

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25983> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Swartjes, Maarten

Title: Neuropathic pain and its treatment with ARA 290 and ketamine : overlapping pathways

Issue Date: 2014-06-12

Chapter 10

Samenvatting en conclusie



Samenvatting

Neuropathische pijn is een invaliderende ziekte met een mechanisme dat bestaat uit verschillende "pathways", die uiteindelijk convergeren in het ontstaan en onderhouden van pijn. Karakteristieke symptomen zijn tactiele en koude allodynie: mechanische en thermale stimuli die niet pijnlijk zijn in gezonde individuen, maar als pijnlijk worden door patiënten. Farmacologische behandeling is vaak ontoereikend en gaat gepaard met onverdraagbare bijwerkingen. Nieuwe behandelingen worden ontwikkeld die neuropathische pijn op een effectievere manier kunnen bestrijden, waarvan het uit 11 aminozuren bestaande peptide ARA 290 er een is. Dit peptide afgeleid van erythropoietine (EPO) heeft geen hematopoietische bijwerkingen zoals de aanmaak van erythrocyten, maar het heeft wel anti-inflammatoire eigenschappen en het stimuleert celoverleving en regeneratie van verscheidene soorten weefsel, waaronder zenuwweefsel. In hoofdstuk 2 tot en met 4 hebben we het "sparing nerve injury" voor chronische neuropathische pijn gebruikt om het effect van ARA 290 te testen op gedragsmatig en cellulair niveau na zenuw schade.

In Hoofdstuk 2 beschreven we hoe het SNI model te induceren in de rat om zo chronische neuropathische pijn te genereren en tactiele en koude allodynie te kunnen kwantificeren door een stapsgewijze gedetailleerde beschrijving te geven van de operatie en de gedragsmatige testen. In deze specifieke procedure benaderden we de nervus ischiadicus (de grote bovenbeen zenuw die zorgt voor de motoriek en het gevoel van de achterpoten) door middel van stompe preparatie in plaats van deze te benaderen door een snede te maken in de spier die deze zenuw bedekt, zoals beschreven staat in het originele artikel dat dit model beschrijft, waardoor bijkomende schade beperkt bleef. Vervolgens beschreven we hoe dit model gebruikt kon worden voor het evalueren van neuropathische pijn. Het kwantificeren van tactiele allodynie werd beschreven met het gebruik van een gestandaardiseerde methode van het meten van de terugtrekrespons bij stimulatie van de achterpoot met Semmes-Weinstein monofilamenten. Koude allodynie werd gekwantificeerd door middel van het meten van de terugtrekrespons ten gevolge van een spray aceton op de achterpoot. We lieten zien dat het mogelijk was door middel van het SNI model om langdurig aanwezige neuropathische te induceren, waardoor dit model geschikt was om chronische neuropathische pijn te vervolgen. Tenslotte onderzochten we het effect van ARA 290 op neuropathische pijn, de resultaten werden gepubliceerd als onderdeel van het onderzoeksartikel beschreven in Hoofdstuk 3.

In Hoofdstuk 3 hebben we de effectiviteit van ARA 290 om allodynie na sparing nerve injury te verlichten onderzocht. We vonden dat een doseerschema van 10 dagen waarin 5 toedieningen van 30 µg/kg ARA 290, beginnend 24 uur na de lesie, een langdurige verlichting gaf van zowel tactiele als koude allodynie wanneer dit

