

Kesehatan

**LAPORAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
Tahun Anggaran 2009**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PENGHAMBATAN AKTIVITAS *NEURONAL MIGRATING*
FACTOR SEBAGAI UPAYA MENCEGAH TERJADINYA
TOLERANSI ANALGESIK**

Ketua Peneliti:

Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D
Dra. Aniek Setiya Budiatin, MS
DR. Imam Susilo, dr, SpPA

Dibiayai oleh DIPA/APBN Rupiah Murni Tahun Anggaran 2009, Sesuai Dengan
Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor : 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
Oktober 2009**

Kesehatan

LAPORAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
Tahun Anggaran 2009

KK-
KKB
LP.02/10
kho
P



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PENGHAMBATAN AKTIVITAS *NEURONAL MIGRATING*
***FACTOR* SEBAGAI UPAYA MENCEGAH TERJADINYA**
TOLERANSI ANALGESIK

Ketua Peneliti:

Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D
Dra. Aniek Setiya Budiatin, MS
DR. Imam Susilo, dr, SpPA

Dibiayai oleh DIPA/APBN Rupiah Murni Tahun Anggaran 2009, Sesuai Dengan
Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor : 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
Oktober 2009

RINGKASAN DAN SUMMARY**1. Ringkasan****Penghambatan aktivitas *Neuronal Migrating Factor* sebagai upaya mencegah terjadinya toleransi analgesik**

Junaidi Khotib*), Imam Susilo**) dan Aniek Setiya Budiatiin*)

*)Departemen Farmasi Klinik Fakultas Farmasi dan **)Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

Lebih dari 90% penyakit selalu diikuti oleh timbulnya rasa nyeri dan hampir 40% berkembang menjadi nyeri yang bersifat kronik. Di negara maju seperti Amerika dan Inggris, ini menjadi salah satu masalah utama di bidang kesehatan karena menimbulkan penurunan kualitas hidup, biaya pengobatan yang sangat besar dan menyebabkan penurunan produktivitas bagi penderita. Masalah menjadi lebih serius dengan timbulnya toleransi pada penggunaan obat-obat anti nyeri. Penurunan potensi obat-obat anti nyeri poten seperti morfin, fentanil dan oksikodon selalu dihubungkan dengan penurunan sensitifitas reseptor (*desensitization*) dan penurunan jumlah reseptor yang bertanggung jawab untuk mengatasi nyeri seperti reseptor opioid mu, delta dan kappa pada permukaan sel (*down regulation*) dari reseptor.

Beberapa laporan menunjukkan bahwa pemberian opioid jangka lama akan menghasilkan peningkatan ekspresi dan pelepasan *neuronal migrating factor* di spinal cord dan otak, salah satu diantaranya yang paling besar konsentrasinya adalah *reelin*. *Reelin* berikatan dengan reseptor *Apolipoprotein A* akan menghasilkan aktivasi *protein tyrosin kinase* yang terikat pada protein adapter (DAB). Selanjutnya akan mengaktifkan beberapa protein kecil yang termasuk dalam jalur *reelin signaling pathway*. Ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan sintesis protein tertentu, perubahan morfologi sel-sel syaraf, sinaptogenesis dan neuroplastisitas. Dengan demikian *penghambatan jalur reelin signaling pathway* memegang peran yang sangat penting dalam perubahan neuronal system yang diduga berkaitan erat dengan proses pengembangan toleransi obat anti nyeri. Untuk itu pada penelitian ini akan menguji efektivitas berbagai protein dan senyawa yang terlibat dalam *reelin signaling pathway* seperti *reelin*, reseptor Apo E2, Dab-1, K252a dan genistein, *breveldin A* serta *roscovitine* dalam mencegah terjadinya proses desensitisasi reseptor opioid, yang pada akhirnya akan menghambat terjadinya pengembangan toleransi obat-obat anti nyeri opioid.

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL

1. Judul : Penghambatan aktivitas *Neuronal Migrating Factor* sebagai upaya mencegah terjadinya toleransi analgesik
2. Ketua peneliti
- a. Nama : Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 132133960
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : Sekretaris Pusat Pembinaan Karir dan Kewirausahaan
- f. Bidang Keahlian : Farmakologi Molekuler
- g. Fakultas/Jurusan : Farmasi / Farmasi Klinik
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti :

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas / Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Imam Susilo, dr, SpPA(K)	Histopatologi	Kedokteran / Patologi Anatomi	Unair
2	Dra. Aniek Setiya B, MS	Bioanalisis	Farmasi / Farmasi Klinik	Unair

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :

- a. Jangka Waktu penelitian : 1 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 99.700.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 90.000.000,-

Mengetahui,

Dekan Fakultas Farmasi

(Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, MS)

(NIP. 130 809 077)

Surabaya, November 2009

Ketua Peneliti,

(Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D)

(NIP. 132 133 980)

Menyetujui,

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

(Prof. Dr. Bambang Sektiari, DEA, drh)

(NIP. 131 837 004)

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN STATISTIS NASIONAL

1. Judul : Penghambatan aktivitas kromatin dengan menggunakan...
 2. Nama peneliti : ...

- a. Nama : Junaidi Khatib, S.Si, M.Kes, Ph.D.
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 1971123090
- d. Jabatan Fungsional : Doktor Kepala
- e. Jabatan Struktural : Sekretaris Pusat Pembinaan Kerja dan Kesejahteraan
- f. Bidang Keahlian : Farmakologi Zooteknik
- g. Fakultas/Jurusan : Farmasi Farmasi Klinik
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

i. Tim Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Hana Suci, dr. Histopatologi Spesialis	Histopatologi	Patologi Anatomi	Lain
2	Dr. Anis Rizka R. M.S. Parasitologi	Parasitologi	Farmasi Farmasi Klinik	Lain

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

- a. Jangka Waktu penelitian : 1 tahun
- b. Biaya total yang dianggarkan : Rp. 99.700.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 90.000.000,-

Sampaya, November 2009
 Ketua Peneliti
 (Junaidi Khatib, S.Si, M.Kes, Ph.D.)
 NIP. 1971123090

Mengetahui
 Dekan Fakultas Farmasi
 (Prof. Dr. H. H. H. H. H.)
 NIP. 1950809077

Mengetahui
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
 (Prof. Dr. Bambang Sektiar, Dr. A. dkk.)
 NIP. 1951837004

Pemberian subkutan agonis reseptor opioid mu morfin 10 mg/kg pada hewan coba mencit galur Balb-C menghasilkan potensi anti nyeri yang kuat yang diukur baik dengan metode *tail flick test* maupun *hot plate test*. Pemberian berulang sehari sekali selama 7 hari akan menimbulkan penurunan secara bermakna potensi morfin sebagai anti nyeri. Dengan menggunakan pendekatan imunohistokimia, menunjukkan bahwa pemberian morfin secara berulang menghasilkan peningkatan ekspresi reelin di dalam korda spinalis dan beberapa bagian di otak yang memegang peranan penting dalam memberikan respon nyeri.

Pada penelitian ini dilakukan upaya untuk mendapatkan senyawa aktif yang dapat menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin secara kronik dengan menggunakan pendekatan *biological mimicry system* yaitu menggunakan antibodi yang mampu memperangkap secara spesifik protein dalam *reelin signaling pathway* seperti monoclonal antibody reelin, antibody reseptor Apo E2, dan antibody Dab-1. Selain itu juga dievaluasi efektivitas senyawa kimia yang mampu memberikan penghambatan pada jalur *reelin signaling pathway* seperti K252a, genistein, brexeldin A dan roscovitine. Dengan metode *hot plate test* dan *tail flick test*, praperlakuan dengan pemberian antibody reelin atau reseptor Apo E2 dapat menghambat secara sempurna perkembangan toleransi analgesik yang diinduksi dengan pemberian morfin 10 mg sehari sekali selama 7 hari. Demikian juga dengan praperlakuan injeksi K252a secara *intracerebroventricular* (icv) pada dosis 0.1 nmol per mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,12)}=1.57$; $p=0.24$). Pada peningkatan dosis K252a menjadi 1 nmol dapat menghambat secara bermakna terjadinya pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh pemberian morfin secara kronik ($F_{(1,14)}=6.53$; $p=0.02$). Penghambatan mulai terjadi pada hari ke 5 setelah pemberian K252a. Hal yang sama terjadi pada pengamatan dengan metode *tail flick test*, dimana kelompok yang mendapatkan K252a secara icv pada dosis 0.1 nmol/mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menghambat secara bermakna terjadinya toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh pemberian morfin kronik ($F_{(1,12)}=3.35$; $p=0.09$). Sementara kelompok yang mendapatkan K252a pada dosis 1 nmol/mencit menunjukkan efektifitas penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh morfin ($F_{(1,14)}=15.24$; $p=0.002$). Ini menunjukkan bahwa K252a mampu menghambat terjadinya pengembangan toleransi yang ditimbulkan oleh morfin.

Penggunaan *tyrosine kinase inhibitor* yang lain yaitu genistein, juga menghasilkan data yang konsisten. Pengamatan dengan menggunakan *hot plate* menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 10 nmol/mencit secara icv sehari sekali selama 7 hari dapat menghambat secara signifikan terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh penggunaan morfin kronik ($F_{(1,14)}=3.49$; $p=0.02$), sementara pada dosis 1 nmol/mencit tidak memberikan aktivitas

penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri ($F_{(1,15)}=1.58$; $p=0.23$). Pengamatan dengan menggunakan metode tail flick test menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 1 dan 10 nmol/mencit dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,15)}=4.73$; $p=0.05$ untuk dosis 1 nmol dan $F_{(1,14)}=20.35$; $p=0.0005$ untuk dosis 10 nmol). Penghambatan perkembangan toleransi analgesik juga ditimbulkan oleh pemberian inhibitor protein penghantar brevelidin A dan inhibitor Cdk 5 roscovitin.

Berdasarkan data farmakologi dan immunohistokimia diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian senyawa yang dapat menghambat jalur aktivasi *neuronal migrating factor* dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri morfin.

2. Summary

[Background] It has been well established that the administration of morphine produces a powerful antinociception / analgesia. Furthermore, prolonged treatment with morphine results in tolerance to morphine-induced analgesia. Several reports suggested that glutamate receptors, including NMDA receptors, are critical in the development and maintenance of opioid tolerance. Recent advances in cellular and molecular biology have demonstrated that the reelin signaling has been shown to modulate directly on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and to be required for a long-term potentiation induction. Its activation plays a pivotal role for the axonal branching, synaptogenesis and synaptic plasticity in adult brain. Substantial recent work has identified multiple diverse functions for Cdk5, including synaptogenesis, axonal targeting, development of neurodegenerative diseases and neuronal cytoskeletal dynamics. Interestingly, it has been proposed that a functional relationship of reelin- and Cdk5-dependent signaling pathways shows some similarities to regulate neuronal migration and synaptic plasticity.

[Objective] In the present study, we therefore investigated whether the reelin signaling pathways in the adult brain could be involved in the development of the tolerance to morphine-induced analgesia.

[Method] To investigate the development of antinociceptive tolerance following repeated treatment with morphine, mice were repeatedly s.c. injected with morphine (10 mg/kg) or saline (10 ml/kg) once a day for 7 consecutive days. The morphine-induced antinociceptive response was evaluated by the hot-plate test and the tail-flick test. To investigate the role of reelin signaling pathway in the development of tolerance to morphine-induced antinociception, groups of mice were treated with their inhibitors or vehicle 30 min before every morphine treatment. The immunohistochemistry method was performed to study the change of protein that involved

in the reelin signaling pathway.

[Result] Here, we show that repeated intracerebroventricular administration with the monoclonal antibody to reelin, the competitive inhibitor of reelin, apolipoprotein receptor E2 recombinant, and a disabled1 (Dab1) protein inhibitor, N-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-leucyl-N-[(1S)-1-formyl-3-methylbutyl]-L leucinamide (MG132), caused the apparent inhibition of the development of antinociceptive tolerance to morphine. Interestingly, the immunoreactivity (IR) for phosphorylated-Dab1 in the thalamus was significantly increased by repeated in vivo treatment with morphine, which was colocalized with reelin-IR. In addition, the development of antinociceptive tolerance to morphine was blocked by repeated pretreatment with the tyrosine kinase inhibitors, K252a and genistein. Furthermore, the Golgi trafficking inhibitor, brefeldin A, and the selective Cdk5 inhibitor, roscovitine partially but significantly attenuated the development of antinociceptive tolerance induced by morphine.

