A.S, White, L.E, Mooney, R.D, Platt, M.L (red.). *Neuroscience*, ss 209-225. Sinauer Associates, INC, Sunderland, Massachusetts U.S.A
- Fischer, G *et al.* 2011. Direct injection into the dorsal root ganglion: technical, behavioral, and histological observations. *Journal of Neuroscience Methods*, **199**: 43-55

- Garcia, S *et al.* 2010. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, **316**: 1648-1650
- Gotti, C *et al.* 2009. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology*, **78**: 703-711
- Griffis, C.A *et al.* 2011. Neuroimmune activation and chronic pain. *American Association of Nurse Anesthetists Journal*, **79**: 31-37
- Hanna, P.C. 2013. Biological Agents of Warfare and Terrorism. Susan Rhyner (red.). *Mechanisms of Microbial Disease*, ss 560-571. Wolters Kluwer, Philadelphia.
- Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. 2004. The international Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia*, **24**: 9-160
- Impellizzeri, D *et al.* 2014. Micronized/ultramicronized palmitoylethanolamide displays superior oral efficacy compared to non-micronized palmitoylethanolamide in a rat model of inflammation pain. *Journal of Neuroinflammation*, doi 10.1186/s12974-014-0136-0
- Jang, S *et al.* 2008. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 7534-7539
- Kadetoff, D *et al.* 2012. Evidence of central inflammation in fibromyalgia- Increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of Neuroimmunology*, **242**: 33-38
- Khan, I *et al.* 2003. Nicotinic acetylcholine receptor distribution in relation to spinal neurotransmission pathways. *Journal of Comparative Neurology*, **467**: 44-59
- Latremoliere, A & Woolf, C.J. 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of Pain*, **10**: 2-15
- Léna, C *et al.* 1999. Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptor in the coeruleus neurons. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**: 12126-12131
- Lefèvre, Y *et al.* 2015. Neuropathic pain depends upon D-serine co-activation of spinal NMDA receptors in rats. *Neuroscience Letters*, **603**: 42-47
- Lin, S.H *et al.* 2015. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology*, doi 10.1016/j.neuropharm.2014.12.011
- Mika *et al.* 2010. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in DRG in rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, **165**: 1420-1428
- Niesters, M & Dahan, A. 2012. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for NMDA receptor antagonists in the treatment of chronic neuropathic pain. *Expert Opinion in Drug Metabolism & Toxicology*, **8**: 1409-1417
- Pantano, S & Montecucco, C. 2014. The blockage of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **71**: 793-811
- Piomelli, D & Sasso, O. 2014. Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators. *Nature Neuroscience*, **17**: 164-174
- Popoff, M.R & Poulain, B. 2010. Bacterial toxins and the nervous system: Neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins*, **2**: 683-737
- Rang *et al.* 2016. General principles. Rang, H.P, Ritter, J.M, Flower, R.J, Henderson, G (red.). *Pharmacology*, ss 6-21. Elsevier, Churchill U.K
- Romero-Sandoval, A *et al.* 2008. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Research*, **1219**: 116-126
- Salim, S. 2014. Oxidative stress and psychological disorders. *Current Neuropharmacology*, **12**: 140-147
- Schell, M.J *et al.* 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 3948-3952

- Skaper, S.D *et al.* 2014. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime?. *Immunology*, **141**: 314-327
- Sluka, K.A & Gregory, N.S. 2015. The dichotomized role for acid sensing ion channels in musculoskeletal pain and inflammation. *Neuropharmacology*, **94**: 58-63
- Tai, Y.H *et al.* 2006. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain*, **124**: 77-86
- Tawfik, V.L *et al.* 2007. Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. *Brain Behavior*, **21**: 238-246
- Tobacman, J.K. 2001. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environmental Health Perspective*, **109**: 983-984
- Todd, A.J. 2012. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, **11**: 823-836
- Torsvik, A *et al.* 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflect cross-contamination: putting the research field on track-letter. *Cancer Research*, **70**: 6393-6396
- Tuan *et al.* 2015. Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. *The Journal of Neuroscience*, **35**: 13879-13888
- Watkins *et al.* 2007. Glia as the "bad guys": Implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain, Behavior, and Immunity*, **21**: 131-146
- White, L.E & Hall, W.C. 2012. Lower Motor Neuron Circuits and Motor Control. Purves, D, Augustine, G.J, Fitzpatrick, D, Hall, W.C, LaMantia, A.S, White, L.E, Mooney, R.D, Platt, M.L (red.). *Neuroscience*, ss 353-374. Sinauer Associates, INC, Sunderland, Massachusetts U.S.A
- Yu, H *et al.* 2015. Analgesia for neuropathic pain by dorsal root ganglion transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells: initial results. *Molecular Pain*, doi 10.1186/s12990-015-0002-9
- Zhang *et al.* 2014. Two doses of botulinum toxin type A for the treatment of trigeminal neuralgia. observation of therapeutic effect from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of Headache and Pain*, doi 10.1186/1129-2377-15-65
<http://www.1177.se/Vastra-Gotaland/Fakta-och-rad/Mer-om/Att-leva-med-kronisk-smarta/>.
 Hämtad: 2015-11-02