werd vergeleken met een placebo behandeling (behandeleffect $P < 0.001$). Dit effect was superieur vergeleken met een 10-daagse behandeling zonder onderhoudsbehandeling. Daarbij vonden we dat het induceren van een unilaterale zenuwlesie resulteerde in een afname van de uit te oefenen kracht op de contra laterale achterpoot (tactiele allodynie). Ook dit effect was verminderd door een behandeling met ARA 290, hetzij met of zonder onderhoudsdosering ($P < 0.001$). Contra laterale koude allodynie werd niet geobserveerd. Vervolgens bestudeerden we het effect van ARA 290 in muizen welke geen β -common-receptor (β cR) hebben, de receptor welke koppelt met de EPO receptor om de weefselbeschermende effecten van EPO te bewerkstelligen. Muizen zonder de β cR ontwikkelden zowel tactiele als koude allodynie na SNI en behandeling met ARA 290 resulteerde niet in de verlichting van neuropathische pijn. ARA 290 bewerkstelligt langdurige verlichting van allodynie door activatie van de β cR. Het verlichtende effect van ARA 290 zou het effect kunnen zijn van de anti-inflammatoire eigenschappen van dit middel, mogelijk binnen het centrale zenuwstelsel. Omdat ARA 290, in tegenstelling tot EPO, geen hematopoietische en cardiovasculaire bijwerkingen vertoont, is dit een veelbelovend middel in de behandeling van perifere neuropathische pijn in mensen.

In Hoofdstuk 4 construeerden we een dosis-respons curve voor de doses 0, 3, 10, 30 en 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARA 290. Dieren behandeld met 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARA 290 vertoonden een snelle toename van tactiele allodynie door SNI, dat werd verminderd door behandeling met 30 ($P = 0.049$) en 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0.001$), durend tot tenminste 20 weken na de operatie. De reductie van koude allodynie was significant tot tenminste 20 weken na de operatie voor alle geteste doses ($P < 0.05$) wanneer vergeleken met 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Het effect van 0, 10 en 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARA 20- toegediend op dag 1, 3, 6, 8 en 10 op microgliose (Iba-1-immunoreactiviteit) en astrocytose (GFAP-immunoreactiviteit) werd onderzocht in dieren die 2 of 20 weken overleefden na de inductie van de lesie of de sham operatie. Na 2 weken overleving was een significante microgliose zichtbaar in ruggenmerg segment L5 van dieren doe 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARA 290 ontvingen ($P < 0.05$), terwijl dieren die behandeld werden met 10 en 30 mg/kg deze microgliose niet toonden. Na 20 weken van overleving werd een uitgebreider en toegenomen microgliose gezien in dieren behandeld met 0 en 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARA 290 vergeleken met sham geopereerde dieren, wat zich openbaarde in een toename van het aantal ruggenmergsegmenten dat microgliose vertoonde en een hogere Iba-1-immunoreactiviteit. Dieren behandeld met 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARA 290 vertoonden deze toename van microgliose niet ($P < 0.05$). Er werd geen veranderingen in GFAP-immunoreactiviteit gezien. Het erythropoietine analoog ARA 290 verminderde dosisafhankelijk allodynie en microgliose in de dorsale hoorn, wat deel is van het werkingsmechanisme van ARA 290 waardoor het verlichting van allodynie na perifere zenuw schade bewerkstelligt.

De eerder genoemde effecten van ARA 290 vertonen een opvallende vergelijking met een meer conventioneel middel dat al meer dan 50 jaar op de markt is en uitgebreid gebruikt is als anestheticum and als analgeticum voor acute pijn: ketamine. In subanesthetische doses is dit middel tevens effectief gebleken in het verlichten van neuropathische pijn met een farmacodynamisch profiel dat zicht uitbreid verder dan de farmacologische halfwaardetijd. De behandeling van ketamine gaat gepaard met psychomimetische bijwerkingen, zoals psychoses, hallucinaties, misselijkheid en braken. Het is onduidelijk echter, of aan het anti-neuropathische pijn effect van ketamine wordt bijgedragen door ketamine zelf, of het actieve metaboliet norketamine. NMDA receptor antagonisten die deze bijwerkingen niet vertonen zijn in ontwikkeling. In Hoofdstuk 5 hebben we 3 NMDA receptor antagonisten vergeleken voor de behandeling van acute en neuropathische pijn, de ernst van de bijwerkingen of de afwezigheid van bijwerkingen.