[Conclusion] Taken together, these findings support the idea that sustained activation of the reelin signaling in the mouse brain following repeated treatment with morphine may be responsible for the development of tolerance to morphine-induced antinociception.

Key words:

Morphine tolerance, Neuronal plasticity, Opioid receptor, Reelin signaling pathway

PRAKATA

Saya panjatkan puji syukur kehadirat Alloh swt atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian hibah strategis nasional beserta laporan dapat terselesaikan dengan baik. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan kesempatan dan pendanaan untuk melakukan seluruh aktivitas penelitian ini.

Dengan terselesaikannya laporan penelitian ini, saya juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada:

1. Ketua Departemen Farmasi Klinis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Ketua Departemen Histopatologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas segala bantuan dan perkenannya untuk menggunakan fasilitas yang ada di kedua departemen sehingga penelitian ini dapat diselesaikan sesuai dengan rencana. Demikian juga dengan bimbingan, masukan dan saran yang sangat bernilai demi peningkatan kualitas penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas perijinan dan penggunaan segala fasilitas di Fakultas Farmasi untuk pelaksanaan penelitian ini.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga atas segala kesempatan dan kepercayaan pemberian dana untuk pelaksanaan p penelitian ini.
4. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk pelaksanaan penelitian.
5. Fajriatul Fitriyah, Irma Hidayatul Rahmi, Siska Herwinda, Rennie Puspa Novita, Ruruh Enggar Sayekti, dan Sofiati Diah Basuni atas bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian ini.

Kami juga berterima kasih pada seluruh anggota Tim Peneliti atas kerjasamanya selama ini dan diskusi yang bersifat membangun sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik sesuai dengan rencana. Demikian juga teknisi laboratorium yang selalu menyediakan tenaga setiap saat dalam pelaksanaan penelitian ini. Akhirnya, saya berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat dan mohon maaf yang sebesar-besarnya jika ada kesalahan ataupun kekurangan.

Hormat kami,
Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN DAN SUMMARY	3
PRAKATA.....	7
DAFTAR ISI.....	8
DAFTAR GAMBAR.....	9
DAFTAR SINGKATAN.....	12
BAB I. PENDAHULUAN.....	13
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	17
BAB III METODE PENELITIAN.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 . Struktur kimia Brefeldin A	19
Gambar 2.2 . Struktur kimia Roscovitin	20
Gambar 2.3. Struktur kimia K252a	20
Gambar 2.4. Struktur kimia Genistein	21
Gambar 3.1. Skema penelitian	23
Gambar 4.1 : Ekspresi reelin pada lumbar 5 korda spinalis mencit dewasa. Skala 100 μm and 50 μm	28
Gambar 4.2. Ekspresi reelin pada thalamus (A), cortex (B) and PAG (C). Skala A and B: 100 μm ; C, A ¹ , A ² and B ¹ : 50 μm and C ² : 10 μm . VPL: ventroposterior lateral thalamus nuclei, VPM: ventroposterior medial thalamus nuclei, CG:cyngulate gyrus; PAG: periaqueductal gray.	29
Gambar 4.3. Ekspresi reelin dan DAB-1 pada thalamus (A), cortex (B) and PAG (C). Skala A and B: 100 μm	30
Gambar 4.4. Efek praperlakuan monoclonal antibody reelin (A-B) atau inhibitor reelin yang bersifat kompetitif apolipoprotein E ₂ (C,D) pada pengembangan toleransi yang diinduksi oleh morfin. Kelompok mencit mendapatkan induksi secara berulang monoclonal antibody reelin (1:1000, ○ ; 1:300, ■ ; 1:100, ●), Apo E ₂ (1:1000, ○ ; 1:500, ■ : 1:100, ●) or normal salin (□). Efek analgesic diukur dengan menggunakan metode tail flick test (A,C) dan hot plate test (B,D). Semua nilai ditunjukkan dengan rata-rata \pm SEM dari 8-9 mencit. *p<0.05 dan ***p<0.001 vs pemberian morfin secara kronik.	32
Gambar 4.5. Efek praperlakuan MG 132 (A,B) pada perkembangan toleransi analgesia morfin. Kelompok mencit diberikan MG 132 secara icv (1 nmol/mouse, ○; 20 nmol/mouse, ■; 20 nmol/mouse, ●), K252a	

Inmo/mouse (■), genistein (1 nmol/mouse, O; 1:100, ●) or normal saline (□). Antinosisseptif dievaluasi dengan tail flick test (A) dan hot plate test (B). Masing-masing nilai menggambarkan rata-rata \pm SEM dari 8-9 ekor mencit. * $p < 0.05$ dan *** $p < 0.001$ vs pemberian morfin pada dosis 10 mg secara kronik. 34

Gambar 4.6. Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *hot plate test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,12)} = 1.57$; $p = 0.24$) dan ^s menunjukkan ($F_{(1,14)} = 6.53$; $p = 0.02$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p < 0.05$ dan ** menunjukkan $p < 0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. 36

Gambar 4.7. Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *tail flick test*. Tanda ^z menunjukkan ($F_{(1,12)} = 3.35$; $p = 0.09$) dan ^s menunjukkan ($F_{(1,14)} = 15.24$; $p < 0.002$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p < 0.05$ dan ** menunjukkan $p < 0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. 37

Gambar 4.8. Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *hot plate test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,15)} = 1.58$; $p = 0.23$) dan ^s menunjukkan ($F_{(1,14)} = 3.49$; $p = 0.02$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p < 0.05$ dan ** menunjukkan $p < 0.001$ dibandingkan

dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. 39

Gambar 4.9. Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *tail flick test*. Tanda [#] menunjukkan ($F_{(1,15)} = 4.73; p=0.05$) dan ⁵ menunjukkan ($F_{(1,14)} = 20.36; p=0.0005$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. 40

Figure 4.10. Efek praperlakuan inhibitor protein pengantar brevelidin A (A,B) atau inhibitor Cdk5 roscovitine (C,D) pada pengembangan toleransi analgesia morfin. Kelompok mencit diberikan brevelidin A secara icv (0.1 nmol/mouse, ○; 1 nmol/mouse, ■; 10 nmol/mouse, ●) roscovitine at 30 nmol/mouse (■) or saline-morphine treatment (□). Efek analgesic diukur dengan menggunakan tail flick test (A,C) dan hot plate test (B,D). Masing-masing nilai berupa rata-rata ± SEM dari 8-9 ekor mencit. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs pemberian morfin pada dosis 10 mg secara kronik. 41

DAFTAR SINGKATAN

i.c.v, intracerebroventricular;

IR, immunoreactivity;

K252a, (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11, 12-hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i] [1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid methyl ester;

MG 132, N-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-leucyl-N-[(1S)-1-formyl-3-methylbutyl]-L-leucinamide,

PAG, periaqueductal gray;

s.c., subcutaneous.

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Lebih dari 90% penyakit selalu diikuti oleh timbulnya rasa nyeri. Dari kasus tersebut hampir 40% berkembang menjadi nyeri yang bersifat kronik. Di negara maju seperti Amerika dan Inggris, ini menjadi salah satu masalah utama di bidang kesehatan karena menimbulkan penurunan kualitas hidup, biaya pengobatan yang sangat besar dan menyebabkan penurunan produktivitas bagi penderita (Bowsher, 1991; Von Kroff *et al*, 1990).

Masalah menjadi lebih serius dengan timbulnya toleransi pada penggunaan obat-obat anti nyeri. Penurunan potensi obat-obat anti nyeri poten seperti morfin, fentanil dan oksikodon selalu dihubungkan dengan penurunan jumlah reseptor, desensitisasi reseptor dan terjadinya *down regulation* reseptor yang bertanggung jawab untuk mengatasi nyeri seperti reseptor opioid mu, delta dan kappa (Lefkowitz, 1998; Zastrow, 2001; Tanowitz and Zastrow, 2002; Khotib *et al*, 2004). Untuk menghindari penurunan potensi analgesik seperti opioid, WHO pada tahun 1986 mengatur pemakaian obat anti nyeri opioid seperti dimana opioid hanya digunakan bila penggunaan obat anti nyeri non steroid tidak mampu menghilangkan rasa nyeri seperti pada nyeri kanker, nyeri luka bakar, nyeri diabetik neuropati dan nyeri akibat herpes (WHO, 1986).

Penelitian tingkat molekuler menyatakan bahwa aktivasi reseptor opioid akan dilanjutkan fosforilasi pada protein G oleh GRK2. Protein G akan pecah menjadi 2 bagian, dimana bagian pertama akan mengatur pembukaan dan penutupan saluran ion, sedangkan bagian yang lain akan memfasilitasi terjadinya internalisasi. Sejumlah protein kecil terlibat

dalam penghantaran signal dan proses internalisasi. Beberapa gugus dalam protein kecil seperti tirosin, treonin dan serin merupakan bagian yang sangat menentukan dalam proses aktivasi. Pada penggunaan obat anti nyeri opioid jangka lama menunjukkan bahwa jumlah sejumlah gugus yang terfosforilasi meningkat secara bermakna (Lefkowitz, 1998; Zastrow, 2001; Tanowitz and Zastrow, 2002).

Penurunan aktivitas analgesik poten seperti morfin, fentanil dan oksikodon selalu dihubungkan dengan penurunan sensitifitas reseptor (*desensitization*) dan penurunan jumlah reseptor yang bertanggung jawab dalam mengatasi nyeri pada permukaan sel (*down regulation*). Selain itu, dilaporkan bahwa pemberian opioid jangka lama menghasilkan ekspresi atau aktivitas *neuronal migrating factor* yang berlebihan. *Neuronal migrating factor* merupakan protein yang bertanggung jawab terhadap migrasi atau pengaturan bentuk dan struktur otak termasuk susunan sel syaraf dan astroglia. Beberapa protein yang termasuk dalam jalur *neuronal migrating factor* adalah reelin, DAB-1, trafficking protein, cyclin dependent kinase dan lain-lain. Ikatan *reelin* dengan reseptor *Apolipoprotein A* akan menghasilkan aktivasi *protein tyrosin kinase* yang terikat pada protein adapter (DAB). Selanjutnya akan mengaktifkan beberapa protein kecil yang termasuk dalam jalur *reelin signaling pathway*. Ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan sintesis protein tertentu, perubahan morfologi sel-sel syaraf, sinaptogenesis dan neuroplastisitas (Quattrocchi *et al*, 2002; Sanada *et al*, 2004; Morimura *et al*, 2005; Khotib *et al*, 2005). Oleh karena itu jalur *neuronal migrating factor* memegang peran yang sangat penting pada proses pengembangan toleransi obat anti nyeri. Untuk itu pada penelitian ini akan diuji peran *neuronal migrating factor* pada perkembangan toleransi analgesik poten seperti morfin dan mengevaluasi efektivitas penghambatan jalur aktivasi *neuronal migrating factor* dengan beberapa antibodi

yang mampu menginaktivasi jalur *neuronal migrating factor* dan senyawa lain seperti MG 132 (DAB-1 inhibitor), K252a dan genistein (tyrosin kinase inhibitor), breveldin A (trafficking inhibitor) dan Roscovitin (Cdk5 inhibitor) sebagai senyawa penghambat perkembangan toleransi analgesik morfin.

1.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini mempunyai beberapa tujuan antara lain :

- (1). Mempelajari mekanisme molekular dari *neuronal migrating factor* yang mendasari perkembangan toleransi analgesik.
- (2). Mempelajari efektivitas senyawa-senyawa yang dapat menghambat aktivitas jalur *neuronal migrating factor* dalam menghambat pengembangan toleransi analgesik.
- (3). Mengembangkan senyawa-senyawa penghambat jalur *neuronal migrating factor* seperti antibodi reelin, antibodi DAB-1, K252a, genistin, roscovitin dan MG 132 sebagai obat yang mampu menghambat perkembangan toleransi analgesik

1.3. Manfaat Penelitian

Penelitian ini akan memberikan manfaat :

- (1). Dengan mengetahui mekanisme yang mendasari terjadinya pengembangan toleransi obat-obat anti nyeri opioid maka akan didapatkan suatu metode yang efektif, efisiensi dan aman dalam menangani penurunan potensi analgesik.
- (2). Bukti dasar ini diharapkan akan menyumbangkan kemajuan dibidang farmasi dan kedokteran tentang dalam mencegah terjadinya penurunan potensi obat nyeri sehingga menjamin penggunaan obat-obat tepat sasaran, meningkatkan kecepatan proses

penyembuhan dan penurunan tingkat kesakitan serta peningkatan kualitas hidup penderita.