Bildreferenser

- <http://sylvius.sinauer.com/protected/#/visual-glossary>
 Hämtade: 2016-01-07

Mekanismerna bakom kronisk smärta och framtidens botemedel: etisk bilaga

Hannah Weman

Självständigt arbete i biologi 2015

Djurförsök- en kontroversiell fråga

Användandet av djur i studier är och bör anses som en kontroversiell fråga. Det kommer alltid vara en konflikt mellan försöksdjurs lidande och den viktiga aspekten att framsteg görs inom forskningen för att kunna utveckla nya och förbättrade läkemedel som kan underlätta för patienter som lider av olika sjukdomar. Det kan argumenteras huruvida experiment skulle kunna utföras på människor, men det finns många anledningar till varför vi utför tester på djur och inte på människor. Framförallt anser de flesta människor att vi har ett högre egenvärde än djur, där vår höga kognitiva förmåga är främst värdesatt. Dessutom är detta en ekonomisk och tidsmässig fråga, då människor har en lång generationstid och därmed skulle forskningen gå avsevärt mycket långsammare och dessutom bli mycket dyrare.

Kronisk smärta är ett stort problem i samhället, då det orsakar mycket lidande hos de drabbade, likväl som det är en stor samhällsekonomisk fråga till följd av långtidssjukskrivningar. Därmed är det viktigt att erhålla framsteg inom forskningen för att öka förståelsen för cellulära mekanismer, sedan den ökade kunskapen förhoppningsvis kan leda till bättre mediciner med mer specificitet och mindre bieffekter. Dock måste smärtan och stressen som försöksdjuren utsätts för beaktas och därmed bör alla djurförsök utföras på ett sådant sätt att obehagskänslan minimeras så mycket som möjligt. Om det finns möjlighet att erhålla kunskapen från andra källor än levande djur, bör detta vara det primära alternativet. Dessutom anser jag personligen att tester på djur vad gäller kosmetika och andra kommersiella produkter som endast är till för att uppfylla fåfänga är obefogat. Detta då kosmetiska produkter inte är essentiell för vår livskvalité och därmed medför detta forskningsområde endast onödigt lidande och stress hos försöksdjuren.

De experiment som utförts för att kartlägga smärtmekanismerna samt undersökningen av potentiella läkemedel, innefattar ett flertal tillvägagångssätt; gen-knockout av receptor-subenheter som har visats vara viktiga för induceringen av smärta, operationer för att inducera smärta, injicering av inflammationsinducerande substanser, behandling med de förhoppningsvis smärtinhiberande preparaten och beteendetester för att undersöka smärtförändringar. Smärtuppfattningen uppfyller en viktig funktion och därmed kan det argumenteras hur etiskt det är att påverka detta genom att förstöra gener som kodar för receptor-subenheterna. Vidare bidrar både injicering av de inflammationsinducerande substraten samt operationerna att försöksdjuren utsätts för smärta och stress, vilket ytterligare ökar vid beteendestudierna. Dock som nämnt ovan, är kronisk smärta ett så pass stort samhällsproblem och därför är det absolut nödvändigt att utföra dessa djurförsök. Detta då forskningen bidrar till större kunskap gällande de bakomliggande molekyllära mekanismerna, vilket på sikt kan leda till utvecklingen av mer målspecifika läkemedel. Dessutom var min uppfattning från samtliga experiment att metoderna var genomtänkta och nödvändiga samt att informationen inte hade kunnat erhållas på något annat sätt.

Det är förståeligt att många personer motsäger sig människans utnyttjande av djur för egen vinning. Det går dock inte att undvika det faktum att utan de djurförsök som utförts, hade människans vetskap om de cellulära mekanismerna varit avsevärt mycket lägre än vad den är idag. Detta hade i sin tur resulterat i att många utav de läkemedel som används idag, aldrig

hade utvecklats. I slutändan avgörs vårt förhållningssätt inom denna fråga på vad vi är beredda att utföra för att öka vår förståelse.

I detta arbete har jag använt mig av artiklar som har publicerats i väl ansedda vetenskapliga skrifter, vilket då har varit en indikation på att artiklarna har genomgått en grundlig granskning. Dock är forskningen inom kronisk smärta ett relativt nytt område och många av de artiklar jag läste var de första av sitt slag. Därmed har artiklarna inte hunnit citeras samt att metoderna inte har testats av andra forskningsgrupper. För att kunna få en bra inblick av hur tillförlitlig en artikel i fråga var, kollade jag upp hur inflytelserika tidigare artiklar från samma forskningsgrupp är. Vad gäller de olika redovisade perspektiven, anser jag att jag har haft ett öppet sinne, då jag har presenterat författarnas slutsatser och samtidigt varit kritisk samt gett mitt egna perspektiv på resultatet om jag inte har varit ense. Slutligen anser jag att det tydligt har framgått i min text vad författarna har kommit fram till och vad mina egna åsikter är genom tydliga refereringar.