In Hoofdstuk 5 hebben we de NMDA receptor antagonisten ketamine, norketamine en Traxoprodil onderzocht in een rat model van acute antinocceptie (terugtrek respons van de poot bij hitte stimulatie bij toenemende doses van het geneesmiddel), en een model van chronische neuropathische pijn (spared nerve injury). Bijwerkingen (stereotype gedrag en mate van activiteit) werden gescoord en locomotor functie van de aangedane poot werd onderzocht met behulp van computergestuurde looppatroon analyse. In het chronische pijn model werd de behandeling gestart 7 dagen na de operatie, 3 uur per dag op 5 opeenvolgende dagen. Alle drie de NMDA receptor antagonisten veroorzaakten dosisafhankelijke antinocceptie in het acute pijnmodel en verlichting van tactiele en koude allodynie gedurende 3-6 weken na de behandeling in het chronische pijnmodel ($P < 0.001$). In beide testen was ketamine het meest potent, met norketamine 1,5-2 maal minder potent en Traxoprodil 5-8 maal minder potent dan ketamine. De zenuwlesie veroorzaakte een beperking in het gebruik van de aangedane poot welke niet verbeterde met behandeling (ketamine en Traxoprodil) of slechts een beperkt effect (norketamine voor alle 3 de parameters, $P < 0.05$). Traxoprodil, maar niet ketamine of norketamine toonde een duidelijke scheiding tussen werking en bijwerking. De observatie dat behandeling met Traxoprodil leidt tot een periode van verlichting van chronische pijn die langer duurt dan de behandelingsperiode zelf, zonder bijwerkingen gedurende de behandeling, maakt het een aantrekkelijk alternatief in de behandeling van chronische neuropathische pijn.

Zowel ARA 290 als de NMDA receptor antagonisten ketamine, norketamine en Traxoprodil hebben getoond effectief te zijn in de verlichting van zowel tactiele als koude allodynie in het SNI model. Een relatief korte behandelperiode met beide typen medicatie resulteerde in een langdurige verlichting van allodynie. In Hoofdstuk 6 hebben we de effecten van ARA 290 en ketamine op de expressie van

NMDA receptor subunits en ontstekingsmarkers vergeleken. We vergeleken tevens de effecten op acute en chronische pijn en de bijwerkingen in gelijke behandelings-schema's in het SNI model in zowel wild-type als $\beta\text{CR}^{-/}$ muizen.

In Hoofdstuk 6 onderzochten we de overlappende pathways van ARA 290 and ketamine door de effecten op de mRNA expressie van de NMDA receptor subunits NR1, NR2A en NR2B, ontstekingsmakers Iba-1 (microglia), GFAP (astrocyten) en chemokine (C-C) motif ligand 2 (CCL-2). We vonden dat zowel ketamine als ARA 290 gelijksoortige effecten bewerkstelligden door zowel significant de expressie van mRNA van de NMDA receptor subunits te verminderen als de mRNA expressie van microglia, astrocyten en CCL-2, die allen een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van neuropathische pijn. Hoewel de effecten van ketamine en ARA 290 op neuropathische pijn en diens moleculaire mediators de suggestie wekken van een gezamenlijk mechanisme, werkt ARA 290 specifiek op de "innate repair receptor" (IRR) welke is betrokken bij weefselbescherming en ARA 290 heeft geen interactie met de NMDA receptor. We speculeerden eerder dat de IRR belangrijk zou kunnen zijn in de werking van ketamine op neuropathische pijn. Om dit te onderzoeken hebben we de effecten van ketamine en ARA 290 op acute pijn, bijwerkingen en allodynie in het SNI model in muizen die de β -common-receptor (βCR) missen, een structurele component van de IRR. Ketamine (50 mg/kg) en ARA 290 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) hadden divergente effecten op acute pijn. Ketamine zorgde voor duidelijke antinociceptie ($P < 0.001$ vergeleken met placebo en ARA 290) en psychomotorische bijwerkingen ($P < 0.001$ vergeleken met placebo en ARA 290), terwijl ARA 290 dit niet had, in zowel normale als $\beta\text{CR}^{-/}$ muizen. In tegenstelling, beide middelen waren effectief in het verlichten van allodynie in wildtype muizen ($P = 0.049$ en $P = 0.03$ versus placebo voor respectievelijk ketamine en ARA 290), maar waren niet effectief in muizen zonder de βCR . Samengenomen laten deze resultaten zien dat een intacte IRR nodig is voor een effectieve behandeling van neuropathische pijn met zowel ketamine als ARA 290, maar dat deze receptor niet is betrokken in ketamine's analgetische werking en bijwerkingen.