- (3). Pencegahan terjadinya toleransi obat-obat anti nyeri akan dapat menurunkan biaya penggunaan obat, yang pada akhirnya akan berdampak pada peningkatan kesejahteraan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Nyeri

Secara alamiah rasa nyeri baik yang bersifat akut maupun kronik merupakan konsekuensi dari kerusakan jaringan (Garry *et al*, 2004). Intensitas rasa nyeri sangat tergantung pada tingkat kerusakan jaringan, jenis jaringan yang rusak dan pengalaman emosional (Sneddon, 2004). Rangsangan panas, kimiawi ataupun fisik yang mengenai permukaan tubuh akan mengaktifkan reseptor nyeri. Informasi ini akan diteruskan ke permukaan dorsal horn spinal cord melalui serabut syaraf primer aferen A α dan C. Syaraf pada dorsal horn spinal cord akan menyampaikan informasi ini ke otak terutama brainstem, midbrain dan thalamus melalui jalur *ascending* untuk memberikan arti dan respon dari rangsangan tersebut (Garry *et al*, 2004; Djouhri dan Lawson, 2004; Clark dan Harris, 2004; Morris *et al*, 2004).

Penelitian di negara-negara maju menunjukkan bahwa hampir 90 % orang yang mempunyai masalah kesehatan selalu diikuti dengan gejala nyeri dan 40 % akan berkembang menjadi nyeri kronik. Ini merupakan masalah yang kompleks karena pemerintah akan terbebani biaya perawatan yang tidak sedikit dan akan terjadi penurunan produktifitas masyarakat (Bowsher, 1991; Von Kroff *et al*, 1990). Untuk mengatasi itu, sejak tahun 2001 di Amerika telah dicanangkan program "*Decade of Pain Control and Research*" yang bertujuan untuk mendapatkan strategi pengobatan pain secara aman, efektif dan efisien (Harden, 2005).

Kesamaan pada tingkat prevalensi, mekanisme yang mendasari dan konsekuensi potensial nyeri antara data klinik pada manusia dan data laboratorium pada hewan maka

memungkinkan penelitian menggunakan model hewan untuk mempelajari nyeri pada manusia (Handwerker, 1987).

2.2. Toleransi Analgesik Opioid

Terjadinya toleransi dan ketergantungan fisik setelah penggunaan berulang merupakan gambaran spesifik obat-obat opioid. Kemungkinan untuk terjadinya toleransi tersebut merupakan salah satu alasan utama untuk membatasi penggunaannya. Secara molekular penggunaan jangka pendek obat-obat opioid, reseptor opioid akan mengalami fosforilasi dan internalisasi. Setelah obat terlepas dari ikatan kompleks obat-reseptor maka reseptor tersebut akan disisipkan kembali ke membran sel. Reseptor ini akan tetap mempunyai fungsi seperti semula. Sementara, pada pemakaian jangka panjang atau berulang, reseptor opioid akan mengalami proses internalisasi dan dilanjutkan desensitisasi (Khotib *et al*, 2004). Sebagian reseptor mengalami penghancuran di dalam sitosol oleh enzim tertentu. Ini sebenarnya merupakan mekanisme sel untuk menjaga homeostasis akibat adanya pemaparan bahan asing.

2.3. Keterlibatan *Neuronal Migrating Factor* Dalam Toleransi Analgesik

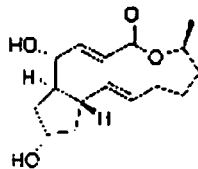
a. MG 132

MG 132 merupakan senyawa penghambat proteasom yang poten dan bersifat selektif. Inaktivasi proteasom akan menyebabkan penghambatan aktivitas DAP-1 yang merupakan protein adaptor dalam menyampaikan pesan yang dibawa oleh ikatan antara *neuronal migrating factor* (reelin) dengan reseptornya. Ikatan antara

reelin pada reseptor apoE akan menyebabkan peningkatan fosforilasi DAP-1. Selanjutnya akan menyebabkan aktivasi jalur neuronal migrating factor. Secara kimiawi MG 132 mempunyai struktur $C_{26}H_{41}N_3O_5$ atau Z-Leu-Leu-Leu-aldehyde dengan adanya hambat $K_i = 4 \text{ nM}$

b. Brefeldin A

Senyawa merupakan antibiotik dengan inti lakton yang dihasilkan oleh organisme *Eupenicillium brefeldianum* yang mampu menghambat trafficking informasi dari permukaan membran ke sitosol. Brefeldin A mempunyai rumus molekul $C_{16}H_{24}O_4$



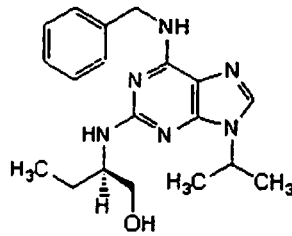
Gambar 2.1 . Struktur kimia Brefeldin A

Brefeldin A berinteraksi dengan protein transport yang bersifat anterograde dari retikulum endoplasma ke aparatus golgi yang berakibat terjadi penumpukkan protein pembawa informasi di sekitar retikulum endoplasma. Ini mengakibatkan informasi yang seharusnya dibawa ke inti tidak akan sampai.

c. Roscovitin

Roscovitin merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{19}H_{26}N_6O$ (2-(R)-(1-Ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine) yang memiliki potensi melalui penghambatan spesifik pada aktivitas cyclin dependent kinase (Cdk).

Inhibisi Cdk ini akan menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas transkripsi pada nukleus.



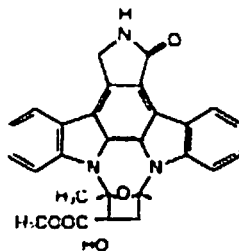
Gambar 2.2 . Struktur kimia Roscovitin

2.4 Peran Tyrosine Kinase Inhibitor

Protein tyrosine kinase merupakan domain protein yang dapat mengalami fosforilasi atau fosfatasi oleh enzim-enzim tertentu. Fosforilasi atau fosfatasi ini akan mempunyai arti yang penting dalam mengaktifkan protein-protein yang terlibat dalam jalur penghantaran signal. Bahan-bahan yang menghambat fosforilasi *tyrosine kinase* antara lain K252a dan genistein.

d. K252a

K252a merupakan alkaloid yang diisolasi dari jamur tanah *Nocardioopsis sp.* mempunyai struktur kimia:

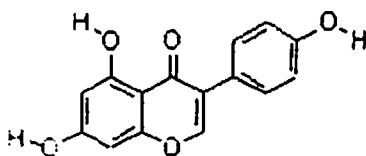


Gambar 2.3. Struktur kimia K252a

Mampu melindungi fosforilasi gugus tirosin dari suatu reseptor. Konsentrasi penghambatan efektif adalah 1.7 nM. K252a mampu menghambat aktivitas tirosin kinase yang terikat pada DAB-1 yang merupakan protein yang berfungsi sebagai starter pada aktivasi jalur *neuronal migrating factor*.

e. Genistein

Genistein merupakan isoflavon yang berasal dari kedelai mempunyai struktur sebagai berikut :



Gambar 2.4. Struktur kimia Genistein

Daya hambat fosforilasi pada gugus tirosin oleh enzim *phosphorylase kinase* adalah 2.6 nM. Genistein mampu menghambat aktivitas tirosin kinase pada PTI/PTB domain yang terikat pada DAB-1 yang merupakan protein yang berfungsi sebagai starter pada aktivasi jalur *neuronal migrating factor*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan kimia yang diperlukan untuk penelitian ini adalah:

- Morfin (Kimia Farma, Pharmaceutical Grade)
- Antibodi reelin dan DAB-1 (Cell signaling, Bioanalytical grade)
- Apolipoprotein E2 (Sigma, Analytical grade)
- K252a (Tocris Cookson LTD, Analytical grade)
- Brefeldin A (Calbiochem, Analytical grade)
- Roscovitin (Calbiochem, Analytical grade)
- MG 132 (Tocris Cookson LTD, Analytical grade)
- Genistein (Tocris Cookson LTD, Analytical grade)
- Aquades

3.2 Alat Penelitian

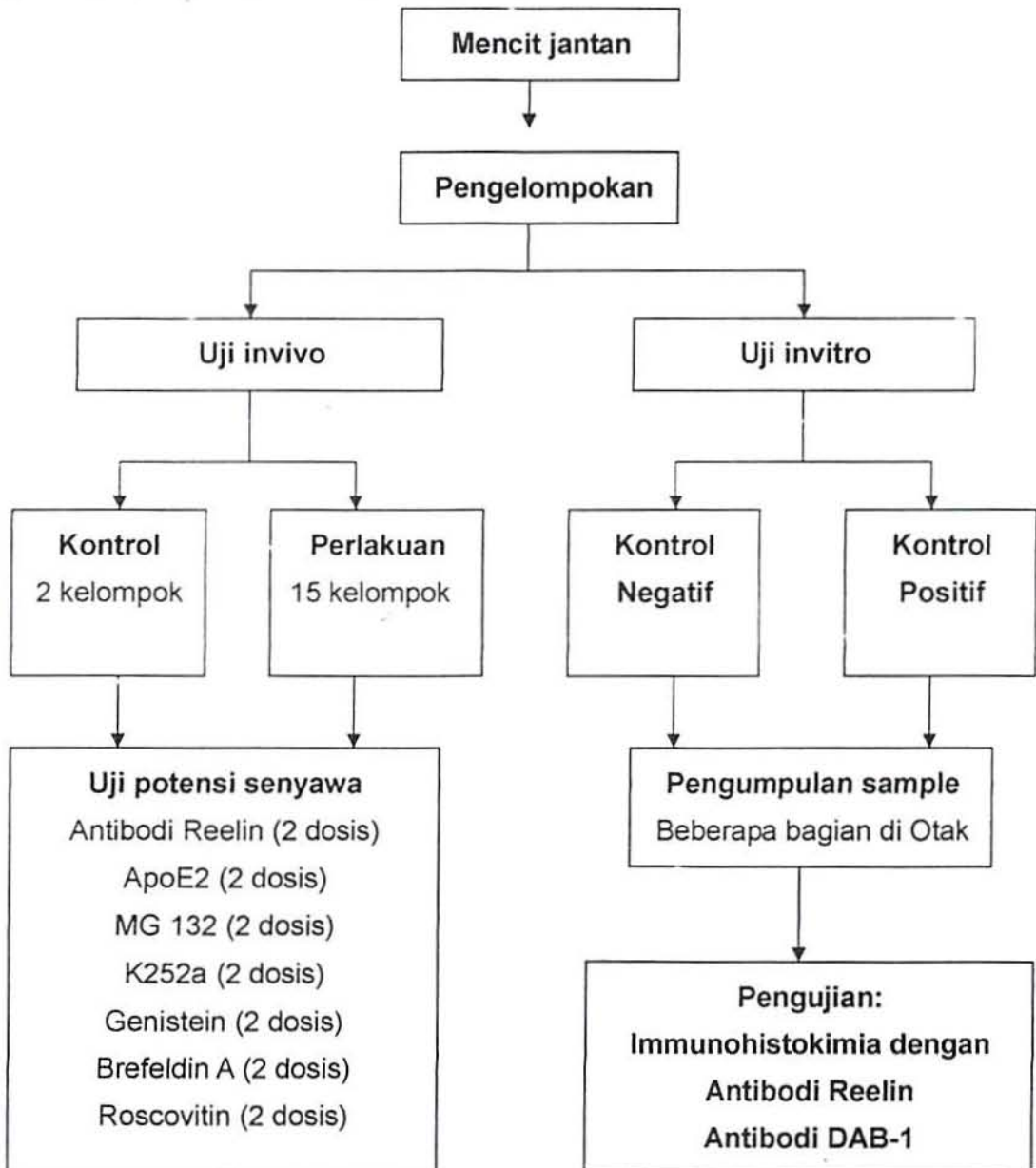
Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah :

- Mikroskop konvokal dan inverted (Olympus)
- Microtom
- *Animal fixation*
- Jarum suntik 26 G
- Socorec micropipet
- Pipet tip
- Kandang mencit

- *Hot plate analgesia meter* (Ugo Basile)
- *Tail flick analgesia meter* (Ugo Basile)

3.3 Hewan Percobaan dan Pengelompokan

Pada penelitian ini menggunakan hewan coba mencit jantan galur balB/c berumur 10 minggu dengan pengelompokan seperti pada diagram berikut:



Gambar 3.1. Skema penelitian

3.3. Membuat Model Toleransi Analgesik Nyeri Pada Mencit

Mencit jantan galur Balb-C (Pusvetmal, Surabaya) berumur 10 minggu ditempatkan secara berkelompok (6 ekor tiap kelompok) dalam kandang dengan temperatur ruangan $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai 6:00 am sampai 18:00 pm). Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman dijaga dalam jumlah yang cukup. Setelah 1 minggu adaptasi, mencit diinjeksi secara sub kutan dengan morfin 10 mg/kg setiap hari selama 7 hari untuk menginduksi terjadinya toleransi obat-obat anti nyeri. Untuk kontrol negatif 1 kelompok mencit hanya diinjeksi dengan larutan salin.

3.4. Pengujian Toleransi Analgesik Pada Mencit

Tiga puluh menit setelah injeksi morfin 10 mg/kg, potensi anti nyeri morfin ditentukan dengan metode *hot plate test* dan *tail flick test*. Pengujian dilakukan pada hari ke 0, 1, 3, 5 dan 7. Potensi anti nyeri dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ anti nyeri} = \frac{\text{Waktu ketahanan } test - \text{Waktu ketahanan } pre-test}{\text{Waktu } cut-off - \text{Waktu penarikan pada } pre-test} \times 100\%$$

Untuk mencegah kerusakan jaringan, ditetapkan cut-off untuk *hot plate test* dan *tail flick test* masing-masing adalah 30 detik dan 15 detik.

3.5. Pengujian Efektivitas Jalur *Neuronal Migrating Factor* Dalam Menghambat Terjadinya Toleransi Analgesik Opioid

Antibodi reelin, apo E2, MG 132, K252a, genistein, breveldin A atau roscovitin diberikan dengan dua dosis 0.1 dan 10 nmol/mencit secara *intracerebroventricular* (icv) 30 menit sebelum injeksi morfin 10 mg/kg. 30 menit setelah pemberian morfin efek anti nyeri ditentukan pada hari 0, 1, 3, 5 dan 7.

3.6. Preparasi Otak Dan Spinal Cord Untuk Pemeriksaan Histologi

Mencit di anestesi dengan eter dan kemudian dibunuh. Otak diambil serta difiksasi dengan menggunakan dapar formalin pH 7.4. Setelah itu jaringan di *embedding* dalam parafin dan diiris dengan mikrotom sesuai dengan metode tertentu setebal 8 μ m. Irisan otak diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin eosin.

3.7. Mengukur Perubahan Aktivitas Jalur *Neuronal Migrating Factor* Dengan Immunohistokimia.

Setelah terjadi toleransi analgesia akibat injeksi kronik morfin 10 mg/kg, mencit dianestesi dengan Na pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) dan diperfusi secara intracardia dengan 4 % paraformaldehida dalam 0.1M bufer fosfat yang mengandung 0.9% NaCl (phosphate-buffered saline / PBS, pH 7.4). Setelah perfusi, otak diambil secara cepat dan di post-fixed dalam 4 % paraformaldehida selama 2 jam, selanjutnya dalam 20 % sukrosa dalam 0.1M PBS untuk 1 hari dan 30 % sukrosa dalam 0.1M PBS untuk 2 hari dengan pengocokan yang baik. Jaringan kemudian dibekukan dalam *embedding compound* (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan). Jaringan beku di potong dengan criostat (Leica CM

1510, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) dengan ketebalan 8 μ m. *Slice* diblok dengan 10 % normal goat serum (NGS) dalam 0.01M PBS selama 1 jam pada temperatur kamar. Masing-masing antibodi (antibodi reelin dan DAB-1) diencerkan dengan dalam 0.01 M PBS yang mengandung 10 % NGS diinkubasi selama 2 hari pada 4°C. Sampel kemudian dicuci dengan PBS dan diinkubasi dengan antibodi skunder yang berkonjugasi dengan Alexa 488 dan Alexa 546 selama 2 jam pada temperatur kamar. Slide kemudian ditutup dengan gelas penutup dengan PermaFluor Aqueous mounting medium (ImmunonTM; ThermoShandon, Pittsburgh, PA, USA). Semua potongan diamati dibawah confocal mikroskop (Olympus BX-80; Olympus) dan difoto dengan digital camera (CoolSNAP HQ; Olympus).

3.8. Analisis Statistik

Efektivitas penghambatan pengembangan toleransi obat anti nyeri morfin oleh jalur *neuronal migrating factor* (MG132, K252a, genistein, brefeldin A dan roscovitin) dibandingkan dengan kontrol negatif (hanya mendapat salin) dan kontrol positif (hanya mendapat morfin) diuji dengan anova. Jika ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan uji Bunferroni/Dunn.

BAB IV

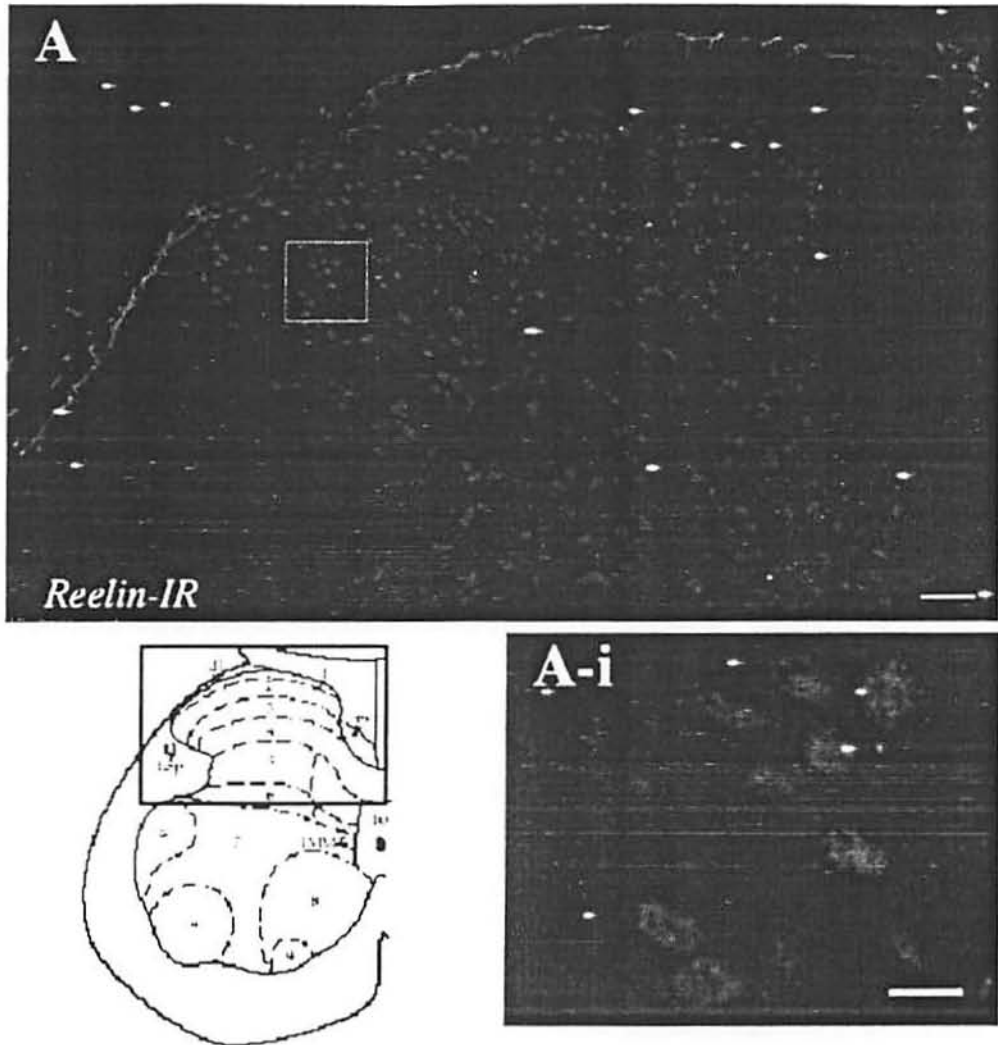
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pemberian subkutan agonis reseptor opioid mu morfin 10 mg/kg pada hewan coba mencit galur balb/C menghasilkan potensi anti nyeri yang kuat yang diukur baik dengan metode *tail flick test* maupun *hot plate test*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian berulang sehari sekali selama 7 hari akan menimbulkan penurunan secara bermakna potensi anti nyeri obat-obat tersebut. Penurunan secara bermakna terjadi mulai pada hari ke 5. Ini menunjukkan bahwa stimulasi reseptor opioid dengan agonisnya secara kronik mengakibatkan desensitisasi reseptor tersebut. Selanjutnya reseptor tersebut mengalami internalisasi dimana reseptor yang berada pada membran sel akan dibawa masuk ke dalam sitoplasma dan akhirnya dihancurkan. Dengan demikian akan terjadi *down-regulation* dari reseptor opioid tersebut (Lefkowitz, 1998; Li *et al.*, 2000; Tanowitz dan von Zastrow 2002). *Down-regulation* ini akan menyebabkan penurunan jumlah reseptor yang mampu berikatan secara efektif dengan agonis. Akibatnya potensi agonis akan mengalami penurunan.

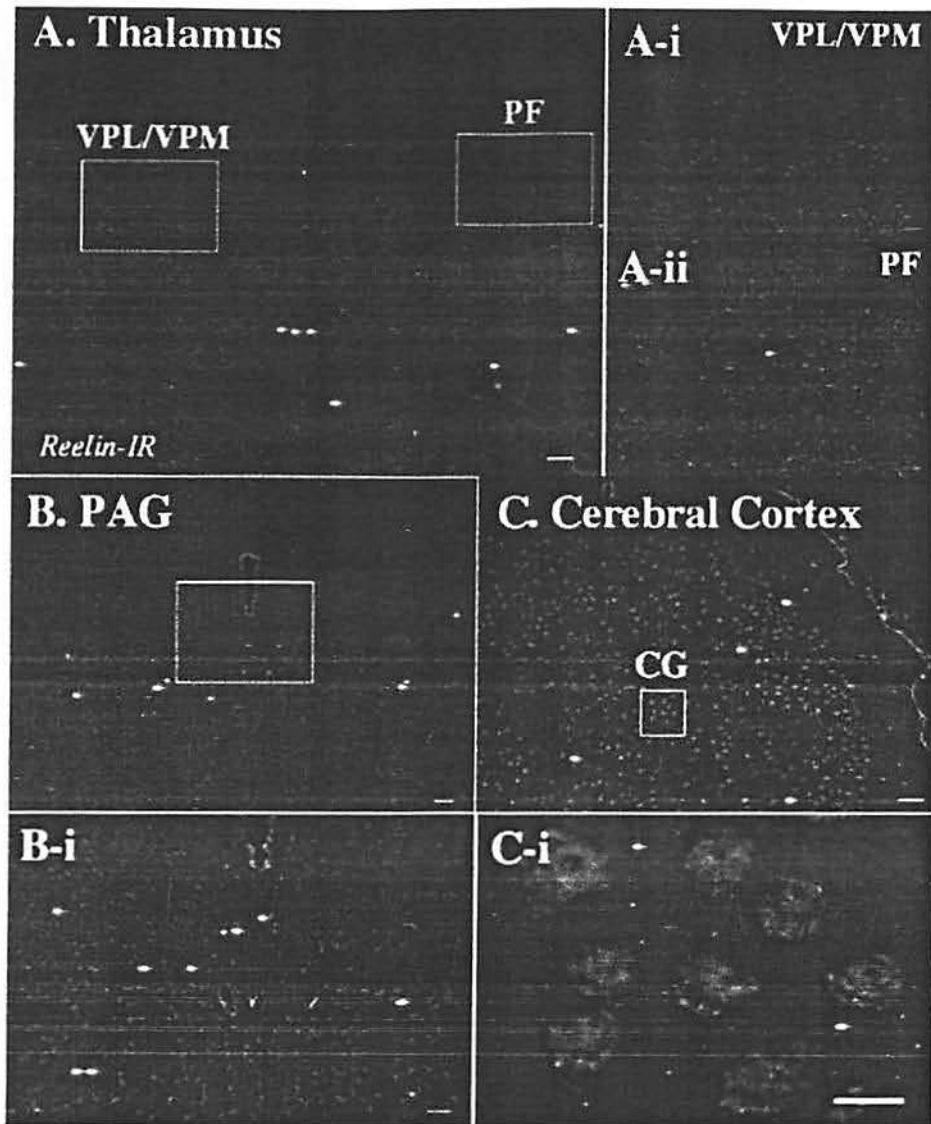
4.1. Ekspresi Reelin-Like Immunoreactivity (IR) Pada Corda Spinalis dan Beberapa Bagian di Otak.