Pijn is een subjectieve uitkomstmaat die gemeten kan worden met behulp van een numerieke score (numerical rating scale, NRS), of vragenlijsten die specifieke aspecten kunnen meten die gecorreleerd zijn aan, bijvoorbeeld, kleine vezel neuropathie (zoals de kleine vezel neuropathie screening lijst, SFNSL). Doordat deze manieren subjectief zijn, is zo een meting niet volledig betrouwbaar om kleine vezel neuropathie (SFN) te diagnosticeren, vanwege de inter- en intrapersonlijke variabiliteit. Daarom wordt de diagnose kleine vezel neuropathie gesteld met de invasieve methode van intra-epidermale zenuwvezel dichtheid bepaald met (fluorescentie) microscopie, wat de gouden standaard is voor de diagnose van SFN. De huid is echter niet het enige orgaan met oppervlakkige kleine zenuwvezels. De cornea heeft een

hoge dichtheid van kleine zenuwvezels welke onderzocht kunnen worden met de niet-invasieve methode cornea confocale microscopie.

In Hoofdstuk 7 lieten we zien dat cornea confocale microscopie (CCM) een objectieve maat is voor neuropathische pijn in sarcoidose patiënten met symptomen van SFN dat correleert met de symptomen die de patiënten rapporteren. Pijn gemeld door patiënten werd in onderzocht door middel van de "brief pain inventory" (BPI) en gekwantificeerd door middel van "quantitative sensory testing" (QST). De meerderheid (~80%) van de sarcoidose patiënten vertoonden veranderde (>2 standaard deviaties onder het gemiddelde van gezond individuen) voor alle drempelwaarden van de temperatuur drempelwaarden in de QST dat wijst op SFN. Op dit moment is een huidbiopt nodig om verlies van zenuwvezels aan te tonen om tot een diagnose van SFN te komen. Echter, het kwantificeren van IENFD in huidbiopten is een invasief, arbeidsintensief proces dat een lage sensitiviteit heeft om SFN te diagnosticeren en niet correleert met de symptomen die door de patiënten gerapporteerd worden. Als alternatief is CCM een snelle niet invasieve klinische oogheelkundige techniek voor de in vivo beeldvorming van cornea zenuwvezels. CCM toonde dat de gemiddelde cornea zenuwvezeldichtheid (CNFD) en cornea zenuwvezel lengte (CNFL) significant verminderd waren in sarcoidose patiënten vergeleken met gezonde individuen ($P < 0.0001$ voor beide uitkomstmaten). De IENFD was verminderd in sarcoidose patiënten vergeleken met gezonde individuen ($P < 0.0001$). Daarbij vonden we dat CNFD en CNFL, maar niet IENFD, een negatieve correlatie hadden met de pijn interferentie score van het BPI ($P = 0.0005$ en $P = 0.012$). Tenslotte voorspelde een lineair model met de CNFL als afhankelijke variabele accuraat de BPI pijn interferentie ($P < 0.0001$). Deze technologie vergroot de rol van CCM als een surrogaat marker voor zowel zenuwvezel schade als pijn in klinische studies van nieuwe therapieën in sarcoidose en misschien andere kleine vezel neuropathieën.