Untuk menguji ekspresi dan distribusi *neuronal migrating factor* reelin di otak dan korda spinalis pada mencit dewasa, kami melakukan penelitian biologi molekuler dengan pedekatom imunohistokimia dengan menggunakan antibodi reelin. Reelin-like IR diekspresikan dengan densitas tinggi pada lamina 1-4 corda spinalis seperti nampak pada gambar 1. Distribusi reelin semakin berkurang pada lapisan bagian dalam. Lebih jauh, ekspresi reelin dengan densitas tinggi terdapat pada beberapa bagian otak mencit dewasa seperti kortek serebral, thalamus, dan

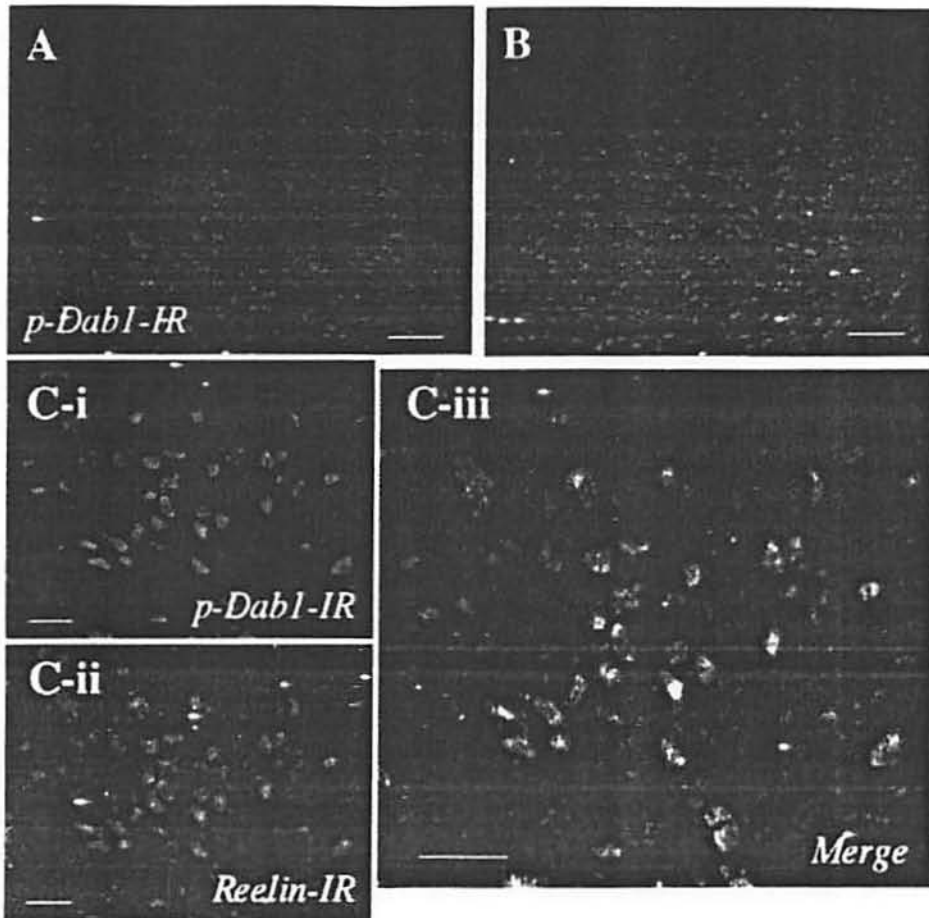
periaqueductal grey (PAG) seperti Nampak pada gambar 2. Pemberian morfin secara sub kutan seharu sekali selama 7 hari meningkatkan ekspresi reelin baik pada korda spinalis maupun beberapa bagian dalam otak seperti gambar 3.



Gambar 4.1 : Ekspresi reelin pada lumbar 5 korda spinalis mencit dewasa. Skala 100 μm and 50 μm .



Gambar 4.2. Ekspresi reelin pada thalamus (A), cortex (B) and PAG (C). Skala A and B: 100 μm ; C, A¹, A² and B¹: 50 μm and C²: 10 μm . VPL: ventroposterior lateral thalamus nuclei, VPM: ventroposterior medial thalamus nuclei, CG:cyngulate gyrus; PAG: periaqueductal gray.



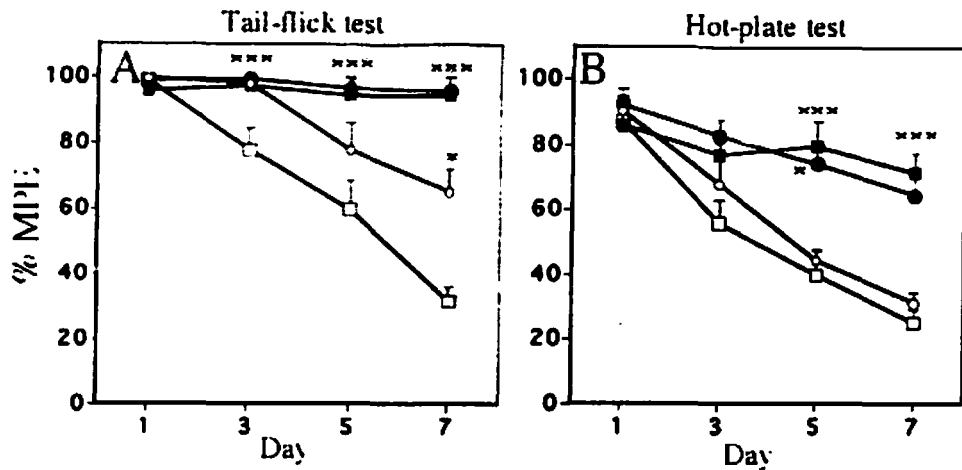
Gambar 4.3. Ekspresi reelin dan DAB-1 pada thalamus (A), cortex (B) and PAG (C). Skala A and B: 100 μ m.

4.2. Efek antibody monoclonal anti reelin pada pengembangan toleransi analgesia morfin

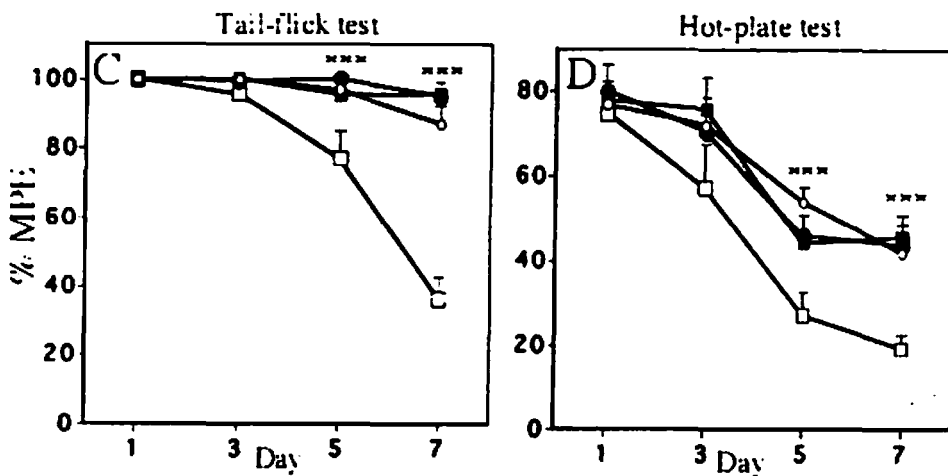
Selanjutnya dilakukan penelitian mengenai keterlibatan reelin respon antinosiseptif pada hewan coba mencit. Kami melakukan pengujian potensi monoclonal antibody reelin terhadap efek analgesik dengan *metode hot plate test* dan *tail flick test*. Injeksi tunggal monoklonal antibody secara icv tidak menghasilkan efek analgesia. Sementara praperlakuan dengan monoklonal antibody reelin dengan beberapa konsentrasi mulai dari 1:1000 sampai 1:100 dalam normal saline tidak merubah efek analgesik morfin yang diberikan secara subkutan (data tidak

ditunjukkan). Pemberian morfin secara subkutan pada dosis 10 mg/kg sekali sehari selama 7 hari akan menghasilkan penurunan efek analgesia morfin pada mencit. Ini menunjukkan adanya pengembangan toleransi analgesia seperti nampak pada gambar 4A-B. Dengan menggunakan metode *tail flick test* menunjukkan bahwa praperlakuan monoklonal antibodi reelin secara icv pada beberapa konsentrasi 1:100; 1:300 dan 1:1000 menghambat secara sempurna perkembangan toleransi analgesia ($F_{(1,14)}=320.1$, $p<0.0001$; $F_{(1,14)}=150.6$, $p<0.0001$ and $F_{(1,15)}=7.2$, $p<0.001$, Gambar 4A). Dengan metode pendekatan lain yaitu metode *hot plate test*, juga menunjukkan bahwa perkembangan toleransi analgesic yang disebabkan oleh pemberian morfin secara terus menerus secara efektif menghambat perkembangan toleransi analgesik morfin pada konsentrasi 1:100 dan 1:300, ($F_{(1,14)}=19.0$, $p<0.01$ and $F_{(1,14)}=9.8$, $p<0.01$, Gambar 4B), sementara pada konsentrasi rendah 1:1000 tidak menunjukkan adanya efek penghambatan ($F_{(1,15)}=0.9$, $p<0.36$).

Anti-reelin monoclonal antibody



Apolipoprotein E2



Gambar 4.4. Efek praperlakuan monoklonal antibodi reelin (A-B) atau inhibitor reelin yang bersifat kompetitif apolipoprotein E₂ (C,D) pada pengembangan toleransi yang diinduksi oleh morfin. Kelompok mencit mendapatkan induksi secara berulang monoklonal antibodi reelin (1:1000, ○ ; 1:300, ■ ; 1:100, ●), Apo E₂ (1:1000, ○ ; 1:500, ■ ; 1:100, ●) atau normal salin (□). Efek analgesik diukur dengan menggunakan metode *tail flick test* (A,C) dan *hot plate test* (B,D). Semua nilai ditunjukkan dengan rata-rata ± SEM dari 8-9 mencit. * $p < 0.05$ dan *** $p < 0.001$ vs pemberian morfin secara kronik.

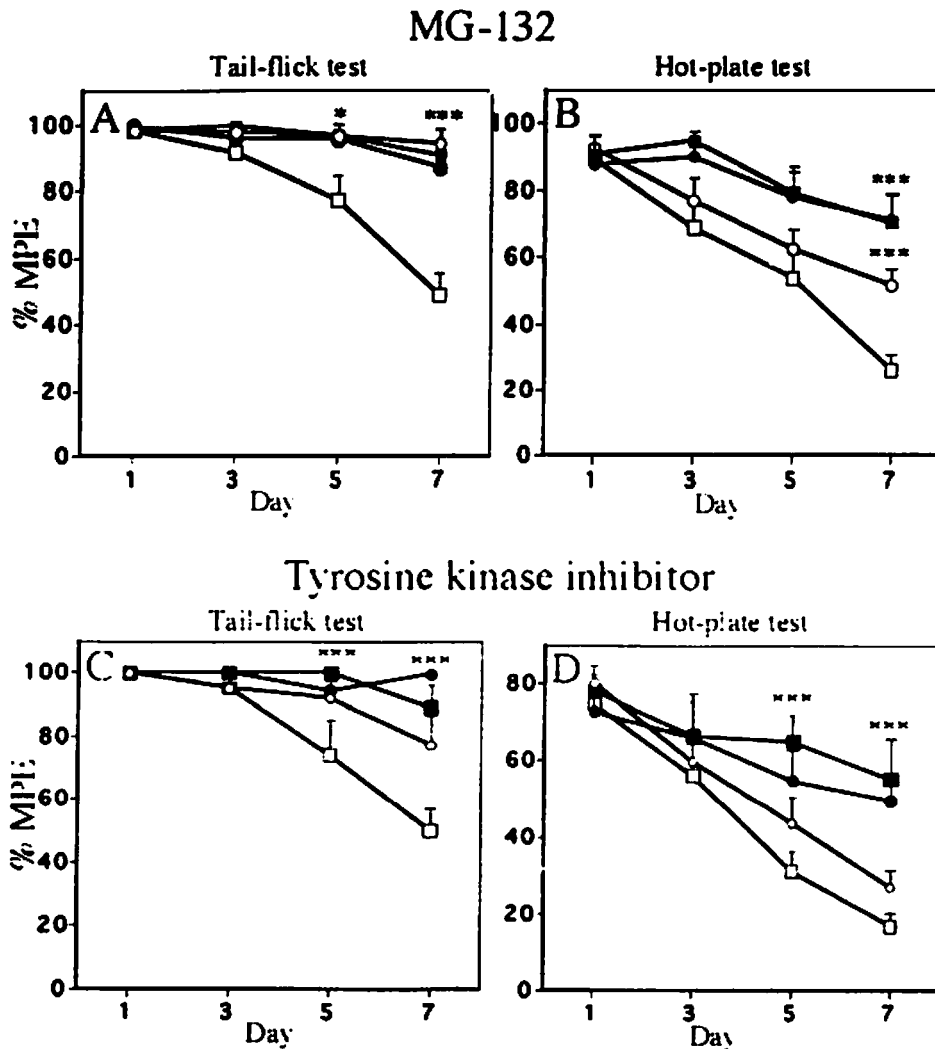
4.3. Efek inhibitor reelin yang bersifat kompetitif apolipoprotein E2 pada pengembangan toleransi analgesia yang diinduksi oleh morfin

Dengan menggunakan inhibitor yang bersifat kompetitif terhadap reelin yaitu rekombinan APO E2 pada berbagai konsentrasi 1:100; 1:300 and 1:1000 dalam normal saline menunjukkan adanya pengeblokan total terhadap pengembangan toleransi analgesia yang diinduksi dengan pemberian morfin dengan metode *tail flick test* ($F_{(1,14)}=82.3$, $p<0.0001$; $F_{(1,12)}=69.2$, $p<0.0001$ and $F_{(1,12)}=52.5$, $p<0.001$) seperti yang ditunjukkan dalam gambar 4C. Pada gambar 4D menunjukkan bahwa praperlakuan rekombinan Apo E2 pada konsentrasi 1:100; 1:300 and 1:1000 menghambat secara signifikan perkembangan toleransi analgesia yang diinduksi oleh morfin dengan metode *hot plate test* ($F_{(1,12)}=6.3$, $p<0.05$; $F_{(1,12)}=7.6$, $p<0.05$ and $F_{(1,12)}=4.9$, $p<0.05$), sementara pemberian injeksi tunggal tidak memberikan efek tersebut (data tidak ditunjukkan).

4.4. Pengaruh penghambat protein disabled-1 (Dab-1) MG 132 pada pengembangan toleransi analgesia yang diinduksi oleh morfin.

Selanjutnya adalah penelitian untuk mengetahui pengaruh praperlakuan penghambat protein MG 132 pada pengembangan toleransi yang diinduksi oleh morfin. Beberapa laporan penelitian menunjukkan bahwa DAP-1 berinteraksi dengan protein permukaan membran termasuk VLDL, reseptor Apo E, protein prekursor amyloid and protein menyerupai amyloid prekursor. Ikatan antara reelin pada reseptor Apo E2 menginduksi terjadinya fosforilasi tirosin pada DAB-1, yang akhirnya menyebabkan aktivitas signaling intraselular. Praperlakuan secara icv MG 132 pada dosis 1, 10 dan 20 nmol/mencit dapat mengblokir secara total penurunan respon analgesia morfin yang diberikan secara terus menerus selama 7 hari, seperti nampak pada

gambar 5A ($F_{(1,15)}=51.8, p<0.0001$; $F_{(1,14)}=41.6, p<0.0001$ and $F_{(1,15)}=22.5, p<0.01$). Dengan menggunakan *hot plate test*, pengembangan toleransi analgesia morfin juga secara signifikan dihambat dengan pemberian MG 132 pada dosis 1, 10 or 20 nmol/mencit ($F_{(1,15)}=4.6, p<0.05$; $F_{(1,14)}=21.0, p<0.001$ or $F_{(1,15)}=12.0, p<0.01$, Gambar 5B).

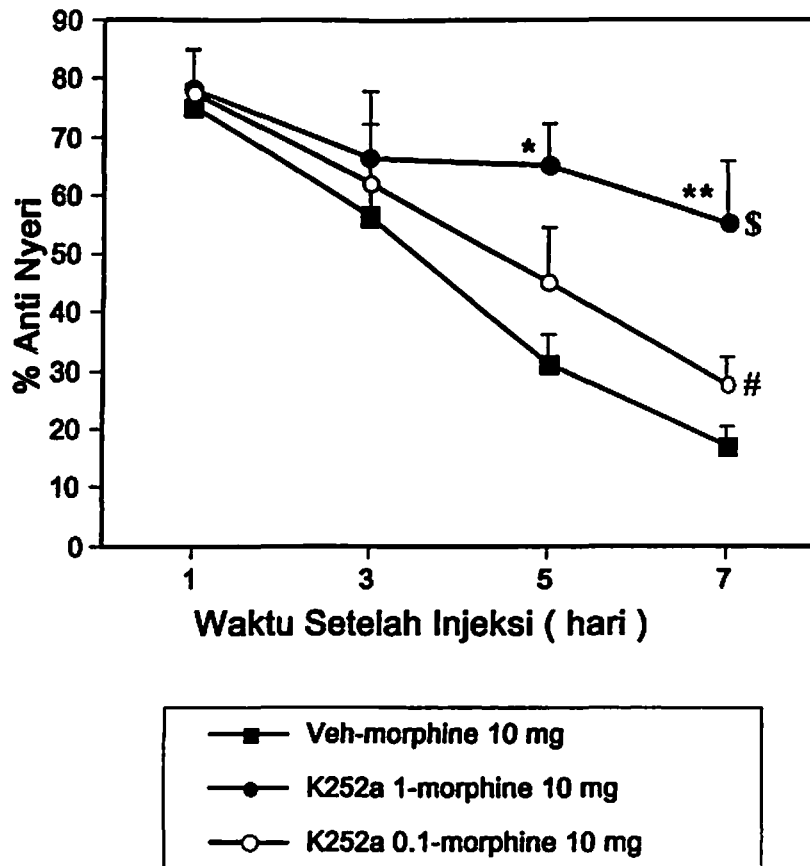


Gambar 4.5. Efek praperlakuan MG 132 (A,B) pada perkembangan toleransi analgesia morfin.

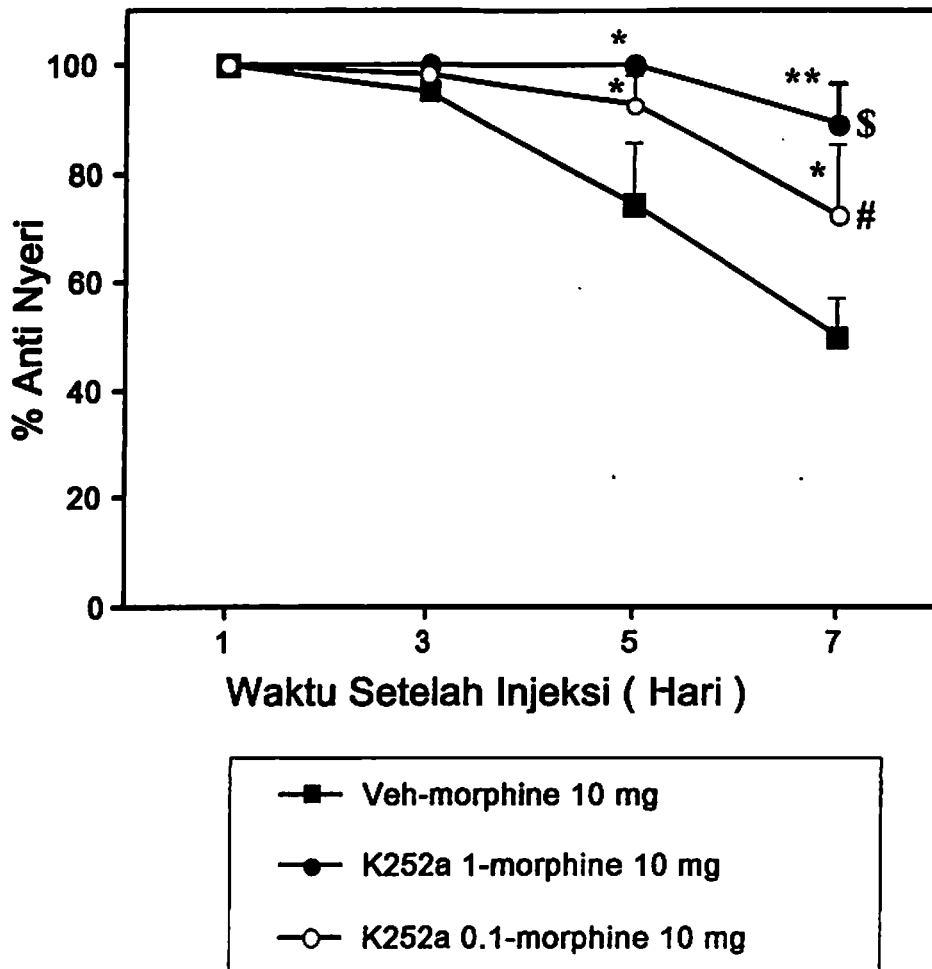
- Kelompok mencit diberikan MG 132 secara icv (1 nmol/mouse, O; 20 nmol/mouse, ■; 20 nmol/mouse, ●), K252a 1nmol/mouse (■), genistein (1 nmol/mouse, O; 1:100, ●) or normal saline (□). Antinosiseptif dievaluasi dengan tail flick test (A) dan hot plate test (B). Masing-masing nilai menggambarkan rata-rata \pm SEM dari 8-9 ekor mencit. * $p<0.05$ dan *** $p<0.001$ vs pemberian morfin pada dosis 10 mg secara kronik.

4.5 Efek inhibitor tirosin kinase K252a dan genistein pada pengembangan toleransi analgesia morfin

Pada penelitian ini dilakukan upaya untuk mendapatkan senyawa aktif yang dapat menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin kronik dengan menggunakan tirosin kinase inhibitor seperti K252a dan genistein. Seperti terlihat pada gambar 6 dengan data *hot plate test*, praperlakuan K252a secara icv pada dosis 0.1 nmol/mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,12)}=1.57$; $p=0.24$). Sementara pemberian K252a secara icv pada dosis 1 nmol/mencit dapat menghambat secara bermakna terjadinya pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh morfin ($F_{(1,14)}=6.53$; $p=0.02$). Penghambatan mulai terjadi pada hari ke 5 setelah pemberian K252a. Hal yang sama terjadi pada pengamatan dengan metode *tail flick test* seperti terlihat pada gambar 7, dimana kelompok yang mendapatkan K252a secara icv pada dosis 0.1 nmol/mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menurunkan secara bermakna terjadinya toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh morfin ($F_{(1,12)}=3.35$; $p=0.09$). Sementara kelompok yang mendapatkan K252a pada dosis 1 nmol/mencit menunjukkan kemampuan penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh morfin ($F_{(1,14)}=15.24$; $p=0.002$). Ini menunjukkan bahwa K252a mampu menghambat terjadinya pengembangan toleransi yang ditimbulkan oleh morfin.



Gambar 4.6. Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *hot plate test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,12)} = 1.57$; $p=0.24$) dan \$ menunjukkan ($F_{(1,14)} = 6.53$; $p=0.02$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.