Uiteindelijk onderzochten we in Hoofdstuk 8 het effect van ARA 290 op het verlies van zenuwvezels en de zenuwvezeldichtheid in de cornea in sarcoidose patiënten in een dubbelblind gerandomiseerde klinische studie. Kleine zenuwvezel verlies en schade (small nerve fiber loss and damage, SNFLD) is een frequente complicatie van sarcoidose welke is geassocieerd met autonome dysfunctie en sensore afwijkingen, inclusief pijnsyndromen, die een negatieve invloed hebben op de kwaliteit van leven. Van SNFLD wordt gedacht dat dit veroorzaakt door een disregulatie van het immuunsysteem, een belangrijke eigenschap van sarcoidose, die hun weerslag hebben op het centrale en perifere zenuwstelsel. De huidige therapie van sarcoidose-gerelateerde SNFLD bestaat in de eerste plaats uit onderdrukking van het zenuwstelsel en symptomatische behandeling, welke vaak niet tot een bevredigend resultaat leidt. Hier tonen we dat een behandeling van 28 dagen met een dagelijkse dosis van subcutaan ARA 290 significant de neuropathische symptomen verbetert

in patiënten met een vastgestelde SNFLD. Met behulp van QST laten we zien dat de temperatuur gevoelige detectiegrenzen (detectiegrens voor koude pijn, $P=0.027$ en detectiegrens voor hittepijn, $P=0.032$) en de temperatuurgevoelszin ($P=0.008$) significant werden verbeterd na behandeling met ARA 290, terwijl deze parameters niet waren veranderd voor placebo behandeling. Patiënt gemelde symptomen verbeterden voor de small fiber neuropathy screening list (SFNSL) welke aanhielden tot 16 weken na het starten van de behandeling ($P=0.037$). De brief pain inventory (BPI) toonde tevens een verbetering van de pijn in de met ARA 290 behandelde groep, maar dit effect verschilde niet van placebo behandelde groep. De BPI pain interference score verschilde significant tijdens de derde week van de dosering tussen de ARA 290 groep en de placebo groep ($P=0.02$). In toevoeging tot de verbeterde patiënt gerapporteerde symptoom gebaseerde uitkomstmaten was de behandeling van ARA 290 geassocieerd met een toename van de kleine vezel dichtheid in de cornea ($P=0.022$ voor ARA 290 in vergelijking met $P=0.462$ voor placebo) en een toegenomen uithoudingsvermogen zoals onderzocht met de 6 minuten looptest (6 minute walk test, 6MWT) op de laatste dag van ARA 290 dosering ($P=0.049$). Gebaseerd op deze resultaten en de resultaten van voorgaande studies blijkt dat ARA 290 een potentieel ziekte modifierend medicijn is voor de behandeling van sarcoidose geassocieerde SNFLD.

Conclusie

De data verzameld in dit proefschrift laat zien dat

- ARA 290 effectief is in het verlichten van neuropathische pijn na zenuw schade en dat dit de β -common-receptor vereist
- Een deel van het mechanisme van het verlichten van neuropathische pijn door ARA 290 wordt bewerkstelligd door suppressie van microgliose in de dorsale hoorn van het ruggenmerg
- Astrocyten zijn niet cruciaal voor neuropathische pijn op 2 en 20 weken post-operatief
- Ketamine, de actieve metaboliet norketamine en het NR2B selectieve N-methyl-D-aspartaat receptor antagonist Traxoprodil zijn effectief in het verlichten van acute en neuropathische pijn
- De NR2B subunit van de N-methyl-D-aspartaat receptor is niet betrokken bij de inductie van bijwerkingen door N-methyl-D-aspartaat antagonisten
- Ketamine en ARA 290 hebben overlappende pathways in de verlichting van neuropathische pijn door suppressie van ruggenmerg inflammatie

- De β -common-receptor is essentieel in de behandeling van neuropathische pijn, maar niet voor acute pijn.
- Sarcoidose patiënten hebben verminderde zenuwvezeldichtheid in de epidermis en de cornea
- Cornea confocaal microscopie, maar niet intra epidermale zenuwvezel dichtheid is gerelateerd aan de symptomen die gerapporteerd worden door sarcoidose patiënten met kleine vezel neuropathie.
- Behandeling van saroidose patiënten met symptomen van kleine vezel neuropathie met ARA 290 resulteert in verbeterde uitkomsten gerelateerd aan pijn
- Behandeling van saroidose patiënten met symptomen van kleine vezel neuropathie met ARA 290 vergroot de zenuwvezeldichtheid in de cornea, maar niet in de epidermis