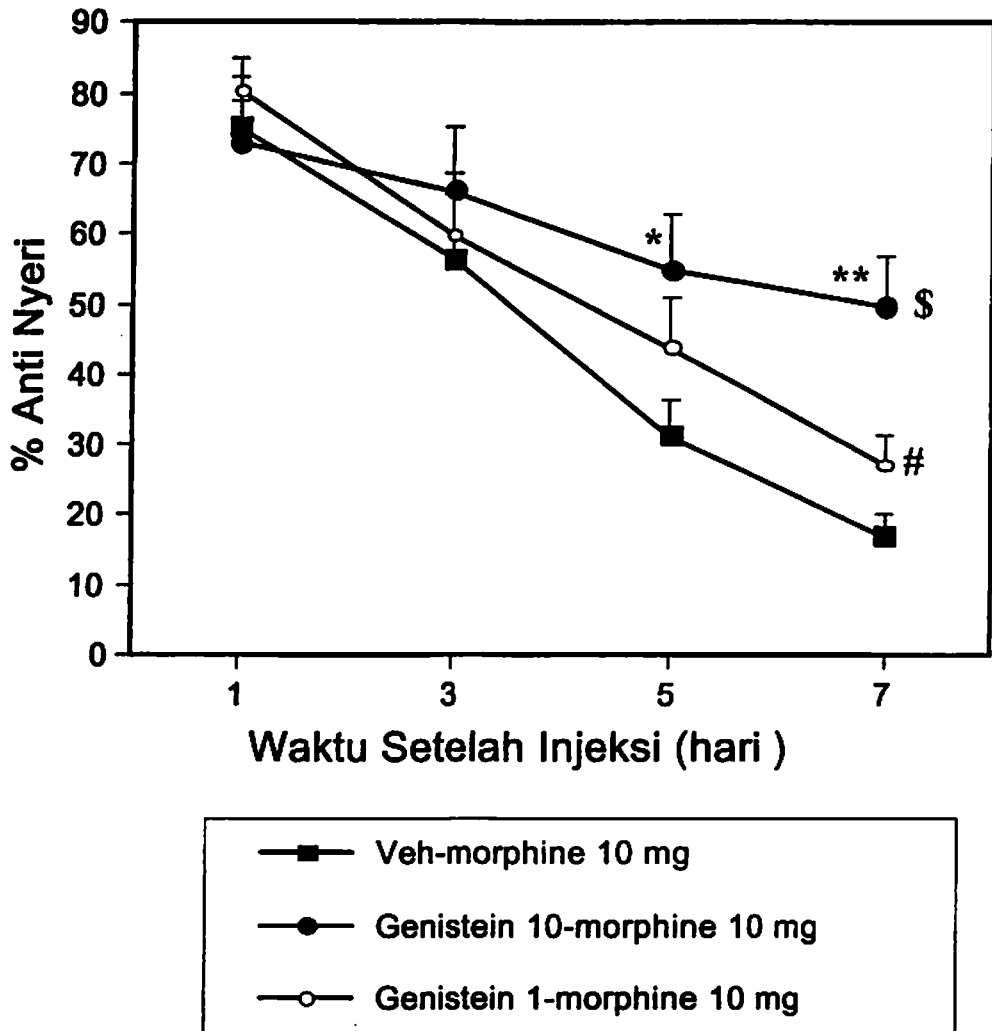
Gambar 4.7. Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *tail flick test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,12)} = 3.35$; $p=0.09$) dan \$ menunjukkan ($F_{(1,14)} = 15.24$; $p<0.002$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.

Penggunaan *tyrosine kinase inhibitor* yang lain yaitu genistein, juga menghasilkan data yang konsisten. Pengamatan dengan menggunakan *hot plate* menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 10 nmol/mencit secara icv sehari sekali selama 7 hari dapat menghambat secara signifikan terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,14)}=3.49$;

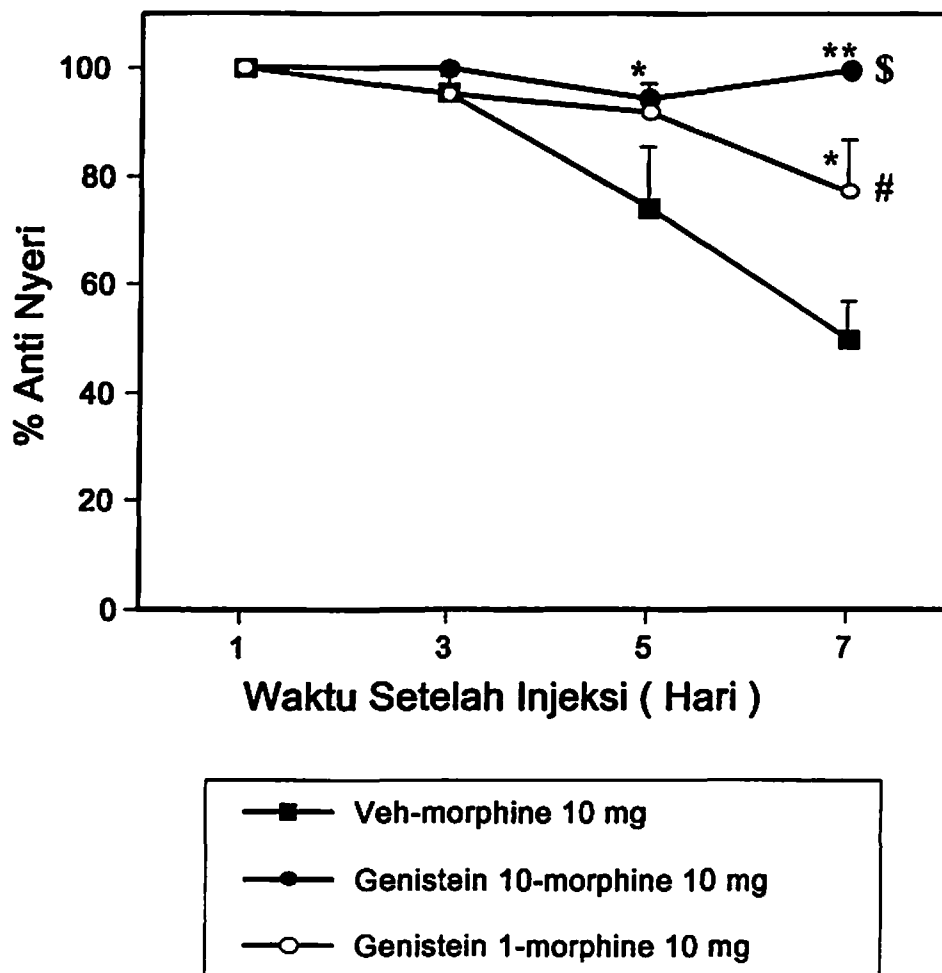
$p=0.02$), sementara pada dosis 1 nmol/mencit tidak memberikan aktivitas penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri ($F_{(1,15)}=1.58$; $p=0.23$) seperti terlihat pada gambar 8.

Pengamatan dengan menggunakan metode *tail flick test* seperti pada gambar 9 menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 1 dan 10 nmol/mencit dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,15)}=4.73$; $p=0.05$ untuk dosis 1 nmol dan $F_{(1,14)}=20.35$; $p=0.0005$ untuk dosis 10 nmol).

Bagaimanapun juga mekanisme penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri dengan praperlakuan tirosin kinase inhibitor belum jelas sampai saat ini. Beberapa pustaka menyebutkan bahwa pemberian morfin yang akan berikatan dengan reseptor opioid mu yang akan mengaktifkan *G-protein coupled-receptor*. Signal ini akan diteruskan untuk memberikan efek farmakologi seperti anti nyeri, euphoria dan lokomotor. Setelah sel syaraf yang mempunyai reseptor opioid teraktifasi, sel tersebut juga akan melepaskan protein kecil yang dikenal sebagai *reelin* yang merupakan faktor *neuronal migrating protein*. Ikatan antara *reelin* dengan reseptornya, apolipoprotein A (Apo A) akan mengaktifkan tirosin kinase untuk menghasilkan respon sebagai mekanisme adaptasi (Rice and Curran, 2001; Ohshima *et al*, 2001; Bock *et al* 2004).



Gambar 4.8. Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *hot plate test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,15)} = 1.58$; $p=0.23$) dan s menunjukkan ($F_{(1,14)} = 3.49$; $p=0.02$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.



Gambar 4.9. Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *tail flick test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,15)} = 4.73$; $p=0.05$) dan $^{\$}$ menunjukkan ($F_{(1,14)} = 20.36$; $p=0.0005$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.

4.6 Efek inhibitor protein pengantar brefeldin A pada pengembangan toleransi analgesia morfin

Implikasi ikatan reelin pada reseptor Apo E2 menyebabkan aktivasi reelin signaling pathway.

Selanjutnya, proses ini akan mengaktifasi protein kecil yang terlibat dalam perkembangan adaptasi neuronal, termasuk neuronal short dan long term plasticity, down- dan up-regulation, serta tolerance. Informasi akan ditransport secara mengikuti jalur mikrotubul dan mencapai daerah inti. Pada penelitian ini, kami melakukan blockade pengantaran protein pada jalur tersebut dengan menggunakan brefeldin A. Hasil penelitian menunjukkan bahwa brefeldin A pada 1, 10 and 20 nmol/mencit dapat mengeblok secara sempurna penghantaran signal yang dibawa oleh protein tertentu ke daerah inti sel seperti Nampak pada gambar 4. 10 ($F_{(1,12)}=59.8$, $p<0.0001$; $F_{(1,12)}=180.1$, $p<0.001$ and $F_{(1,12)}=187.9$, $p<0.001$ untuk tail flick test or $F_{(1,12)}=6.6$, $p<0.03$; $F_{(1,12)}=13.1$, $p<0.005$ and $F_{(1,12)}=40.1$, $p<0.001$ untuk hot plate test).

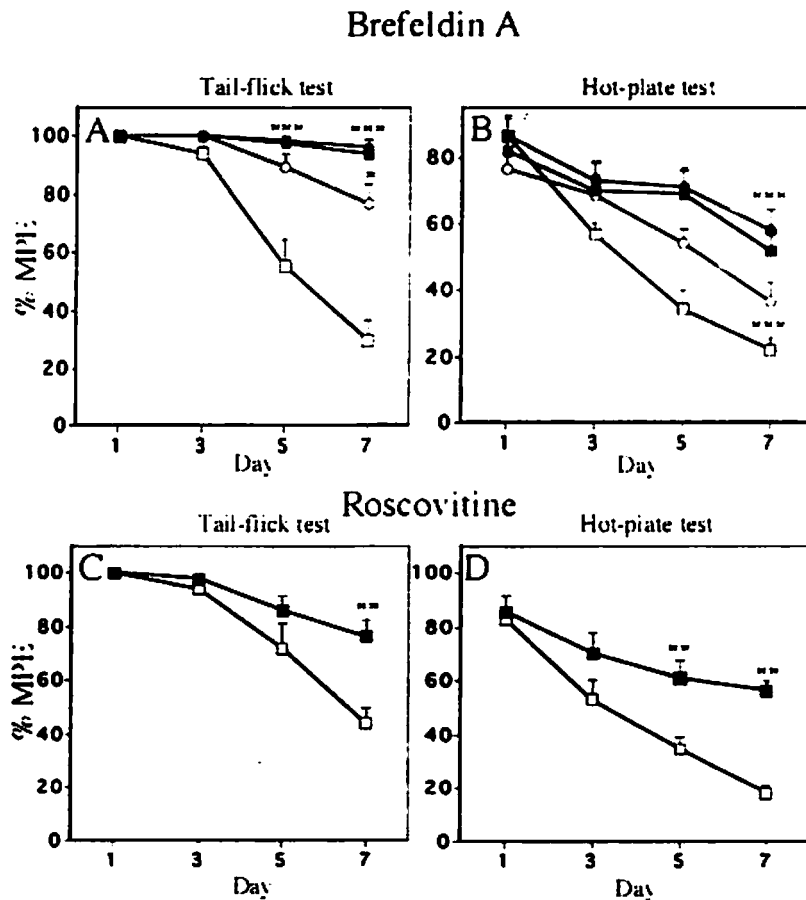


Figure 4.10. Efek praperlakuan inhibitor protein pengantar breveldin A (A,B) atau inhibitor Cdk5 roscovitine (C,D) pada pengembangan toleransi analgesia morfin. Kelompok mencit

diberikan breveldin A secara icv (0.1 nmol/mouse, ○; 1 nmol/mouse, ■; 10 nmol/mouse, ●), roscovitine at 30 nmol/mouse (■) atau perlakuan dengan saline-morphine (□). Efek analgesik diukur dengan menggunakan tail flick test (A,C) dan hot plate test (B,D). Masing-masing nilai berupa rata-rata ± SEM dari 8-9 ekor mencit. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs pemberian morfin pada dosis 10 mg secara kronik.

4.7 Efek inhibitor Cdk5 roscovitine pada pengembangan toleransi analgesia morfin

Kami menguji lebih jauh interaksi potensial antara reelin dengan Cdk-5. Kami menggunakan pendekatan dan menguji kemampuan reelin untuk memodulasi fosforilasi Cdk5 endogen dan data kami menunjukkan bahwa aktivasi Cdk5 akibat pemberian morfin berulang dapat diturunkan secara signifikan dengan pemberian praperlakuan roscovitine pada 30 nmol/mencit secara icv ($F_{(1,15)}=6.3$, $p < 0.03$ untuk tail flick test and $F_{(1,15)}=15.3$, $p < 0.001$ untuk hot plate test) seperti pada gambar 4.10.

Ikatan reelin dengan reseptor transmembran seperti reseptor ApoE2 atau VLDL menghasilkan aktivasi rangkaian signal intraselular yang mengakibatkan perubahan kemampuan neuron termasuk pengendalian perkembangan neuron atau mengendalikan sinaptogenesis (Arcangelo *et al*, 1995; Quattrocchi *et al*, 2002; Yip *et al*, 2004; Beffert *et al*, 2004). Kompleks reelin-reseptor Apo E₂ mengaktifkan fosforilasi pada domain PI/PTB pada Dab1. Tyrosine phosphorylated-Dab1 ditranspor sepanjang mikrotubuli dan kontak dengan Lis 1 pada daerah inti sel dan pusat kendali mikrotubulus (Ohshima *et al*, 2001; Luque, 2004; Sanada *et al*, 2004; Bock *et al*, 2004; Morimura *et al*, 2005). Interaksi yang sinergis dari tyrosine phosphorylated-Dab1 dengan Lis1 dan Nudel, kemudian teraktifkan melalui fosforilasi diperlukan untuk transmisi sinaptik, percabangan pada akson dan sinaptogenesis pada mencit dewasa. Fenomena ini yang

juga mendasari terjadinya toleransi analgesic.

Praperlakuan dengan berbagai variasi dosis antibody anti reelin menghasilkan penghambatan perkembangan toleransi analgesia yang diinduksi dengan pemberian morfin jangka panjang. Pada dasarnya, reelin endogen dibebaskan oleh syaraf glutamatergik dan GABAergik yang akan berikatan dengan reseptor Apo E2 atau VLDL untuk mengaktifkan *reelin signaling pathway* karena adanya . Pretreatment dengan monoklonal antibody anti reelin dapat meengikat reelin endogen, yang mengakibatkan terjadinya blokade aktivitas jalur *reeling signaling pathway* (Lacor *et al*, 2000; Caruncho *et al*, 2004; Fatemi *et al*, 2005). Rangsangan reseptor Apo E2 oleh reelin akan menyebabkan fosforilasi disabled-1 protein (Dab1). Morimura *et al* telah melaporkan bahwa reelin dan Dab-1 berada pada lokasi yang sama ketika mengalami aktivasi (Morimura *et al*, 2005).

Praperlakuan dengan menggunakan inhibitor protein Dab-1 MG 132 yang mempunyai ikatan kuat terhadap domain PI/PTB akan menghambat secara sempurna pengembangan toleransi analgesik akibat pemberian morfin secara berulang. Mekanisme yang untuk mengaktivasi Dab-1 adalah melalui fosforilasi domain non reseptor yaitu tirosin kinase. Beberapa laporan menunjukkan bahwa K252a atau genistein mempunyai target untuk fosforilasi Dab-1 pada lokasi ini. Pretreatment dengan K252a atau genistein dapat mengeblok secara total pengembangan toleransi analgesik morfin. Kelompok peneliti lain telah melaporkan bahwa inhibitor protein penghantar breveldin A mempunyai kapasitas sebagai penghambat jalur hantaran informasi dari Dab-1 yang teraktivasi. Pada penelitian ini, praperlakuan dengan breveldin A menghambat secara signifikan pengembangan toleransi analgesik akibat pemberian morfin berulang. Cdk5 dan protein p35 diduga mempunyai peran dalam jalur *reelin signaling pathway*. Cdk5 terdiri dari lobe besar yang mengandung C-terminal α -helix dan lekukan sebagai

tempat untuk aktivasi, sedangkan lobe kecil mengandung a N-terminal α -helix dan lekukan yang banyak mengandung glisin. Pemberian inhibitor selektif Cdk5 roscovitine menghambat secara signifikan perkembangan toleransi analgesia morfin (Garcia *et al*, 2004; Kuvbachieva *et al*, 2004; Mapelli, 2005).

Secara keseluruhan data kami menunjukkan bahwa protein yang terlibat dalam reelin signaling pathway mempunyai peran dalam perkembangan toleransi analgesia yang diinduksi dengan pemberian morfin berulang. Pemberian senyawa yang mampu menghambat aktivasi jalur tersebut akan mencegah terjadi perkembangan toleransi analgesia morfin.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Reelin terekspresikan dengan densitas tinggi pada korda spinalis dan beberapa bagian otak yang bertanggung jawab terhadap ekspresi nyeri.
2. Jalur *neuronal migrating factor* mempunyai peran besar dalam perkembangan toleransi analgesik akibat induksi morfin pada dosis 10 mg/kg sehari sekali selama 7 hari.
3. Pemberian antibodi pengeblok aktivitas jalur *neuronal migrating factor* seperti monoklonal antibodi reelin dan receptor ApoE2 dapat menghambat secara signifikan perkembangan toleransi analgesia.
4. Pemberian senyawa-senyawa yang menghambat jalur *neuronal migrating factor* seperti antibodi reelin, antibodi DAP-1, K252a, genistein, breveldin A dan roscovitine dapat menghambat secara sempurna perkembangan toleransi analgesia yang diinduksi pemberian morfin secara berulang.

DAFTAR PUSTAKA

- Beffert U, Weeber EJ, Morfini G, Ko J, Brady ST, Tsai LH, Sweatt JD, Herz J (2004) Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signal cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J. Neurosci.* 24: 1897-1906.
- Bock HH, Jossin Y, May P, Berger O, Herz J (2004) Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteosomal degradation of the neuronal adaptor protein disabled-1, *J. Biol. Chem.* 279: 33471-33479.
- Borrel V, Rio JAD, Alcantara S, Derer M, Martinez A, D'Arcangelo G, Nakajima K, Mikoshiba K, Derer P, Curran T, Soriano E (1999) Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J. Neurosci.* 19: 1345-1358.
- Bowsher, D. (1991) Neurogenic pain syndromes and their management, *Br. Med. Bull.* 47: 644-666.
- Caruncho HJ, Dopeso-reyes IG, Loza MI, Rodriguez MA (2004) GABA reelin, and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Critical Rev. Neurobiol.* 16: 25-32.
- Clark, R.W., Harris, J. (2004) The organization of motor responses to noxious stimuli, *Brain Res. Rev.* 46: 163-172.
- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24: 471-479.
- D'Arcangelo G, Miao G, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374: 719-723.
- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 1997: 23-31.

- Djoughri, L., Lawson, S.N. (2004) Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals, *Brain Res. Rev.* 46: 131-145.
- Dong E, Caruncho H, Liu WS, Smalheiser NR, Grayson DR, Costa E, Guidotti A (2003) A reelin-integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptonerosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100: 5479-5484.
- Fatemi SH, Stary JM, Earle JA, Agaghi-Niknam M, Eagan E (2005) GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorder as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and reelin proteins in cerebellum. *Schizophrenia Res.* 72: 109-122
- Garry, E.M., Jones, E., Fleetwood-Walker, S.M.(2004) Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals, *Brain Res. Rev.* 46: 216-224.
- Goffinet AM (1984) Event governing organization of postmigratory neurons: study on brain development in normal and reeler mice. *Brain res.* 319: 261-296
- Goffinet AM (1995) A real gene for reeler. *Nature* 374: 675-677.
- Goffinet AM (1997) Unscrambling a disabled brain. *Nature* 386: 668-669.
- Goffinet AM, So KF, Yamamoto M, Edwards M, Caviness V jr (1984) Architectonic and hodological organization of the cerebellum in reeler mutant mice. *Brain Res.* 318:263-276
- Handwerker, H.O., Anton, F., Reeh, P.W. (1987) Discharge patterns of different cutaneous nerve fibres from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation, *Exp. Brain Res.* 65: 493-504.
- Harden, R.N. (2005) Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis, and treatment, *The Neurologist* 11: 111-122.
- Harden, R.N., (2000) A clinical approach to complex regional pain syndrome, *Clin. J. Pain* 16: S26-S32.

- Hartfuss E, Foster E, Bock HH, Hack MA, Leprince P, Luque JM, Herz J, Frostcher M, Gotz M (2003) Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130: 4597-4608.
- Howell BW, Lanier LM, Frank R, Gertler FB, Cooper JA (1999) The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signal of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5179-5188.
- Ji Y, Pang PT, Feng L, Lu B (2005) Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 8: 164-172.
- Jossin Y, Goffinet AM (2001) Reelin does not directly influence axonal growth. *J. Neurosci.* 21: RC 183, 1-4.
- Kahn L, Alonso G, Normand E, Manzoni OJ (2005) Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 21: 493-500
- Khotib, J., Narita, M., Suzuki, M., Yajima, Y. and Suzuki, T. (2004) Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of μ - and δ -opioid receptor functions after repeated stimulation of μ -opioid receptors. *Neuropharmacology* 46, 531-540.
- Kubasak MD, Brooks R, Chen S, Villeda SA, Phelps PE (2004) Developmental distribution of reelin-positive cells and their secreted product in the rodent spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 468: 165-178.
- Kuvbachieva A, Bestel AM, Tissir F, Mialoum I, Guimiot F, Ramoz N, Bourgeois F, Moalic JM, Goffinet AM, Simonneau M (2004) Identification of a novel brain-specific and reelin-regulated gene that encodes a protein colocalized with synapsin. *Eur. J. Neurosci.* 20: 603-610
- Lacor PN, Grayson DR, Auta J, Sugaya I, Costa E, Gidotti A (2000) Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is dependent on neurotransmitter regulation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 3556-3561.

- Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273: 18677-18680.
- Luque JM (2004) Integrin and the reelin-DAB1 pathway: a sticky affair? *Dev. Brain Res.* 152: 269-271.
- Mahley RW (1998) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
- Mapelli M, Massimiliano L, Crovace C, Seeliger MA, Tsai LH, Meijer L, Musacchio A (2005) Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitor. *J. Med Chem.* 48: 671-679.
- Morante-Oria J, Carleton A, Ortino B, Kremer EJ, Fairen A, Lledo PM (2003) Subpallidal origin of a population of projecting pioneer neurons during corticogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100:12468-12473.
- Morimura T, Hattori M, Ogawa M, Mikoshiba K (2005) Disabled-1 regulates the intracellular trafficking of reelin receptor. *J. Biol. Chem.* In Press.
- Morris, R., Cheunsuang, O., Stewart, A., Maxwell, D. (2004) Spinal dorsal horn neuron targets for nociceptive primary afferents: do single neuron morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the level, *Brain Res. Rev.* 46: 173-190.
- Ohshima T, Ogawa M, Veerana, Hirasawa M, Longenecker G, Ishiguro K, Pant HC, Brady RO, Kulkarni AB, Mikoshiba K (2001) Synergic contributions of cyclin-dependent kinase 5/p35 and reelin/Dab-1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98: 2764-2769.
- Perez-garcia CG, Tissir F, Goffinet AM, Meyer G (2004) Reelin receptor in developing laminated brain structures of mouse and human. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2827-2832.
- Pramatarova A, Ochalski PG, Chen K, Gropman A, Myers S, Min KT, Howell BW (2003) Nck2 interacts with tyrosine-phosphorylated disabled 1 and redistributes in reelin-stimulated neurons. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7210-7221.

- Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafre SA, D'Arcangelo G, Farece MG, Keller F (2002) Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 277: 303-309.
- Rice DS, Curran T (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development, *Ann. Rev. Neurosci.* 24: 1005-1039
- Rice DS, Sheldon M, D'Arcangelo G, Nakajima K, Goldowitz D, Curran T (1998) Disabled-1 acts downstream of reelin in a signaling pathway that control laminar organization in the mammalian brain. *Development* 125: 3719-3729.
- Sanada K, Gupta A, Tsai LH (2004) Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* 42: 197-211.
- Shakiryanova D, Tully A, Hewes RS, Deitcher DL, Levitan ES (2005) Activity-dependent liberation of synaptic neuropeptide vesicles. *Nat. Neurosci.* 8: 173-178.
- Sneddon, L.U. (2004) Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates, *Brain Res. Rev.* 46: 123-130
- Strittmater WJ, Rose AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease *Annu Rev. Neurosci.* 19: 53-77.
- Tanowitz, M., von Zastrow, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G Protein-coupled receptor to lysosomes, *J. Biol. Chem.* 277: 50219-502.22
- Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaël K, Van den Haute C, Moechars D van Leuven (2000) Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brain of transgenic mice *Am. J. pathol.* 150: 951-964.
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998) Internalization of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptor and amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem* 273: 33556-33560.
- Von Kroff, M., Dworkin, S.F., Le Resche, L. (1990) Graded chronic pain status: an

epidemiologic evaluation, *Pain* 40: 279-291.

von Zastrow, M. (2001) Role of endocytosis in signaling and regulation of G-protein-coupled receptors. *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 500-504.

Yip YP, Capriotti C, Magdaleno S, Benhayon D, Curran T, Nakajima K, Yip JW (2004) Components of the reelin signaling pathway are expressed in the spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 470: 210-219